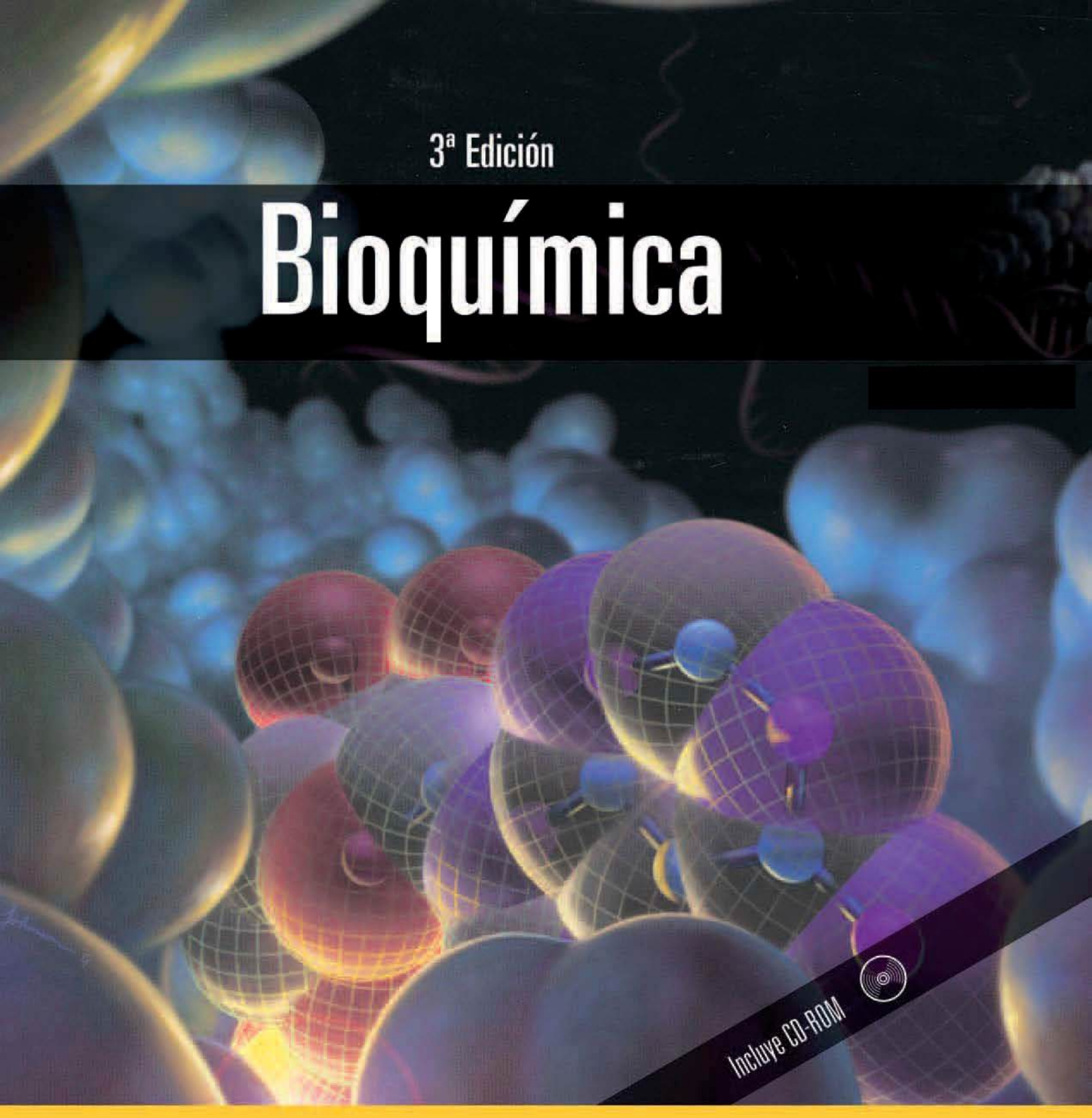
3ª Edición

Bioquímica



Christopher K. Mathews
Kensal E. Van Holde
Kevin G. Ahern

PEARSON
Addison Wesley

Bioquímica

TERCERA EDICIÓN

Christopher K. Mathews
OREGON STATE UNIVERSITY

K. E. van Holde
OREGON STATE UNIVERSITY

Kevin G. Ahern
OREGON STATE UNIVERSITY

Traducción

José Manuel González de Buitrago
Catedrático de Bioquímica de Escuela Universitaria
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Salamanca

Jefe de Sección de Bioquímica
Servicio de Bioquímica
Hospital Universitario de Salamanca

booksmedicos.org

Addison Wesley

Madrid • México • Santafé de Bogotá • Buenos Aires • Caracas • Lima • Montevideo
San Juan • San José • Santiago • São Paulo • Reading, Massachusetts • Harlow, England

Datos de catalogación bibliográfica

MATHEWS, C. K.; VAN HOLDE, K. E.; AHERN, K. G.
BIOQUÍMICA

PEARSON EDUCACIÓN, S. A., Madrid, 2002

ISBN: 978-84-832-2694-0
Materia: Bioquímica, 577

Formato: 195 × 270 Páginas: 1.368

Todos los derechos reservados.
No está permitida la reproducción total o parcial de esta obra
ni su tratamiento o transmisión por cualquier medio o método
sin autorización escrita de la Editorial.

DERECHOS RESERVADOS
© 2002 respecto a la primera edición en español por:
PEARSON EDUCACIÓN, S. A.
Núñez de Balboa, 120
28006 Madrid

MATHEWS, C. K.; VAN HOLDE, K. E.; AHERN, K. G.
BIOQUÍMICA
ISBN: 84-7829-053-2
Depósito Legal: M-
PRENTICE HALL es un sello editorial de PEARSON EDUCACIÓN

Traducido de:
Biochemistry. Third edition.
Copyright © 2002, por Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.
ISBN: **0-8053-3066-6**

Edición en español:

Equipo editorial:
Editora: Isabel Capella
Técnico editorial: Sonia Ayerra

Equipo de producción:
Director: José A. Clares
Técnico:

Equipo de diseño: Mario Guindel, Lía Sáenz y Begoña Pérez

Composición: COPIBOOK, S. L.

Impreso por:

IMPRESO EN ESPAÑA - PRINTED IN SPAIN



Este libro ha sido impreso con papel y tintas ecológicos

Acerca de los autores

CHRISTOPHER K. MATHEWS es Catedrático Distinguido y Jefe del Departamento de Bioquímica y Biofísica de la Universidad del Estado de Oregón. Posee un B.A. del Reed College (1958) y un Ph.D. de la Universidad de Washington (1962). Ha trabajado en los claustros de las Universidades de Yale y de Arizona antes de aceptar su posición actual. Su principal campo de interés en la investigación es la coordinación entre la biosíntesis de los precursores del DNA y la replicación del DNA. El Dr. Mathews fue becario Eleanor Roosevelt International Cancer en el Instituto Karolinska de Estocolmo de 1984 a 1985, y Catedrático Invitado Tage Erlander en la Universidad de Estocolmo de 1994-1995. Ha publicado más de 150 artículos científicos sobre virología molecular, regulación metabólica, enzimología de nucleótidos y genética bioquímica. Es autor de *Bacteriophage Biochemistry* (1971) y codirector de *Bacteriphage T4* (1983) y de *Structural and Organizational Aspects of Metabolic Regulation* (1990). Su experiencia docente comprende cursos de bioquímica de pregrado y postgrado en la Facultad de Medicina.

K. E. VAN HOLDE es Catedrático Emérito Distinguido de Biofísica y Bioquímica, en la Universidad del Estado de Oregón. Obtuvo su B.A. (1949) y Ph.D. (1952) en la Universidad de Winsconsin. Durante muchos años, el interés investigador principal del Dr. Van Holde ha sido la estructura de la cromatina y este trabajo le valió, en 1977, la concesión de una Cátedra de Investigación de la Sociedad Americana del Cáncer. Ha trabajado en la Universidad del Estado de Oregón desde 1967 y en 1988 fue nombrado Catedrático Distinguido. Es miembro de la Academia Nacional de Ciencias y ha recibido las becas Guggenheim, NSF y EMBO. Es autor de más de 200 artículos científicos y de tres libros, además de éste: *Physical Biochemistry* (1971,1985), *Chromatin* (1988) y *Principles of Physical Biochemistry* (1998). Ha sido también codirector de *The Origins of Life and Evolution* (1981). Su experiencia docente comprende cursos de química, bioquímica y biofísica de pregrado y de postgrado, así como el Curso de Fisiología y Biología Molecular en el Laboratorio de Biología Marina de Woods Hole.

KEVIN G. AHERN es profesor Ayudante del Departamento de Bioquímica y Biofísica de la Universidad del Estado de Oregón. Obtuvo sus títulos de B.S. (1976) y M.S. (1981) en la Universidad del Estado de Oklahoma y su Ph.D. (1986) en la Universidad del Estado de Oregón. Entre sus temas de interés se encuentran la utilización de los ordenadores en la investigación científica y la en-

señanza. El Dr. Ahern pertenece al claustro de la Universidad del Estado de Oregón donde ha sido promotor de los cursos a través de la red para la enseñanza de la bioquímica. Es redactor colaborador de la revista *Science*, columnista de *Genetic Engineering News* y escritor libre de numerosas publicaciones online e impresas. El Dr. Ahern ha ejercido como director, desde 1987 a 1998, de *Biotechnology Software and Internet Journal* y es el fundador de Da Vinci Press Ink (www.davincipress.com), una empresa consultora de software. Ha dirigido la edición de dos libros *Biotechnology Software Reports-Computer Applications for Molecular Biologist* y *The Biotechnology Software Directory, A Buyer´s Guide*. La experiencia docente del Dr. Ahern comprende cursos de bioquímica de pregrado y postgrado.

Prefacio

La planificación de la tercera edición de un libro de texto de Bioquímica que ha sido bien recibido parecería un trabajo sencillo. Ciertamente, son necesarias las mejoras: las sugeridas por los que utilizan el texto, así como los cambios esenciales identificados por los autores. A pesar del mayor cuidado han aparecido los molestos errores inevitables que deben corregirse. Pero seguramente, si el texto ha funcionado bien, la tarea principal debe ser actualizarlo. Así pensábamos hasta que comenzamos a contemplar la expansión explosiva del conocimiento bioquímico que se ha producido en los pocos años transcurridos desde la aparición de la segunda edición de *Bioquímica*. ¿Cómo puede disponerse esta información nueva sin dar lugar a un libro de texto con una información tan densa que no puedan utilizarlo los estudiantes, la mayoría de los cuales estudian el primer año de bioquímica?

Estaba claro que se requería un enfoque cualitativamente diferente. Sin duda, este enfoque debe utilizar la potencia del ordenador para acceder y organizar la enorme información sobre genómica, proteómica, secuencias génicas y estructuras proteicas presentes en las bases de datos de expansión continua. Es crucial que el texto forme un todo sin costuras con los recursos de información auxiliar y que estos recursos estén estrechamente conectados con el texto. Además, estos recursos deben diseñarse y producirse en colaboración con alguien que no sólo tenga la destreza técnica sino también la experiencia de la enseñanza de la bioquímica, de forma ideal con las ediciones previas de nuestro libro de texto. En otras palabras, para conseguir nuestros objetivos era esencial reclutar a un tercer autor.

Los dos que participamos en las dos primeras ediciones, esto es, los Drs. Van Holde y Mathews, fuimos muy afortunados de poder incorporar al Dr. Kevin Ahern como tercer autor. El Dr. Ahern tiene una experiencia amplia y profunda de la bioinformática, pulida por la experiencia como Director de la revista *Biotechnology Software & Internet Journal* y como redactor colaborador de *Science* con responsabilidad concreta de las aplicaciones de los ordenadores en las ciencias biológicas. De igual importancia, el Dr. Ahern enseña bioquímica en nuestro departamento utilizando este libro de texto.

La participación del Dr. Ahern hace que la nueva edición de *Bioquímica* sea una nueva empresa, aunque el libro se parezca a las ediciones anteriores en lo esencial. Pensamos que el texto tiene dos funciones. Como en el pasado, hemos tratado de crear un texto que pueda leerse y utilizarse, para guiar a los estu-

diantes a través de un curso de introducción a la bioquímica, que es normal, aunque no frecuente, que tenga un año de duración. Pero, en combinación con la Guía Electrónica de Estudio diseñada por el Dr. Ahern, el texto se ha convertido en una puerta de entrada al mundo enorme y en continua evolución que es la bioquímica. Nuestro objetivo ha sido crear un recurso informático que ayudará y guiará a los estudiantes mucho después de que hayan completado su primer curso de bioquímica.

RECURSOS INFORMÁTICOS

La Guía Electrónica de Estudio debe cumplir dos fines principales. (1) Debe potenciar la capacidad de los estudiantes para entender la bioquímica, y (2) debe proporcionar acceso a un cuerpo de conocimiento mucho mayor del que puede cubrirse en las páginas impresas del libro de texto. Para conseguir la mayor accesibilidad y facilidad de uso, todo el material se da en un formato hipertexto corriente (HTML) y un lenguaje de programación (Java) al que se puede acceder fácilmente a través de los navegadores comunes como Navigator de Netscape o Internet Explorer de Microsoft, virtualmente en cualquier ordenador personal. Nuestra Guía Electrónica de Estudio tiene dos partes: una almacenada en un medio fijo, esto es el CD-ROM que acompaña a este texto, y la otra en uno dinámico, la página Web de Pearson Educación en www.librosite.net/mathews.

El CD-ROM Guía Electrónica de Estudio que acompaña a cada copia de este texto contiene las secciones Visión General, Conceptos, y Terminología. La sección Visión General sigue la organización del capítulo del texto y contiene hipervínculos que conducen al estudiante con un toque de botón a otros puntos de información relevante, como las estructuras químicas y las reacciones enzimáticas. La sección de Conceptos proporciona resúmenes cortos con hipervínculos de las ideas importantes de cada capítulo. La sección de Terminología contiene resúmenes y definiciones de todos los términos importantes de cada capítulo.

Nuestra página Web incorpora todas las características esenciales tanto del CD de los estudiantes como del de los profesores, así como otros recursos informáticos de interés para estudiantes y profesores.

EVOLUCIÓN DEL TEXTO

En el texto, la organización global permanece igual, esto es, comenzamos con la estructura y el mecanismo, seguido del metabolismo intermediario y luego el procesamiento de la información biológica. Con todo, se han realizado unos cuantos cambios significativos. El Capítulo 3 (Bioenergética) se ha acortado transfiriendo una sección (El ATP como moneda de intercambio energético) al Capítulo 12 (Introducción al Metabolismo). Este cambio elimina alguna redundancia y sitúa esta parte en una yuxtaposición adecuada con el metabolismo.

Muchas secciones se crearon o escribieron de nuevo para ampliar conceptos y descubrimientos nuevos. Entre los ejemplos, se encuentran los tratamientos ampliados del plegado proteico y las proteínas chaperonas (Capítulo 6), los motores moleculares (Capítulo 8), las estructuras de los complejos respiratorios mitocondriales (Capítulo 15), las especies reactivas de oxígeno y las enfermedades humanas (Capítulo 15), los conocimientos bioquímicos de la obesidad (Capítulo 18), el ácido fólico y el corazón (Capítulo 20), los neurotransmisores y la psicofarmacología (Capítulo 21), las nuevas rutas de transducción de señal (Capítulo 23), las estructuras y mecanismos de las DNA polimerasas (Capítulo

24), los mecanismos de recombinación genética (Capítulo 26) y la expresión de los genes en los eucariotas (Capítulo 28). Este material nuevo se ha plegado en el formato que ha funcionado bien en las ediciones anteriores, que es una introducción precoz de la estructura de los ácidos nucleicos (para clarificar las presentaciones de la estructura y función proteicas), un énfasis en las raíces experimentales de la bioquímica, un énfasis continuo en las relaciones energéticas en la bioquímica, y un enfoque a pasos de las rutas metabólicas complejas (introducción, seguida de una visión general y luego, de los detalles y reiteración de la visión general y el tratamiento de la regulación).

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA

Dado que los métodos que utilizan los bioquímicos están evolucionando continuamente, en cada edición añadimos técnicas nuevas en cada sección y eliminamos las que dejan de utilizarse. En la Tercera Edición hemos añadido una nueva sección de Herramientas, "Métodos para detectar y analizar las interacciones Proteína-Proteína". Hemos eliminado la sección sobre secuenciación de Maxam y Gilbert (aunque esta técnica de importancia histórica se esquematizará cuando presentemos las técnicas de cartografiado de tránscritos en el Capítulo 26), y también hemos eliminado una sección que describe la identificación de los N- y C-terminales de los polipéptidos. La sección sobre el análisis de la secuencia proteica (Capítulo 5) indica aún cómo se identifican los N-terminales como parte de los protocolos de secuenciación automática.

Hemos ampliado otras secciones de Herramientas para incluir variantes nuevas de técnicas más antiguas, como la microscopía confocal de barrido láser (Capítulo 1) y la síntesis de conjuntos de péptidos combinatorios (Capítulo 5). La sección sobre espectrometría de masas (Capítulo 6) también se ha ampliado para reflejar la importancia creciente y la versatilidad de esta técnica.

PROBLEMAS AL FINAL DE LOS CAPÍTULOS

Los problemas cuantitativos y las preguntas de tipo discusión se encuentran entre los recursos de aprendizaje más valiosos de un texto, y los usuarios suelen pedir más problemas y respuestas completas. La mayor parte de los capítulos de la Tercera Edición tienen de dos a cuatro problemas nuevos cada uno, con respuestas breves a todos ellos al final del libro.

AGRADECIMIENTOS

Cada una de las tres ediciones de este libro nos ha encontrado trabajando con un equipo editorial y de producción totalmente diferente en Addison Wesley Longman. Hemos disfrutado en particular trabajando con este equipo. Su profesionalismo y dedicación al proyecto han hecho un placer trabajar con ellos y nos ha permitido escribir este texto, crear los recursos informáticos y ver completado el proyecto en, aproximadamente, un año menos del tiempo proyectado en principio. Dirigiendo el equipo estaba Ben Roberts, Editor de Química, que supervisó las fases editorial y de producción del trabajo. El entusiasmo continuo de Ben por el proyecto fue una fuerza motivadora poderosa. El Dr. John Murdzek, Editor de Desarrollo, fue un crítico perspicaz y persistente. John posee un Ph.D. en química, lo que le permitió contactar con nosotros como científico, y le ayudó a detectar errores y ambigüedades que ciertamente hubieran pasado inadvertidas a un editor menos formado en la ciencia contemporánea.

Claudia Herman, Publicista Asociada, ayudó de muchas formas a que avanzara el proyecto, incluyendo la concordancia de todos los revisores y asegurándose de que recibíamos las revisiones en el momento adecuado. Una vez que se envió el texto a producción, tuvimos el placer de trabajar con Lisa Weber, Editora de Producción. En su capacidad para enfrentarse a una miríada de detalles y coordinar todas las fases del proceso de producción, Lisa nos recordaba a un jugador de ajedrez que puede jugar veinte partidas simultáneamente y ganar todas ellas. Lisa tenía como ayudante a la Investigadora Fotográfica Roberta Spieckerman, que nos evitó una enorme cantidad de trabajo contactando con autores y propietarios de los derechos de reproducción de las numerosas figuras que reprodujimos o adaptamos de fuentes ya publicadas. Anita Wagner, nuestra correctora de pruebas, nos advirtió de muchos temas sustanciosos, así como de errores tipográficos, durante su lectura cuidadosa de las pruebas. Estamos agradecidos a muchos colegas, a los que agradecemos en los pies de figura correspondientes, que contactaron con los autores directamente para proporcionarles los gráficos moleculares y los dibujos. Agradecemos también a la editora de copias Mary Prescott, la única miembro del equipo que trabajó también en la Primera Edición de este texto. Gracias también a Lynn Armstrong y Charlotte Shane por la preparación del índice.

Un agradecimiento especial al artista Graham Johnson, que diseñó una ilustración para la cubierta notablemente bella y original y que, de manera brillante, transformó muchas de nuestras ideas esquemáticas en figuras atractivas e informativas. Gracias también a muchos bioquímicos, que se comprometieron con la editorial para revisar los primeros borradores de nuestros manuscritos. Tuvimos en cuenta todas sus sugerencias, aun aquéllas que no fuimos capaces de seguir.

Debemos dar las gracias de forma especial a dos revisores, Drs. Kimberley Waldrom (Regis College) y Robert Ludwig (Universidad de California, Santa Cruz), que leyeron todo el texto en la fase de corrección de pruebas, localizando errores y ambigüedades que habían pasado inadvertidas a todos los autores y revisores.

Los esfuerzos de Kevin Ahern para realizar la Guía Electrónica de Estudio dependieron en gran medida de la estudiante Jody Franke de la Universidad del Estado de Oregón, que le ayudó con los temas de enlaces y HTLM, de Heather Wycoff, que ayudó con los gráficos y Hamid Ghanadan, con información sobre los temas HTLM. Gracias a estas tres personas de parte de los autores.

Como siempre, nuestras esposas Kate Mathews, Barbara van Holde e Indira Rajagopal fueron nuestros principales valedores y críticos. El amor y el apoyo que constantemente nos han ofrecido fueron los elementos más importantes para llevar este proyecto a su finalización satisfactoria a tiempo.

CHRISTOPHER K. MATHEWS K.E. VAN HOLDE KEVIN G. AHERN

Revisores

REVISORES (TERCERA EDICIÓN)

Roger Acey, California State University, Long Beach
Hugh Akers, Lamar University
Charles Allen, University of Florida
James Allen, Arizona State University
Dean Appling, University of Texas, Austin
Roy Baker, University of Toronto
Steven Blanke, University of Houston
Linda Bloom, Arizona State University
Albert Bobst, University of Cincinnati
Rodney Boyer, Hope College
Alexander Brownie, SUNY Buffalo
Tom Buckley, University of Victoria, Canada
Jeffrey Cohlberg, California State University, Long Beach
Richard Drake, University of Arkansas for Medical Sciences
Patricia Draves, University of Central Arkansas
Kristin Eckert, Pennsylvania State University
Jeremy Evans, Washington State University
David Fahrney, Colorado State University
James Franzen, University of Pittsburgh
Jeffrey Hayes, University of Rochester
Colleen Jonsson, New Mexico State University
Thomas Jue, University of California, Davis
Jason Kahn, University of Maryland, College Park
Harvey Knull, University of North Dakota
Robert Kuchta, University of Colorado, Boulder
Robley Light, Florida State University
Dennis Lohr, Arizona State University
Robert Ludwig, University of California, Santa Cruz
Theo Macrides, RMIT University, Australia
Susan Martinis, University of Houston
Douglas McAbee, California State University, Long Beach
Graham Parslow, University of Melbourne, Australia
Mulchand Patel, SUNY Buffalo
Kevin Plaxco, University of California, Santa Barbara
Leigh Plesniak, University of San Diego
Linda Roberts, California State University, Sacramento
Andrew Robertson, University of Iowa
John Sadleir, University of Western Australia, Australia
Wilma Saffran, CUNY Queens College
Charles Samuel, University of California, Santa Barbara
Pearl Tsang, University of Cincinnati
Elizabeth Vierling, University of Arizona
Kimberley Waldron, Regis University
Leigh Ward, University of Queensland, Australia
Randy Weselake, University of Lethbridge, Canada
E. J. Wood, University of Leeds, England

REVISORES ESTUDIANTES (SEGUNDA EDICIÓN)

Dennis Ahern, State College, PA
Jasmeet Bajaj, University Park, PA
Ken Bradley, Santa Cruz, CA
Ann Brolly, Santa Cruz, CA
Jay Chaplin, Santa Cruz, CA
Kirk Egge, Stillwater, MN
Felicia Goodvum, Blacksburg, VA
Jeanette Harlow, Santa Cruz, CA
Mara Jeffress, Santa Cruz, CA
Tabinda Khan, Santa Cruz, CA
Scott Kiss, Spruce Grove, Alberta, Canada
Emile Le Blanc, Edmonton, Alberta, Canada
Jonathan Lo Cicero, Sherwood Park, Alberta, Canada
Mihir Mooi, University Park, PA
Sam Pejham, Los Gatos, CA
Keri Pomella, Eaton Park, FL
Arthur Roberson, Memphis, TN
Terrance Strobaugh, Jr., Altoona, PA
Tim Sturgeon, University Park, PA
Trevor Swartz, Santa Cruz, CA
Ruth Thatcher, Blacksburg, VA
Krista Watson, Edmonton, Alberta, Canada

ESTUDIANTES LICENCIADOS QUE REVISARON LOS PROBLEMAS (SEGUNDA EDICIÓN)

Wei Chen, Tucson, AZ
Brian Orendel, Tucson, AZ
Eric Peterson, Denver, CO
Ziaoquing You, Tucson, AZ

REVISORES (SEGUNDA EDICIÓN)

Genia S. Albrecht, Cornell University
Lisa T. Alty, Washington and Lee University
Lars Backman, University of Umeå, Sweden
Bruce R. Banks, University of North Carolina, Greensboro
Frank O. Brady, University of South Dakota, School of Medicine, Vermillion

Barbara Brennessel, Wheaton College
William A. Bridger, University of Alberta, Edmonton, Canada
Ronald Brosemer, Washington State University
Ray Brown, Wayne State University
Michael F. Bruist, Vassar College
Andrew Buchman, Pennsylvania State University
George E. Bunce, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg
Jim Chambers, University of Texas, San Antonio
Scott Champney, East Tennessee State University
Derek A. Chignell, Wheaton College
William Currier, University of Vermont
James Davenport, University of Tennessee, Memphis
Daniel Davison, University of Houston
Michael Dennis, Eastern Montana College
Ruth L. Dusenbery, Wayne State University
Lehman L. Ellis, University of New Orleans
Mary Lou Ernst-Fonberg, East Tennessee State University
Nancy Federspiel, University of Idaho
Gerald W. Feigenson, Cornell University
Blaise Frost, West Chester State University
Thomas E. Goyne, Valparaiso University
Ralph J. Henderson, Louisiana State University, School of Medicine, Shreveport
E. Clifford Herrmann, Loma Linda University
George Hoch, Emeritus, University of Rochester
Ching-hsien Huang, University of Virginia, School of Medicine
Richard Ikeda, Georgia Institute of Technology
Ralph A. Jacobson, California Polytechnic State University
Peter C. Kahn, Rutgers University
Teh-Hui Kao, Pennsylvania State University, University Park
Thomas A. Keevil, Southern Oregon State University
Marvin L. Kientz, Sonoma State University
George B. Kitto, University of Texas, Austin
James A. Knopp, North Carolina State University
Torsten Kristensen, University of Aarhus, Langelandsgate, Denmark
Rick Krueger, University of South Carolina, Spartanburg
Robert D. Kuchta, University of Colorado, Boulder
LeRoy R. Kuehl, University of Utah, Medical School
Franklin R. Leach, Oklahoma State University
Harold G. Martinson, University of California, Los Angeles
Celia Marshak, San Diego State University
Ronald W. McCune, Idaho State University
Kelly Meckling-Gill, University of Guelph, Ontario, Canada
Armando John Merola, Ohio State University, College of Medicine, Columbus
Julie T. Millard, Colby College
Richard Morgan, University of Alberta, Edmonton, Canada
Kim Kusk Mortensen, University of Aarhus, Langelandsgate, Denmark
Bradley B. Olwin, Purdue University
David H. Peyton, Portland State University
Robert L. Potter, University of South Florida
Roger Rice, Wye College, University of London, England
Joe M. Ross, Central State University
Alan H. Rowe, Norfolk State University
Dennis P. Ryan, Hofstra University
Robert Ryan, University of Alberta, Edmonton, Canada
Marvin Salin, Mississippi State University
Dorothy Elaine Schumm, Ohio State University
Thomas W. Sneider, Colorado State University
Hans Sperling-Petersen, University of Aarhus, Langelandsgate, Denmark
Thomas Squier, University of Kansas
Pamela C. Stacks, San Jose State University
Paul Stein, College of St. Scholastica
Rune Stjernholm, Tulane University, Medical Center
Bik-Kwoon Tye, Cornell University
Theodorus van Es, Rutgers University
Harry van Keulen, Cleveland State University
Charles J. Waechter, University of Kentucky, School of Medicine
Gary A. Weisman, University of Missouri, Columbia
Peter Wejksnora, University of Wisconsin, Milwaukee
Michael Wells, University of Arizona
William R. Widger, University of Houston
Ann Wood, University of Puget Sound
Les Wynston, California State University, Long Beach
Lee A. Young, Lincoln, MA
Daniel M. Ziegler, University of Texas, Austin

REVISORES (PRIMERA EDICIÓN)

Hugh Akers, Lamar University
David F. Albertini, Tufts University
Mark Alper, University of California, Berkeley
Dean R. Appling, University of Texas at Austin
Thomas O. Baldwin, Texas A&M University
Clinton E. Ballou, University of California, Berkeley
Wayne M. Becker, University of Wisconsin, Madison
Helen M. Berman, Fox Chase Cancer Center
Loran L. Bieber, Michigan State University
Robert Blankenship, Arizona State University
John W. Bodnar, Northeastern University
Rodney F. Boyer, Hope College
Robert B. Buchanan, University of California, Berkeley
Neil A. Campbell, San Bernardino Valley College
W. Scott Champney, East Tennessee State University
John Coffin, Tufts University
Jeffrey A. Cohlberg, California State University, Long Beach
Anne Dell, Imperial College, London
John Elam, Florida State University
Donald M. Engleman, Yale University
David E. Fahrney, Colorado State University

Richard E. Fine, Boston University School of Medicine
William H. Fuchsman, Oberlin College
Reginald H. Garrett, University of Virginia
Arthur M. Geller, University of Tennessee, Memphis
John H. Golbeck, Portland State University
Lowell P. Hager, University of Illinois, Urbana-Champaign
Gerald W. Hart, Johns Hopkins University
Standish C. Hartman, Boston University
Glenn A. Herrick, University of Utah
John W. B. Hershey, University of California, Davis
C. H. W. Hirs, University of Colorado Health Sciences Center
Laura L. M. Hoopes, Occidental College
Joyce E. Jentoft, Case Western Reserve University
Howard M. Jernigan, Jr., University of Tennessee, Memphis
Kenneth A. Johnson, Pennsylvania State University
G. Barrie Kitto, University of Texas
Gunter B. Kohlhaw, Purdue University
Sydney R. Kushner, University of Georgia
Tomas M. Laue, University of New Hampshire
Timothy M. Lohman, Texas A&M University
Kenneth J. Longmuir, University of California, Irvine
Ponzy Lu, University of Pennsylvania
Joan Lusk, Brown University
Judith K. Marquis, Boston University School of Medicine
Rowena G. Matthews, University of Michigan, Ann Arbor
William R. McClure, Carnegie Mellon University
David B. McKay, University of Colorado, Boulder
David Mount, University of Arizona
Burton L. Nesset, Pacific Lutheran University
Merle S. Olson, University of Texas Health Science Center, San Antonio
Stanley Parsons, University of California, Santa Barbara
Mulchand S. Patel, Case Western Reserve University
David M. Prescott, University of Colorado, Boulder
David G. Priest, Medical University of South Carolina
Norbert O. Reich, University of California, Santa Barbara
Thomas Schleich, University of California, Santa Cruz
Earl Shrago, University of Wisconsin, Madison
Elizabeth R. Simons, Boston University School of Medicine
Gerald R. Smith, Fred Hutchinson Cancer Research Institute
Thomas W. Sneider, Colorado State University
Lewis Stevens, Stirling University
Phyllis R. Strauss, Northeastern University
Charles C. Sweeley, Michigan State University, East Lansing
Robert L. Switzer, University of Illinois at Urbana-Champaign
Buddy Ullman, Oregon Health Sciences University
Dennis E. Vance, University of Alberta
Andrew H.-J. Wang, Massachusetts Institute of Technology
Peter J. Wejksnora, University of Wisconsin, Milwaukee
Beulah M. Woodfin, University of New Mexico

Resumen del contenido

Parte I El campo de la bioquímica 1

CAPÍTULO 1 El alcance de la bioquímica *3*

CAPÍTULO 2 La matriz de la vida: interacciones débiles en un medio acuoso *31*

CAPÍTULO 3 Energética de la vida *65*

Parte II Arquitectura molecular de la materia viva 93

CAPÍTULO 4 Ácidos nucleicos *95*

CAPÍTULO 5 Introducción a las proteínas: nivel primario de la estructura proteica *141*

CAPÍTULO 6 Estructura tridimensional de las proteínas *181*

CAPÍTULO 7 Función y evolución de las proteínas *237*

CAPÍTULO 8 Proteínas en movimiento: sistemas contráctiles y motores moleculares *287*

CAPÍTULO 9 Hidratos de carbono *311*

CAPÍTULO 10 Lípidos, membranas y transporte celular *353*

Parte III Dinámica de la vida: catálisis y control de las relacciones bioquímicas 401

CAPÍTULO 11 Enzimas: catalizadores biológicos *403*

CAPÍTULO 12 Introducción al metabolismo *463*

Parte IV Dinámica de la vida: energía, biosíntesis y utilización de los precursores 499

CAPÍTULO 13 Metabolismo de los hidratos de carbono I: procesos anaerobios en la generación de energía metabólica *501*

CAPÍTULO 14 Procesos oxidativos: ciclo del ácido cítrico y ruta de las pentosas fosfato *541*

CAPÍTULO 15 Transporte electrónico, fosforilación oxidativa y metabolismo del oxígeno *583*

CAPÍTULO 16 Metabolismo de los hidratos de carbono II: biosíntesis *627*

CAPÍTULO 17 Fotosíntesis *665*

CAPÍTULO 18 Metabolismo lipídico I: ácidos grasos, triacilgliceroles y lipoproteínas *701*

CAPÍTULO 19 Metabolismo lipídico II: lípidos de membrana, esteroides, isoprenoides y eicosanoides *747*

CAPÍTULO 20 Metabolismo de los compuestos nitrogenados: principios de la biosíntesis, la utilización y el recambio *791*

CAPÍTULO 21 Metabolismo de los compuestos nitrogenados: aminoácidos, porfirinas y neurotransmisores *835*

CAPÍTULO 22 Metabolismo de los nucleótidos *889*

CAPÍTULO 23 Coordinación metabólica, control metabólico y transducción de señal *931*

Parte V Información 983

CAPÍTULO 24 Copiado de la información: replicación *985*

CAPÍTULO 25 Reestructuración de la información: restricción, reparación, recombinación, reordenamiento y amplificación *1043*

CAPÍTULO 26 Lectura de la información: transcripción *1105*

CAPÍTULO 27 Descodificación de la información: traducción *1159*

CAPÍTULO 28 Los genes eucariotas y su expresión *1205*

Respuestas a los problemas *1259*
Glosario *1289*
Índice *1311*

Contenido

PARTE I

El campo de la bioquímica *1*

CAPÍTULO 1

El alcance de la bioquímica *3*

¿Qué es la bioquímica? *5*
- Objetivos de la bioquímica *5*
- Las raíces de la bioquímica *6*
- La bioquímica como disciplina y ciencia interdisciplinar 8

La bioquímica como ciencia química *9*
- Los elementos químicos de la materia viva *9*
- Moléculas biológicas *11*

La bioquímica como ciencia biológica *14*
- Características que distinguen a la materia viva *15*
- La unidad de la orbanización biológica: la célula *16*
- Ventanas sobre la función celular: los virus *21*

Nuevas herramientas en la revolución biológica *22*

Aplicaciones de la bioquímica *22*

RESUMEN *23*

Herramientas de la bioquímica 1A
- LA MICROSCOPIA A VARIOS NIVELES *24*

CAPÍTULO 2

La matriz de la vida: interacciones débiles en un medio acuoso *31*

Naturaleza de las interacciones no covalentes *32*
- Interacciones carga-carga *32*
- Interacciones de dipolos permanentes e inducidos *34*
- Repulsión molecular en distancias muy reducidas: radio de van der Waals *36*
- Enlaces de hidrógeno *37*

Misión del agua en los procesos biológicos *38*
- Estructura y propiedades del agua *39*
- El agua como disolvente *41*

Equilibrios iónicos *45*
- Ácidos y bases: donadores y aceptores de protones *45*
- Ionización del agua y producto iónico *45*
- La escala de ph y los valores fisiológicos de pH *47*
- Equilibrios de ácidos y bases débiles *47*
- Un examen más detallado de los valores de pK_a: factores que afectan a la disociación de los ácidos *48*
- Titulación de los ácidos débiles: ecuación de Henderson-Hasselbalch *49*
- Soluciones amortiguadoras *50*
- Moléculas con grupos ionizables múltiples: anfólitos, polianfólitos y polielectrólitos *52*

Interacciones entre macroiones en solución *54*
- Solubilidad de los macroiones y pH *54*
- Influencia de los iones pequeños: fuerza iónica *55*

RESUMEN *57*

Bibliografía *58*

Problemas *58*

Herramientas de la bioquímica 2A
- ELECTROFORESIS Y ENFOQUE ISOELÉCTRICO *59*

CAPÍTULO 3

Energética de la vida *65*

Energía, calor y trabajo *65*
- Energía interna y estado de un sistema *66*
- Primera ley de la termodinámica *67*
- Entalpía *69*

La entropía y la segunda ley de la termodinámica *70*
- La dirección de los procesos *70*
- Entropía *71*
- Segunda ley de la termodinámica *72*

Energía libre: la segunda ley en sistemas abiertos *72*
- Un ejemplo de la interrelación de la entalpía y la entropía: la transición entre el agua líquida y el hielo *73*
- Interrelación de la entalpía y la entropía: resumen *74*
- Energía libre y trabajo útil *76*

Energía libre y concentración *77*
- Potencial químico *77*

Un ejemplo de cómo se utiliza el potencial químico: examen detallado a la difusión a través de una membrana *78*

Energía libre y reacciones químicas: equilibrio químico *79*

Cambio de energía libre y constante de equilibrio *79*
Cálculos de energía libre: un ejemplo bioquímico *81*

Compuestos de fosfato de energía elevada: fuentes de energía de los sistemas biológicos *83*

Compuestos de fosfato de energía elevada como lanzaderas de energía *84*
Potencial de transferencia de fosfato *88*

RESUMEN *89*
Bibliografía *90*
Problemas *90*

PARTE II

Arquitectura molecular de la materia viva *93*

CAPÍTULO 4

Ácidos nucleicos *95*

Naturaleza de los ácidos nucleicos *95*

Dos tipos de ácido nucleico: DNA y RNA *96*
Propiedades de los nucleótidos *99*
Estabilidad y formación del enlace fosfodiéster *99*

Estructura primaria de los ácidos nucleicos *102*

Naturaleza y trascendencia de la estructura primaria *102*
El DNA como sustancia genética: indicios iniciales *103*

Estructura secundaria y terciaria de los ácidos nucleicos *105*

La doble hélice *105*
Naturaleza semiconservativa de la replicación del DNA *107*
Estructuras alternativas de los ácidos nucleicos: hélices B y A *109*
Moléculas de DNA y RNA in vivo *113*

Funciones biológicas de los ácidos nucleicos: una visión preliminar de la biología molecular *117*

Almacenamiento de la información genética: el genoma *118*
Replicación: DNA a DNA *118*
Transcripción: del DNA al RNA *119*
Traducción: del RNA a la proteína *120*
Manipulación del DNA *121*

Plasticidad de la estructura secundaria y terciaria del DNA *122*

Cambios de la estructura terciaria: un examen más detenido del superenrollamiento *122*
Estructuras secundarias del DNA poco habituales *125*

Estabilidad de la estructura secundaria y terciaria *128*

Transición hélice-ovillo aleatorio: desnaturalización de los ácidos nucleicos *128*
Energía superhelicoidal y cambios de la conformación del DNA *131*

RESUMEN *132*
Bibliografía *133*
Problemas *133*

Herramientas de la bioquímica 4A
INTRODUCCIÓN A LA DIFRACCIÓN DE RAYOS X *134*

Herramientas de la bioquímica 4B
SÍNTESIS QUÍMICA DE OLIGONUCLEÓTIDOS *139*

CAPÍTULO 5

Introducción a las proteínas: nivel primario de la estructura proteica *141*

Aminoácidos *141*

Estructura de los α-aminoácidos *141*
Estereoquímica de los α-aminoácidos *144*
Propiedades de las cadenas laterales de los aminoácidos: clases de α-aminoácidos *147*
Aminoácidos modificados *150*

Péptidos y enlace peptídico *150*

Péptidos *150*
Los polipéptidos como polianfólitos *152*
Estructura del enlace peptídico *154*
Estabilidad y formación del enlace peptídico *155*

Proteínas: polipéptidos de secuencia definida *156*

Del gen a la proteína *159*

Código genético *159*
Traducción *161*
Procesamiento de las proteínas tras la traducción *162*

RESUMEN *163*
Bibliografía *164*
Problemas *164*

Herramientas de la bioquímica 5A
MODOS DE AISLAR Y PURIFICAR LAS PROTEÍNAS Y OTRAS MACROMOLÉCULAS *166*

Herramientas de la bioquímica 5B
ANÁLISIS DE LOS AMINOÁCIDOS DE LAS PROTEÍNAS *171*

Herramientas de la bioquímica 5C
CÓMO SECUENCIAR UNA PROTEÍNA *173*

Herramientas de la bioquímica 5D
CÓMO SE SINTETIZA UN POLIPÉPTIDO *177*

CAPÍTULO 6

Estructura tridimensional de las proteínas *181*

Estructura secundaria: formas regulares de plegar la cadena polipeptídica *181*

Descubrimiento de las estructuras polipeptídicas regulares *181*
Descripción de las estructuras: hélices moleculares y *lám*inas pegadas *183*
Representaciones de Kamachandran *187*

Proteínas fibrosas: materiales estructurales de las células y los tejidos *191*

Queratinas *191*
Fibroína *193*
Colágeno *194*
Elastina *196*
Resumen *198*

Proteínas globulares: estructura terciaria y diversidad funcional *198*

Plegados distintos para funciones diferentes *198*
Variedades de la estructura de las proteínas globulares: patrones de plegado *200*

Factores que determinan las estructuras secundaria y terciaria *202*

Información para el plegado proteico *202*
Termodinámica del plegado *204*
Función de los enlaces disulfuro *208*

Dinámica de la estructura de las proteínas globulares *209*

Cinética del plegado de las proteínas *209*
Cinética de la formación de los enlaces disulfuro *211*
Chaperoninas *212*
Movimientos dentro de las moléculas proteicas globulares *213*
Priones: plegado proteico y enfermedad de las vacas locas *214*

Predicción de la estructura proteica secundaria y terciaria *215*

Predicción de la estructura secundaria *215*
Estructura terciaria: simulación por ordenador del plegado *217*

Estructura cuaternaria de las proteínas *217*

Proteínas con múltiples subunidades: interacciones proteína-proteína homotípicas *218*
Interacciones proteína-proteína heterotípicas *221*

RESUMEN *222*
Bibliografía *223*
Problemas *224*

Herramientas de la bioquímica 6A

MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS PARA EL ESTUDIO DE LA CONFORMACIÓN MACROMOLECULAR EN SOLUCIÓN *225*

Herramientas de la bioquímica 6B

DETERMINACIÓN DE PESOS MOLECULARES Y DEL NÚMERO DE SUBUNIDADES DE UNA MOLÉCULA DE PROTEÍNA 233

CAPÍTULO 7

Función y evolución de las proteínas *237*

Transporte y almacenamiento de oxígeno: funciones de la hemoglobina y la mioglobina *238*

Mecanismo de unión del oxígeno por las hemoproteínas *239*

Lugar de unión del oxígeno *240*
Análisis de la unión del oxígeno por la mioglobina *242*

Transporte de oxígeno: hemoglobina *244*

Unión cooperativa y alosterismo *244*
Modelos del cambio alostérico de la hemoglobina *247*
Cambios de la estructura de la hemoglobina que acompañan a la unión del oxígeno *249*
Un examen más detallado del cambio alostérico de la hemoglobina *251*

Efectos de otros ligandos sobre el comportamiento alostérico de la hemoglobina *253*

Respuesta a los cambios de pH: efecto Bohr *254*
Transporte del dióxido de carbono *254*
Bisfosfoglicerato *255*

Evolución proteica: los ejemplos de la mioglobina y la hemoglobina *257*

Estructura de los genes eucariotas: exones e intrones *257*
Mecanismos de mutación proteica *258*
Evolución de la familia de proteínas mioglobina-hemoglobina *261*

Variantes de la hemoglobina: la evolución en curso *263*

Las variantes y su herencia *263*
Efectos patológicos de las hemoglobinas variantes *265*
Talasemias: efectos de la disfunción de los genes de la hemoglobina *268*

Inmunoglobulinas: la variabilidad de la estructura produce la versatilidad de la unión *269*

Respuesta inmunitaria *270*
Estructura de los anticuerpos *273*
Generación de la diversidad de anticuerpos *276*
Células T y respuesta celular *276*

SIDA y respuesta inmunitaria *278*

RESUMEN *279*
Bibliografía *280*
Problemas *281*

Herramientas de la bioquímica 7A

MÉTODOS INMUNOLÓGICOS *282*

CAPÍTULO 8

Proteínas en movimiento: sistemas contráctiles y motores moleculares *287*

Los músculos y otros sistemas contráctiles de actina-miosina *288*

Actina y miosina *288*
Estructura del músculo *290*
Mecanismo de la contracción: el modelo del filamento deslizante *293*
Estimulación de la contracción: papel del calcio *295*
Energética y aportes de energía en el músculo *296*
Actina y miosina no musculares *298*

Sistemas de microtúbulos para la motilidad *299*
Movimientos de cilios y flagelos *300*
Transporte intracelular *303*
Microtúbulos y mitosis *305*
Motilidad bacteriana: proteínas rotatorias *306*

RESUMEN *308*
Bibliografía *309*
Problemas *309*

CAPÍTULO 9

Hidratos de carbono *311*

Monosacáridos *313*
Aldosas y acetosas *313*
Enantiómeros *313*
Diastereómeros *315*
Estructuras de anillo *316*
Derivados de los monosacáridos *324*
Ésteres fosfato *324*
Ácidos y lactonas *325*
Alditoles *326*
Aminoazúcares *326*
Glucósidos *327*
Oligosacáridos *328*
Estructuras de los oligosacáridos *329*
Estabilidad y formación del enlace glucosídico *331*
Polisacáridos *332*
Polisacáridos de almacenamiento *333*
Polisacáridos estructurales *335*
Glucosaminoglucanos *338*
Polisacáridos de la pared celular bacteriana *340*
Glucoproteínas *343*
Glucoproteínas con enlaces N- y con enlaces O- *343*
Antígenos de los grupos sanguíneos *345*
Los oligosacáridos como marcadores celulares *346*

RESUMEN *348*
Bibliografía *348*
Problemas *349*

Herramientas de la bioquímica 9A
SECUENCIACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS *350*

CAPÍTULO 10

Lípidos, membranas y transporte celular *353*

Estructura molecular y comportamiento de los lípidos *353*
Ácidos grasos *354*
Triacilgliceroles: grasas *356*
Jabones y detergentes *357*
Ceras *358*
Componentes lipídicos de las membranas biológicas *358*
Glicerofosfolípidos *359*
Esfingolípidos y glucoesfingolípidos *361*
Glucoglicerolípidos *362*
Colesterol *363*
Estructura y propiedades de las membranas y de las proteínas de la membrana *363*
Movimiento en las membranas *364*
Asimetría de las membranas *367*
Características de las proteínas de la membrana *368*
Membrana del eritrocito: un ejemplo de estructura de membrana *369*
Transporte a través de membranas *373*
Termodinámica del transporte *374*
Transporte pasivo: difusión *375*
Transporte facilitado: difusión acelerada *377*
Transporte activo: transporte en contra de un gradiente de concentración *380*
Membranas excitables, potenciales de acción y neurotransmisión *386*
Potencial de reposo *387*
Potencial de acción *388*
Velocidad de la transmisión nerviosa *391*
Toxinas y neurotransmisión *392*

RESUMEN *394*
Bibliografía *394*
Problemas *395*

Herramientas de la bioquímica 10A
TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LAS MEMBRANAS *396*

PARTE III

Dinámica de la vida: catálisis y control de las relacciones bioquímicas *401*

CAPÍTULO 11

Enzimas: catalizadores biológicos *403*

Función de las enzimas *403*
Velocidades de las reacciones químicas y efectos de los catalizadores *404*
Velocidades de reacción y orden de reacción *404*
Estados de transición y velocidades de reacción *408*
Lo que hace un catalizador *411*
Cómo actúan las enzimas como catalizadores: principios y ejemplos *412*
Principios generales: el modelo del ajuste inducido *412*
Triosa fosfato isomerasa *414*
Serina proteasas *416*
Cinética de la catálisis enzimática *420*

Velocidad de reacción para una reacción simple catalizada por una enzima: cinética de Michaelis-Menten *420*
Expresión de las velocidades de reacción para las reacciones de múltiples pasos *422*
Significado de K_M, K_{cat} y K_{cat}/K_M *423*
Análisis de los datos cinéticos: comprobación de la ecuación de Michaelis-Menten *425*
Reacciones con múltiples sustratos *426*
Un examen más detallado de algunas reacciones complejas *427*

Inhibición enzimática *429*
Inhibición reversible *429*
Inhibición irreversible *433*

Coenzimas, vitaminas y metales esenciales *434*
Las coenzimas y sus funciones *435*
Iones metálicos en las enzimas *437*

Diversidad de la función enzimática *438*
Clasificación de las enzimas proteicas *438*
Ingeniería molecular de enzimas nuevas y modificadas *439*

Biocatalizadores no proteicos: ribozimas *442*

Regulación de la actividad enzimática: enzimas alostéricas *443*
Control a nivel de sustrato *445*
Control por retroacción *446*
Enzimas alostéricas *447*
Aspartato carbamoiltransferasa: un ejemplo de enzima alostérica *448*

Modificaciones covalentes utilizadas para regular la actividad enzimática *450*
Proteasas pancreáticas: activación mediante ruptura *450*
Un examen más detenido de la activación por ruptura: coagulación de la sangre *453*

RESUMEN *455*
Bibliografía *455*
Problemas *456*

Herramientas de la bioquímica 11A
CÓMO MEDIR LAS VELOCIDADES DE LAS REACCIONES CATALIZADAS POR ENZIMAS *459*

CAPÍTULO 12

Introducción al metabolismo *463*

Una primera mirada al metabolismo *463*

Autopistas del mapa de carreteras metabólico *465*
Rutas centrales del metabolismo energético *465*
Rutas diferenciadas para la biosíntesis y la degradación *469*

Algunas consideraciones bioenergéticas *471*
La oxidación como fuente de energía metabólica *471*
El ATP como moneda de energía libre *473*

Principales mecanismos de control metabólico *478*
Control de las concentraciones enzimáticas *478*
Control de la actividad enzimática *479*
Compartimentación *481*
Regulación hormonal *483*
Control distributivo del metabolismo *485*

Análisis experimental del metabolismo *486*
Objetivos del estudio del metabolismo *486*
Niveles de organización a los que se estudia el metabolismo *487*
Sondas metabólicas *491*

RESUMEN *492*
Bibliografía *493*
Problemas *493*

Herramientas de la bioquímica 12A
LOS ISÓTOPOS RADIACTIVOS Y EL CONTADOR DE CENTELLEO LÍQUIDO *494*

PARTE IV

Dinámica de la vida: energía, biosíntesis y utilización de los precursores *499*

CAPÍTULO 13

Metabolismo de los hidratos de carbono I: procesos anaerobios en la generación de energía metabólica *501*

Glucólisis: perspectiva *503*
Relación de la glucólisis con otras rutas *503*
Glucólisis anaerobia y aerobia *503*
Experimentos iniciales cruciales *504*
Estrategia de la glucólisis *505*

Reacciones de la glucólisis *507*
Reacciones 1-5: fase de inversión de energía *507*
Reacciones 6-10: fase de generación de energía *510*

Destinos metabólicos del piruvato *514*
Metabolismo del lactato *514*
Isoenzimas de lactato deshidrogenasa *517*
Metabolismo del etanol *517*

Hojas de balance energético y electrónico *518*

Regulación de la glucólisis *519*
Efecto Pasteur *520*
Oscilaciones de los intermediarios glucolíticos *520*
Regulación alostérica de la fosfofructoquinasa *521*
Control de la piruvato quinasa *522*
La glucólisis como ruta catabólica y anabólica *522*

Entrada de otros azúcares en la ruta glucolítica *523*
Metabolismo de los monosacáridos *524*
Metabolismo de los disacáridos *526*
Metabolismo del glicerol *527*

Catabolismo de los polisacáridos *527*
Rupturas hidrolítica y fosforolítica *528*

Digestión del almidón y del glucógeno *528*
Movilización del glucógeno *530*
Regulación de la degradación del glucógeno *531*

RESUMEN *535*
Bibliografía *536*
Problemas *536*

Herramientas de la bioquímica 13A
DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA *537*

CAPÍTULO 14

Procesos oxidativos: ciclo del ácido cítrico y ruta de las pentosas fosfato *541*

Visión general de la oxidación del piruvato y del ciclo del ácido cítrico *543*
Las tres etapas de la respiración *543*
Estrategia del ciclo del ácido cítrico *544*
Descubrimiento del ciclo del ácido cítrico *546*
Oxidación del piruvato: ruta de entrada principal del carbono en el ciclo del ácido cítrico *547*
Coenzimas que intervienen en la oxidación del piruvato y en el ciclo del ácido cítrico *548*
Pirofosfato de tiamina *549*
Ácido lipoico (lipoamida) *549*
Coenzimas de flavina *551*
Coenzima A y activación de grupos acilo *552*
Acción del complejo piruvato deshidrogenasa *553*
Ciclo del ácido cítrico *555*
Fase 1: introducción y pérdida de dos átomos de carbono *556*
Fase 2: regeneración del oxalacetato *559*
Estequiometría y energética del ciclo del ácido cítrico *561*
Regulación de la piruvato deshidrogenasa y del ciclo del ácido cítrico *562*
Control de la oxidación del piruvato *563*
Control del ciclo del ácido cítrico *564*
Secuencias anapleróticas: necesidad de reponer los intermediarios del ciclo *565*
Reacciones que reponen oxalacetato *566*
Enzima málica *566*
Reacciones en las que participan aminoácidos *567*
Ciclo del glioxilato: una variante anabólica del ciclo del ácido cítrico *568*
Una ruta de biosíntesis que oxida la glucosa: la ruta de las pentosas fosfato *571*
Fase oxidativa: generación de poder reductor en forma de nadph *572*
Fase no oxidativa: destinos alternativos de las pentosas fosfato *573*
Trastornos genéticos humanos que afectan a enzimas de la ruta de las pentosas fosfato *576*

RESUMEN *579*
Bibliografía *580*
Problemas *580*

CAPÍTULO 15

Transporte electrónico, fosforilación oxidativa y metabolismo del oxígeno *583*

La mitocondria: el escenario de la acción *584*
Oxidaciones y generación de energía *585*
Cuantificación del poder reductor: potencial de reducción estándar *585*
Cambios de energía libre en las reacciones de oxidación-reducción *589*
Transporte electrónico *591*
Transportadores electrónicos en la cadena respiratoria *591*
Determinación de la secuencia de los transportadores electrónicos respiratorios *595*
Transferencia de los transportadores electrónicos a las mitocondrias *599*
Fosforilación oxidativa *600*
La relación P/O: eficacia de la fosforilación oxidativa *600*
Reacciones oxidativas que impulsan la síntesis de ATP *601*
El sistema enzimático para la síntesis de ATP *602*
Mecanismo de la fosforilación oxidativa: acoplamiento quimiosmótico *604*
Un examen más detallado del acoplamiento quimiosmótico: pruebas experimentales *605*
Perspectivas estructurales en la fosforilación oxidativa *607*
Estados respiratorios y control respiratorio *610*
Sistemas de transporte mitocondriales *612*
Rendimientos energéticos del metabolismo oxidativo *614*
El oxígeno como sustrato para otras reacciones metabólicas *615*
Oxidasas y oxigenasas *615*
Citocromo P450 *616*
Especies de oxígeno reactivas, defensas antioxidantes y enfermedad humana *618*

RESUMEN *621*
Bibliografía *622*
Problemas *623*

CAPÍTULO 16

Metabolismo de los hidratos de carbono II: biosíntesis *627*

Gluconeogénesis *627*
Necesidad fisiológica de la síntesis de glucosa en los animales *627*
Relación enzimática de la gluconeogénesis con la glucólisis *629*

Estequiometría y balance energético de la gluconeogénesis *632*
Sustratos de la gluconeogénesis *632*
Consumo de etanol y gluconeogénesis *635*
Funciones de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa extrahepática *636*
Regulación de la gluconeogénesis *636*
Regulación recíproca de la glucólisis y la gluconeogénesis *637*
Fructosa-2,6-bisfosfato y control de la gluconeogénesis *639*
Biosíntesis de glucógeno *641*
Glucógeno sintasa y proceso de ramificación *641*
Relación recíproca entre la síntesis y la movilización del glucógeno *643*
Funciones de las reservas de glucógeno en el músculo y el hígado *646*
Defectos congénitos del metabolismo del glucógeno en el ser humano *647*
Biosíntesis de otros polisacáridos *648*
Biosíntesis de los aminoazúcares *649*
Biosíntesis de los glucoconjugados *650*
Oligosacáridos ligados por O: antígenos de los grupos sanguíneos *651*
Oligosacáridos ligados por N: glucoproteínas *652*
Polisacáridos de la pared celular microbiana: peptidoglucanos *656*
Polisacáridos de la pared celular microbiana: antígenos O *659*
RESUMEN *662*
Bibliografía *662*
Problemas *663*

CAPÍTULO 17

Fotosíntesis *665*

Procesos básicos de la fotosíntesis *666*
El cloroplasto *669*
Reacciones luminosas *670*
Absorción de la luz: el sistema de recogida de luz *670*
Fotoquímica de las plantas y las algas: dos fotosistemas en serie *674*
Un mecanismo alternativo de la reacción luminosa: flujo electrónico cíclico *683*
Complejos del centro de reacción en las bacterias fotosintéticas *684*
Fotosíntesis artificial *686*
Reacciones oscuras: ciclo de Calvin *687*
Fase I: fijación del dióxido de carbono y producción de azúcar *688*
Fase II: regeneración del aceptor *690*
Resumen de las reacciones luminosa y oscura en la fotosíntesis de dos sistemas *691*
Reacción global y eficacia de la fotosíntesis *691*
Regulación de la fotosíntesis *692*
Fotorrespiración y ciclo C_4 *693*
RESUMEN *696*
Bibliografía *698*
Problemas *698*

CAPÍTULO 18

Metabolismo lipídico I: ácidos grasos, triacilgliceroles y lipoproteínas *701*

Utilización y transporte de las grasas y el colesterol *701*
Las grasas como reservas energéticas *703*
Digestión y absorción de las grasas *704*
Transporte de las grasas a los tejidos: lipoproteínas *705*
Transporte y utilización del colesterol en los animales *708*
Movilización de la grasa almacenada *714*
Oxidación de los ácidos grasos *716*
Experimentos iniciales *716*
Activación de los ácidos grasos y transporte a las mitocondrias *716*
Ruta de la β-oxidación *719*
Rendimiento energético de la oxidación de los ácidos grasos *721*
Oxidación de los ácidos grasos insaturados *722*
Oxidación de los ácidos grasos con cadenas carbonadas de número impar *724*
Control de la oxidación de los ácidos grasos *724*
β-Oxidación peroxisómica de los ácidos grasos *725*
α-Oxidación de los ácidos grasos *725*
Cetogénesis *726*
Biosíntesis de los ácidos grasos *727*
Relación de la síntesis de los ácidos grasos con el metabolismo de los hidratos de carbono *727*
Estudios iniciales sobre la síntesis de los ácidos grasos *728*
Biosíntesis del palmitato a partir de la acetil-CoA *729*
Elongación de las cadenas de los ácidos grasos *737*
Desaturación de los ácidos grasos *737*
Control de la síntesis de los ácidos grasos *738*
Rutas diferentes de la síntesis de ácidos grasos que conducen a antibióticos *740*
Biosíntesis de los triacilgliceroles *740*
Conocimientos bioquímicos sobre la obesidad *742*
RESUMEN *742*
Bibliografía *743*
Problemas *744*

CAPÍTULO 19

Metabolismo lipídico II: lípidos de membrana, esteroides, isoprenoides y eicosanoides *747*

Metabolismo de los glicerofosfolípidos *747*
Biosíntesis de los glicerofosfolípidos en las bacterias *748*

Metabolismo de los glicerofosfolípidos en los eucariotas *752*
Metabolismo de los esfingolípidos *763*
Metabolismo de los esteroides *768*
Algunas consideraciones estructurales *768*
Biosíntesis del colesterol *769*
Ácidos biliares *773*
Hormonas esteroideas *774*
Otros compuestos isoprenoides *778*
Vitaminas liposolubles *778*
Otros terpenos *781*
Eicosanoides: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos *781*
Algunos aspectos históricos *782*
Estructura *783*
Biosíntesis y catabolismo *784*
Acciones biológicas *785*
RESUMEN *786*
Bibliografía *787*
Problemas *788*

CAPÍTULO 20

Metabolismo de los compuestos nitrogenados: principios de la biosíntesis, la utilización y el recambio *791*

Utilización del nitrógeno inorgánico: ciclo del nitrógeno *793*
Fijación biológica del nitrógeno *794*
Utilización del nitrato *797*
Utilización del amoníaco: biogénesis del nitrógeno orgánico *798*
Glutamato deshidrogenasa: aminación reductora del α-cetoglutarato *799*
Glutamina sintetasa: generación de nitrógeno amida biológicamente activo *800*
Asparagina sintetasa: una reacción semejante de amidación *803*
Carbamoil fosfato sintetasa: generación de un intermediario para la síntesis de arginina y pirimidina *803*
Economía del nitrógeno: aspectos de la síntesis y degradación de los aminoácidos *804*
Consecuencias metabólicas de la ausencia de compuestos de almacenamiento nitrogenados *804*
Capacidades de biosíntesis de los organismos *805*
Transaminación *805*
Recambio proteico *807*
Características cuantitativas del recambio proteico *807*
Importancia biológica del recambio proteico *808*
Proteasas intracelulares y lugares de recambio *809*
Señales químicas para el recambio *810*
Degradación de los aminoácidos y metabolismo de los productos finales nitrogenados *812*
Características comunes de las rutas de degradación de los aminoácidos *812*
Desactivación tóxica y excreción de amoníaco *813*
Ciclo de la urea de Krebs-Henseleit *814*
Transporte del amoníaco al hígado *816*
Coenzimas que intervienen fundamentalmente en el metabolismo del nitrógeno *817*
Piridoxal fosfato *817*
Coenzimas de tetrahidrofolato y metabolismo de un carbono *820*
Coenzimas de B_{12} *825*
RESUMEN *830*
Bibliografía *831*
Problemas *832*

CAPÍTULO 21

Metabolismo de los compuestos nitrogenados: aminoácidos, porfirinas y neurotransmisores *835*

Aminoácidos relacionados con intermediarios del ciclo del ácido cítrico *835*
Síntesis y catabolismo de glutamato, aspartato, alanina glutamina y asparagina *836*
Metabolismo intermediario del glutamato *838*
Metabolismo de los aminoácidos que contienen azufre *841*
Reducción del azufre inorgánico *841*
Síntesis de cisteína y metionina en las plantas y las bacterias *842*
La metionina como origen del azufre de la cisteína en los animales *844*
Metabolismo del glutatión *844*
S-adenosilmetionina y metilación biológica *846*
Poliaminas *848*
Catabolismo de la cisteína y la metionina *849*
Aminoácidos aromáticos *850*
Biosíntesis de los anillos aromáticos: la ruta del ácido sikímico *851*
Biosíntesis de histidina *854*
Utilización de los aminoácidos aromáticos en las plantas *856*
Metabolismo de los aminoácidos aromáticos en los animales *859*
Serina, glicina y treonina *865*
Valina, leucina, isoleucina y lisina *867*
Valina, leucina e isoleucina *867*
Lisina *868*
Metabolismo de la porfirina y el hemo *868*
Biosíntesis de los tetrapirroles: ruta del succinato-glicina *868*
Degradación del hemo en los animales *873*
Los aminoácidos y sus metabolitos como neurotransmisores y reguladores biológicos *873*
Biosíntesis de la serotonina y las catecolaminas *875*
Bioquímica de la neurotransmisión *876*

RESUMEN *884*
Bibliografía *885*
Problemas *886*

CAPÍTULO 22

Metabolismo de los nucleótidos *889*

Esquema de las rutas del metabolismo de los nucleótidos *889*
- Rutas de biosíntesis: rutas de novo y de salvamento *889*
- Degradación de los ácidos nucleicos e importancia del salvamento de nucleótidos *890*
- El PRPP: un metabolito central en las rutas de novo y de salvamento *892*

Biosíntesis de novo de los nucleótidos de purina *893*
- Estudios iniciales sobre la síntesis de novo de las purinas *893*
- Síntesis de purinas a partir de PRPP hasta el ácido inosínico *894*
- Síntesis de ATP y GTP a partir del ácido inosínico *896*
- Utilización de los nucleótidos de adenina en la biosíntesis de coenzimas *898*

Degradación de las purinas y trastornos clínicos del metabolismo de las purinas *898*
- Formación de ácido úrico *898*
- Acumulación excesiva de ácido úrico: gota *899*
- Consecuencias dramáticas de un déficit grave de HGPRT: el síndrome de Lesch-Nyhan *901*
- Consecuencias imprevistas del catabolismo defectuoso de las purinas: inmunodeficiencia *901*

Metabolismo de los nucleótidos de pirimidina *902*
- Biosíntesis de novo del anillo de pirimidina *902*
- Control de la biosíntesis de pirimidinas en las bacterias *902*
- Enzimas multifuncionales en la síntesis de pirimidinas de los eucariotas *904*
- Síntesis de salvamento y catabolismo de las pirimidinas *905*

Biosíntesis y metabolismo de los desoxirribonucleótidos *905*
- Reducción de los ribonucleótidos a los desoxirribonucleótidos *905*
- Biosíntesis de los desoxirribonucleótidos de timina *912*
- Metabolismo de los nucleótidos de desoxiuridina *912*
- Rutas de salvamento para la síntesis de desoxirribonucleótidos *915*

Timidilato sintasa: una enzima diana de la quimioterapia *916*

Alteraciones del metabolismo de los nucleótidos dirigidas por los virus *920*

Importancia biológica y médica de otros análogos de los nucleótidos *921*
- Análogos de nucleótidos como agentes quimioterapéuticos *922*
- Análogos de nucleótidos y mutagénesis *924*
- Las enzimas que metabolizan los nucleótidos como marcadores genéticos seleccionables *925*

RESUMEN *926*
Bibliografía *926*
Problemas *927*

CAPÍTULO 23

Coordinación metabólica, control metabólico y transducción de señal *931*

Interdependencia de los principales órganos en el metabolismo de los combustibles en los vertebrados *932*
- Entradas y salidas de combustible *932*
- División metabólica del trabajo entre los principales órganos *932*

Regulación hormonal del metabolismo de los combustibles *936*
- Acciones de las principales hormonas *937*
- Respuestas al estrés metabólico: inanición, diabetes *940*

Mecanismos de acción hormonal *944*
- Esquema general de la acción hormonal *946*
- Naturaleza jerárquica del control hormonal *947*
- Síntesis de las hormonas: precursores de las hormonas peptídicas *949*
- Transducción de señal: receptores *951*
- Transducción de señal: proteínas G *954*
- Sistemas de segundos mensajeros *959*
- El receptor de insulina y otros receptores relacionados con actividad proteína quinasa *962*
- Hormonas esteroideas y tiroideas: receptores intracelulares *964*

Transducción de señal, oncogenes y cáncer *967*
- Oncogenes celulares y víricos *967*
- Oncogenes en los tumores humanos *970*
- Oncogenes y señalización celular *972*

Hormonas vegetales *975*

RESUMEN *977*
Bibliografía *978*
Problemas *980*

Herramientas de la bioquímica 23A
RADIOINMUNOANÁLISIS *981*

PARTE V

Información *983*

CAPÍTULO 24

Copiado de la información: replicación *985*

Metabolismo de la información: procesos principales *985*

Visión general de la replicación del DNA *986*

Revisión de la terminología genética *992*

Primeros datos sobre la replicación del DNA *995*
- Naturaleza semiconservativa de la replicación del DNA *995*
- Naturaleza secuencial de la replicación *995*
- Origen y dirección de la replicación *996*
- Unidades de replicación: el replicón *998*

DNA polimerasas: enzimas que catalizan la elongación de la cadena de polinucleótidos *1000*
- Descubrimiento de la DNA polimerasa *1000*
- Estructura y actividades de la DNA polimerasa I *1001*
- DNA polimerasas II y III *1003*
- Estructura y mecanismo de las DNA polimerasas *1004*
- Holoenzima DNA polimerasa III *1006*
- DNA polimerasas eucariotas *1008*

Otras proteínas de la replicación *1009*
- DNA ligasa: replicación discontinua del DNA *1010*
- Primasa: síntesis de las secuencias líderes de RNA *1011*
- Pinzas y cargadores de pinza: procesividad *1012*
- Roteínas de unión al DNA de cadena única: mantenimiento de la conformación óptima del molde *1013*
- Helicasas: desenrollamiento del DNA por encima de la horquilla *1014*
- Topoisomerasas: alivio de las tensiones de torsión *1016*
- Uracilo-DNA *N*-Glucosilasa: eliminación del uracilo incorporado *1020*

Reconstrucción de las máquinas de replicación *1020*

Iniciación de la replicación del DNA *1023*
- Exigencias para la iniciación de la replicación *1023*
- Iniciación de la replicación del DNA de *E. coli* en ori^c *1023*
- Replicación del DNA de plásmidos: control de la iniciación por el RNA *1025*
- DNA mitocondrial: dos horquillas de replicación unidireccionales *1025*

Replicación de genomas lineales *1026*

Fidelidad de la replicación del DNA *1027*

Virus de RNA: la replicación de genomas de RNA *1031*
- Replicasas de RNA dependientes de RNA *1031*
- Replicación de los genomas de los retrovirus *1032*

RESUMEN *1034*

Bibliografía *1035*

Problemas *1036*

Herramientas de la bioquímica 24A
- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA *1038*

Herramientas de la bioquímica 24B
- ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO EN GEL BIDIMENSIONAL DE TOPOISÓMEROS DEL DNA *1040*

CAPÍTULO 25

Reestructuración de la información: restricción, reparación, recombinación, reordenamiento y amplificación *1043*

Metilación del DNA *1044*

Restricción y modificación *1047*
- Biología de la restricción y la modificación *1047*
- Propiedades de las enzimas de restricción y modificación *1048*

Reparación del DNA *1052*
- Tipos y consecuencias del daño del DNA *1052*
- Fotoproductos del DNA biológicamente importantes: dímeros de pirimidina *1054*
- Reparación directa de las bases del DNA dañadas: fotorreactivación y alquiltransferasas *1055*
- Reparación por escisión de nucleótidos: escinucleasas *1057*
- Reparación por escisión de bases: DNA-*N*-glucosilasas *1058*
- Reparación postreplicación: reparación por recombinación y respuesta SOS *1059*
- Reparación de mal apareamientos *1062*

Recombinación *1064*
- Clasificación de los procesos de recombinación *1065*
- Recombinación homóloga *1066*
- Recombinación específica de lugar *1072*

Reordenamientos génicos *1075*
- Síntesis de las inmunoglobulinas: generación de la diversidad de anticuerpos *1075*
- Elementos genéticos transponibles *1078*
- Retrovirus *1083*

Amplificación génica *1085*

RESUMEN *1087*

Bibliografía *1087*

Problemas *1089*

Herramientas de la bioquímica 25A
- CARTOGRAFIADO DEL GENOMA *1091*

Herramientas de la bioquímica 25B
- CLONACIÓN DE GENES *1093*

Herramientas de la bioquímica 25C
- SECUENCIACIÓN DE GENES CON DIDESOXINUCLEÓTIDOS *1097*

Herramientas de la bioquímica 25D
- TRANSFERENCIA SOUTHERN *1099*

Herramientas de la bioquímica 25E
- MUTAGÉNESIS DE LUGAR DIRIGIDA *1102*

CAPÍTULO 26

Lectura de la información: transcripción *1105*

El DNA como molde para la síntesis de RNA *1106*
- Predicción de la existencia del RNA mensajero *1106*
- El bacteriófago T2 y la demostración del RNA mensajero *1108*
- Dinámica del RNA en las células no infectadas *1109*

Enzimología de la síntesis del RNA: RNA polimerasa *1109*
- Papel biológico de la RNA polimerasa *1110*
- Estructura de la RNA polimerasa *1112*

Mecanismo de la transcripción *1114*
- Iniciación de la transcripción: interacciones con los promotores *1114*

Iniciación y elongación: incorporación de los ribonucleótidos *1116*
Puntuación de la transcripción: reconocimiento del promotor *1119*
Puntuación de la transcripción: terminación *1122*
Regulación de la transcripción *1125*
Operón lactosa: primeros indicios del control transcripcional de la expresión de los genes *1125*
Bacteriófago λ: operadores múltiples, represores duales y modelos para la especificidad de unión al DNA *1133*
Estructura de los represores Cro y cI y proteínas relacionadas de unión al DNA *1138*
Regulón SOS: activación de operones múltiples mediante un conjunto común de señales ambientales *1140*
Operones biosintéticos: represores activados por el ligando y atenuación *1142*
Otras formas de regulación *1145*
Procesamiento posterior a la transcripción *1149*
Recambio del mRNA *1149*
Procesamiento posterior a la transcripción en la síntesis de rRNA y tRNA *1149*
RESUMEN *1152*
Bibliografía *1152*
Problemas *1153*
Herramientas de la bioquímica 26A
HUELLAS DACTILARES: IDENTIFICACIÓN DE LUGARES DE UNIÓN DE PROTEÍNAS EN EL DNA *1155*
Herramientas de la bioquímica 26B
CARTOGRAFIADO DE LOS PUNTOS DE COMIENZO DE LA TRANSCRIPCIÓN *1157*

CAPÍTULO 27

Descodificación de la información: traducción *1159*

Visión general de la traducción *1159*
El código genético *1160*
Cómo se descifró el código *1160*
Características del código *1162*
Principales participantes en la traducción: mRNA, tRNA y ribosomas *1164*
Estructura de los mRNA de los procariotas *1164*
Estructura de los RNA de transferencia *1166*
Acoplamiento de los tRNA a los aminoácidos y formación de los tRNA aminoacilados: primer paso en la síntesis de proteínas *1169*
El ribosoma *1172*
Mecanismos de la traducción *1177*
Iniciación *1178*
Elongación *1180*
Terminación *1184*
Supresión de las mutaciones *1186*
Inhibición de la traducción por antibióticos *1187*
Velocidades y energética de la traducción *1189*
Fases finales de la síntesis proteica: plegado y modificación covalente *1191*
Plegado de la cadena *1191*
Modificación covalente *1191*
Regulación de la síntesis proteica en los procariotas *1192*
RESUMEN *1196*
Bibliografía *1196*
Problemas *1198*
Herramientas de la bioquímica 27A
FORMAS DE ESTABLECER UN MAPA DE ESTRUCTURAS MACROMOLECULARES COMPLEJAS *1199*

CAPÍTULO 28

Los genes eucariotas y su expresión *1205*

El genoma eucariota *1206*
Tamaño del genoma *1206*
Secuencias repetitivas *1207*
Intrones *1209*
Familias génicas *1210*
Organización física del DNA eucariota: núcleo, cromosomas y cromatina *1211*
Cromosomas *1211*
Cromatina *1213*
El nucleosoma *1214*
Estructura de orden superior de la cromatina en el núcleo *1216*
Ciclo celular y replicación del DNA en los eucariotas *1218*
Ciclo celular *1218*
Fenómenos moleculares durante la replicación de la cromatina *1221*
La transcripción y su control en las células eucariotas *1225*
RNA polimerasa I: transcripción de los principales genes de RNA ribosómico *1225*
RNA polimerasa III: transcripción de los genes pequeños de RNA *1227*
RNA polimerasa II: transcripción de los genes estructurales *1230*
Estructura de la cromatina y transcripción *1232*
Terminación de la transcripción *1236*
Procesamiento del RNA mensajero eucariota *1236*
Formación de la caperuza *1236*
Corte y empalme *1237*
Corte y empalme alternativo *1240*
Edición *1240*
Traducción en los eucariotas *1241*
Comparación con los mecanismos de los procariotas *1241*
Inhibidores de la traducción *1242*
Control de la traducción *1244*

Direccionamiento de las proteínas en los eucariotas *1245*
Proteínas sintetizadas en el citoplasma *1245*
Proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso *1245*
Función del complejo de Golgi *1247*
El destino de las proteínas: destrucción programada *1248*
El sistema lisosómico *1248*
Degradación proteica citosólica *1250*
Apoptosis *1251*
DNA eucariota y desarrollo: un breve ejemplo *1252*
RESUMEN *1254*
Bibliografía *1254*
Problemas *1256*
Herramientas de la bioquímica 28A
DESCUBRIMIENTO DE FACTORES DE UNIÓN Y SECUENCIAS DE UNIÓN *1257*
Respuestas a los problemas *1259*
Glosario *1289*
Índice *1311*

PARTE 1

El campo de la bioquímica



CAPÍTULO 1

El alcance de la bioquímica

Las ciencias biológicas han experimentado una revolución y la bioquímica ha estado en el corazón de la misma. No hay nada que demuestre mejor este hecho que el considerable número de Premios Nobel de Química y de Medicina o Fisiología que han ganado los bioquímicos en los últimos años. Un ejemplo representativo es la concesión del Premio Nobel de Medicina o Fisiología de 1988, que compartieron Gertrude Elion y George Hitchings de Estados Unidos y Sir James Black de Gran Bretaña, por su posición destacada en la invención de nuevos fármacos. Elion y Hitchings descubrieron análogos químicos de los ácidos nucleicos y las vitaminas, que se utilizan actualmente para el tratamiento de la leucemia, las infecciones bacterianas, el paludismo, la gota, las infecciones por virus del herpes y el SIDA; Black obtuvo los betabloqueantes, que se utilizan para reducir el riesgo de infartos de miocardio y para tratar enfermedades como el asma. En la Figura 1.1 se describen tres de estos fármacos. La **6-mercaptopurina**, un análogo de un precursor de los ácidos nucleicos, inhibe la replicación incontrolada del DNA que se asocia con la proliferación de los glóbulos blancos en la leucemia. La **3′-azido-2′,3′-didesoxitimidina** (AZT), un análogo del nucleótido timidina, se sintetizó inicialmente como posible fármaco antineoplásico, pero se ha utilizado principalmente para el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente infeccioso que causa el SIDA. El **isoproterenol**, un análogo de la hormona **adrenalina** (también denominada **epinefrina**), emula las acciones de la adrenalina, que transmite señales al corazón, los pulmones y otros órganos vitales.

Estos fármacos no se descubrieron mediante una síntesis al azar de productos químicos orgánicos, sino que se *diseñaron* como consecuencia de varias décadas de acumulación de conocimientos en temas centrales de la bioquímica, como la estructura y función de las proteínas, la síntesis de los ácidos nucleicos, los mecanismos enzimáticos, los receptores y el control metabólico, las vitaminas y las coenzimas y la bioquímica comparada (el estudio de las diferencias bioquímicas entre los diversos organismos). La influencia de la bioquímica se percibe en toda nuestra vida, mediante descubrimientos como éstos y en la forma en la que dichos descubrimientos estimulan el crecimiento de todas las ciencias de la vida.

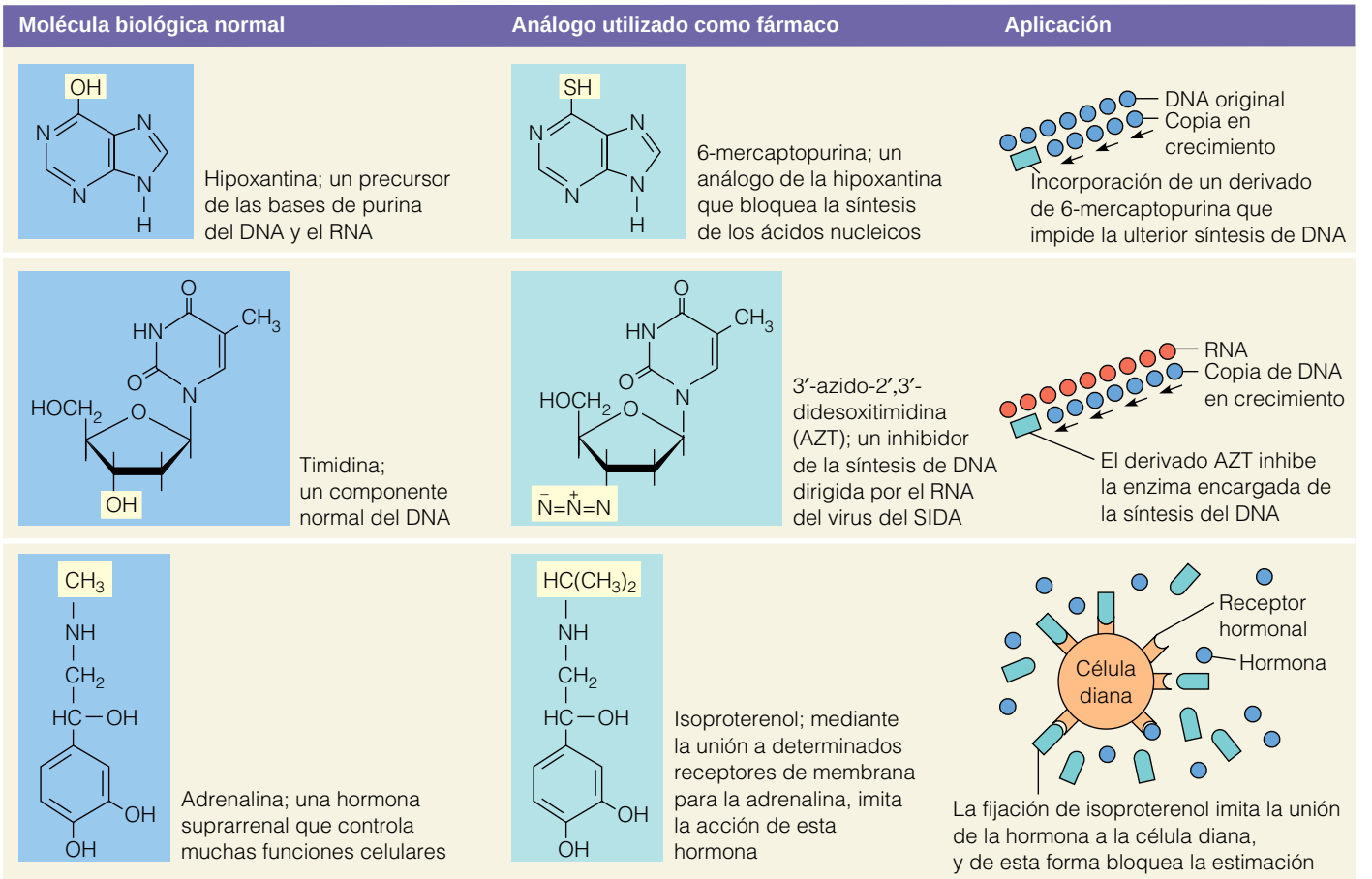


FIGURA **1.1**

Aplicaciones médicas de la bioquímica. Tres ejemplos de análogos metabólicos diseñados por los bioquímicos que se utilizan como fármacos importantes.

Otros dos premios más recientes aportan nuevas pruebas de la amplitud de la influencia de la bioquímica en todas las ciencias de la vida. En 1997 compartieron el premio de Química tres investigadores, el americano Paul Boyer y el británico J. Walker, por su descubrimiento de la "máquina rotatoria" que genera el compuesto portador de energía ATP, y el danés J. Skou por sus estudios de la "bomba" que lleva al sodio y al potasio a través de las membranas. En el mismo año, el premio de Medicina o Fisiología fue para Stanley Prusiner, por sus estudios del agente responsable de la enfermedad de las "vacas locas".

Hay dos factores que contribuyen al atractivo que tiene hoy en día la bioquímica y a su influencia sobre otras ciencias biológicas. En primer lugar, actualmente está bien establecido que la materia viva cumple las mismas leyes físicas fundamentales que gobiernan a toda la materia. En consecuencia, es posible aplicar toda la potencia de las modernas teorías químicas y físicas a los problemas biológicos. En segundo lugar, las nuevas técnicas de investigación, de una potencia increíble, están permitiendo a los científicos plantear preguntas acerca de los procesos básicos de la vida que no podían haberse imaginado siquiera hace unos pocos años.

La materia viva, ilustrada por la célula que se muestra en la Figura 1.2, está formada por sustancias químicas, y cualquier función biológica se puede describir mediante las estructuras y las reacciones de dichas sustancias. Para comprender cualquier proceso vital es necesario, pues, comprender su química. Esto es cierto incluso para los procesos biológicos muy complejos, como la evolución, la diferenciación y el comportamiento, que hasta hace poco no se consideraba que pudieran analizarse a nivel molecular. El hecho es que la bio-

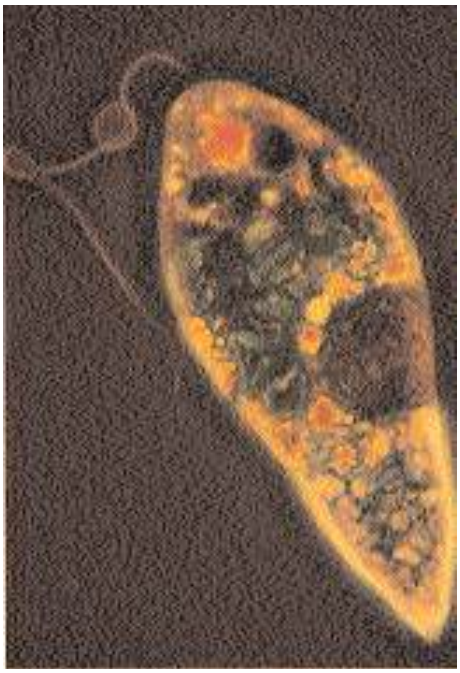


FIGURA **1.2**

Complejidad de la materia viva. Esta microfotografía en color de un organismo unicelular, el protozoo fotosintético *Euglena*, muestra la complejidad estructural que puede existir en el interior de una sola célula. El núcleo es el área marrón situada en el centro a la derecha. Por encima y a la izquierda del núcleo se encuentran los cloroplastos verdes; en la parte superior izquierda hay un flagelo en forma de látigo que impulsa al organismo. El funcionamiento de una célula, por compleja que sea, puede describirse en términos de reacciones físicas y químicas.

© Biophoto Associates/Photo Researchers, Inc.

química está penetrando en todas las disciplinas de la biología. Al mismo tiempo, algunos químicos de diversas áreas se están dirigiendo hacia los problemas bioquímicos como centro de su investigación.

La potencia de las técnicas de investigación que hacen posible estos nuevos estudios es enorme. Nos permiten identificar a una persona mediante el análisis del material genético de un solo pelo, y modificar las características más básicas de los organismos vivos mediante la introducción en ellos de nuevos genes. Estas técnicas hacen posible explorar los procesos más complicados que se dan en las células y observar las moléculas en acción. Inevitablemente, han dado lugar a aplicaciones prácticas en los campos de la farmacia, la medicina y otras áreas relacionadas. Se están haciendo también progresos con mucha mayor rapidez de lo que nadie hubiera previsto hace sólo 10 años. Envidiamos a los estudiantes que están empezando ahora el estudio de la bioquímica. Se enfrentan con el atractivo reto de entrar en un campo que está progresando con una velocidad sin precedentes, y que afecta a prácticamente todas las áreas de la actividad humana.

¿Qué es la bioquímica?

OBJETIVOS DE LA BIOQUÍMICA

El objetivo de la bioquímica es el conocimiento de la vida en términos moleculares.

La bioquímica pretende describir la estructura, la organización y las funciones de la materia viva en términos moleculares. ¿Cuáles son las estructuras químicas de los componentes de la materia viva? ¿De qué forma interactúan estos componentes para dar origen a estructuras supramoleculares organizadas, células, tejidos multicelulares y organismos? ¿Cómo extrae energía de su entorno la materia viva para mantener su existencia? ¿De qué manera almacena y transmite un organismo la información que necesita para crecer y reproducirse de forma exacta? ¿Qué cambios químicos acompañan a la reproducción, el envejecimiento y la muerte de las células y los organismos? ¿Cómo se controlan las reacciones químicas en el interior de las células vivas? Los bioquímicos se plantean este tipo de preguntas y el estudio de la química de la vida busca las respuestas.

La bioquímica puede dividirse en tres áreas principales: (1) la **química estructural** de los componentes de la materia viva y la relación de la función biológica con la estructura química; (2) el **metabolismo**, la totalidad de las reacciones químicas que se producen en la materia viva; y (3) la química de los procesos y las sustancias que almacenan y transmiten la información biológica. Este tercer campo también es el área de la **genética molecular**, que pretende conocer la herencia y la expresión de la información genética en términos moleculares.

LAS RAÍCES DE LA BIOQUÍMICA

Los primeros bioquímicos tuvieron que superar la idea de que la materia viva y la carente de vida eran fundamentalmente diferentes.

La bioquímica tuvo su origen como campo científico diferenciado a comienzos del siglo XIX, con los trabajos pioneros de Friedrich Wöhler (Figura 1.3). Antes de la época de Wöhler, se creía que las sustancias existentes en la materia viva eran cualitativamente diferentes de aquéllas de la materia muerta y no se comportaban según las leyes conocidas de la física y la química. En 1828, Wöhler demostró que la urea, una sustancia de origen biológico, podía sintetizarse en el laboratorio a partir del compuesto inorgánico cianato amónico. Como decía

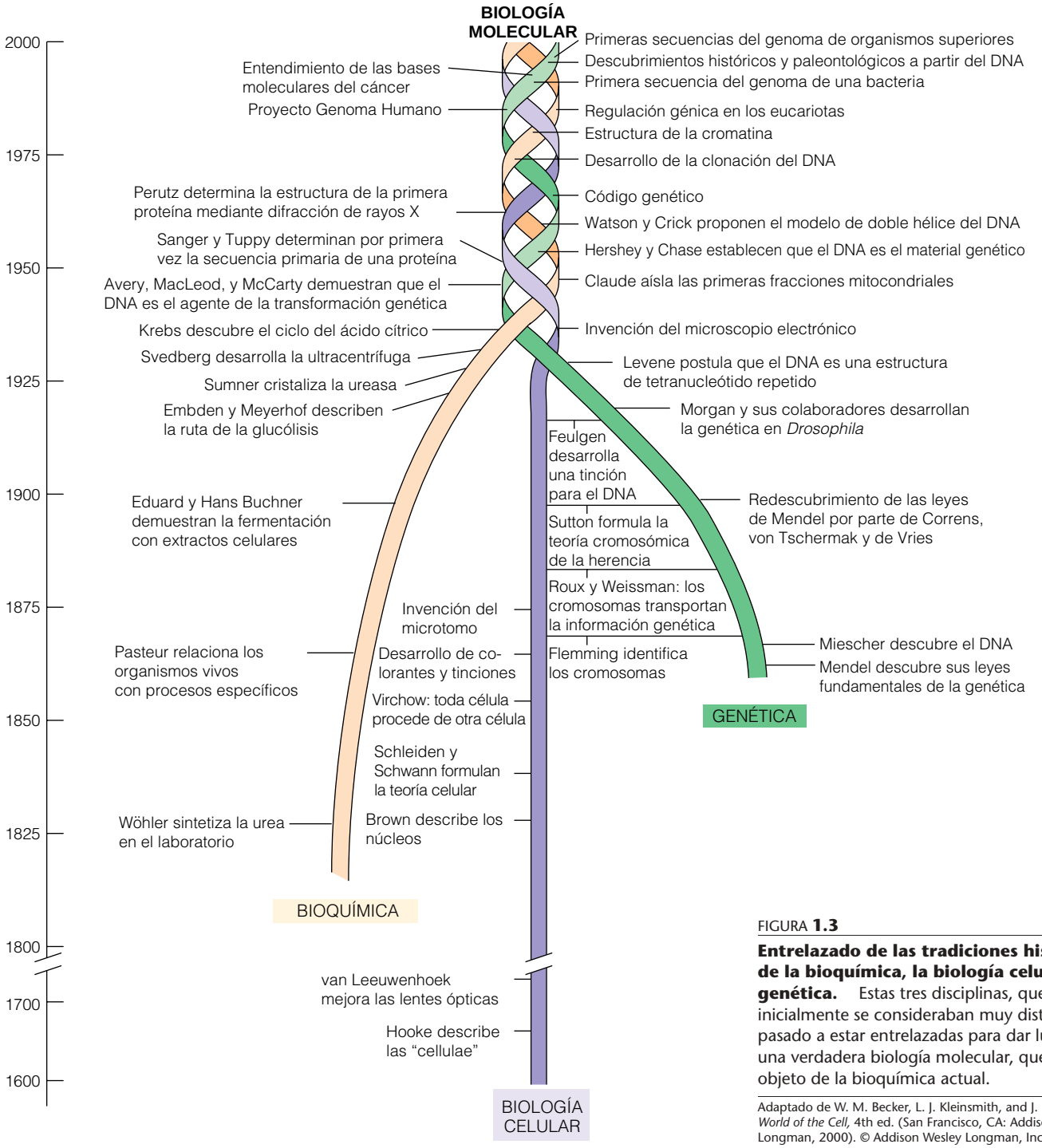
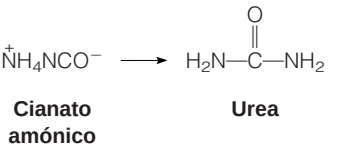


FIGURA **1.3**

Entrelazado de las tradiciones históricas de la bioquímica, la biología celular y la genética. Estas tres disciplinas, que inicialmente se consideraban muy distintas, han pasado a estar entrelazadas para dar lugar a una verdadera biología molecular, que es el objeto de la bioquímica actual.

Adaptado de W. M. Becker, L. J. Kleinsmith, and J. Hardin, *The World of the Cell,* 4th ed. (San Francisco, CA: Addison Wesley Longman, 2000). © Addison Wesley Longman, Inc.

Wöhler en una carta a un colega, "debo decirte que puedo preparar urea sin necesidad de un riñón ni de un animal, sea un hombre o un perro". Esta afirmación era muy sorprendente en su época, puesto que rompía la barrera que se suponía que existía entre lo vivo y lo que no tenía vida.



Aún después de la demostración de Wöhler, una corriente de opinión convincente, denominada **vitalismo**, sostenía que, si no los compuestos, al menos las reacciones de la materia viva sólo podían darse en las células vivas. Según este punto de vista, las reacciones biológicas se producían por la acción de una "fuerza vital" misteriosa en vez de mediante procesos físicos y químicos. El dogma vitalista quedó destruido en 1897, cuando dos hermanos alemanes, Eduard y Hans Buchner, observaron que los extractos de células de levadura destruidas (y completamente muertas) pueden llevar a cabo todo el proceso de la fermentación del azúcar hasta el etanol. Este descubrimiento abrió las puertas al análisis de las reacciones y los procesos bioquímicos **in vitro** (del latín, "en el vidrio"), es decir, en un tubo de ensayo en vez de **in vivo**, en la materia viva. En las décadas siguientes, se reprodujeron in vitro otras muchas reacciones metabólicas y rutas de reacciones, lo cual permitió la identificación de reactantes y productos y de las **enzimas**, o catalizadores biológicos, que aceleraban cada una de las reacciones bioquímicas.

La naturaleza de la catálisis biológica fue el último refugio de los vitalistas, que sostenían que las estructuras de las enzimas (o "fermentos") eran demasiado complejas para poder describirse en términos químicos. Sin embargo, en 1926, J. B. Sumner demostró que la proteína ureasa, una enzima de las judías, podía cristalizarse como cualquier otro compuesto orgánico. Aunque las proteínas tienen unas estructuras grandes y complejas, sólo son compuestos orgánicos, y sus estructuras pueden determinarse con los métodos de la química. Este descubrimiento hizo que acabara de derrumbarse el vitalismo.

Paralelamente a los avances de la bioquímica, los **biólogos celulares** han ido perfeccionando continuamente el conocimiento de la estructura celular. A partir de la primera observación de las células, realizada por Robert Hooke en el siglo XVII, las mejoras continuas de las técnicas microscópicas permitieron averiguar que la célula era una estructura compartimentada y compleja (véase la Figura 1.2). Walter Flemming descubrió los *cromosomas* en 1875, y en 1902 se realizó su identificación como elementos genéticos. La construcción del microscopio electrónico, entre los años 1930 y 1950, aportó todo un nuevo nivel de perspectiva dentro de la estructura celular. Desde este momento podían estudiarse orgánulos subcelulares como las *mitocondrias* y los *cloroplastos*, lo cual llevó a descubrir que los distintos procesos bioquímicos estaban localizados en estas partículas subcelulares.

Aunque los avances realizados en la primera mitad del siglo XX descubrieron a grandes rasgos las estructuras químicas de las sustancias biológicas, identificaron las reacciones de muchas rutas metabólicas y localizaron estas reacciones en el interior de la célula, la bioquímica continuaba siendo una ciencia incompleta. Sabíamos que la singularidad de un organismo está definida por la totalidad de sus reacciones químicas. Sin embargo, conocíamos poco sobre el control de estas reacciones en el tejido vivo o la manera de almacenar la información que regula estas reacciones, su transmisión cuando la célula se divide y su procesamiento cuando las células se diferencian.

La idea del **gen** como unidad de información hereditaria, fue propuesta por primera vez a mediados del siglo XIX por Gregor Mendel. Alrededor del año 1900, los biólogos celulares se dieron cuenta de que los genes deben encontrase en los cromosomas, que están formados por proteínas y ácidos nucleicos. Durante las décadas siguientes, la nueva ciencia de la **genética** aportó un cono-

cimiento cada vez más detallado de los patrones de herencia y de desarrollo. Sin embargo, hasta mediados del siglo XX nadie había aislado un gen, ni había determinado su composición química. Friedrich Miescher había aislado los ácidos nucleicos en 1869, pero sus estructuras químicas se conocían mal y a comienzos de siglo se pensaba que eran sustancias sencillas que cumplían tan sólo funciones estructurales en la célula. La mayor parte de los bioquímicos pensaban que tan sólo las proteínas eran lo suficientemente complejas desde el punto de vista estructural como para ser portadoras de la información genética.

Esta creencia era errónea. Los experimentos realizados en los años 1940 y comienzos de los años 1950 demostraron de manera concluyente que el **ácido desoxirribonucleico** (**DNA**) es el portador de la información genética. Uno de los avances más importantes en la historia de la ciencia se produjo en 1953, cuando James Watson y Francis Crick describieron la estructura de doble hélice del DNA. Este concepto sugirió inmediatamente las formas en las que podía codificarse la información en la estructura de las moléculas y transmitirse inalterada de una generación a la siguiente.

La biología molecular es una fusión de la bioquímica, la biología celular y la genética.

En este punto, las hebras del desarrollo científico que se muestran en la Figura 1.3, bioquímica, biología celular y genética, pasaron a entrelazarse, y apareció la nueva ciencia de la **biología molecular**. La distinción entre biología molecular y bioquímica no siempre está clara, puesto que ambas disciplinas toman como campo de actuación la definición completa de la vida en términos moleculares. El término *biología molecular* se suele utilizar en un sentido más limitado, para indicar el estudio de la estructura y función de los ácidos nucleicos y los aspectos genéticos de la bioquímica, un campo al que podríamos denominar con mayor exactitud *genética molecular*. La biología molecular y la bioquímica se diferencian tal vez con mayor facilidad por las orientaciones de los científicos que se dedican a ellas, que por los problemas de investigación que abordan. Puede afirmarse que los bioquímicos piensan como los químicos y que los biólogos moleculares piensan como los biólogos. Incluso esta distinción es en cierto modo artificial, puesto que los científicos de éxito de ambos campos deben utilizar métodos de todas las disciplinas pertinentes, como la química, la biología y la física. De hecho, tres de las técnicas de investigación más potentes que utilizan los bioquímicos las han desarrollado los físicos: la **microscopia electrónica**, que ha descubierto características notables de la estructura celular (véase Herramientas de la Bioquímica 1A), la **difracción de rayos X** y la **resonancia magnética nuclear**, que han descubierto la estructura tridimensional exacta de las enormes moléculas biológicas (véase Herramientas de la Bioquímica 4A y 6A).

LA BIOQUÍMICA COMO DISCIPLINA Y CIENCIA INTERDISCIPLINAR

La bioquímica extrae sus principales temas de muchas disciplinas: de la química orgánica, que describe las propiedades de las biomoléculas; de la biofísica, que aplica las técnicas de la física al estudio de las estructuras de las biomoléculas; de la investigación médica, que intenta cada vez más comprender los estados patológicos en términos moleculares; de la nutrición, que ha aclarado el metabolismo mediante la descripción de las necesidades alimentarias para el mantenimiento de la salud; de la microbiología, que ha demostrado que los organismos unicelulares y los virus son especialmente adecuados para la determinación de muchas rutas metabólicas y mecanismos de regulación; de la fisiología, que investiga los procesos vitales a nivel tisular y del organismo; de la biología celular, que describe la división bioquímica del trabajo en el interior de una célula; y de la genética, que describe el mecanismo que proporciona a una determinada célula u organismo su identidad bioquímica. La bioquímica ad-

quiere su fuerza de todas estas disciplinas y, a cambio, las nutre también; se trata de una ciencia realmente interdisciplinar.

La bioquímica es también una disciplina diferenciada, con su propia identidad. Se distingue por su énfasis en las estructuras y las reacciones de las biomoléculas, en especial las enzimas y la catálisis biológica; por la explicación de las rutas metabólicas y su control; y por el principio de que los procesos vitales pueden comprenderse mediante las leyes de la química. Cuando lea este libro, tenga en cuenta tanto el carácter propio de la bioquímica como disciplina diferenciada, como la absoluta interdependencia de la bioquímica con otras ciencias físicas y naturales.

La bioquímica como ciencia química

Para comprender la bioquímica, es preciso estudiar antes la química básica.

Aunque solemos describir la bioquímica como una ciencia de la vida y relacionamos sus avances con la historia de la biología, sigue siendo en primer lugar y ante todo una ciencia química. Para comprender la influencia de la bioquímica sobre la biología, es preciso conocer los elementos químicos de la materia viva y las estructuras completas de muchos compuestos biológicos (aminoácidos, azúcares, lípidos, nucleótidos, vitaminas y hormonas) y su comportamiento durante las reacciones metabólicas. Será preciso conocer la estequiometría y los mecanismos de un gran número de reacciones. Además, el conocimiento de los principios básicos de la termodinámica es esencial para entender de qué manera obtienen las plantas la energía de la luz del sol y cómo obtienen los animales la energía de los alimentos.

Todas las formas de vida, desde la célula bacteriana más pequeña hasta el ser humano, están formadas por los mismos elementos químicos, que se utilizan para elaborar los mismos tipos de moléculas. La química de la materia viva es similar en todo el mundo biológico. Indudablemente, esta continuidad de los procesos bioquímicos refleja el origen evolutivo común de todas las células y organismos. Empecemos por un examen preliminar de la composición de la materia viva, partiendo de los elementos químicos.

Los elementos químicos de la materia viva

La vida es un fenómeno de la segunda generación de estrellas. Esta afirmación, que parece bastante extraña, se basa en el hecho de que la vida, tal como la concebimos, sólo pudo aparecer cuando eran abundantes determinados elementos como carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo (C, H, O, N y P). El universo más primitivo estaba formado casi por completo por hidrógeno y helio, puesto que tan sólo se produjeron estos elementos más sencillos en la condensación de la materia tras la explosión inicial o "big bang". La primera generación de estrellas no contenía elementos más pesados con los que pudieran formarse los planetas. Cuando estas primeras estrellas maduraron, a lo largo de miles de millones de años, quemaron su hidrógeno y helio en reacciones termonucleares. Estas reacciones produjeron elementos más pesados, primero carbono, nitrógeno y oxígeno, y más tarde, todos los demás elementos de la tabla periódica. Al madurar las estrellas grandes, se hicieron inestables y explotaron en forma de novas y supernovas, diseminando los elementos más pesados por todo el entorno cósmico. Esta materia se condensó de nuevo para formar las estrellas de segunda generación, con sistemas planetarios con abundancia de elementos pesados. Nuestro universo, que ahora contiene una abundante cantidad de estrellas de segunda generación, tiene una composición de elementos que corresponde aproximadamente a la que se indica en la Figura 1.4. En este uni-

verso existe la posibilidad de vida, y sabemos que al menos en un planeta, de un sistema solar, existe vida.

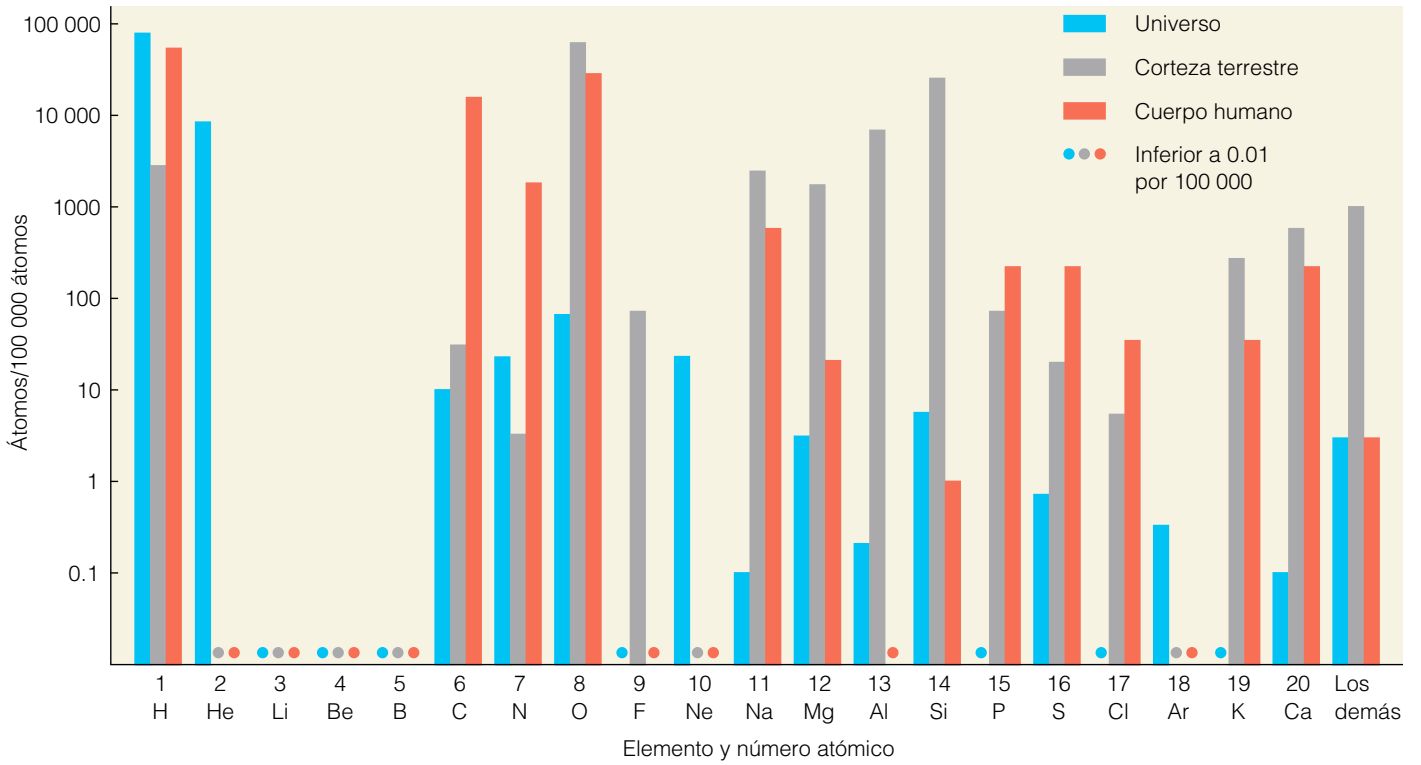
¿Por qué son esenciales los elementos más pesados que el H y el He para la vida? La respuesta es que la vida, tal como podemos concebirla, requiere estructuras moleculares grandes y complejas. Estas estructuras tan sólo pueden formarse a partir de determinados elementos y sólo pueden ser estables en unas condiciones ambientales limitadas. Un universo de hidrógeno y helio no tiene química. Tampoco es posible la química en el calor de las estrellas, donde todos los compuestos se descomponen en sus elementos. En medios tan fríos como la luna o el espacio, puede producirse una química sencilla y lenta, pero no podemos pensar en la formación de moléculas tan complejas como las proteínas o los ácidos nucleicos. Tan sólo puede aparecer la vida en un medio ambiente templado de un planeta adecuado, con una cantidad abundante de elementos capaces de formar compuestos complicados.

La vida se basa fundamentalmente en unos pocos elementos (C, H, O, N), aunque hay muchos otros que se utilizan en menor cantidad.

Las criaturas vivas de la tierra están formadas fundamentalmente por muy pocos elementos; básicamente, carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno (C, H, O, N), como se indica en la Figura 1.4. Adviértase que estos elementos, con la adición del helio y el neón, son también los más abundantes del universo. El helio y el neón son gases inertes que no tienen las propiedades necesarias para desempeñar alguna función en los procesos vitales; no forman compuestos estables y se pierden fácilmente de las atmósferas de los planetas.

FIGURA **1.4**

Composición del universo, la corteza terrestre y el cuerpo humano. Las cantidades se expresan como número de átomos de cada elemento por cada 100 000 átomos. Obsérvese que la escala es logarítmica. En una escala lineal, el H y el He dominarían de manera abundante en el universo, el O y el Si en la corteza terrestre, y el H, el C, el N y el O en el cuerpo. Un círculo indica menos de 0.01 átomos del elemento por cada 100 000 átomos.



La abundancia de oxígeno e hidrógeno en los organismos se explica en parte por el importante cometido que desempeña el agua en la vida sobre la tierra. Vivimos en un mundo muy acuoso y, como veremos en el Capítulo 2, las propiedades disolventes del agua son indispensables en los procesos bioquímicos. De hecho, el cuerpo humano está formado en un 70%, aproximadamente, por agua. Los elementos C, H, O y N son importantes para la vida, debido a su fuerte tendencia a formar enlaces covalentes. En concreto, la estabilidad de los enlaces carbono-carbono y la posibilidad de formar enlaces simples, dobles o triples dan al carbono la versatilidad necesaria para formar parte de una enorme diversidad de compuestos químicos.

Pero la vida no está formada solamente por estos cuatro elementos. Otros muchos son necesarios en los organismos terrestres, como puede observarse en la Tabla 1.1. Un "segundo nivel" de elementos esenciales es el formado por el azufre y el fósforo, que forman enlaces covalentes, y los iones Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} y Cl^-. El azufre es un componente importante de las proteínas, y el fósforo desempeña funciones esenciales en el metabolismo energético y en la estructura de los ácidos nucleicos. Más allá de los dos primeros niveles de elementos, que corresponden aproximadamente a los elementos más abundantes de las dos primeras filas de la tabla periódica, llegamos a los que desempeñan cometidos cuantitativamente menores, aunque a menudo indispensables. Como muestra la Tabla 1.1, la mayor parte de estos elementos de tercer y cuarto nivel son metales, y algunos de ellos actúan como colaboradores de la catálisis de las reacciones bioquímicas. En los capítulos sucesivos encontraremos muchos ejemplos de la importancia de estos oligoelementos para la vida.

TABLA 1.1 Elementos que se encuentran en los organismos

Elemento	Comentario
Primer Nivel	
Carbono (C)	Los más abundantes en *todos los organismos*
Hidrógeno (H)	
Nitrógeno (N)	
Oxígeno (O)	
Segundo Nivel	
Calcio (Ca)	Mucho menos abundantes, pero se encuentran en *todos los organismos*
Cloro (Cl)	
Magnesio (Mg)	
Fósforo (P)	
Potasio (K)	
Sodio (Na)	
Azufre (S)	
Tercer Nivel	
Cobalto (Co)	Metales presentes en pequeñas cantidades en *todos los organismos*, pero son esenciales para la vida
Cobre (Cu)	
Hierro (Fe)	
Manganeso (Mn)	
Zinc (Zn)	
Cuarto Nivel	
Aluminio (Al)	Se encuentran o son necesarios en *algunos organismos* en cantidades mínimas
Arsénico (As)	
Boro (B)	
Bromo (Br)	
Cromo (Cr)	
Flúor (F)	
Galio (Ga)	
Yodo (I)	
Molibdeno (Mo)	
Níquel (Ni)	
Selenio (Se)	
Silicio (Si)	
Wolframio (W)	
Vanadio (V)	

MOLÉCULAS BIOLÓGICAS

La complejidad de los procesos de la vida requiere que muchas de las moléculas que participan en estos procesos sean enormes. El ejemplo más extremo es el DNA. Consideremos, por ejemplo, las moléculas de DNA liberadas de un cromosoma humano, como se muestra en la Figura 1.5. La cadena larga y plegada que se observa corresponde a tan sólo dos moléculas enormes, cada una con un peso molecular de aproximadamente 20 000 millones de dalton (un dalton [Da] es 1/12 la masa de un átomo de carbono 12, 1.66×10^{-24} g). Incluso un organismo sencillo como la bacteria unicelular *Escherichia coli* contiene una molécula de DNA con un peso molecular de alrededor de 2000 millones de Da. Las moléculas proteicas tienen generalmente un tamaño mucho menor, pero son todavía grandes, puesto que una proteína característica posee una masa de 50 000 dalton. Para dar una idea de la complejidad de una molécula de este tipo, en la Figura 1.6 se presenta la estructura tridimensional de una molécula proteica obtenida mediante cristalografía de rayos X.

Estas moléculas gigantes o **macromoléculas**, constituyen una parte importante de la masa de cualquier célula. Como veremos con mayor detalle en los capítulos posteriores, existen buenas razones para que algunas moléculas biológicas sean tan grandes. Así por ejemplo, las moléculas de DNA pueden considerarse como "cintas" de las que se extrae linealmente la información genética. Como la cantidad de información necesaria para especificar la estructura de un organismo multicelular es muy grande, estas cintas deben ser extraordinariamente largas. De hecho, las moléculas de DNA de una sola célula humana, si se extendieran de extremo a extremo, alcanzarían una longitud de unos 2 metros.

La síntesis de estas moléculas tan grandes plantea un reto interesante a la célula. Si ésta funcionara como un químico orgánico que realizara una síntesis de

Muchas de las moléculas importantes de la célula son de un tamaño enorme.

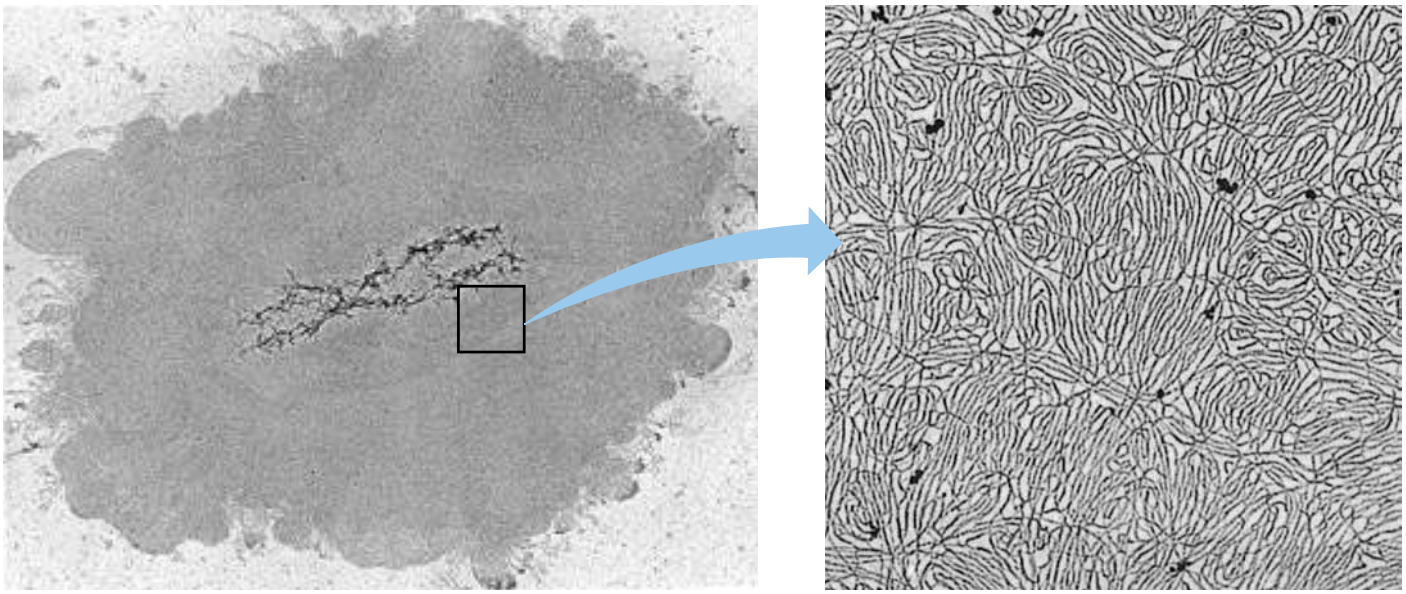


FIGURA **1.5**

DNA de un solo cromosoma humano. La mayor parte de las proteínas cromosómicas se han extraído, dejando sólo un "esqueleto" proteico del que surgen enormes lazos de DNA. En este cromosoma sólo hay dos moléculas de DNA. La amplificación de la derecha muestra la fibra larga de DNA con mayor detalle. La fibra tiene unos 2 nm de ancho.

Cortesia de J. Paulson and U. K. Laemmli, *Cell* 12 (1977):817: © 1997 Cell Press.

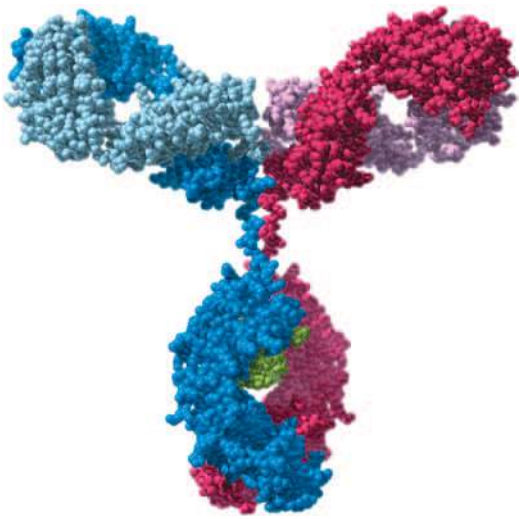


FIGURA **1.6**

Una molécula de proteína. Se presenta aquí un modelo de una molécula de inmunoglobulina que es una molécula que actúa como anticuerpo en la reacción inmunitaria. Tiene un peso molecular de aproximadamente 150 000 Da. La molécula está formada por dos mitades o subunidades idénticas.

Adaptado de Eduardo A. Padlan, *Mol. Imm.* (1994) 31:169–217. © 1994 con permiso de Elsevier Science.

laboratorio compleja, fragmento a fragmento, se producirían millones de tipos diferentes de reacciones y se acumularían miles de intermediarios. En su lugar, las células utilizan un planteamiento modular para elaborar las moléculas grandes. Todas estas estructuras son **polímeros** formados por la unión de unidades prefabricadas o **monómeros**. Los monómeros de un determinado tipo de macromolécula son de una diversidad limitada y se unen entre ellos o **polimerizan**, mediante mecanismos idénticos. Un ejemplo sencillo es el hidrato de carbono **celulosa** (Figura 1.7a), un componente fundamental de las paredes celulares de las plantas. La celulosa es un polímero formado por la unión de mi-

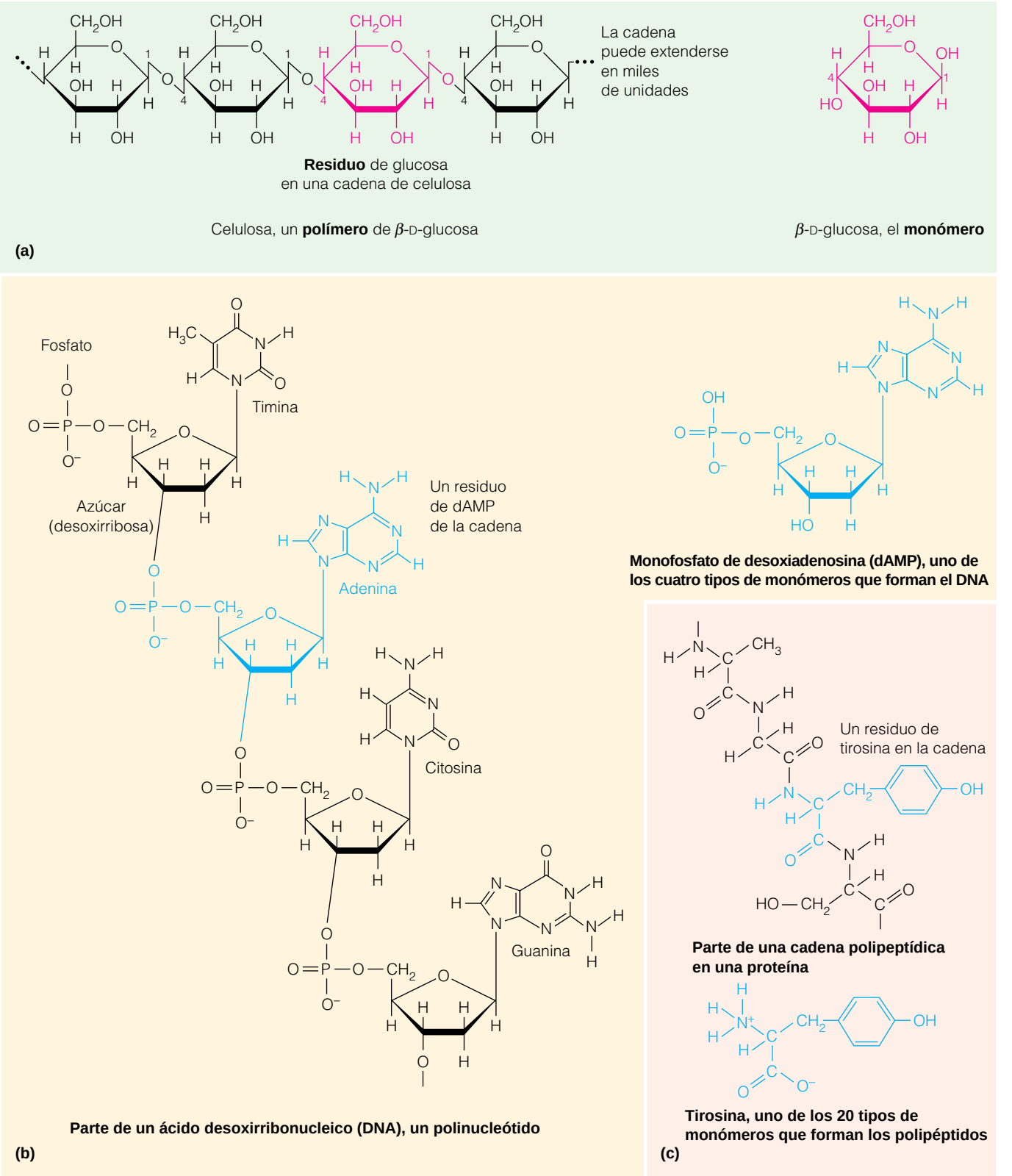


FIGURA **1.7**

Ejemplos de polímeros. **(a)** Un hidrato de carbono. El hidrato de carbono celulosa es un polímero de monómeros de β-D-glucosa. **(b)** Un ácido nucleico. Los ácidos nucleicos, DNA y RNA, son polímeros de nucleótidos. Se muestra una parte de la molécula de DNA, junto con uno de sus monómeros, el dAMP. **(c)** Un polipéptido. Las cadenas proteicas, o polipéptidos, son polímeros de aminoácidos. Se muestra una parte de un polipéptido, junto con uno de sus monómeros, la tirosina.

les de moléculas de glucosa, un azúcar simple; en este polímero, son idénticos todos los enlaces químicos entre los monómeros. Se forman enlaces covalentes entre las unidades de glucosa mediante la eliminación de una molécula de agua entre dos moléculas adyacentes de glucosa; la parte de una molécula de glucosa que queda en la cadena se denomina **residuo** de glucosa.

Los biopolímeros principales son los ácidos nucleicos, las proteínas y los polisacáridos. Todas estas sustancias son polímeros formados por una o más clases de unidades monoméricas.

Dado que la celulosa es un polímero de un azúcar simple, o **sacárido**, se llama **polisacárido**. Este polímero concreto se elabora a partir de unidades monoméricas idénticas, por lo que se denomina **homopolímero**. En cambio, otros muchos polisacáridos y todos los ácidos nucleicos y las proteínas son **heteropolímeros**, es decir, polímeros formados a partir de diversos tipos de unidades monoméricas. Los ácidos nucleicos (Figura 1.7b) son polímeros de cuatro **nucleótidos**, y por este motivo a los ácidos nucleicos se les denomina también **polinucleótidos**. De igual modo, las proteínas (Figura 1.7c) se forman mediante las combinaciones de 20 **aminoácidos** diferentes. Las cadenas proteicas se denominan **polipéptidos**, término que procede del **enlace peptídico** que une a dos aminoácidos.

Los polímeros forman la mayor parte de la maquinaria estructural y funcional de la célula. Los polisacáridos actúan como componentes estructurales, como la celulosa, y como reservas de energía biológica, como el **almidón**, otro tipo de polímero de glucosa presente en las plantas. Los ácidos nucleicos, DNA y RNA, participan en el almacenamiento, transmisión y expresión de la información. El DNA o ácido desoxirribonucleico, actúa principalmente como almacén de la información genética, mientras que el **RNA** o **ácido ribonucleico**, de estructura similar, interviene en la extracción de la información almacenada en el DNA. Las proteínas, que tienen una diversidad estructural muy superior a la de los polisacáridos o los ácidos nucleicos, realizan un conjunto más diverso de funciones biológicas. Algunas de ellas desempeñan cometidos estructurales, como la queratina en el pelo y la piel y el colágeno en el tejido conjuntivo. Otras actúan como sustancias transportadoras, cuyo ejemplo destacado es la hemoglobina, la proteína que transporta oxígeno en la sangre. Las proteínas pueden transmitir información entre partes distantes de un organismo, como lo hacen las **hormonas** proteicas y los **receptores** de la superficie celular que reciben las señales de las hormonas, o pueden defender al organismo frente a la infección, como lo hacen los **anticuerpos**. Las más importantes de todas, las proteínas que actúan como enzimas, catalizan las miles de reacciones químicas que se producen en el interior de cada célula.

Los lípidos son los principales componentes de las membranas biológicas.

Además de estas macromoléculas y de las múltiples moléculas pequeñas que intervienen en el metabolismo y como monómeros en la síntesis macromolecular, existe otra clase extraordinariamente importante de componentes celulares. Los **lípidos** son un grupo de compuestos químicamente diverso que se clasifican juntos debido a sus estructuras con abundantes hidrocarburos, que les proporcionan una solubilidad muy baja en el medio acuoso de la célula. Esta baja solubilidad dota a los lípidos para una de sus funciones más importantes, la de actuar como el elemento estructural principal de las **membranas** que rodean a las células y que las dividen en varios compartimientos.

La bioquímica como ciencia biológica

No debemos perder de vista en ningún momento el hecho de que lo que aquí nos ocupa es la química de la *vida*. Las sustancias químicas complejas y las reacciones que hemos presentado anteriormente tienen su importancia como partes de la materia viva y de los procesos vitales. Para contemplar la bioquímica desde esta perspectiva, debemos empezar por preguntarnos: ¿qué es la vida?

CARACTERÍSTICAS QUE DISTINGUEN A LA MATERIA VIVA

¿Qué es lo que distingue a la materia viva de la que no tiene vida? El primer atributo que nos viene a la mente es la gran *complejidad* de las criaturas vivas, incluso las más sencillas. Pero la complejidad no es suficiente; hay muchas cosas en el universo que son complejas y que no tienen vida. Un ratón muerto es, al menos durante un breve período de tiempo, casi tan complicado como uno vivo. Tampoco podemos diferenciar la materia viva de la que no tiene vida simplemente en función de la *motilidad*, puesto que muchas cosas que carecen por completo de motilidad (como las setas), están bien vivas.

La cualidad principal que diferencia a la vida es la constante *renovación* de una estructura muy ordenada, que se acompaña a menudo de un aumento de la complejidad de esa estructura. Los organismos crean un orden molecular magnífico dentro de ellos mismos y transmiten un patrón de ese orden a sus descendientes. Esta creación y duplicación del orden, que se diferencia del entorno a menudo caótico, es una característica propia de la vida, y parece ir en contra de una de las leyes fundamentales del universo, la **segunda ley de la termodinámica**. Una forma de expresar esta segunda ley es la siguiente: el desorden global del universo aumenta de manera continua. Pero la segunda ley de la termodinámica no exige que el desorden aumente en todos los lugares y en todos los momentos; las criaturas vivas son como pequeños remolinos de orden dentro de la corriente del universo. No obstante, las leyes de la termodinámica exigen que esta creación local de orden y complejidad en la materia esté compensada por un gasto continuo de energía. Éste es el motivo por el que los seres vivos deben captar siempre energía de su entorno, ya sea de la luz solar, como hacen las plantas, ya sea del alimento, como hacen los animales. Para obtener energía, todo organismo debe interactuar con su entorno y, en muchos casos, debe actuar sobre él, como hacemos los seres humanos. Ningún organismo puede sobrevivir aislado de su entorno.

La vida se basa en la creación y duplicación de orden en un medio caótico. Esta ordenación utiliza energía.

Por último, y en cierto sentido lo más importante de todo, la vida se *autorreproduce*. Se ha sugerido que los "organismos" más primitivos, en los albores de la vida, no eran más que moléculas gigantes que podían dirigir su propia replicación. El proceso reproductor ha llegado a ser extraordinariamente complejo a lo largo de la evolución, pero su base continúa siendo idéntica: la información que describe la estructura de un organismo se transmite de una generación a la siguiente. Así pues, aunque cada criatura individual deba perder finalmente su propia batalla con el caos, la vida en sí continúa.

¿Cómo surgió este notable proceso que llamamos vida? No lo sabemos, pero sí sabemos que es verdaderamente antiguo, casi tan viejo como la misma tierra. La tierra se condensó del polvo cósmico hace unos 4.5 miles de millones de años, aunque los trazos reconocibles de microbios vivos tienen 3.8 miles de millones de años, sólo 700 millones de años más tarde. Es posible que algunos de estos organismos primitivos (o proto-organismos) utilizaran bloques de construcción químicos ya formados. Por ejemplo, se han encontrado trazas de aminoácidos en los meteoritos, lo cual demuestra que estas sustancias pueden generarse de forma abiótica.

Cualquiera que sea su origen, sabemos que los primeros organismos debieron vivir una existencia anaerobia, ya que la tierra carecía de oxígeno libre. De hecho, se piensa que todo el oxígeno presente en la actualidad en la atmósfera de la tierra es el producto de la fotosíntesis de algas y plantas. Probablemente se requirieron 1-2 miles de millones de años para que se acumulara la cantidad de oxígeno actual. La vida no sólo ocupó este planeta, sino que lo construyó de nuevo.

LA UNIDAD DE LA ORGANIZACIÓN BIOLÓGICA: LA CÉLULA

Todas las criaturas vivas están formadas por células. Todas las células tienen aproximadamente el mismo tamaño.

Uno de los primeros descubrimientos principales de la biología fue la observación de Robert Hooke (1665) de que los tejidos de las plantas (en este caso, el corcho) estaban divididos en minúsculos compartimientos, a los que denominó *cellulae* o **células**. En 1840, el perfeccionamiento en la observación de muchos tejidos llevó a Theodor Schwann a proponer que todos los organismos existen bien como células únicas o bien como agregados de células. Más de un siglo de cuidadosos estudios realizados por los citólogos han confirmado esta hipótesis.

Además, las células de cualquier organismo son de un tamaño bastante similar. La mayor parte de las células bacterianas tienen 1-2 μm de diámetro, y la mayoría de las células de los organismos superiores sólo son unas 10-20 veces mayores, mientras que las células vegetales son algo más grandes que las animales. Existen, ciertamente, excepciones: hay bacterias muy pequeñas (0.2 μm) y existen células poco comunes, como las del sistema nervioso de los vertebrados, que pueden llegar a tener una longitud de más de 1 m. Pero en comparación con la gama de tamaños existentes en los organismos naturales (Figura 1.8), todos los tamaños celulares son muy parecidos.

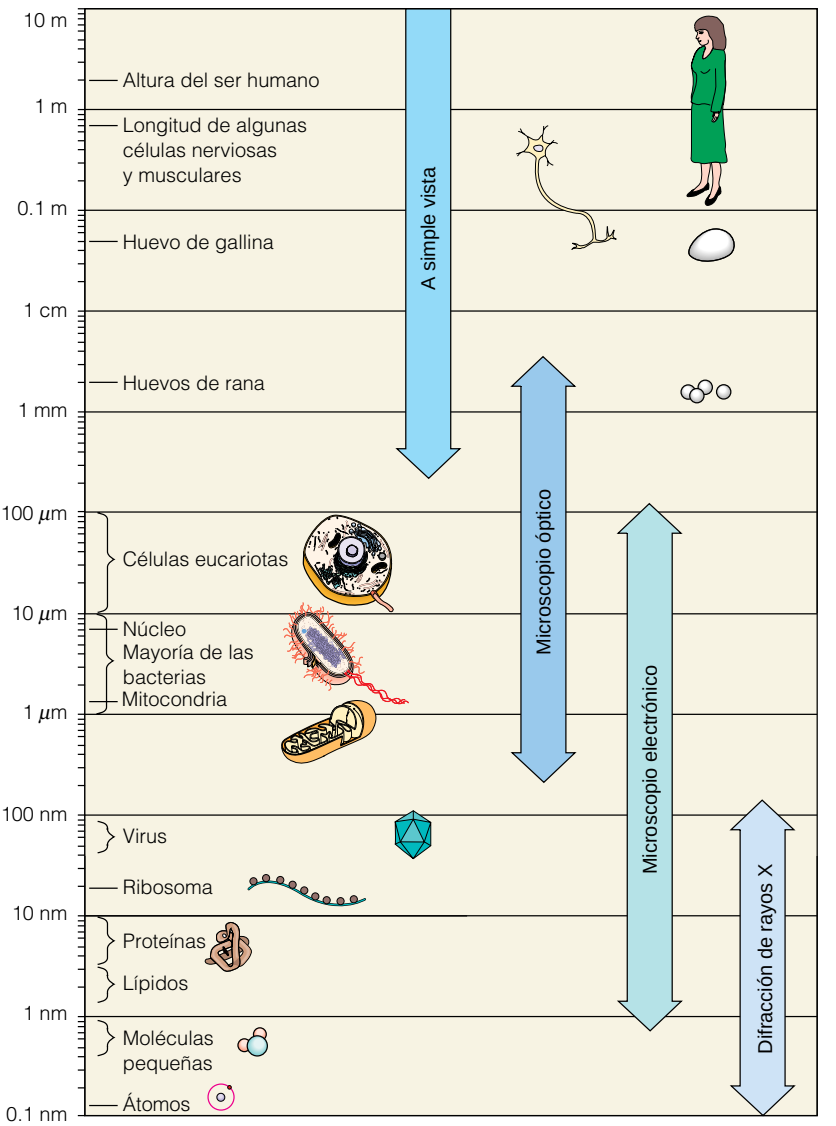


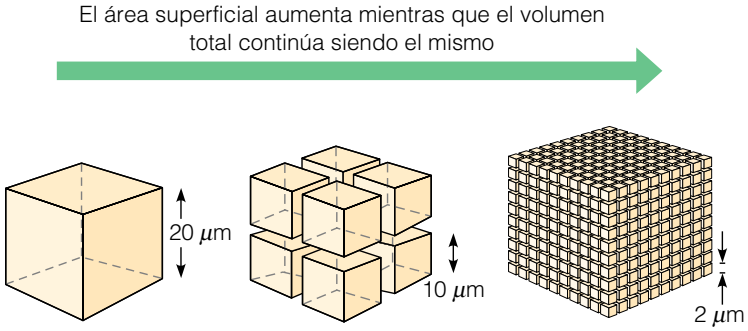
FIGURA **1.8**

Tamaño de los objetos estudiados por los bioquímicos y los biólogos. Obsérvese que la escala es logarítmica. Se indican mediante flechas los límites aproximados de los diferentes métodos utilizados para observar la estructura.

El tamaño de las células no guarda relación con el tamaño del organismo, tanto en los vegetales como en los animales. Un elefante y una pulga tienen células de un tamaño aproximadamente igual; lo único que ocurre es que el elefante tiene un mayor número de células. ¿Por qué se mantiene esa uniformidad en el tamaño celular? Podemos encontrar una pista en el hecho de que la proporción superficie/volumen de un objeto de una forma determinada depende de su tamaño (Figura 1.9). Los procesos químicos complejos que se producen en una célula y las grandes moléculas que participan en ellos requieren un volumen importante. Además, la célula debe intercambiar también sustancias con su entorno, para mantener el metabolismo activo existente en su interior. Una célula demasiado grande no tendrá la superficie suficiente para que se produzca este intercambio, a no ser que sea muy alargada, como una célula nerviosa de un vertebrado, con lo que aumenta su proporción superficie/volumen. Las células bacterianas son más pequeñas que las células de los organismos superiores porque el metabolismo bacteriano es más sencillo. Los virus, que son aún más pequeños que las bacterias, no poseen un metabolismo propio, sino que existen como parásitos en las células que invaden.

Dado que las células son las unidades universales de la vida, las analizaremos con más detalle. Las principales diferencias entre las estructuras celulares definen las dos grandes clases de organismos: procariotas y eucariotas. Los **procariotas**, que son siempre unicelulares, comprenden las **bacterias** verdaderas (eubacterias) y una clase antigua denominada **arqueobacterias**. En la Figura 1.10 se muestra esquemáticamente un organismo procariota característico. Las células procariotas están rodeadas por una membrana plasmática y, general-

Las dos grandes clases de organismos existentes tienen tipos celulares diferentes. Las células procariotas no están compartimentadas; las células eucariotas poseen orgánulos limitados por membranas.



Longitud de un lado	20 μm	10 μm	2 μm
Área superficial total (altura × anchura × número de lados × número de cubos)	2400 μm^2	4800 μm^2	24 000 μm^2
Volumen total (longitud × anchura × altura × número de cubos)	8000 μm^3	8000 μm^3	8000 μm^3
Proporción de área superficial respecto a volumen (área superficial ÷ volumen)	0.3	0.6	3.0

FIGURA **1.9**

Manera en la que la proporción superficie/volumen depende del tamaño. Si dividimos un determinado volumen en elementos cada vez más pequeños, la proporción de la superficie respecto al volumen aumenta de manera extraordinaria. De esta manera, los objetos pequeños tienen una proporción superficie/volumen mayor que los más grandes y pueden comunicar mejor con su ambiente.

Tomado de W. M. Becker, L. J. Kleinsmith, y J. Hardin, *The World of the Cell,* 4ª ed. (San Francisco, CA: Addison Wesley Longman, 2000) © Addison Wesley Longman, Inc.

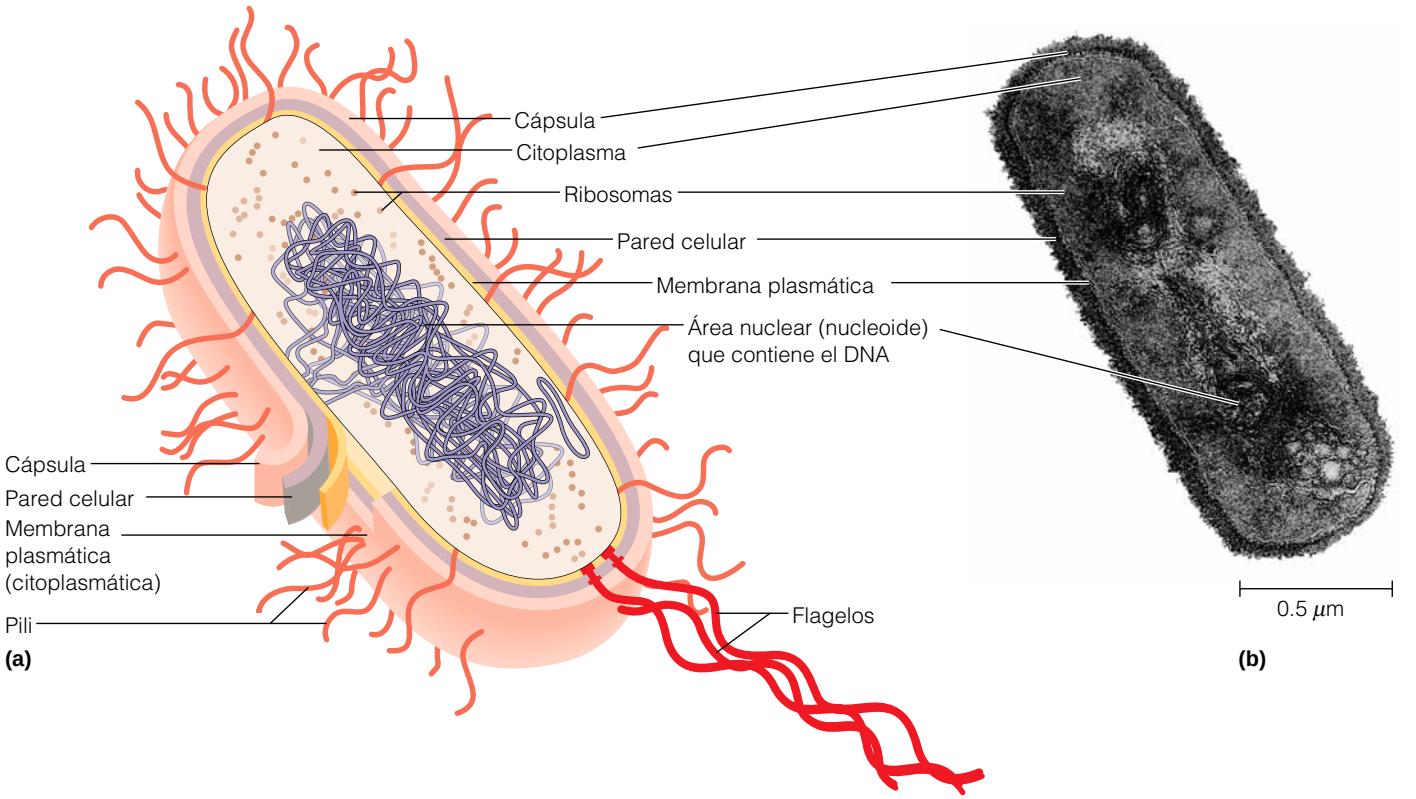


FIGURA **1.10**

Células procariotas. **(a)** Imagen esquemática de una célula bacteriana representativa. La molécula de DNA que constituye la mayor parte del material genético está enrollada en una región denominada nucleoide, que comparte el líquido del interior de la célula (el citoplasma) con los ribosomas (que sintetizan las proteínas), otras partículas y una amplia variedad de moléculas disueltas. La célula está limitada por una membrana plasmática, por fuera de la cual suele haber una pared celular bastante rígida. Muchas bacterias tienen también una cápsula externa gelatinosa. A partir de la superficie salen vellosidades o pili, que fijan la célula a otras células o superficies, y uno o varios flagelos, que permiten a la célula nadar en un medio líquido. **(b)** Fotografía de microscopia electrónica de una célula bacteriana. Esta imagen se obtuvo mediante un corte fino de una célula de la bacteria *Bacillus coagulans* en fase de división. Las áreas claras corresponden a los dos nucleoides, y los gránulos oscuros corresponden a los ribosomas.

(b) Cortesía de S. C. Holt, University of Texas Health Center/BPS.

mente, también por una pared celular rígida. Dentro de la membrana se encuentra el **citoplasma**, que contiene el **citosol**, una solución o suspensión semilíquida concentrada, y las estructuras que están suspendidas en el mismo. En los procariotas, el citoplasma no está dividido en compartimientos y la información genética se encuentra en forma de una o varias moléculas de DNA que están libres en el citosol. También están suspendidos en el citosol los **ribosomas**, que constituyen la maquinaria molecular para la síntesis de proteínas. La superficie de las células procariotas puede poseer **pili** o vellosidades, que facilitan la fijación del organismo a otras células o superficies, y **flagelos**, que le permiten nadar.

El resto de los organismos se denominan **eucariotas**, y comprenden los vegetales y los animales multicelulares, así como los organismos unicelulares y multicelulares simples denominados protozoos, hongos y algas. En la Tabla 1.2 se indican algunas de las muchas diferencias existentes entre los eucariotas y los procariotas. La mayor parte de las células eucariotas son de mayor tamaño (unas 10 veces mayores) que las células procariotas, pero compensan este mayor tamaño mediante una *compartimentación*. Sus funciones especializadas se llevan a cabo en **orgánulos**, que son estructuras rodeadas por una membrana que están inmersas en el citoplasma circundante.

En la Figura 1.11 se presentan imágenes esquemáticas de células idealizadas de animales y vegetales. Los orgánulos más importantes que son comunes a la mayor parte de las células eucariotas son las **mitocondrias**, que se especializan en el metabolismo oxidativo; el **retículo endoplásmico** que es una estructura de membranas plegadas, con abundantes ribosomas y donde tiene lugar gran parte de la síntesis de proteínas; el **complejo de Golgi**, que son cámaras unidas a membranas que intervienen en la secreción y el desplazamiento intracelular de las nuevas proteínas, y el **núcleo**. El núcleo de una célula eucariota contiene la

TABLA 1.2 Comparación de algunas propiedades de las células procariotas y eucariotas

	Células Procariotas	Células Eucariotas
Tamaño	0.2–5 μm de diámetro	La mayoría tiene 10–50 μm de diámetro
Compartimentación interna	No	Sí, con varios tipos de orgánulos
Localización del DNA	Libre en el citoplasma como nucleoide	En el núcleo, condensado con proteínas formando múltiples cromosomas
Ploidía[a]	Generalmente haploide	Casi siempre diploide o poliploide
Mecanismo de replicación celular	División simple tras la replicación del DNA	Mitosis en las células somáticas, meiosis en los gametos[b]

[a]El término *ploidía* representa el número de copias de la información genética que lleva cada célula. Las células haploides poseen una sola copia, las células diploides dos y las células poliploides más de dos.

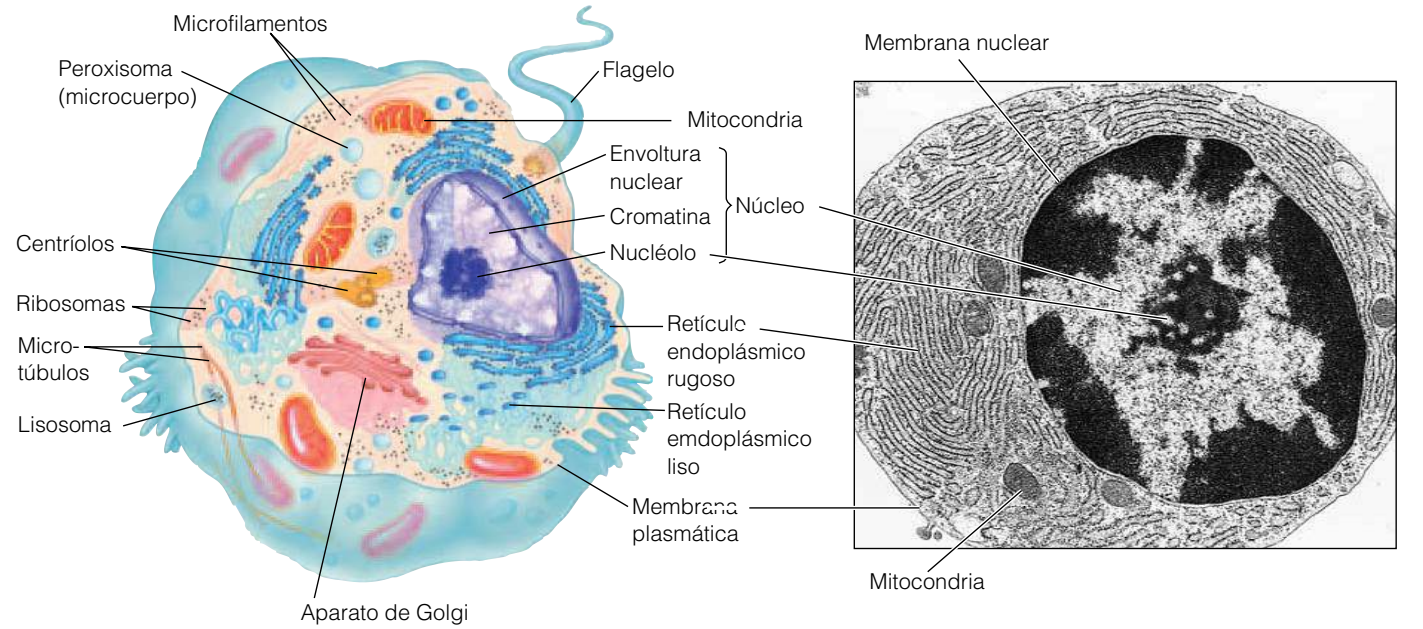
[b]En la mitosis, el estado diploide se mantiene mediante la duplicación cromosómica, lo cual se produce en la mayoría de las células *somáticas* o "corporales" de los organismos. En las células que producen los gametos (espermatozoides u óvulos) se produce un proceso algo diferente, denominado meiosis, que da lugar a un estado haploide.

información genética de la célula, codificada en el DNA, que está empaquetado en los **cromosomas**. Una parte de este DNA está subempaquetado en una región densa del interior del núcleo, denominada **nucléolo**. Alrededor del núcleo hay una **envoltura nuclear**, perforada por poros a través de los cuales se comunican el núcleo y el citoplasma.

También existen orgánulos específicos de las células vegetales o animales. Así, por ejemplo, las células animales contienen unos cuerpos digestivos denominados **lisosomas**, de los que carecen las células vegetales. Por su parte, éstas tienen **cloroplastos**, que son los lugares en los que se produce la fotosíntesis y, generalmente una **vacuola** grande llena de agua. Además, mientras que la mayor parte de las células animales están rodeadas tan sólo por una **membrana plasmática**, las células vegetales suelen tener una **pared celular** dura de celulosa por fuera de la membrana. Los **cuerpos basales** actúan como anclajes para los cilios o flagelos en las células que poseen estos apéndices.

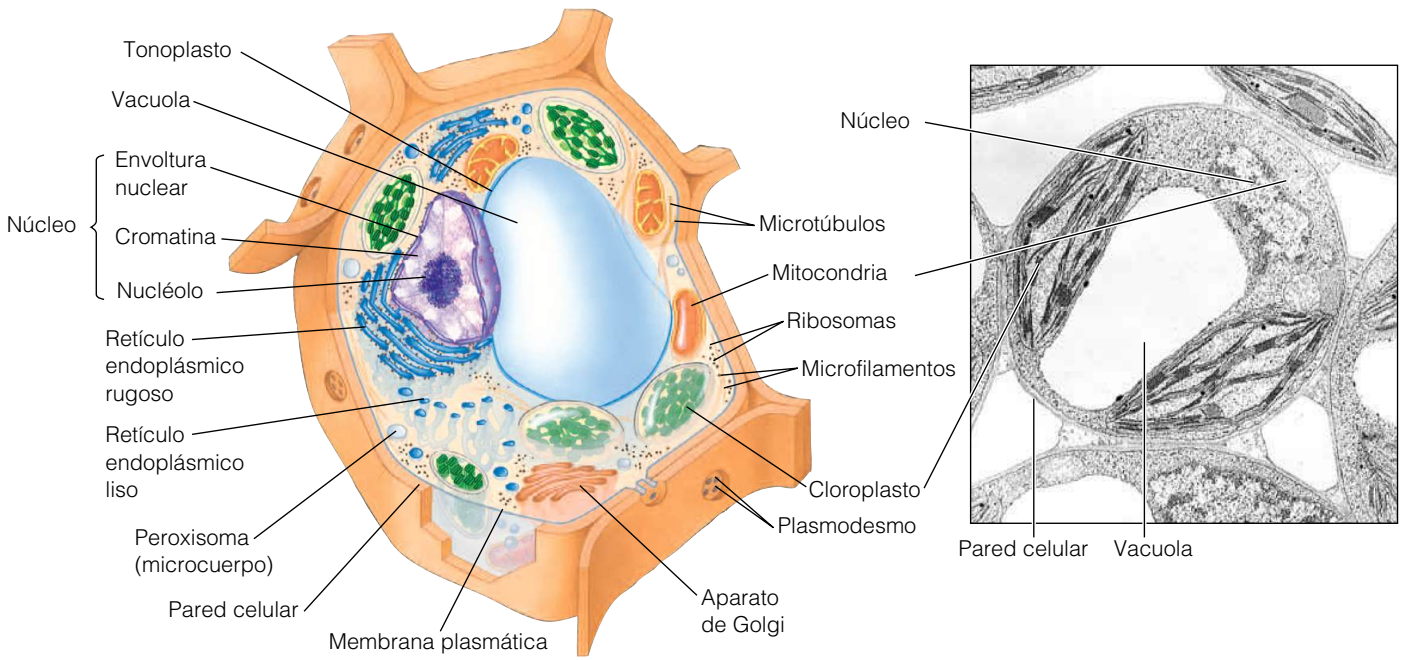
A menudo resulta útil considerar la célula como una fábrica, analogía que utilizaremos con frecuencia en los capítulos posteriores. Las membranas envuelven toda la estructura y separan los distintos orgánulos, que pueden considerarse departamentos con funciones especializadas. Así, por ejemplo, el núcleo es la administración central. Contiene, en su DNA, una biblioteca de información para las estructuras y procesos celulares, y emite instrucciones para la regulación adecuada de los negocios de la célula. Los cloroplastos y las mitocondrias son los generadores de energía (siendo los primeros solares, y los segundos quemadores de combustible). El citoplasma es el área de trabajo general, en donde la maquinaria proteica (enzimas) lleva a cabo la formación de moléculas nuevas a partir de las materias primas importadas. Los canales moleculares especiales en las membranas entre los compartimientos y entre la célula y su entorno regulan el flujo de moléculas en las direcciones adecuadas. Al igual que las fábricas, las células tienden a especializarse en su función. Así, por ejemplo, muchas de las células de los organismos superiores están dedicadas en gran parte a la producción y exportación de uno o unos pocos productos moleculares.

Las células eucariotas que se presentan en la Figura 1.11 son representaciones idealizadas de sus clases. La Figura 1.12, en la que se muestran imágenes microscópicas de varios tipos celulares reales, proporciona una idea mejor de la diversidad de formas en que las células han evolucionado para adaptarse a las necesidades de los organismos. Pero por muy diferentes que puedan ser estas células, todas ellas están formadas por los mismos tipos de moléculas y macromoléculas que hemos comentado en el apartado anterior. La Figura 1.13 nos da una idea de la forma en que estos tipos de moléculas están distribuidos en una célula.



(a) Célula animal característica

(b) Leucocito



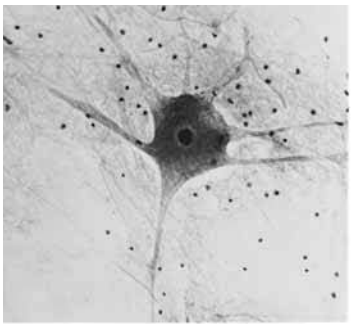
(c) Célula vegetal característica

(d) Célula de una hoja de *Coleus*

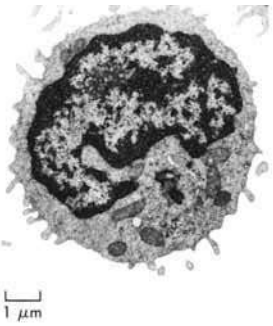
FIGURA **1.11**

Células eucariotas. **(a)** Imagen esquemática de una célula animal representativa. **(b)** Fotografía de microscopia electrónica de una célula animal. En la microfotografía se observa un corte fino de un leucocito. **(c)** Imagen esquemática de una célula vegetal característica. Obsérvese la presencia de cloroplastos, una vacuola grande y una pared celular rígida, que diferencia a esta célula de una célula animal. **(d)** Fotografía de microscopia electrónica de una célula vegetal. La microfotografía muestra un corte fino de una célula de una hoja de *Coleus*.

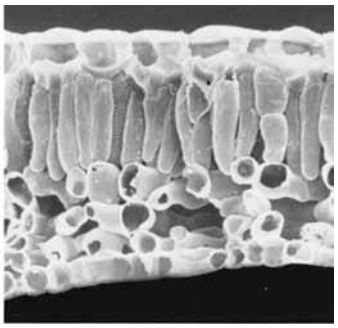
(a, c) Tomado de Neil Campbell, Jane Reece, y Larry Mitchell, *Biology, 5ª* ed. (Menlo Park, CA: Addison Wesley Longman, 1999) © Addison Wesley Longman, Inc.; **(b)** Courtesy of R. Rodewald, University of Virginia/BPS; **(d)** W. P. Wergin; courtesy of E. H. Newcomb, University of Wisconsin–Madison.



(a) Una célula nerviosa de la médula espinal humana



(b) Un linfocito B inmaduro



(c) Células de la hoja del helecho *Salvinia*

FIGURA **1.12**

Ejemplos de células. El recuadro **(a)** corresponde a una imagen de microscopia óptica, el recuadro **(b)** a una de microscopia electrónica de transmisión y el recuadro **(c)** a una de microscopia electrónica de barrido.

(a) © Ed Reschke; **(b)** Cortesía de la Dra. Dorothea Zucker-Franklin, New York University School of Medicine; **(c)** Cortesía de Judith Croxdale, Universidad de Wisconsin, Madison.

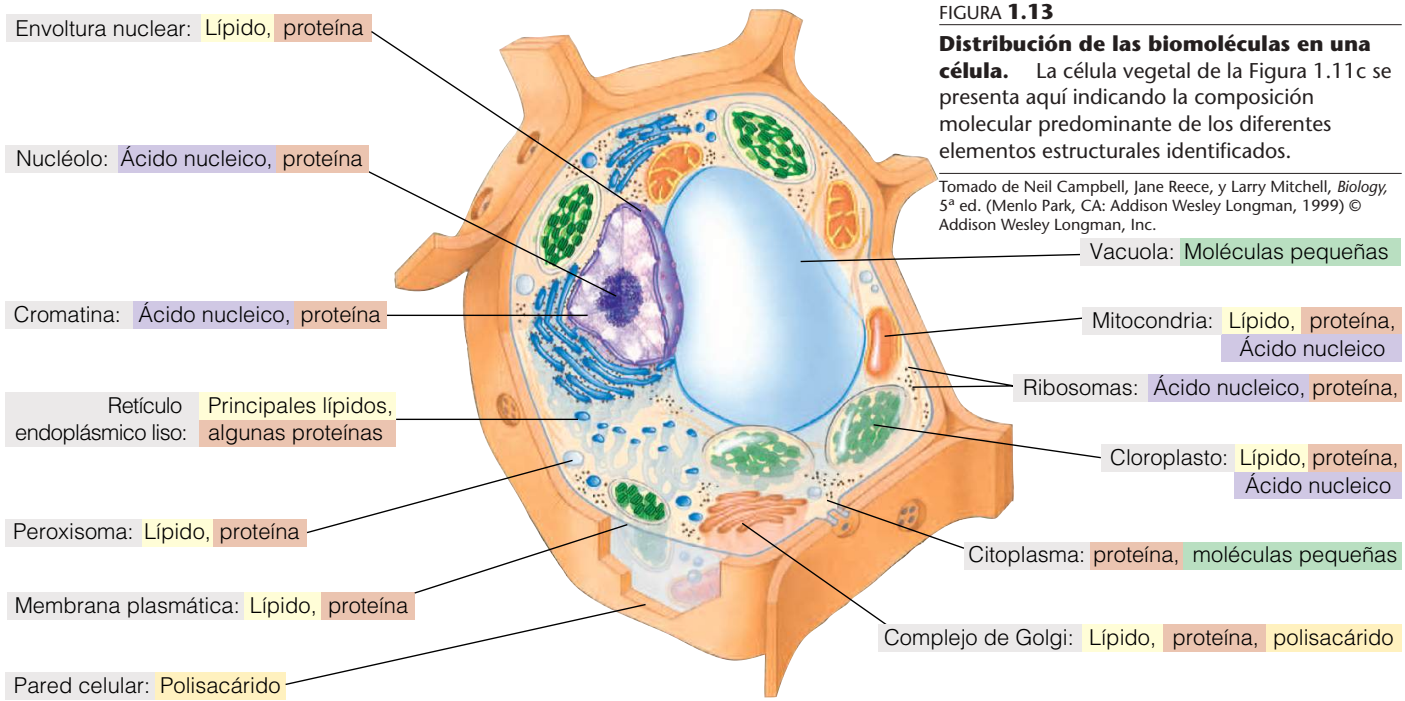


FIGURA **1.13**

Distribución de las biomoléculas en una célula. La célula vegetal de la Figura 1.11c se presenta aquí indicando la composición molecular predominante de los diferentes elementos estructurales identificados.

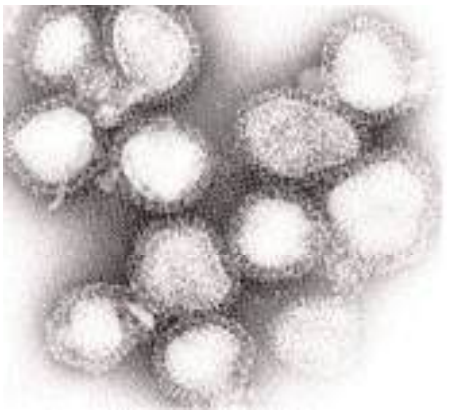
Tomado de Neil Campbell, Jane Reece, y Larry Mitchell, *Biology,* 5ª ed. (Menlo Park, CA: Addison Wesley Longman, 1999) © Addison Wesley Longman, Inc.

VENTANAS SOBRE LA FUNCIÓN CELULAR: LOS VIRUS

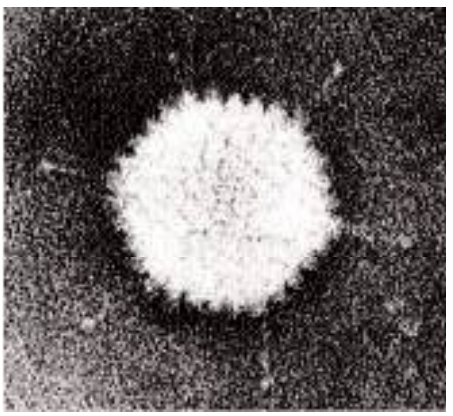
Los virus son parásitos intracelulares que utilizan la maquinaria y las fuentes de energía de la célula para replicarse.

Para analizar el metabolismo y el procesamiento de la información genética, los bioquímicos han contado con la inestimable ayuda de los **virus**. Los virus no son celulares, y se describen, por tanto, como "entidades biológicas" en lugar de como organismos; son parásitos intracelulares que tan sólo pueden crecer invadiendo células. Los virus están formados generalmente por una molécula de ácido nucleico (ya sea DNA, ya sea RNA) recubierta por una envoltura que está formada en su mayor parte o completamente por proteína. La envoltura está especializada en permitir que la partícula vírica entre en determinadas células vegetales, animales o bacterianas. En la Figura 1.14 se muestran las estructuras de varios virus representativos.

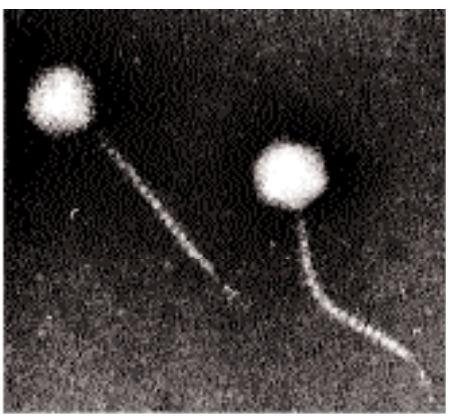
Dado que los virus no contienen una maquinaria metabólica propia, deben utilizar la de la célula hospedadora para reproducirse. Al estudiar las condiciones necesarias para la replicación del virus, podemos obtener pruebas sencillas sobre la manera en que actúa la maquinaria celular. Los virus nos proporcionan, pues, ventanas útiles sobre las funciones celulares que ellos comparten



(a) Virus de la gripe



(b) Adenovirus



(c) Bacteriófago lambda

FIGURA **1.14**

Ejemplos de virus.

(a, b) Cortesía de Frederick A. Murphy, Centers for Disease Control and Prevention; **(c)** Cortesía del Dr. R. C. Williams, University of California, Berkeley.

durante la infección. Así, por ejemplo, los virus más pequeños que contienen DNA replican éste utilizando únicamente las enzimas de la célula hospedadora. Dado su pequeño tamaño, estas moléculas de DNA vírico pueden aislarse y caracterizarse con mucha mayor facilidad que las moléculas de DNA gigantes de los cromosomas celulares. Los virus de mayor tamaño estimulan la formación de nuevas enzimas tras la infección, y los genes del virus especifican las estructuras de estas enzimas. Los estudios de estas enzimas han aclarado los mecanismos de regulación genética y han identificado objetivos para el tratamiento de las enfermedades víricas.

Nuevas herramientas en la revolución biológica

Desde sus mismos comienzos, la bioquímica ha sido una ciencia mucho más experimental que teórica. El conocimiento se ha desarrollado más a partir de los intentos de explicar las observaciones de laboratorio que a partir de los experimentos diseñados para comprobar las teorías. Así, por ejemplo, los hermanos Buchner no intentaban demostrar que la fermentación del azúcar para dar etanol podía producirse fuera de la célula. Fue más bien su observación casual de que este hecho tenía lugar lo que activó los avances que condujeron a entender el metabolismo de los hidratos de carbono.

El carácter experimental de la bioquímica tiene dos corolarios importantes. En primer lugar, para comprender la bioquímica, es preciso entender los experimentos esenciales y las técnicas experimentales en las que se fundamentan nuestros conocimientos comunes. Ése es el motivo por el que en este libro se incluyen descripciones separadas de la metodología experimental en los apartados de Herramientas de la Bioquímica que se presentan al final de muchos de los capítulos. En segundo lugar, el crecimiento espectacular del conocimiento bioquímico que se ha producido a lo largo de las cuatro últimas décadas se debe directamente al descubrimiento de muchas metodologías de investigación potentes, que constituyen el arsenal de la revolución biológica. En la Figura 1.15 se sitúa en el tiempo parte de estos descubrimientos.

Probablemente el ejemplo que resulte más familiar al lector sea la clonación de genes, que data de aproximadamente el año 1973. Nuestra capacidad para aislar cualquier gen que se desee, leer su información y manipularlo para que pueda formarse cualquier producto génico en cantidades prácticamente ilimitadas, ha transformado toda la biología. Sin embargo, la clonación génica no es más que uno de una larga serie de avances experimentales que han transformado la bioquímica y la biología de maneras igualmente fundamentales. Así, por ejemplo, la introducción de los isótopos radiactivos fue esencial para aclarar la mayor parte de las rutas metabólicas; la cristalografía de rayos X permitió la localización estructural de cada átomo en la estructura proteica; y la electroforesis en gel bidimensional hizo posible la visualización y cuantificación de la práctica totalidad de las miles de moléculas de proteínas existentes en una célula. La cantidad de información generada por las nuevas metodologías es tan amplia que sería casi inutilizable si no se produjeran avances paralelos en la tecnología informática y de procesamiento de datos.

Aplicaciones de la bioquímica

La bioquímica es una disciplina de investigación, pero los resultados de la investigación bioquímica se utilizan ampliamente en el mundo fuera del laboratorio, por ejemplo, en la agricultura, las ciencias médicas, la nutrición

y otros muchos campos. En química clínica, las determinaciones bioquímicas en las personas facilitan el diagnóstico de las enfermedades y el seguimiento de las respuestas al tratamiento. Por citar un solo ejemplo, en la actualidad las enfermedades hepáticas se diagnostican y se controlan mediante las medidas de las actividades sanguíneas de las enzimas denominadas **transaminasas** y de un producto de degradación de la hemoglobina que se denomina **bilirrubina**.

La farmacología y la toxicología se ocupan de los efectos de las sustancias químicas externas sobre el metabolismo. Los fármacos y los productos tóxicos actúan generalmente interfiriendo sobre rutas metabólicas específicas. Un buen ejemplo de ello es el antibiótico penicilina, que destruye las bacterias mediante la inhibición de una enzima que sintetiza un polisacárido esencial de la pared celular bacteriana. Dado que las células animales no sintetizan estos polisacáridos, no se ven afectadas por este inhibidor, que puede, por tanto, utilizarse terapéuticamente. Una perspectiva especialmente atractiva de la bioquímica contemporánea es la de crear los denominados fármacos de diseño. Si el lugar de acción de un fármaco es una enzima o un receptor proteico, la determinación de la estructura molecular detallada del objetivo nos permite diseñar inhibidores que se unan a él con una selectividad elevada. En la actualidad se están probando los primeros productos de esta *arquitectura farmacológica*. A mediados de los años 1980, se empezaron a determinar las estructuras moleculares detalladas de los virus, con lo cual se abrió también la posibilidad del diseño lógico de agentes antivíricos.

Los herbicidas y los pesticidas actúan, en muchos casos, de forma similar, mediante el bloqueo de enzimas o receptores del organismo. Las primeras generaciones de estos agentes tóxicos (como el DDT) eran tan inespecíficas en sus efectos que a menudo afectaban a organismos distintos de los que se pretendía atacar, con lo que se producían con frecuencia daños graves e imprevistos en el medio ambiente. Además, el empleo indiscriminado de estos agentes dio origen a poblaciones resistentes de los organismos, con lo que fue necesario utilizar un número de productos tóxicos cada vez mayor. La bioquímica permite comprender las acciones de los herbicidas y los pesticidas, aumentar su selectividad, y comprender y abordar los mecanismos mediante los cuales los organismos se hacen resistentes a ellos. Así pues, la bioquímica ha pasado a ser un elemento importante de la ciencia medioambiental.

Finalmente, mediante la ingeniería genética y la clonación, en un futuro próximo llegará un progreso notable de la agricultura. Ya se encuentran en producción plantas modificadas genéticamente y se ha producido con éxito la clonación de criaturas tan grandes como una oveja.

RESUMEN

El objetivo de la ciencia de la bioquímica es explicar la vida en términos moleculares, puesto que actualmente sabemos que no existen diferencias fundamentales entre la materia viva y la que no lo es. La bioquímica moderna extrae sus conocimientos de la química, la biología celular y la genética, y utiliza técnicas prestadas de la física. Los descubrimientos que se han realizado en todas estas ciencias han contribuido a impulsar una verdadera biología molecular.

Aunque la bioquímica estudia organismos, células y componentes celulares, se trata fundamentalmente de una ciencia química. La química básica es la correspondiente al carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, pero los organismos utilizan otros muchos elementos en cantidades menores. Muchas de las sus-

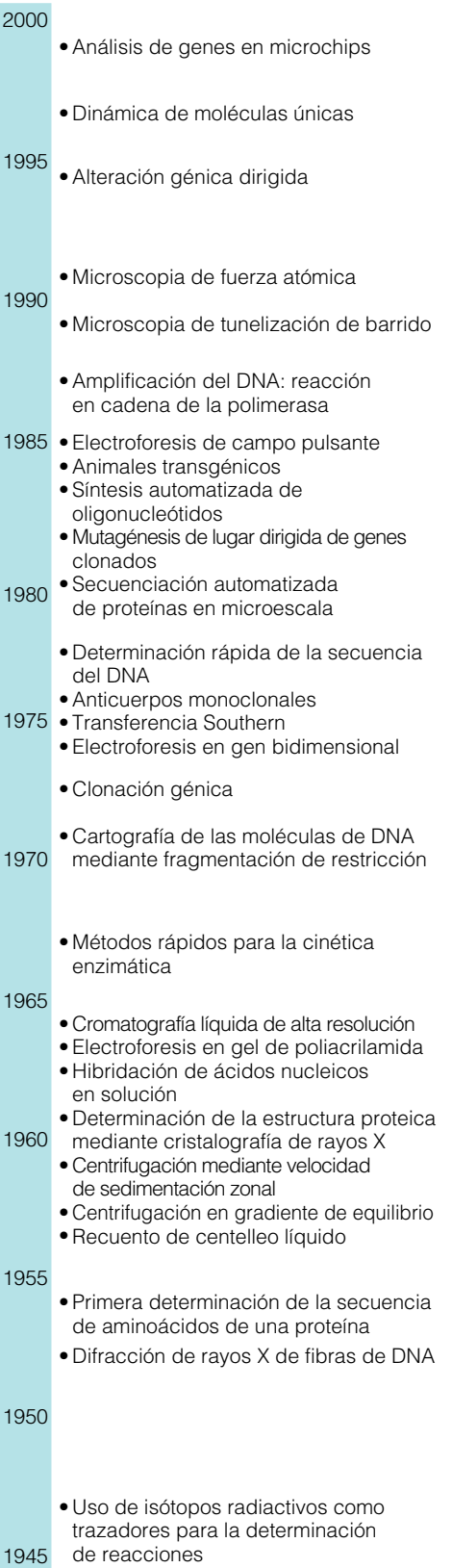


FIGURA **1.15**

Avances recientes de las técnicas experimentales de la bioquímica.

tancias biológicas importantes son moléculas gigantes, polímeros de unidades monoméricas más sencillas. Estos biopolímeros son los polisacáridos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Los lípidos constituyen el cuarto grupo fundamental de sustancias de importancia biológica.

La característica distintiva de la materia viva es el empleo de la energía para crear y duplicar la estructura de una manera ordenada. Todos los organismos vivos están formados por una o más células, y estas células son de un tamaño bastante similar. Sin embargo, los dos grandes tipos de organismos, procariotas y eucariotas, presentan unas estructuras celulares básicamente diferentes. Así, las células procariotas no están compartimentadas y carecen de los orgánulos con membranas que son característicos de las células eucariotas. Los virus son parásitos intracelulares, básicamente portadores de ácido nucleico y para duplicarse a sí mismos utilizan la maquinaria de reproducción y las fuentes de energía de la célula hospedadora.

La bioquímica es una ciencia experimental, y los notables avances que se han producido en la misma se deben en gran parte a la aparición de técnicas de laboratorio nuevas de gran capacidad. La bioquímica ha tenido una influencia importante en la medicina, la agricultura, la nutrición, la ecología y otras muchas facetas de la vida.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 1A

La microscopia a varios niveles

El microscopio óptico y sus limitaciones

Todos los estudiantes de ciencias están familiarizados con el microscopio óptico (Figura 1A.1); la mayoría de ellos lo han utilizado. Éste fue el instrumento que hizo posible la biología celular. De hecho, puede decirse que este campo tuvo su inicio con los primeros estudios microscópicos realizados por Hooke. Generaciones de biólogos han seguido los pasos de Hooke con instrumentos cada vez mejores. Pero cuando la biología ha profundizado más en los detalles de la vida, la microscopia óptica ha llegado a sus límites.

Para comprender por qué existen estos límites, debemos considerar una magnitud denominada **resolución** de un microscopio. La resolución (r) se define cuantitativamente como la distancia mínima entre dos objetos para que éstos puedan distinguirse como objetos separados. Viene dada por la siguiente ecuación

$$r = \frac{0.61\lambda}{n \operatorname{sen} \alpha} \qquad (1A.1)$$

en donde λ es la longitud de onda de la radiación utilizada, n es el índice de refracción del medio existente entre la muestra y la lente objetivo, y α es la **apertura angular** del objetivo. La cantidad sen α es básicamente una medida del poder de concentración de la radiación que posee el sistema de lentes. La resolución depende básicamente de la longitud de onda, puesto que los objetos deben ser de un tamaño comparable a la longitud de onda para alterar las ondas lo suficiente como para proporcionar información.

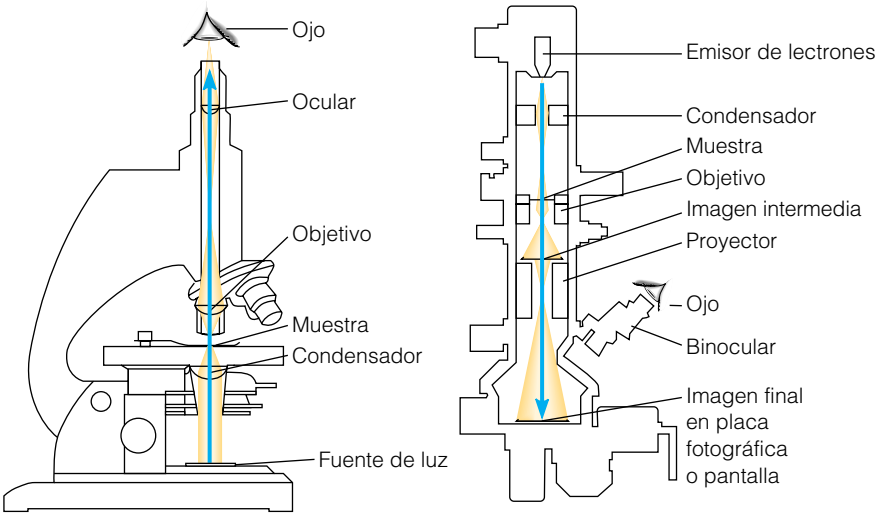
Las aperturas angulares de los mejores microscopios ópticos son de aproximadamente 70°, por lo que, aunque se utilice una luz azul oscura de una longitud de onda de 450 nm y el medio existente entre la muestra y el objetivo sea el aire ($n = 1$), obtenemos

$$r = \frac{0.61 \times 450}{1.0 \times \operatorname{sen} 70°} \cong 300 \text{ nm} = 0.3\ \mu\text{m} \qquad (1A.2)$$

Este valor corresponde al límite práctico de resolución del microscopio óptico. Puede conseguirse algo más de resolución mediante el empleo de una luz próxima al ultravioleta, pero la absorción de dicha luz por los materiales celulares limita su utilidad. Las imágenes fotográficas pueden ampliarse, pero no tiene sentido ampliar una imagen más allá del punto en el que su resolución sea la que el ojo humano puede discernir. Dado que nuestros ojos pueden distinguir imágenes con una separación de 0.3-0.6 mm, los mejores microscopios ópticos poseen una capacidad de aumento máxima de alrededor de 1000-2000 (ampliando 0.3 μm 2000 veces se obtiene 0.6 mm). Una mayor ampliación de la imagen carece de utilidad, puesto que sólo se consigue que aumente la difuminación. Para mejorar estos resultados de manera importante, fue necesario utilizar una radiación de longitud de onda mucho más corta, una radiación que no podemos ver pero que

FIGURA **1A.1**

Estructura del microscopio óptico y del microscopio electrónico de transmisión. Las dos imágenes no están a la misma escala, ya que el microscopio electrónico es mucho mayor que un microscopio óptico convencional.



(a) Microscopio óptico **(b)** Microscopio electrónico de transmisión

nos permite producir una imagen fotográfica. De esta forma nació en los años 1930 el **microscopio electrónico**.

Microscopia electrónica de transmisión

Existen varios tipos de microscopios electrónicos. El primer tipo que se utilizó fue el **microscopio electrónico de transmisión** (**MET**), que recibe este nombre porque detecta los electrones que se transmiten a través de una muestra. En la Figura 1A.1 se compara el microscopio electrónico de transmisión con el microscopio óptico. Un filamento de wolframio emite un haz de electrones, que se acelera mediante un campo eléctrico. Las lentes magnéticas enfocan el haz, de la misma forma que las lentes de vidrio enfocan un haz de luz en el microscopio convencional. La clave para la obtención de una mayor resolución es que los electrones, al igual que los fotones de la luz, tienen una naturaleza de tipo partícula y de tipo onda. Un fotón o un electrón que se mueve con una energía E está caracterizado por una longitud de onda

$$\lambda = \frac{h}{E} \qquad (1A.3)$$

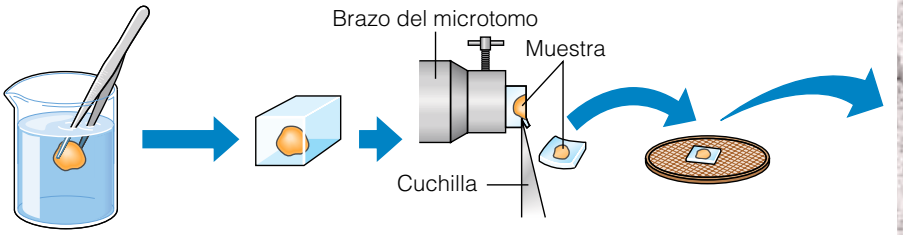
en donde h es la constante de Planck (6.626×10^{-27} erg·s = $= 6.626 \times 10^{-34}$ J·s). Cuando los electrones se aceleran mediante 50 000-100 000 voltios entre el cátodo y el ánodo, sus longitudes de onda son mucho más cortas que las de la luz visible; en realidad, inferiores a 1 nm. Esta longitud de onda predeciría una resolución mejor que 1 nm para un microscopio electrónico de transmisión. Algunas consideraciones prácticas hacen que el límite operativo se sitúe alrededor de 2 nm para la mayor parte de los instrumentos. No obstante, esta resolución es unas 100 veces mejor que la que puede conseguirse con el mejor microscopio óptico: un buen microscopio electrónico de transmisión puede proporcionar generalmente una ampliación de más de 100 000 veces.

Por muy clara que sea esta ventaja, la microscopia electrónica de transmisión tiene ciertos inconvenientes. El haz de electrones requiere el mantenimiento de un vacío elevado en todo el instrumento, incluyendo la cámara en la que se coloca la muestra. Ello implica, a su vez, que tan sólo pueden examinarse muestras completamente desecadas. Aunque se han diseñado muchos métodos para la fijación y el secado, siempre existe la posibilidad de inducir cambios en las muestras. Naturalmente no es posible examinar estructuras vivas.

En la Figura 1A.2 se muestran algunos de los métodos utilizados para la preparación de muestras para la microscopia electrónica de transmisión. Las energías de los electrones en la mayor parte de los microscopios de transmisión no les permiten penetrar en las muestras gruesas (>100 nm). En consecuencia, las muestras celulares deben fijarse, teñirse y cortarse de manera muy fina con un **ultramicrotomo** (Figura 1A.2a). Las partículas como los virus y las moléculas grandes pueden depositarse directamente sobre una fina película sostenida por una rejilla de cobre. Pero el contraste entre esta partícula y el fondo no es suficiente, por lo que generalmente la muestra se **tiñe negativamente** (Figura 1A.2b) o se **ensombrece** (Figura 1A.2c). Otras técnicas especiales, como la *fractura por congelación* y el *grabado por congelación* se comentarán en capítulos posteriores.

Microscopia electrónica de barrido

Un tipo de técnica muy distinta es la denominada **microscopia electrónica de barrido** (**MEB**). En la Figura 1A.3 se presenta un esquema de un microscopio electrónico de barrido. En este caso, el haz de electrones se desplaza en uno y otro sentido a través de la muestra, siguiendo un patrón originado por el generador de barrido y el deflector del haz, y los electrones secundarios emitidos por el punto en el que el haz choca sobre la superficie de la muestra son captados por un detector. La imagen se presenta entonces en una pantalla de vídeo, cuya



1 Se fija la muestra en aldehído y se tiñe con OsO_4 para incrementar el contraste.

2 Se incluye la muestra en un bloque de plástico.

3 Se realizan cortes finos con un ultramicrotomo.

4 Se colocan los cortes sobre una rejilla de cobre para el examen.

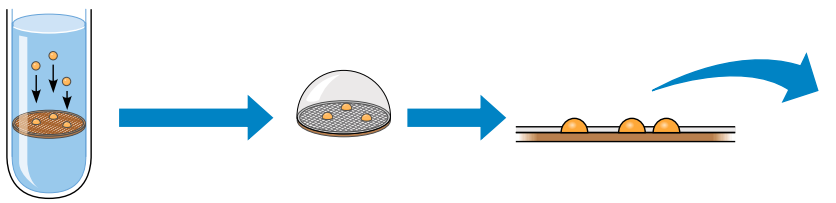
(a) Corte y tinción con OsO_4



5 Músculo esquelético teñido



4 Fibras de proteína muscular con tinción negativa

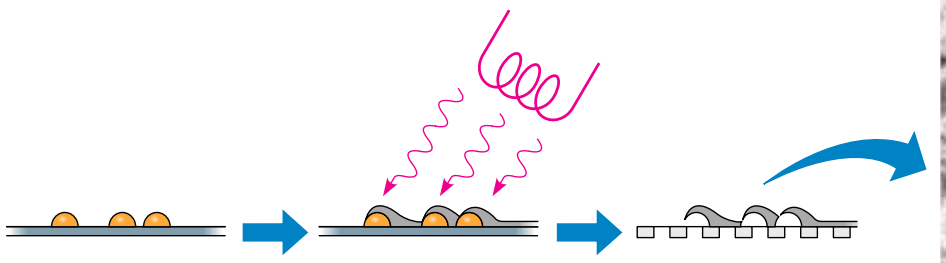


1 Se recogen las partículas sobre una rejilla de cobre cubierta con una fina película de plástico.

2 Se coloca sobre la rejilla una gota de tinción con un metal pesado.

3 El metal pesado forma una capa alrededor de la partícula, que se observa luego de forma más transparente que el fondo.

(b) Tinción negativa

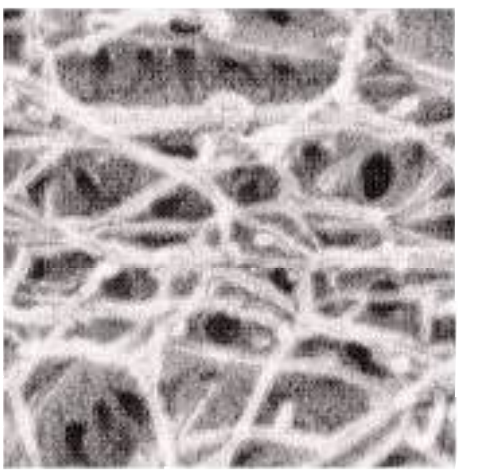


1 Las partículas se depositan sobre una lámina de mica.

2 Se deposita el metal formando un ángulo mientras se mantiene el vacío y se forma con ello una réplica de la muestra.

3 La muestra se elimina por disolución y se coloca la réplica metálica sobre una rejilla para su examen.

(c) Ensombrecimiento



4 Fibras de proteína muscular ensombrecidas

FIGURA **1A.2**

Tres métodos de preparación de muestras para la microscopia electrónica de transmisión.

Cortesía de T. Pollard y P. Maupin from *Electron Microscopy in Biology,* Vol. II, J. D. Griffith, ed.; © 1982 by John Wiley and Sons, Inc.

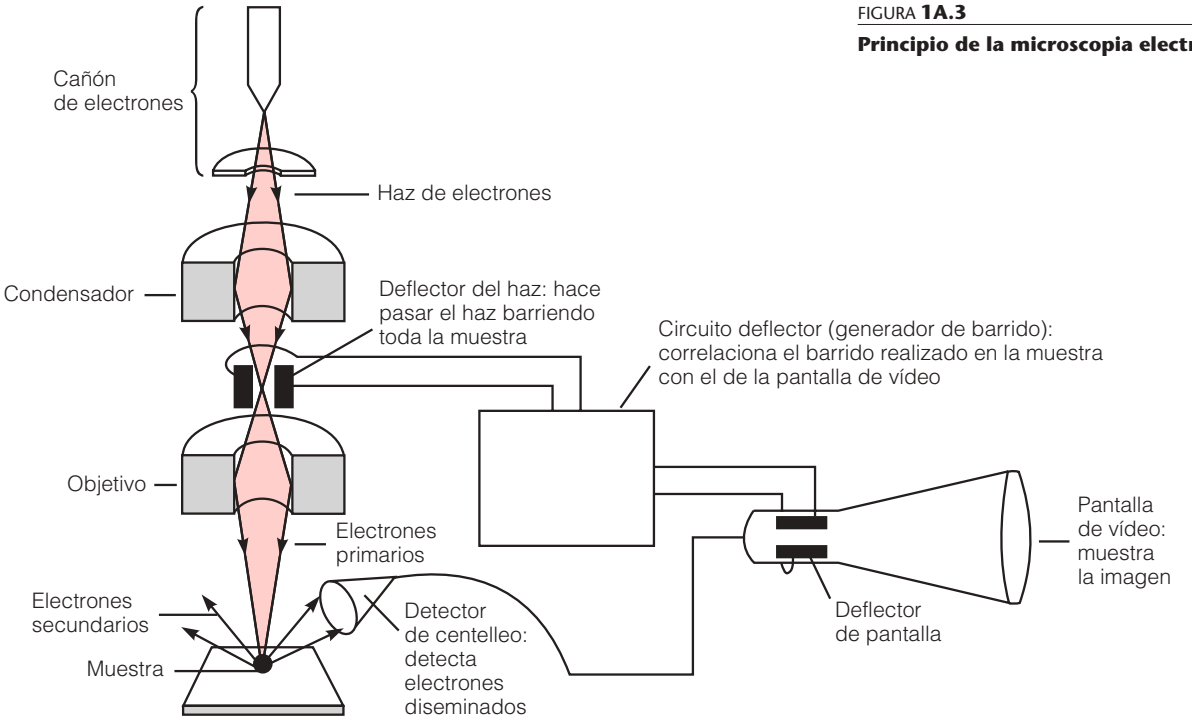


FIGURA **1A.3**

Principio de la microscopia electrónica de barrido.

superficie se rastrea en correspondencia con el barrido de la muestra. El método de la MEB no alcanza la resolución de la MET, pero es excelente para obtener imágenes extraordinariamente claras de las superficies de objetos minúsculos, como puede observarse en la Figura 1A.4. La preparación para los estudios de MEB no requiere realizar cortes, aunque la muestra debe fijarse y secarse para que se mantenga estable en el vacío elevado y suele recubrirse con una capa fina de oro para facilitar la emisión de los electrones secundarios.

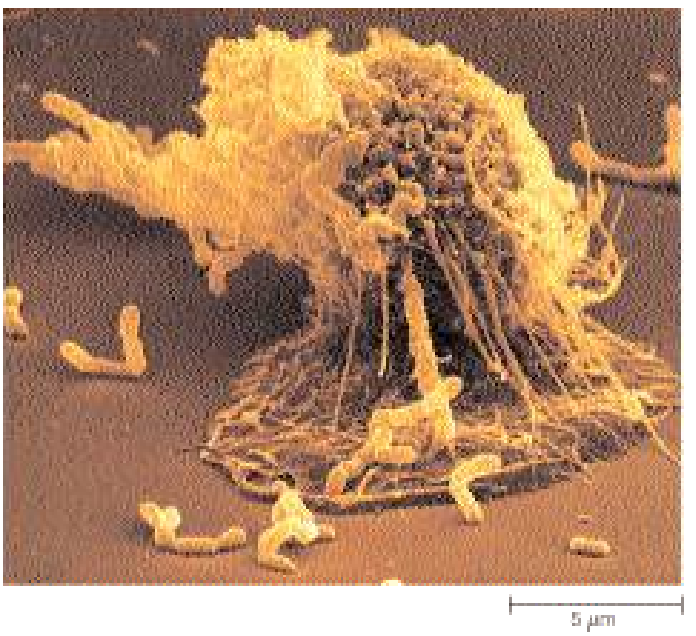


FIGURA **1A.4**

Fotografía de microscopia electrónica de barrido en la que se observa la fagocitosis. En esta imagen de × 4300 aumentos, un macrófago está engullendo varias *E. coli* en forma de bastoncitos.

© Lennart Nillson, Boehringer Ingelheim International/Albert Bonniers Forlag AB.

Existe otra técnica que debe mencionarse, aunque por el momento sólo se utiliza en un número limitado de laboratorios; se trata de la **microscopia electrónica de transmisión con barrido** (**METB**). En este método, el haz de electrones se desplaza por toda la muestra, como en la MEB, pero se detecta en transmisión. El método tiene la ventaja de que, a veces, permite utilizar muestras sin fijar ni teñir. Además, la absorción de electrones de diferentes energías proporciona información acerca de la composición de distintas partes de la muestra.

Microscopia confocal de barrido láser

Aparte de los problemas de resolución mencionados en la página 24, existe otra limitación fundamental en el uso de la microscopia óptica convencional para el estudio de la estructura interna de las células y otras muestras biológicas. A resolución elevada (~0.3 μm) la profundidad de enfoque de un microscopio óptico será de unos 3 μm, con lo que la superposición de imágenes de material en este corte grueso oscurecerá los detalles. Para solventar este problema se diseñó el microscopio confocal. Como se presenta en la Figura 1A.5, un rayo de luz, con preferencia un láser, se enfoca sobre un volumen muy pequeño al nivel que se desee dentro de la muestra. La luz fluorescente o reflejada por este punto se envía de vuelta a un detector a través de un poro que excluye la luz dispersada por otras regiones. Se realiza un barrido hacia atrás y hacia delante de la posición del lugar iluminado a través de la muestra, siempre al

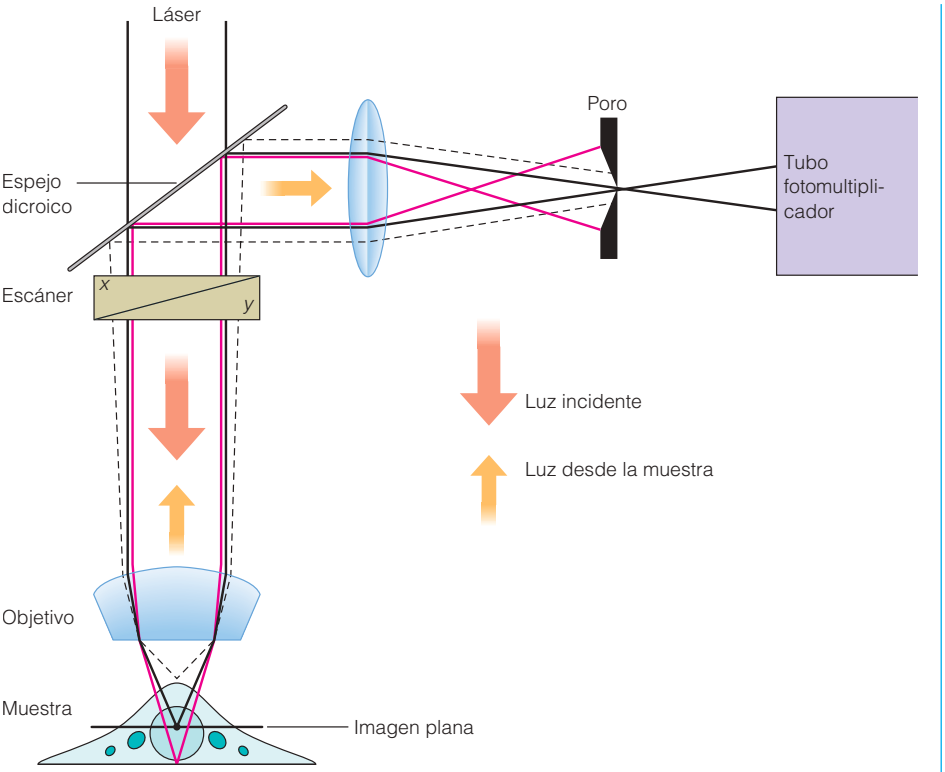


FIGURA **1A.5**

Diagrama que explica el principio de la microscopia confocal de barrido láser. Se pasa un rayo láser a través de un escáner *x-y*, colimado a un pequeño punto por las lentes del objetivo. La luz que fluoresce se recoge por el objetivo y se dirige mediante un espejo dicroico (un espejo que refleja la luz fluorescente pero no la luz del láser de longitud de onda más corta) hacia un poro de apertura localizado en el plano de la imagen conjugada. La luz que surge del plano del objetivo del foco pasa a través del poro a un detector fotomultiplicador. La luz por encima o por debajo del plano focal del espécimen golpea las paredes de la apertura y no se transmite.

Tomado de J. Lemasters, et al., *Optical Microscopy: Emerging Methods and Applications,* editado por B. Herman y J. Lemasters, pp. 339–354. (San Diego: Academic Press, 1996). © 1993 Academic Press, Inc.

mismo nivel. La imagen que se construye electrónicamente de esta manera representa un "corte" muy fino de elevada resolución a través de la muestra y puede también repetirse a diferentes niveles para construir una imagen tridimensional.

El método es más potente cuando se emplea una detección fluorescente, ya que pueden localizarse de forma precisa estructuras o sustancias marcadas de manera específica en el interior de la célula. Como el método es relativamente poco destructor, puede emplearse para el seguimiento de procesos dinámicos en las células. Por ejemplo, se ha empleado para señalar los lugares dentro de un núcleo celular donde está teniendo lugar la replicación activa del DNA. El rápido diseño de sondas fluorescentes más versátiles y discriminadoras está haciendo a la microscopia confocal una técnica fundamental de la bioquímica celular.

Microscopia de tunelización de barrido y microscopia de fuerza atómica

Muy recientemente, se ha construido un nuevo tipo de microscopio muy notable. La **microscopia de tunelización de barrido** utiliza una punta de metal muy fina, cargada eléctricamente, que se desplaza por la muestra. Cuando los electrones se escapan (tunelizan) entre la punta y la superficie de apoyo de la muestra, la resistencia que encuentran varía según la altura de los objetos microscópicos situados sobre su superficie. Las fluctuaciones resultantes de la corriente producen una imagen en vídeo de la superficie, con una resolución comparable a la de un microscopio electrónico. En la **microscopia de fuerza atómica** (Figura 1A.6), se arrastra o se golpea con una punta extremadamente cortante hacia atrás y hacia delante a lo largo de la muestra y se detecta un movimiento arriba y abajo por la deflexión de un haz láser reflejado fuera del voladizo que sostiene la punta. Este movimiento se amplifica de mane-

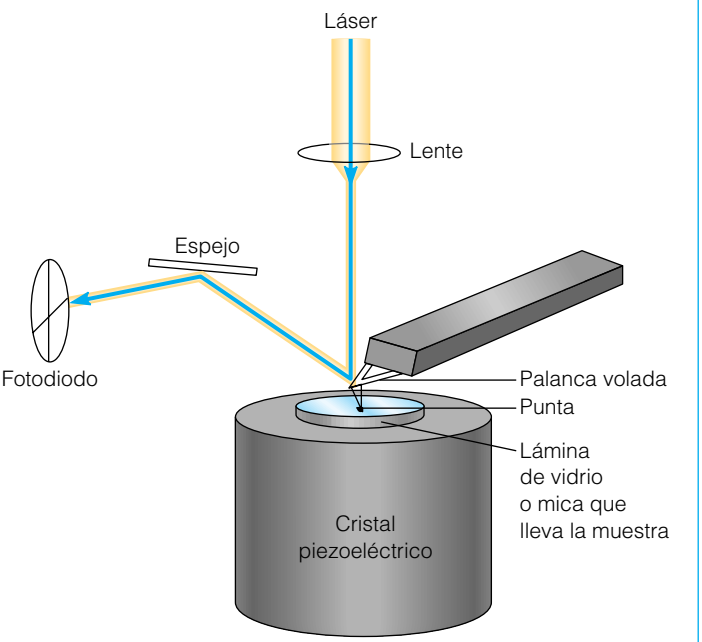


FIGURA **1A.6**

Principio de la microscopia de fuerza atómica. La potencia del cristal piezoeléctrico se regula para mover la muestra en sentido ascendente y descendente y mantener la punta a una altura constante mientras se examina la muestra.

ra muy notable para dar un mapa del contorno del objeto. Ambas técnicas tienen la enorme ventaja respecto a la microscopia electrónica de que pueden estudiarse muestras húmedas, e incluso en inmersión. Ambas técnicas están aún en fase de perfeccionamiento y tienen unas posibilidades fascinantes.

Bibliografía

Corle, T. R. y G. S. Kino, eds. (1998) *Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems.* Academic Press, San Diego.

Engel, A. (1991) Biological application of scanning probe microscopy. *Annu. Rev. Biophys. & Biophys. Chem.* 20:79-108.

Herman, B. y J. J. Lemasters, eds. (1996) *Optical Microscopy: Emerging Methods and Applications.* Academic Press, San Diego. Un conjunto de trabajos cortos sobre una amplia variedad de métodos microscópicos nuevos.

Watt, I. M. (1985) *The Principles and Practice of Electron Microscopy.* Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.

CAPÍTULO 2

La matriz de la vida: interacciones débiles en un medio acuoso

Las macromoléculas que participan en la matriz estructural y funcional de la vida son estructuras inmensas que se mantienen unidas mediante enlaces covalentes fuertes. Con todo, el enlace covalente por sí solo no puede describir la complejidad de la estructura molecular en biología. Las interacciones mucho más débiles son responsables de la mayor parte de la arquitectura celular tan elegante que se ve en las fotografías de microscopia electrónica del Capítulo 1. Se trata de las **interacciones no covalentes**, también denominadas *fuerzas no covalentes* o *enlaces no covalentes*, que se producen entre iones, moléculas y partes de las moléculas.

Considérense las macromoléculas presentadas en el Capítulo 1. La secuencia lineal de residuos de nucleótidos en una cadena de DNA se mantiene por enlaces covalentes. Pero, el DNA tiene también una estructura tridimensional muy específica, que está estabilizada por interacciones no covalentes entre diferentes partes de la molécula. De modo parecido, cada clase de proteína está formada por aminoácidos unidos covalentemente, pero también está plegada en una conformación molecular específica mediante fuerzas no covalentes. Las proteínas interactúan con otras moléculas de proteína o con el DNA para formar niveles de organización aún mayores, que en última instancia conducen a las células, los tejidos y los organismos completos. Toda esta complejidad se explica por innumerables interacciones no covalentes que se producen dentro de las macromoléculas y entre las macromoléculas.

Las interacciones no covalentes son interacciones débiles entre iones, moléculas y partes de las moléculas.

¿Qué es lo que hace que las interacciones no covalentes sean tan importantes en biología y en bioquímica? La respuesta se encuentra en la Figura 2.1, que compara las energías de enlace no covalente y covalente. Los enlaces *covalentes* más importantes en biología (como los C—C y C—H) tienen energías de enlace que oscilan entre 300 y 400 kJ/mol. Los enlaces *no covalentes* relevantes en biología son de 10 a 100 veces más débiles. Son esenciales precisamente porque sus enlaces son débiles, y esto les permite romperse y volver a formarse continuamente en la interacción molecular dinámica que es la vida. Esta interacción depende de los rápidos intercambios de parejas moleculares, que podrían no producirse si las fuerzas intermoleculares fueran tan fuertes que bloquearan las moléculas en una conformación y en una localización.

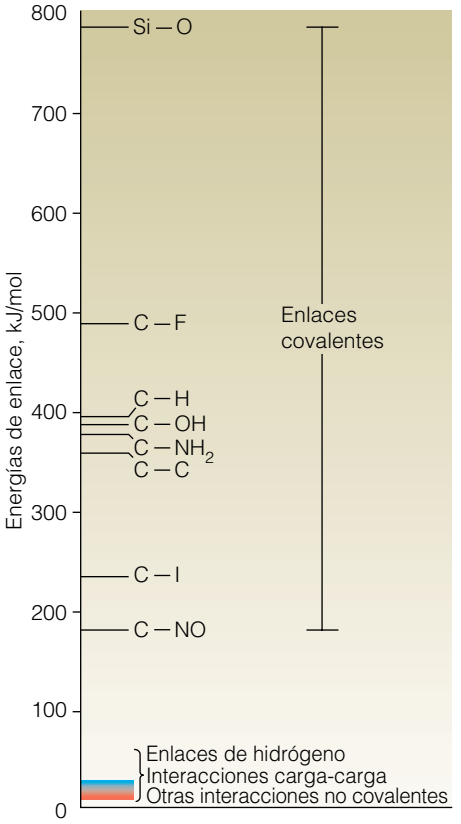


FIGURA **2.1**

Energías de los enlaces covalentes y no covalentes. Las energías características de los enlaces no covalentes son de uno a dos órdenes de magnitud más débiles que las energías de los enlaces covalentes que aparecen con más frecuencia en los compuestos bioquímicos.

En las interacciones no covalentes siempre están implicadas cargas eléctricas.

Por lo tanto, si queremos entender la vida, debemos conocer las interacciones no covalentes. Además, debemos saber cómo se comportan estas interacciones en un medio acuoso, puesto que todas las células de todos los organismos de la tierra están bañadas e impregnadas de agua. Esto sucede tanto en los organismos que se encuentran en los desiertos áridos, como en los que se encuentran en las profundidades marinas. El agua es el componente principal de los organismos: en la mayoría de los casos representa el 70% o más de su peso total.

Este capítulo describe, en primer lugar, las interacciones no covalentes y luego muestra el notable efecto de las propiedades del agua sobre dichas interacciones.

Naturaleza de las interacciones no covalentes

Las moléculas y los iones pueden interactuar de forma no covalente de varios modos, tal como se describe en este apartado y se resume en la Figura 2.2. Todas estas interacciones no covalentes son fundamentalmente de naturaleza electrostática, es decir, dependen de las fuerzas que las cargas eléctricas ejercen entre ellas, aunque esto no se detecta fácilmente en algunos casos.

INTERACCIONES CARGA-CARGA

La interacción no covalente más sencilla es la interacción electrostática entre un par de partículas cargadas. Muchas de las moléculas que se encuentran en las células, entre ellas las macromoléculas como el DNA y las proteínas, tienen una carga eléctrica neta. Además de estas moléculas, la célula contiene abundantes iones pequeños, tanto cationes como Na^+, K^+ y Mg^{2+}, como aniones como Cl^- y $HOPO_3^{2-}$. Todas estas entidades con carga ejercen fuerzas sobre las demás (véase la Figura 2.2a). La fuerza entre un par de cargas q_1 y q_2, separadas *en el vacío* por una distancia r, viene determinada por la **ley de Coulomb**:

$$F = k\,\frac{q_1 q_2}{r^2} \qquad (2.1)$$

donde k es una constante cuyo valor depende de las unidades utilizadas*. Si q_1 y q_2 tienen el mismo signo, F es positiva, de modo que un valor positivo significa repulsión. Si una carga es + y la otra –, F es negativa, lo que representa atracción. Son estas interacciones carga-carga las que estabilizan un cristal de una sal, como el que se muestra en la Figura 2.3.

El entorno biológico, obviamente, no es el vacío. En una célula, las cargas siempre están separadas por agua o por otras moléculas o partes de moléculas. La existencia de este **medio dieléctrico** entre las cargas tiene el efecto de apantallarlas de las otras, de modo que la fuerza real es siempre inferior a la que nos da la ecuación (2.1). Este efecto apantallador se expresa añadiendo a la ecuación (2.1) un número sin dimensión: la **constante dieléctrica** (ε):

$$F = k\,\frac{q_1 q_2}{\varepsilon r^2} \qquad (2.2)$$

Toda sustancia que actúe como un medio dieléctrico tiene un valor característico de ε. Cuanto más elevado es este valor, más débil es la fuerza entre las cargas separadas. La constante dieléctrica del agua es elevada, aproximadamente 80, mientras que las sustancias orgánicas generalmente tienen valores muy infe-

* En el sistema c.g.s. (centímetro-gramo-segundo), con las cargas en unidades electrostáticas, k es la unidad. En este libro utilizamos el SI, o sistema internacional de unidades. En este caso, q_1 y q_2 están en culombios (C), r en metros (m), y $k = 1/(4\pi\varepsilon_0)$. La cantidad ε_0 es la *permisividad de un vacío* y tiene el valor de $8.85 \times 10^{-12}\ J^{-1}C^2m^{-1}$, donde J es la unidad de energía en julios. F está en newtons (N).

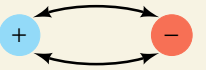
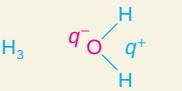
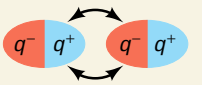
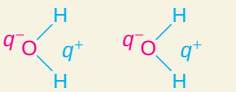
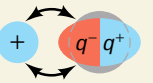
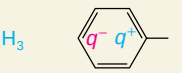
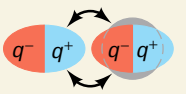
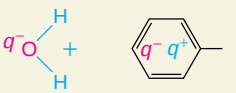
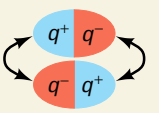
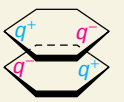
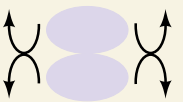
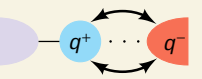
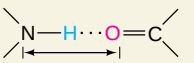
Tipo de interacción	Modelo	Ejemplo	Dependencia de la energía con la distancia
(a) Carga-carga Fuerza con el intervalo más largo; no direccional			$1/r$
(b) Carga-dipolo Depende de la orientación del dipolo			$1/r^2$
(c) Dipolo-dipolo Depende de la orientación mutua de los dipolos			$1/r^3$
(d) Carga-dipolo inducido Depende de la polarizabilidad de la molécula en la que se ha inducido el dipolo			$1/r^4$
(e) Dipolo-dipolo inducido Depende de la polarizabilidad de la molécula en la que se ha inducido el dipolo			$1/r^5$
(f) Dispersión Implica la sincronización mutua de las cargas fluctuantes			$1/r^6$
(g) Repulsión de van der Waals Tiene lugar cuando los orbitales electrónicos más externos se solapan			$1/r^{12}$
(h) Enlace de hidrógeno Atracción de las cargas + enlace covalente parcial	 Donador Aceptor	 Longitud del enlace de hidrógeno	Longitud del enlace fijo

FIGURA **2.2**

Clases de interacciones no covalentes. El dipolo inducido **(d, e)** y las fuerzas de dispersión **(f)** dependen de una distorsión en la distribución electrónica de un átomo o molécula no polar. Los símbolos q^-, q^+ indican una fracción de la carga de un electrón o un protón.

riores, entre 1 y 10. A continuación, consideraremos la razón de este elevado valor de ε en el agua, cuya principal consecuencia es que las partículas cargadas interaccionan bastante débilmente entre ellas en un medio acuoso a menos que estén muy cerca.

La ley de Coulomb expresa una *fuerza*; es decir, es una descripción cuantitativa de una interacción. Sin embargo, cada interacción implica un cambio de *energía*, y como nos ocupamos de los cambios de energía en los procesos biológicos, estamos especialmente interesados en la **energía de interacción** (U). Se trata de la energía necesaria para separar dos partículas cargadas desde una distancia r a una distancia infinita; es decir, separarlas superando la fuerza electrostática. La energía de interacción viene dada por la ecuación (2.3) que es parecida a la ecuación (2.2):

$$U = k\frac{q_1 q_2}{\varepsilon r} \qquad (2.3)$$

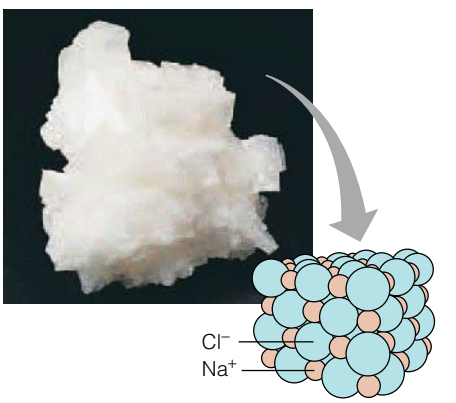
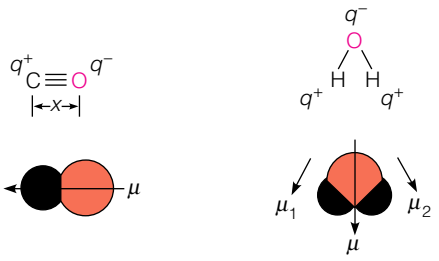


FIGURA **2.3**

Interacciones carga-carga en un cristal iónico. Los cristales iónicos se mantienen unidos mediante interacciones carga-carga entre iones positivos y negativos. En un cristal de cloruro sódico, cada ion sodio está rodeado por seis iones cloro, y cada ion cloro está rodeado por seis iones sodio.

Foto por cortesía de Stephen Frisch.



(a) Monóxido de carbono **(b)** Agua

FIGURA **2.4**

Moléculas dipolares. **(a)** Monóxido de carbono: el exceso de carga negativa (q^-) sobre el oxígeno junto con la correspondiente carga positiva (q^+) sobre el carbono crea un momento dipolar orientado a lo largo del eje C—O. **(b)** Agua: el exceso de carga negativa sobre el O junto con el exceso de carga positiva sobre cada H crea dos momentos μ_1 y μ_2, orientados a lo largo de los enlaces H—O. Su suma vectorial (μ) representa el momento dipolar de la molécula.

Al igual que con la fuerza, la energía de una pareja q_1 y q_2 con carga opuesta siempre es negativa; es decir, existe atracción, pero U tiende a cero cuando r tiene un valor muy alto.

Dos características principales de las interacciones carga-carga surgen de las ecuaciones (2.2) y (2.3). En primer lugar, la fuerza entre las cargas es totalmente *adireccional*, y depende únicamente de la *distancia* de separación. En segundo lugar, la energía de interacción varía bastante gradualmente con la distancia ya que es inversamente proporcional a la primera potencia de r. Estas características permiten distinguir las interacciones carga-carga de otras interacciones no covalentes que describiremos. Las interacciones carga-carga se producen con frecuencia dentro de o entre biopolímeros; por ejemplo, en la atracción entre los grupos amino y carboxilo, como se muestra en la Figura 2.2a.

INTERACCIONES DE DIPOLOS PERMANENTES E INDUCIDOS

Las moléculas que no tienen carga *neta* pueden, no obstante, tener una distribución interna asimétrica de la carga. Por ejemplo, la distribución electrónica de la molécula de monóxido de carbono sin carga es tal que el extremo del oxígeno es ligeramente más negativo que el extremo del carbono (Figura 2.4a). Una molécula así se denomina *polar*, o **dipolo permanente**, y se dice que tiene un **momento dipolar permanente** (μ). El momento dipolar expresa la magnitud de la polaridad de una molécula. Si una molécula lineal como el CO tiene cargas fraccionarias q^+ y q^-, separadas por una distancia x, el momento dipolar es un vector orientado hacia q^+, cuya magnitud es

$$\mu = qx \tag{2.4}$$

Algunas moléculas son dipolos e interactúan por tener momentos dipolares.

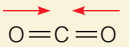
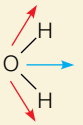
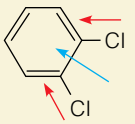
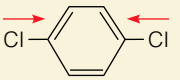
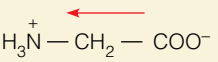
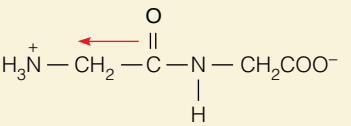
En las moléculas con una forma más compleja, como el agua, el momento dipolar es una suma de vectores de los momentos a lo largo de los enlaces (Figura 2.4b). El agua tiene un μ significativo, ya que los electrones son atraídos desde los hidrógenos hacia el oxígeno, como consecuencia de la electronegatividad del oxígeno.

En la Tabla 2.1 aparecen algunos valores de momentos dipolares. Obsérvense los valores grandes de la glicina y de la glicilglicina. A pH neutro, el aminoácido glicina existe como el ion $^+H_3NCH_2COO^-$ por lo cual ambos tienen un grupo ionizado negativo y otro positivo. De este modo, las cargas electrónicas totales están separadas por la longitud de la molécula, lo cual explica el valor elevado de μ. En el caso de la glicilglicina, formada por dos moléculas de glicina unidas covalentemente, el momento dipolar es casi el doble de grande, puesto que la separación entre las cargas es aproximadamente el doble de grande. Las moléculas con unos momentos dipolares grandes se denominan muy polares.

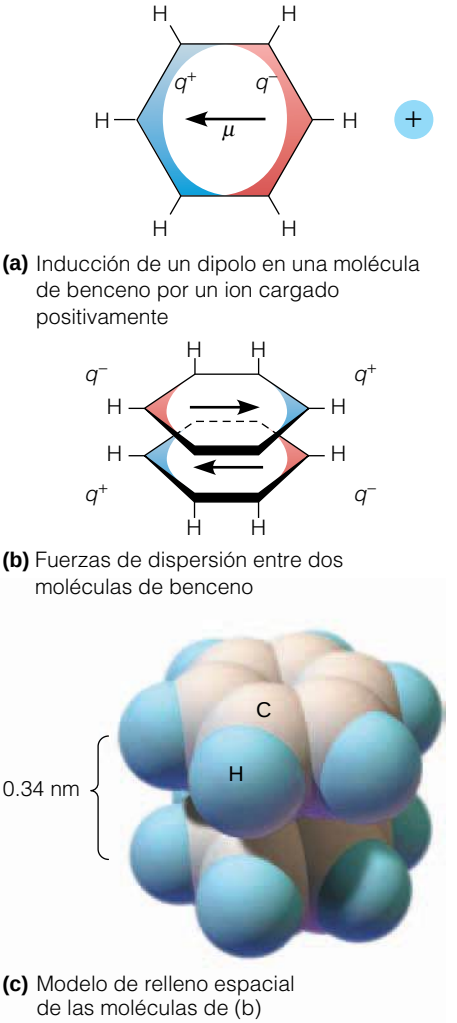
Obsérvese también en la Tabla 2.1 que las moléculas deben ser asimétricas para tener momentos dipolares: compárese el C≡O con el O═C═O, o bien el *o*-diclorobenceno con el *p*-diclorobenceno. En el caso del dióxido de carbono y del *p*-diclorobenceno, los vectores dipolares tienen la misma magnitud pero están orientados en sentidos opuestos, de modo que el efecto de uno contrarresta al del otro.

En el entorno acuoso de una célula, un dipolo permanente puede ser atraído por un ion cercano (*interacción carga-dipolo*) o por otro dipolo permanente (*interacción dipolo-dipolo*). Estas **interacciones de dipolos permanentes** aparecen descritas en la Figura 2.2b y c. A diferencia de las interacciones simples carga-carga descritas anteriormente, las interacciones dipolares dependen de la orientación de los dipolos. Además, son interacciones con un alcance inferior. La energía de una interacción carga-dipolo es proporcional a $1/r^2$ y la de una interacción di-

TABLA 2.1 Momentos dipolares de algunas moléculas

Molécula	Fórmula	Momento dipolar (D)[a]
Monóxido de carbono		0.12
Dióxido de carbono		0
Agua		1.83
orto-Diclorobenceno		2.59
para-Diclorobenceno		0
Glicino		16.7
Glicilglicino		28.6

[a] La unidad más habitual para el momento dipolar es el *debye;* 1 debye (D) es igual a 3.34×10^{-30} C m.



(a) Inducción de un dipolo en una molécula de benceno por un ion cargado positivamente

(b) Fuerzas de dispersión entre dos moléculas de benceno

(c) Modelo de relleno espacial de las moléculas de (b)

FIGURA **2.5**

Dipolos inducidos y fuerzas de dispersión. (a) El benceno no tiene carga neta ni momento dipolar permanente, pero una carga cercana puede inducir una redistribución de los electrones dentro del anillo de benceno, produciendo un momento inducido (μ). **(b)** Las moléculas planas como el benceno tienen una fuerte tendencia a apilarse, porque las fluctuaciones de las nubes electrónicas de los anillos apilados interactúan entre ellas, produciendo una fuerza de dispersión. **(c)** Aunque las moléculas se aproximen mucho, no entran unas dentro de las otras.

polo-dipolo es proporcional a $1/r^3$. De este modo, para que la interacción sea fuerte, un par de dipolos permanentes deben estar bastante cerca. El momento dipolar permanente del agua contribuye a su interacción con otras moléculas de agua, y explica por qué disuelve fácilmente las sustancias iónicas como el NaCl.

Las moléculas que no tienen momentos dipolares permanentes pueden transformarse en dipolares si se encuentran en un campo eléctrico. Se las puede someter a este campo externamente, como en el caso de un instrumento de laboratorio, o también puede producirse mediante una partícula cercana con carga o dipolar. Una molécula se dice que es **polarizable** cuando se le puede inducir un dipolo del modo descrito. Por ejemplo, los anillos aromáticos son muy polarizables, porque los electrones pueden desplazarse fácilmente en el plano del anillo, como se muestra en la Figura 2.5a. Las interacciones de las moléculas polarizables se denominan **interacciones de dipolos inducidos**. Un anión o un catión pueden inducir un dipolo en una molécula polarizable y, de este modo, ser atraídos hacia ella (*interacción carga-dipolo inducido*, Figura 2.2d), o un dipolo permanente puede hacer lo mismo (*interacción dipolo-dipolo inducido*, Figura 2.2e). Estas interacciones dipolares inducidas tienen un alcance menor al de las interacciones dipolares permanentes, con unas energías de interacción proporcionales a $1/r^4$ y $1/r^5$, respectivamente.

Incluso dos moléculas sin carga neta ni momento dipolar permanente pueden atraerse mutuamente si están lo bastante cerca (Figura 2.2f). La distribución de la carga electrónica en una molécula nunca es estática, sino que fluctúa. Cuando dos moléculas se acercan mucho, sincronizan las fluctuaciones de sus

cargas produciendo una fuerza de atracción neta. Estas fuerzas intermoleculares, que pueden considerarse una inducción dipolar mutua, se denominan **fuerzas de dispersión**. Su energía de atracción varía con la inversa de la sexta potencia de la distancia, de modo que las fuerzas de dispersión sólo son significativas a muy corto alcance. Pueden llegar a ser especialmente fuertes cuando dos moléculas planas pueden apilarse la una sobre la otra, como se muestra en la Figura 2.5b y c. Encontraremos numerosos ejemplos de dichas interacciones en el empaquetamiento interno de moléculas como las proteínas y los ácidos nucleicos.

Las fuerzas intermoleculares e intramoleculares bastante débiles que implican dipolos y dipolos inducidos suelen designarse, de forma general, fuerzas de *van der Waals*.

REPULSIÓN MOLECULAR EN DISTANCIAS MUY REDUCIDAS: RADIO DE VAN DER WAALS

Las moléculas pueden atraerse entre ellas por fuerzas no covalentes, pero no pueden penetrar las unas en las otras: los radios de van der Waals determinan las superficies moleculares.

Cuando las moléculas o los átomos que no tienen enlaces covalentes entre ellos se acercan tanto que sus orbitales electrónicos más externos empiezan a solaparse, existe una repulsión mutua (Figura 2.2g). Esta repulsión aumenta muy rápidamente a medida que la distancia entre sus centros (r) disminuye; es aproximadamente proporcional a r^{-12}. Si combinamos esta energía de repulsión con una o más de las clases de energía de atracción descritas anteriormente, vemos que la energía total de la interacción no covalente (U) de una pareja de átomos, moléculas o iones cambiará según la distancia que los separa (r) del modo descrito en la Figura 2.6. Deben destacarse dos puntos del gráfico. En primer

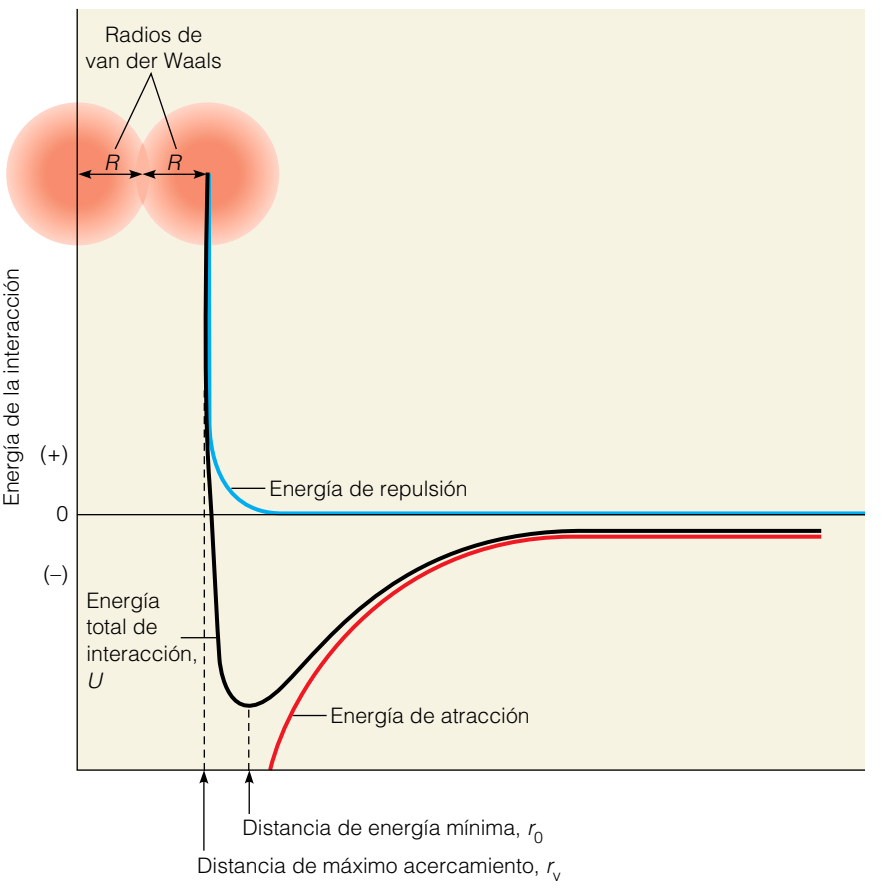


FIGURA **2.6**

Energía de interacción no covalente de dos partículas que se aproximan. Se representa gráficamente la energía de interacción de dos átomos, moléculas o iones frente a la distancia entre sus centros, *r*. La energía total de interacción (*U*) a cualquier distancia es la suma de la energía de atracción y de la energía de repulsión. A medida que disminuye la distancia entre las partículas (de *derecha a izquierda* a lo largo del eje x), aumenta tanto la energía de atracción (–) como la de repulsión (+), pero a velocidades diferentes. En un principio predomina la atracción de largo alcance, pero luego la energía de repulsión aumenta tan rápidamente que actúa como una barrera, definiendo la distancia de máximo acercamiento (r_v) y los radios de van der Waals (*R*). La posición de energía mínima (r_0) normalmente está muy cercana a r_v.

lugar, en la posición r_0 existe un mínimo en la curva de energía. Este mínimo corresponde a la distancia más estable entre los centros de las dos partículas. Si dejamos que se aproximen, ésta es la distancia mínima que les separará. En segundo lugar, el potencial de repulsión aumenta tan pronunciadamente en distancias más cortas que actúa como una "barrera", impidiendo de modo efectivo que se aproximen más de la distancia r_v. Esta distancia define el denominado **radio de van der Waals, R**, el radio eficaz para el empaquetamiento molecular más cercano. Para una pareja de moléculas esféricas idénticas, $r_v = 2R$; para moléculas con radios de van der Waals R_1 y R_2, $r_v = R_1 + R_2$.

Las moléculas reales, por supuesto, no son objetos esféricos como los representados en la Figura 2.6. Puesto que las moléculas biológicas grandes tienen todas formas complejas, es útil extender el concepto del radio de van der Waals a los átomos o a los grupos de átomos que hay dentro de una molécula. Los valores de los radios de van der Waals que aparecen en la Tabla 2.2 representan las distancias de aproximación más cercanas a otro átomo o grupo. Cuando intentamos representar moléculas complejas en forma de "relleno espacial", cada átomo aparece como una esfera con su radio de van der Waals adecuado (véase la Figura 2.5c). En este caso, los radios de van der Waals de los átomos de carbono (0.17 nm) hacen que los planos de los dos anillos apilados no puedan estar más cerca de 0.34 nm.

TABLA 2.2 Radios de van der Waals de algunos átomos y grupos de átomos

	R (nm)
Átomos	
H	0.12
O	0.14
N	0.15
C	0.17
S	0.18
P	0.19
Grupos	
—OH	0.14
$—NH_2$	0.15
$—CH_2—$	0.20
$—CH_3$	0.20
Mitad de grosor del anillo aromático	0.17

ENLACES DE HIDRÓGENO

Un tipo específico de interacción no covalente, el **enlace de hidrógeno**, tiene una gran importancia en bioquímica. La estructura y las propiedades de muchas moléculas biológicas así como las del agua, el disolvente biológico universal, están determinadas en gran medida por este tipo de enlace. Un enlace de hidrógeno es una interacción entre un átomo de hidrógeno unido covalentemente a un *grupo donador* (como —O—H o $>$N—H) y un par de electrones libres perteneciente a un *grupo aceptor* (como O=C— o N$<$), como muestra la Figura 2.2h y la Figura 2.7. El átomo al que el hidrógeno está unido covalentemente se denomina *donador de enlace de hidrógeno*, y el átomo con el par de electrones libres se denomina *aceptor de enlace de hidrógeno*. Se define la longitud del enlace de hidrógeno como la distancia centro-centro entre los átomos donador y aceptor.

La capacidad de un átomo para actuar como donador de enlace de hidrógeno depende en gran medida de su electronegatividad. Cuanto más electronegativo es el átomo donador, más carga negativa extrae del hidrógeno al cual está enlazado. De este modo, el hidrógeno se vuelve más positivo y es atraído con más fuerza hacia el par de electrones del aceptor. Entre los átomos que se encuentran en los compuestos biológicos, sólo el O y el N tienen las electronegatividades adecuadas para comportarse como donadores fuertes. De este modo, los grupos $>$C—H no forman enlaces de hidrógeno fuertes y sí los forman los grupos —O—H. En este libro, se representa el enlace entre el hidrógeno y el aceptor mediante una línea de puntos (véase la Figura 2.7).

El enlace de hidrógeno comparte algunas propiedades tanto con las interacciones covalentes como con las no covalentes. En parte, es como una interacción carga-carga entre la carga positiva parcial del H y la carga negativa del par de electrones. Pero, al mismo tiempo, también se comparten electrones (igual que en un enlace covalente) entre el H y el aceptor. Estas dos propiedades se reflejan en la longitud del enlace de H. La distancia entre el átomo de hidrógeno y el átomo aceptor en un enlace de hidrógeno es bastante más reducida que la que cabría esperar de sus radios de van der Waals. Por ejemplo, la distancia entre el H y el O en el enlace $>$N—H···O=C$<$ es aproximadamen-

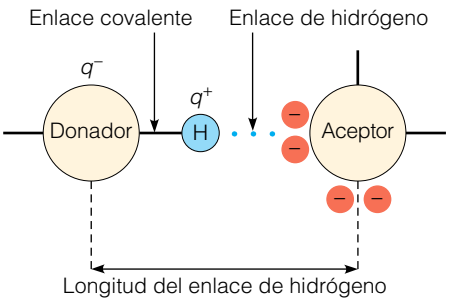


FIGURA **2.7**

El enlace de hidrógeno. La figura muestra un enlace de H ideal que podría existir, por ejemplo, en —O—H···O=. Aunque el enlace de H es entre H y el aceptor, la longitud del enlace de H se define como la distancia entre el donador y el aceptor.

te de sólo 0.19 nm, mientras que, según la suma de los radios de van der Waals que aparecen en la Tabla 2.2, se podría predecir una distancia de 0.26 nm. Por otro lado, un enlace *covalente* H—O tiene una longitud de sólo 0.10 nm. El enlace de hidrógeno completo, incluyendo el enlace covalente con el nitrógeno, tiene una longitud aproximada de 0.29 nm. Las longitudes de enlace de algunos enlaces de hidrógeno especialmente fuertes aparecen enumeradas en la Tabla 2.3. Obsérvese que las longitudes de los enlaces son fijas, del mismo modo que en los enlaces covalentes (pero no lo son en otros enlaces no covalentes).

La energía de los enlaces de H es notablemente superior a la de la mayoría de los otros enlaces no covalentes, en consonancia con su carácter parcialmente covalente (véase la Figura 2.1). Los enlaces de hidrógeno, al igual que los enlaces covalentes, son altamente direccionales: el enlace de H donador tiende a apuntar directamente hacia el par de electrones aceptores. La importancia de esta direccionalidad puede observarse en el cometido que desempeñan los enlaces de hidrógeno en la organización de una estructura bioquímica regular como la hélice α en las proteínas (Figura 2.8). Éste es tan sólo un ejemplo de entre los muchos que encontraremos en el que los enlaces de hidrógeno estabilizan estructuras ordenadas en moléculas grandes.

Las diferentes clases de interacciones no covalentes que hemos descrito son débiles de forma individual, pero cuando se encuentran presentes muchas de ellas en una determinada macromolécula o entre macromoléculas, sus energías pueden dar una suma total impresionante, a menudo de varios cientos de kilojulios. De esta forma, estas interacciones pueden explicar la estabilidad de las estructuras macromoleculares. Al mismo tiempo, la facilidad con la que pueden romperse y volver a formarse los enlaces no covalentes individuales proporciona a estas estructuras la flexibilidad necesaria para su función.

Los enlaces de hidrógeno son las interacciones no covalentes más fuertes y más específicas.

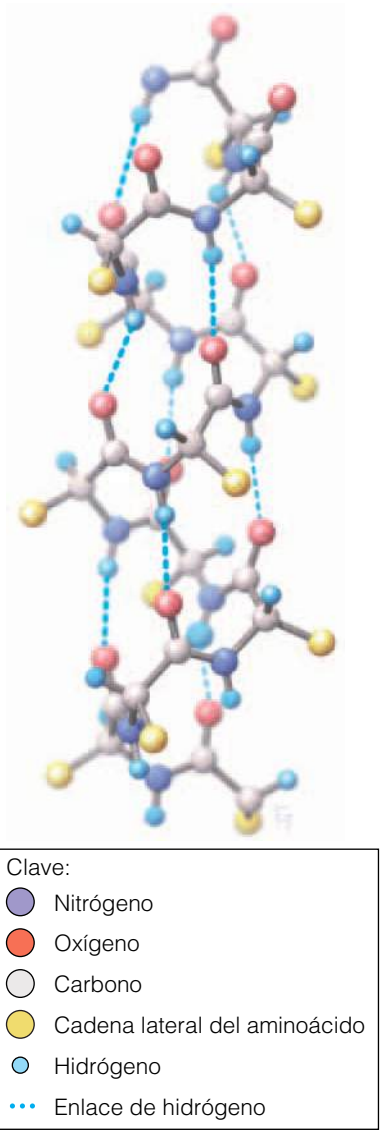


FIGURA **2.8**

Los enlaces de hidrógeno en la estructura biológica. Este ejemplo es una parte de una proteína con una conformación de hélice α. La hélice α, un elemento estructural corriente en las proteínas, se mantiene mediante enlaces de hidrógeno $>N—H\cdots O=C<$ entre grupos en la cadena de proteica.

Misión del agua en los procesos biológicos

Los procesos químicos y físicos de la vida requieren que las moléculas puedan desplazarse, encontrarse e intercambiar parejas continuamente en los procesos

TABLA **2.3** **Principales clases de enlaces de hidrógeno en moléculas con importancia biológica**

Donador···Aceptor	Longitud del enlace[a] (nm)	Comentario
—O—H ··· O(H)	0.28 ± 0.01	Enlace de H formado en el agua
—O—H ··· O=C	0.28 ± 0.01	El enlace del agua con otras moléculas se realiza de estas formas
N—H ··· O(H)	0.29 ± 0.01	
N—H ··· O=C	0.29 ± 0.01	Muy importante en las estructuras de las proteínas y los ácidos nucleicos
N—H ··· N	0.31 ± 0.02	
N—H ··· S	0.37	Relativamente poco frecuente; más débil que los anteriores

[a] Definida como la distancia desde el centro del átomo donador hasta el centro del átomo aceptor. Por ejemplo, en el enlace $N—H\cdots O=C<$ es la distancia N—O.

complicados del metabolismo y de la síntesis. Un entorno líquido permite una movilidad molecular, y el agua no es sólo el líquido más abundante de la tierra, sino que, además, está admirablemente adecuado para esta finalidad. Para ver por qué esto es así, debemos examinar detalladamente las propiedades del agua.

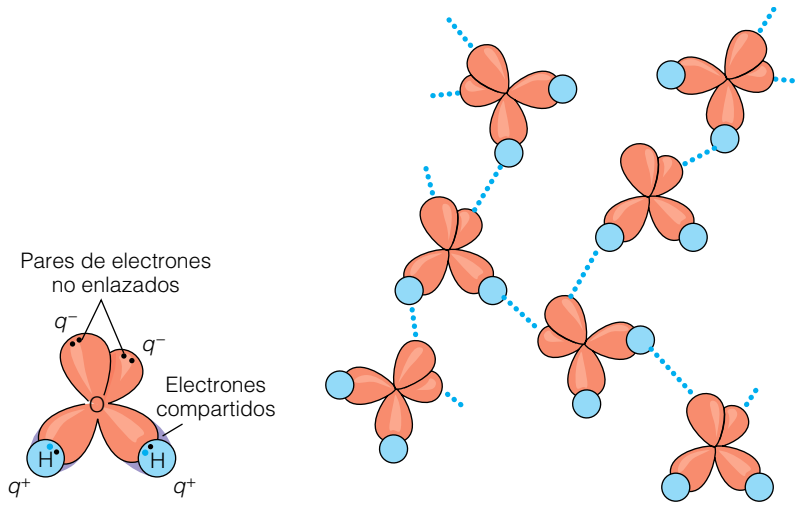
ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DEL AGUA

Aunque se tienda a dar por supuestas las propiedades del agua, en realidad se trata de una sustancia muy particular. La Tabla 2.4, que compara el H_2O (peso molecular 18) con otros compuestos de peso molecular similar, muestra un hecho destacable. La mayoría de esos compuestos de peso molecular bajo son gases a temperatura ambiente y tienen unos puntos de ebullición muy inferiores al del agua. ¿Por qué es el agua una sustancia poco corriente? La respuesta la encontramos principalmente en la fuerte tendencia de las moléculas de agua a formar enlaces de hidrógeno con otras moléculas de agua.

La disposición electrónica de una única molécula de agua aparece en la Figura 2.9a. Dos de los seis electrones de los orbitales más externos del átomo de oxígeno intervienen en los enlaces covalentes con los hidrógenos. Los cuatro electrones restantes están en pares no enlazados, que son excelentes aceptores de enlaces de hidrógeno. En el agua, los grupos —OH son potentes donadores de enlaces de hidrógeno. De este modo, cada molécula de agua es *simultáneamente* un donador de enlace de hidrógeno y un aceptor de enlace de hidrógeno, y una muestra de agua es una red dinámica de moléculas unidas por enlaces de H

TABLA 2.4 Propiedades del agua en comparación con otros compuestos de bajo peso molecular

Compuesto	Peso molecular	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Calor de Evaporación (kJ/mol)
CH_4	16.04	−182	−164	8.16
NH_3	17.03	−78	−33	23.26
H_2O	18.02	0	+100	40.71
H_2S	34.08	−86	−61	18.66



(a) Estructura electrónica de una molécula de agua

(b) Enlaces de hidrógeno en el agua

FIGURA **2.9**

Enlaces de hidrógeno en el agua. (a) Estructura electrónica en una molécula de agua individual. Los pares de electrones no enlazados de los dos orbitales actúan como aceptores de H. **(b)** Enlaces entre moléculas de agua. Cada molécula actúa al mismo tiempo como donador de H y como aceptor de H, permitiendo que se formen agrupaciones de moléculas de agua.

La mayor parte de las propiedades singulares del agua se deben a su potencial para formar enlaces de hidrógeno y a su naturaleza polar.

(Figura 2.9b). En consecuencia, la evaporación del agua requiere una cantidad de energía excepcional para una molécula de su tamaño. Por consiguiente, tanto el calor de evaporación como el punto de ebullición del agua son excepcionalmente elevados (Tabla 2.4), y el agua permanece en estado líquido a las temperaturas propias de gran parte de la superficie terrestre.

Cuando el agua se congela a hielo, los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua pasan a ser más regulares y mejor definidos, creando una red molecular tetraédrica rígida en la que cada molécula está enlazada a otras cuatro mediante enlace de H (Figura 2.10a). Esta estructura de red se desmantela sólo parcialmente cuando el hielo se funde y persiste un cierto orden de largo alcance incluso a temperaturas más elevadas. Se ha descrito la estructura del agua líquida como "agrupaciones parpadeantes" de enlaces de hidrógeno, con restos de la red del hielo que continuamente se escinde y se vuelve a formar a medida que las moléculas se desplazan (Figura 2.10b). La estructura relativamente abierta de la red del hielo explica otra de las propiedades poco corrientes del agua: el agua en estado líquido tiene mayor densidad que en estado sólido, ya que cuando la red se rompe, las moléculas pueden acercarse más. Este hecho aparentemente banal es de suma importancia para la vida terrestre. Si el

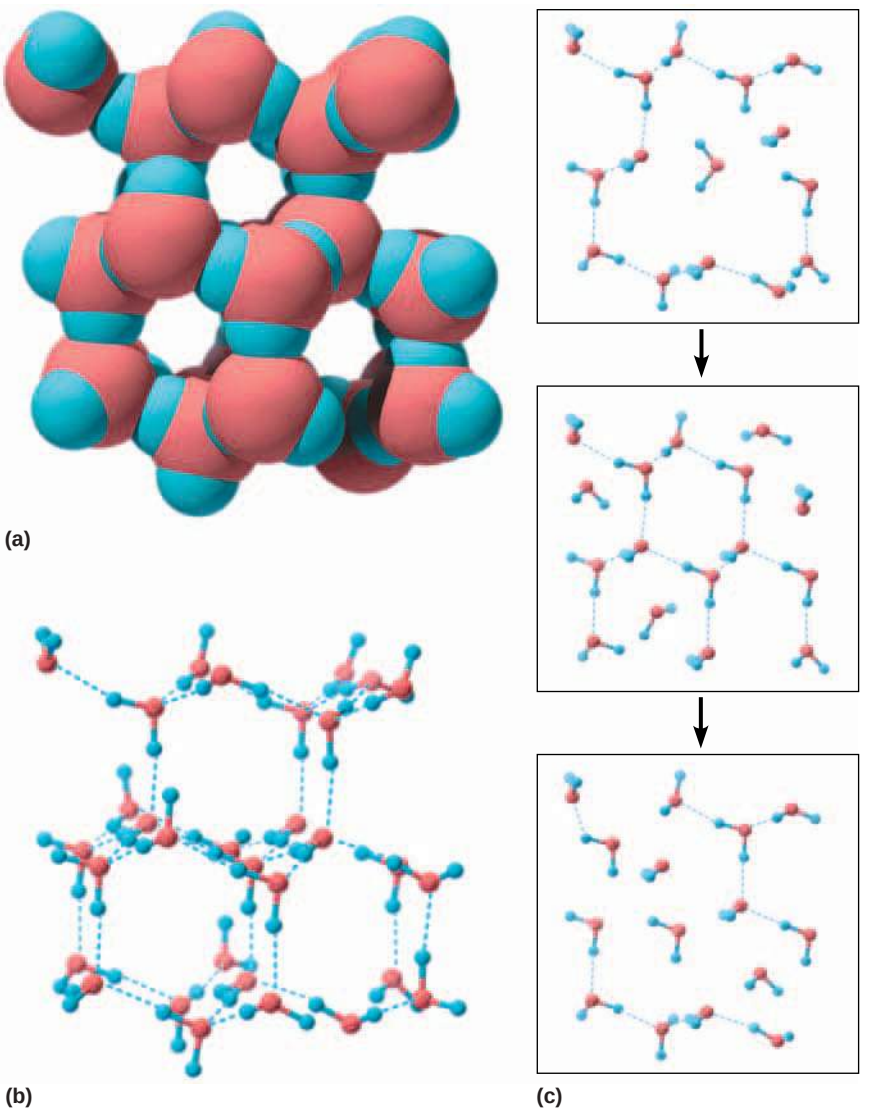


FIGURA **2.10**

El agua como una red molecular. (a) Un modelo de relleno espacial de la estructura del hielo. El hielo es una red molecular formada por una repetición indefinida de un patrón tetraédrico de enlaces de hidrógeno. Cada molécula actúa a la vez como donador a otras dos moléculas y como aceptor de otras dos moléculas. La estructura es relativamente abierta, dada la longitud de los enlaces de hidrógeno, y ello explica la baja densidad del hielo. **(b)** Un modelo en esqueleto de la red de hielo. **(c)** Estructura del agua líquida. Cuando el hielo se funde, la red tetraédrica regular se rompe, pero siguen conservándose partes considerables de la misma, especialmente a temperaturas bajas. En el agua líquida, agrupaciones parpadeantes de moléculas están unidas mediante enlaces de hidrógeno que continuamente se escinden y se forman de nuevo. En esta "película en movimiento" esquemática, las imágenes sucesivas representan cambios que tienen lugar en picosegundos (10^{-12} s).

(a–b) Adaptado de L. Pauling and P. Pauling, *Chemistry* (New York, NY: W. H. Freeman, 1975), p. 289.

agua se comportara como la mayoría de las sustancias, cuya densidad aumenta cuando se congelan, el hielo que se forma cada invierno en las superficies de los lagos y de los océanos se hundiría hasta el fondo. Una vez allí, aislado por las capas que lo recubren, se iría acumulando con los años, y actualmente la mayor parte del agua de la tierra estaría retenida en forma de hielo. Si el agua líquida a 0ºC fuera un 9% menos densa de lo que es, la vida difícilmente hubiera podido evolucionar, puesto que en este caso el hielo se hundiría.

En la Tabla 2.5 aparecen enumeradas otras propiedades poco corrientes del agua que se explican fácilmente en términos de su estructura molecular. En comparación con la mayoría de los líquidos orgánicos, el agua tiene una elevada *viscosidad*, que es una consecuencia de la estructura trabada de enlaces de hidrógeno. Esta cohesión explica también la elevada *tensión superficial* del agua. La constante dieléctrica elevada del agua, que ya se ha mencionado, es consecuencia de su carácter dipolar. Un campo eléctrico generado entre dos iones produce una orientación considerable de los dipolos de agua situados en él, así como una cantidad significativa de polarización inducida. Estos dipolos orientados contribuyen a un contracampo, reduciendo la fuerza electrostática efectiva entre los dos iones.

EL AGUA COMO DISOLVENTE

El agua es un disolvente excelente por su potencial para formar enlaces de hidrógeno y su naturaleza polar.

Los procesos vitales requieren que una gran variedad de iones y moléculas se muevan en proximidad, es decir, que sean solubles en un medio común. El agua funciona como disolvente universal en los medios intracelular y extracelular gracias principalmente a las dos propiedades del agua descritas anteriormente: su tendencia a formar enlaces de hidrógeno y su carácter dipolar. Las sustancias que pueden beneficiarse de estas propiedades de modo que se disuelven fácilmente en agua se denominan **hidrófilas** o "afines al agua".

Las moléculas hidrófilas en una disolución acuosa

Las moléculas con grupos capaces de formar enlaces de hidrógeno tienden a unirse con el agua con este tipo de enlace. De este modo, el agua disuelve fácilmente los compuestos hidroxilo, las aminas, los compuestos sulfhidrilo, los ésteres, las cetonas y una gran variedad de otros compuestos orgánicos. Cuando las moléculas que contienen enlaces de hidrógeno internos (como la hélice α de la Figura 2.8) se disuelven en agua, algunos de estos enlaces de H internos o todos ellos pueden intercambiarse por enlaces de H con el H_2O (Figura 2.11).

Pero no sólo se disuelven bien en agua los aceptores y donadores de enlaces de hidrógeno. A diferencia de la mayoría de los líquidos orgánicos, el agua es un disolvente excelente para los compuestos iónicos. Las sustancias como el cloruro sódico, que se encuentran en estado sólido en forma de redes estables de iones,

TABLA 2.5 Propiedades importantes del agua líquida en comparación con las del *n*-pentano, un líquido no polar y sin enlaces de hidrógeno[a]

Propiedad	Agua	*n*-Pentano
Peso molecular (g/mol)	18.02	72.15
Densidad (g/cm^3)	0.997	0.626
Punto de ebullición (°C)	100	36.1
Constante dieléctrica	78.54	1.84
Viscosidad (g/cm·s)	0.890×10^{-2}	0.228×10^{-2}
Tensión superficial (dina/cm)	71.97	17

[a] Todos los datos corresponden a 25°C.

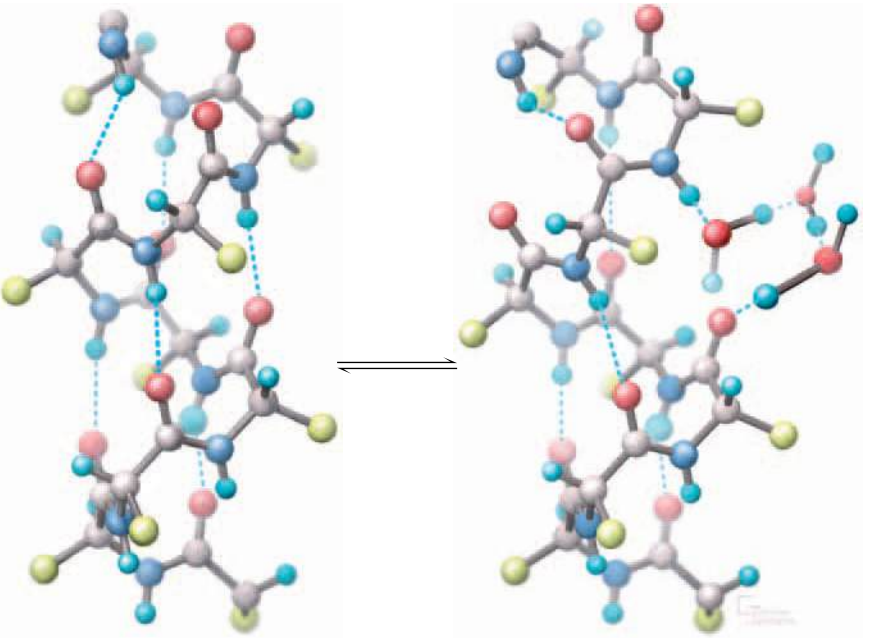


FIGURA **2.11**

Intercambio de enlaces de hidrógeno internos por enlaces de hidrógeno del agua. Se muestra una sección de una molécula proteica como la de la Figura 2.8 sustituyendo algunos de sus enlaces de hidrógeno intramoleculares por enlaces de hidrógeno con el disolvente (agua). Debido a este intercambio, las moléculas con enlaces internos de hidrógeno se disuelven en agua con facilidad.

se disuelven con facilidad en agua. La explicación de este hecho reside en la naturaleza dipolar de la molécula de agua. Las interacciones de los dipolos del agua con los cationes y los aniones en una disolución acuosa hacen que los iones se **hidraten**; es decir, se rodeen de capas de moléculas de agua denominadas **capas de hidratación** (Figura 2.12). La tendencia a disolverse en agua de muchos compuestos iónicos, como el NaCl, se explica en gran parte por dos factores. En primer lugar, la formación de las capas de hidratación es energéticamente favorable. En segundo lugar, la constante dieléctrica elevada del agua apantalla y

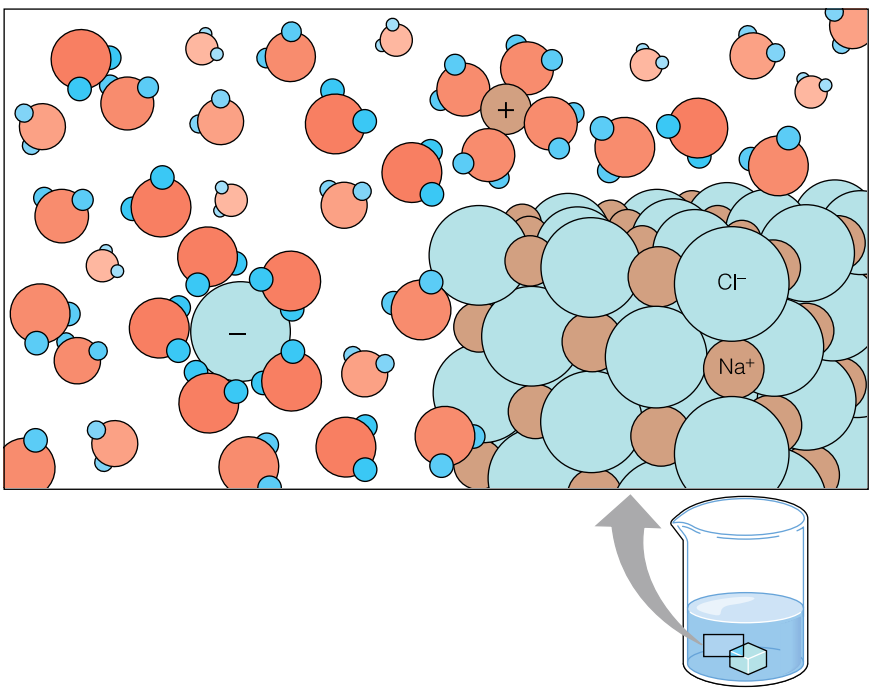


FIGURA **2.12**

Hidratación de los iones en disolución. La figura muestra un cristal salino disolviéndose en agua. A medida que los iones sodio y cloro dejan el cristal, la interacción no covalente entre estos iones y las moléculas dipolares de agua forma una capa de hidratación alrededor de cada ion. La energía que se desprende en esta interacción ayuda a superar las interacciones carga-carga, que estabilizan el cristal.

disminuye la fuerza electrostática entre los iones con cargas opuestas que, de otro modo, volverían a unirse.

La naturaleza dipolar de la molécula de agua favorece también la capacidad del agua para disolver las moléculas orgánicas no iónicas, aunque polares, como los fenoles, los ésteres y las amidas. A menudo, estas moléculas tienen momentos dipolares elevados y la interacción con el dipolo de agua favorece su solubilidad en la misma.

Las moléculas hidrófobas en una disolución acuosa

La solubilidad de las sustancias hidrófilas depende de su interacción energéticamente favorable con las moléculas de agua. Por tanto, no es extraño que las sustancias como los hidrocarburos, que son no polares y no iónicos y que no pueden formar enlaces de hidrógeno, muestren sólo una limitada solubilidad en el agua. Las moléculas que se comportan de esta manera se denominan **hidrófobas** o "con aversión al agua". Sin embargo, la energía no es el único factor que limita su solubilidad. Cuando las moléculas hidrófobas se disuelven, no forman capas de hidratación, a diferencia de las sustancias hidrófilas. En lugar de esto, la red regular del agua forma estructuras de **clatrato** similares a la del hielo, o "jaulas", alrededor de las moléculas no polares (Figura 2.13). Esta disposición ordenada de las moléculas de agua, que va más allá de la jaula, se produce por una disminución de la *entropía*, o aleatoriedad, de la mezcla (véase el Capítulo 3). La disminución de la entropía favorece la baja solubilidad de las sustancias hidrófobas en agua. También explica la tendencia, bien conocida, de las sustancias hidrófobas a formar agregados en agua; todos hemos visto que el aceite forma gotitas cuando lo agitamos con vinagre. Se necesita más ordenación para rodear dos moléculas hidrófobas con dos jaulas separadas que para rodearlas a ambas con una única jaula, de modo que las moléculas hidrófobas tienden a agruparse.

Las moléculas anfipáticas en una disolución acuosa

Existe una clase de moléculas muy interesantes e importantes que muestra propiedades hidrófilas e hidrófobas al mismo tiempo. Dichas sustancias **anfipáticas** comprenden ácidos grasos y detergentes (Figura 2.14). Las moléculas anfipáti-

Las sustancias anfipáticas son esquizofrénicos moleculares: parte de la molécula es hidrófila y parte es hidrófoba.

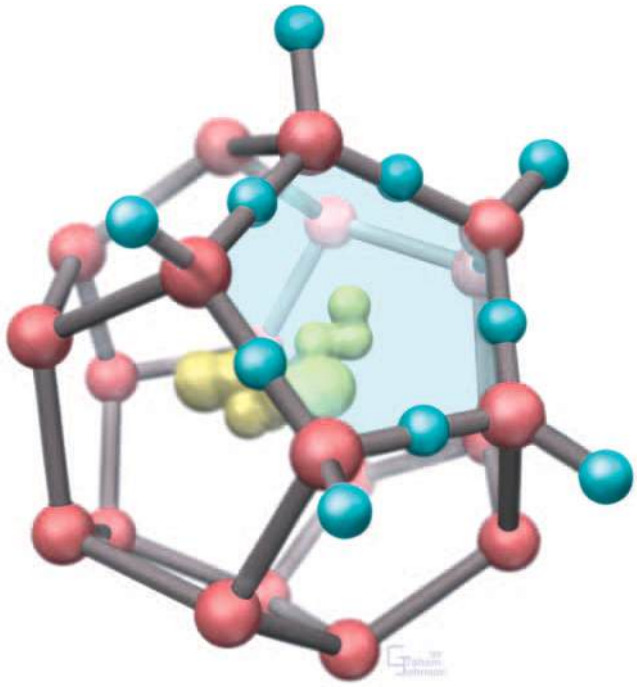


FIGURA **2.13**

Una unidad de la estructura de clatrato que rodea a una molécula hidrófoba (en amarillo). Los átomos de oxígeno se presentan en rojo. Los hidrógenos se muestran en un pentágono de oxígenos. La estructura ordenada puede ampliarse considerablemente más dentro del agua que la rodea.

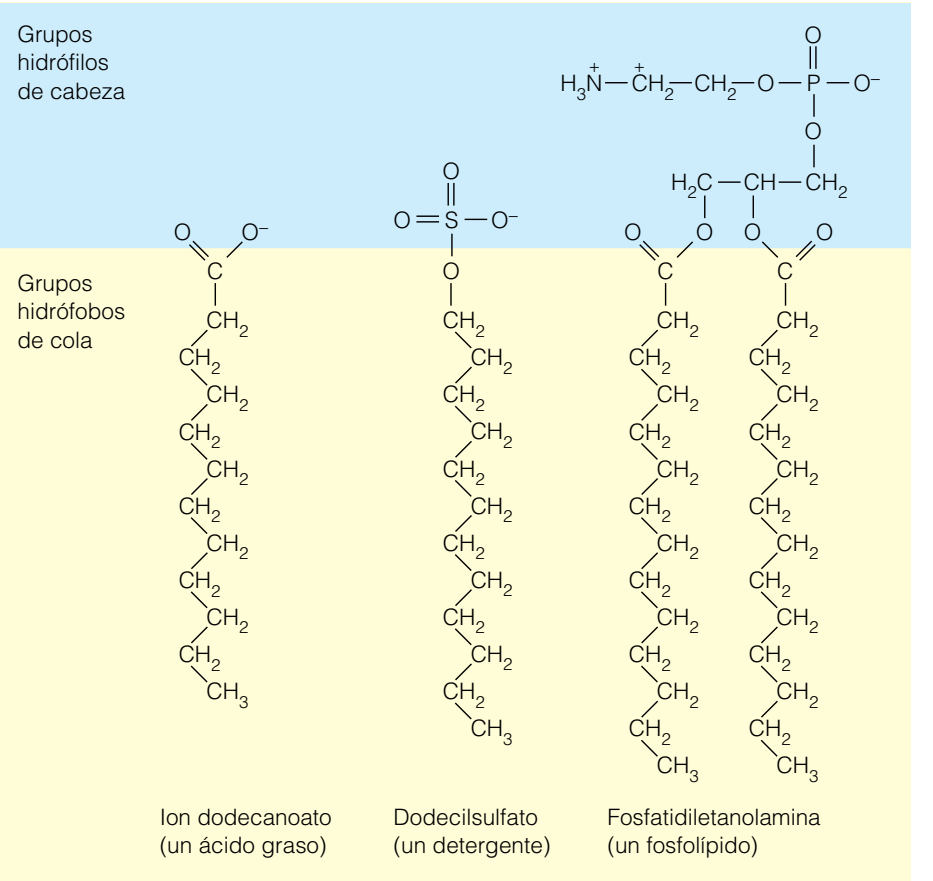
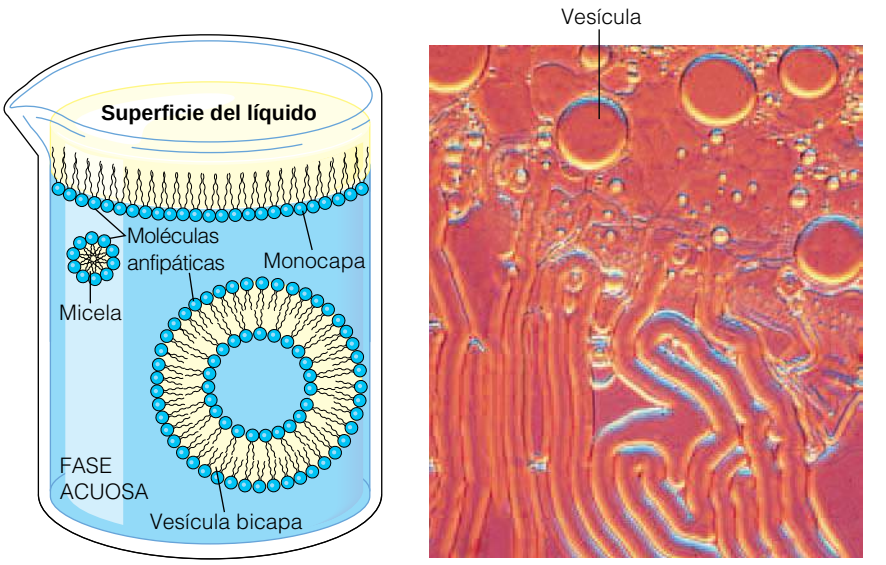


FIGURA **2.14**

Moléculas anfipáticas. Estos tres ejemplos ilustran la estructura "esquizofrénica" de las moléculas anfipáticas que tienen un grupo de cabeza hidrófilo unido a una cola hidrófoba.

cas tienen un grupo de cabeza muy hidrófilo, acoplado a una cola hidrófoba, generalmente un hidrocarburo. Cuando se intenta disolverlas en agua, las sustancias anfipáticas forman una o varias de las estructuras de la Figura 2.15a. Por ejemplo, pueden formar una **monocapa** en la superficie del agua donde sólo los grupos de cabeza están sumergidos. Por otro lado, si la mezcla se agita enérgicamente, se pueden formar **micelas** (estructuras esféricas formadas por una



(a) Estructuras formadas en el agua **(b)** Formación de vesículas

FIGURA **2.15**

Interacciones de las moléculas anfipáticas con el agua. **(a)** Las estructuras que pueden formarse cuando las sustancias anfipáticas se mezclan con el agua son una monocapa en la superficie del agua, una micela y una vesícula bicapa, una esfera hueca que contiene y está rodeada de agua. En cada uno de estos casos, los grupos de cabeza hidrófilos están en contacto con la fase acuosa, mientras que las colas hidrófobas se asocian entre ellas. **(b)** Cuando los fosfolípidos se mezclan con agua, las moléculas anfipáticas se agregan para formar películas parecidas a las membranas biológicas. La agitación hace que la película se rompa en vesículas.

(b) Por cortesía de D. W. Deamer y P. B. Armstrong, Universidad de California, Davis.

única capa de moléculas) o **vesículas bicapa**. En estos casos, las colas de hidrocarburo de las moléculas tienden a disponerse de modo más o menos paralelo, lo cual les permite interactuar mediante fuerzas de van der Waals. Los grupos de cabeza polares o iónicos están fuertemente hidratados por el agua que les rodea. En bioquímica es muy importante el hecho de que las moléculas anfipáticas constituyen la base de las **membranas bicapa** biológicas que rodean las células y que forman las separaciones entre los compartimientos celulares. Estas bicapas están formadas fundamentalmente por fosfolípidos, como el que aparece en la Figura 2.14. La Figura 2.15b muestra la formación de membranas sintéticas a partir de los fosfolípidos. En el Capítulo 10 hablaremos más detalladamente sobre los fosfolípidos y las membranas.

Equilibrios iónicos

Prácticamente todas las reacciones bioquímicas tienen lugar en un medio acuoso; las excepciones son las pocas que tienen lugar en los interiores hidrófobos de las membranas. Las numerosas sustancias disueltas en el citosol acuoso y en los líquidos extracelulares corporales incluyen iones libres como K^+, Cl^- y Mg^{2+}, así como moléculas y macromoléculas con grupos ionizables. El comportamiento de todas estas moléculas en los procesos bioquímicos depende en gran medida de su estado de ionización. Por eso es importante que revisemos brevemente algunos aspectos del equilibrio iónico, especialmente el equilibrio ácido-base y la ionización del agua.

ÁCIDOS Y BASES: DONADORES Y ACEPTORES DE PROTONES

Recuerde de la química elemental que los ácidos son donadores de protones y que las bases son aceptoras de protones. Un **ácido fuerte** se disocia casi totalmente en protones y aniones. Por ejemplo, el HCl se disocia casi totalmente en agua para dar H^+ y Cl^-, de modo que la concentración de H^+ en la disolución es prácticamente igual a la concentración molar de HCl añadido. Asimismo, el NaOH se denomina una **base fuerte** puesto que se ioniza completamente para dar iones OH^-, que son poderosos aceptores de protones.

En bioquímica, la mayoría de las sustancias ácidas y básicas son **ácidos débiles** o **bases débiles**, que sólo se disocian parcialmente. En una solución acuosa de un ácido débil existe un equilibrio, que puede medirse, entre el ácido y su *base conjugada*, la sustancia que puede aceptar un protón y formar de nuevo el ácido. En la Tabla 2.6 aparecen ejemplos de ácidos débiles y sus bases conjugadas. Obsérvese que estas bases no contienen necesariamente grupos —OH, pero aumentan la concentración de OH^- de una solución extrayendo un protón del agua.

Muchas moléculas biológicas son ácidos débiles o bases débiles.

Los ácidos débiles enumerados en la Tabla 2.6 varían en gran medida en su fuerza, esto es, en su tendencia a donar protones. Esta variación de la fuerza ácida está indicada por la gama de valores de K_a y de pK_a que consideraremos a continuación. Cuanto más fuerte es el ácido, más débil es su base conjugada. En otras palabras, cuanto más fuerte es la tendencia de un ácido a donar un protón, más débil es la tendencia de su base conjugada a aceptar un protón y a volver a formar el ácido.

IONIZACIÓN DEL AGUA Y PRODUCTO IÓNICO

A pesar de que el agua es fundamentalmente una molécula neutra, tiene una ligera tendencia a ionizarse; en realidad, puede actuar como ácido muy débil y como base muy débil. El mejor modo de entender esta reacción de ionización

TABLA 2.6 Algunos ácidos débiles y sus bases conjugadas

Ácido (Donador de Protón)		Base Conjugada (Aceptor de Protón)		pK_a	K_a (M)
$HCOOH$ Ácido fórmico	$\rightleftharpoons$	$HCOO^-$ Ion formiato	$+H^+$	3.75	1.78×10^{-4}
CH_3COOH Ácido acético	$\rightleftharpoons$	CH_3COO^- Ion acetato	$+H^+$	4.76	1.74×10^{-5}
$CH_3CH(OH)COOH$ Ácido láctico	$\rightleftharpoons$	$CH_3CH(OH)COO^-$ Ion lactato	$+H^+$	3.86	1.38×10^{-4}
H_3PO_4 Ácido fosfórico	$\rightleftharpoons$	$H_2PO_4^-$ Ion dihidrógeno fosfato	$+H^+$	2.14	7.24×10^{-3}
$H_2PO_4^-$ Ion dihidrógeno fosfato	$\rightleftharpoons$	HPO_4^{2-} Ion monohidrógeno fosfato	$+H^+$	6.86	1.38×10^{-7}
HPO_4^{2-} Ion monohidrógeno fosfato	$\rightleftharpoons$	PO_4^{3-} Ion fosfato	$+H^+$	12.4	3.98×10^{-13}
H_2CO_3 Ácido carbónico	$\rightleftharpoons$	HCO_3^- Ion bicarbonato	$+H^+$	6.37	4.27×10^{-7}
HCO_3^- Ion bicarbonato	$\rightleftharpoons$	CO_3^{2-} Ion carbonato	$+H^+$	10.25	5.62×10^{-11}
C_6H_5OH Fenol	$\rightleftharpoons$	$C_6H_5O^-$ Ion fenolato	$+H^+$	9.89	1.29×10^{-10}
NH_4^+ Ion amonio	$\rightleftharpoons$	NH_3 Amoníaco	$+H^+$	9.25	5.62×10^{-10}

Serie del ácido fosfórico Serie del ácido carbónico

es observar que una molécula de agua puede transferir un protón a otra molécula para dar un ion hidronio (H_3O^+) y un ion hidroxilo (OH^-), de modo que el agua es el donador del protón y el aceptor del protón al mismo tiempo:

$$H_2O + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + OH^-$$

En realidad, esto es una simplificación, puesto que el protón transferido puede estar unido a varios grupos de moléculas de agua para producir especies como $H_5O_2^+$ y H_7O^{3+}. En una disolución acuosa, los protones tienen mucha movilidad, y la carga salta de una molécula de agua a otra en una fracción de tiempo de aproximadamente 10^{-15} segundos.

A efectos prácticos, casi siempre es suficiente describir el proceso de ionización de una forma mucho más sencilla,

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

siempre que recordemos que un protón *nunca* se encuentra en una solución acuosa como un ion libre, sino que siempre está asociado a una o más moléculas de agua. Cuando escribimos una reacción en la que interviene H^+, en realidad nos estamos refiriendo a un protón *hidratado*.

El equilibrio descrito en la ecuación anterior puede expresarse mediante el **producto iónico** del agua, que a 25°C es de 10^{-14} M^2:

$$[H^+][OH^-] = K_w = 1 \times 10^{-14}\ M^2 \qquad (2.5)$$

El símbolo M, en este caso y de ahora en adelante, indica moles por litro. Puesto que el producto iónico es una constante, $[H^+]$ y $[OH^-]$ no pueden variar inde-

pendientemente. Si modificamos $[H^+]$ o bien $[OH^-]$ añadiendo sustancias ácidas o básicas al agua, la otra concentración cambia en función de ello. Una disolución con una $[H^+]$ alta tiene una $[OH^-]$ baja, y viceversa.

Si tomamos agua pura a la que no se han añadido sustancias ácidas ni básicas, todos los iones H^+ y OH^- deben proceder de la disociación de la propia agua. En estas condiciones, las concentraciones de H^+ y OH^- son iguales, de modo que a 25°C

$$[H^+] = [OH^-] = 1 \times 10^{-7}\ \text{M} \qquad (2.6)$$

y se dice que la disolución es *neutra*, es decir, ni ácida ni básica. Sin embargo, el producto iónico depende de la temperatura, de modo que una disolución neutra no siempre tiene $[H^+]$ y $[OH^-]$ de exactamente 10^{-7} M. Por ejemplo, a la temperatura del cuerpo humano (37°C) las concentraciones de los iones H^+ y OH^- en una disolución neutra son ambas de 1.6×10^{-7} M.

LA ESCALA DE pH Y LOS VALORES FISIOLÓGICOS DE pH

Para no tener que trabajar con las potencias negativas de 10, casi siempre expresamos la concentración del ion hidrógeno como pH, definido* como

$$\text{pH} = -\log [H^+] \qquad (2.7)$$

Cuanto más alta sea la $[H^+]$ en una disolución, menor será el pH, de modo que un pH bajo corresponde a una disolución ácida. Por otro lado, una $[H^+]$ baja debe ir acompañada de una $[OH^-]$ alta, como indica la ecuación (2.5), de modo que un pH alto corresponde a una disolución básica.

La Figura 2.16 muestra una escala esquemática de valores de pH, con los valores de algunas disoluciónes bien conocidas. Obsérvese que la mayoría de los líquidos corporales tienen unos valores de pH que se sitúan en un margen de 6.5 a 8.0, que a menudo se denomina **margen de pH fisiológico**. La mayoría de los procesos bioquímicos tienen lugar en esta zona de la escala.

A causa de la sensibilidad de los procesos bioquímicos a los más pequeños cambios de pH, el control del pH es esencial en la mayoría de los experimentos bioquímicos. Actualmente casi todas las medidas de pH se realizan con pH metros con electrodos de vidrio. El electrodo genera un potencial eléctrico que depende de la concentración de H^+, y que el instrumento convierte en una lectura de pH.

EQUILIBRIOS DE ÁCIDOS Y BASES DÉBILES

Muchos compuestos importantes en biología contienen grupos débilmente ácidos y básicos. Por ejemplo, algunas moléculas proteicas muy grandes tienen grupos ácidos (como los carboxilatos) y básicos (como los amino) en sus superficies. La respuesta de estos grupos a los cambios de pH en el margen fisiológico o cerca de éste, a menudo tiene una importancia considerable para su función. Por ejemplo, la eficacia catalítica de muchas enzimas depende de forma crucial del estado de ionización de algunos grupos, de modo que estos catalizadores sólo son eficaces dentro de unos márgenes determinados de pH. Hay que revisar el equilibrio de disociación de los ácidos y de las bases débiles para entender estos efectos. Para hacerlo, considérense los ejemplos que aparecen en la Tabla 2.6.

* Para ser más exactos en nuestra definición del pH, debemos utilizar la *actividad* del ion hidrógeno en vez de la concentración, siendo la actividad un número sin dimensiones igual a la concentración eficaz. Sin embargo, la distinción entre la concentración molar y la actividad casi siempre se desdeña en bioquímica. Este planteamiento es adecuado en la mayoría de los experimentos bioquímicos, que generalmente se realizan en disoluciones diluidas, donde la actividad y la concentración son casi iguales.

La mayoría de las reacciones biológicas se producen entre pH 6.5 y pH 8.0.

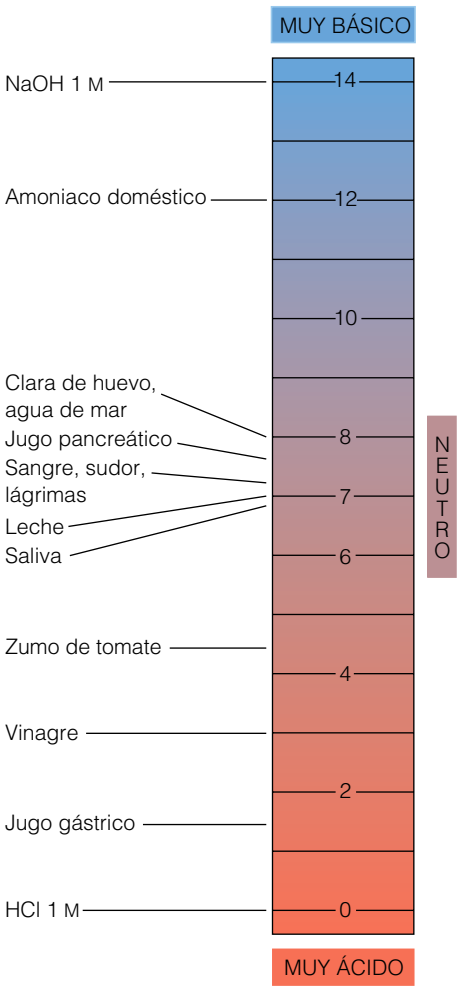


FIGURA **2.16**

La escala de pH y el intervalo de pH fisiológico. Esta figura muestra los valores de pH de algunas sustancias muy corrientes y de algunos líquidos orgánicos, con el NaOH en el extremo más básico y el HCl en el extremo más ácido del intervalo que se muestra. El pH de la mayoría de los líquidos corporales está situado en el intervalo neutro, entre 6.5 y 8.0, donde tienen lugar la mayoría de los procesos fisiológicos. Existen algunas excepciones, como el jugo gástrico, que tiene un pH entre 1 y 2.

K_a y pK_a

Todas las reacciones de la Tabla 2.6 pueden escribirse como la disociación de un ácido. Esta disociación puede adoptar varias formas, dependiendo de la sustancia implicada:

$$HA^+ \rightleftharpoons A + H^+$$
$$HA \rightleftharpoons A^- + H^+$$
$$HA^- \rightleftharpoons A^{2-} + H^+$$

Obsérvese que en algunos casos la base conjugada tiene carga negativa y en otros casos no es así, pero en *todos* ellos tiene una carga positiva menor que el ácido. A efectos prácticos, escribiremos siempre estas reacciones como $HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$. La constante de equilibrio de la disociación de un ácido débil (a menudo denominada **constante de disociación**) se define como

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \tag{2.8}$$

Cuanto más grande sea K_a mayor es la tendencia del ácido a disociarse. Así, cuanto mayor es K_a, más fuerte es el ácido.

La fuerza de los ácidos generalmente se expresa en función del valor de pK_a:

$$pK_a = -\log K_a \tag{2.9}$$

Una forma adecuada de expresar la fuerza de un ácido es mediante su pK_a; cuanto menor es el pK_a más fuerte es el ácido.

Dado que el pK_a es el logaritmo negativo de K_a, un valor numéricamente pequeño de pK_a corresponde a un ácido fuerte y un valor numéricamente grande corresponde a un ácido débil. En la Tabla 2.6 aparecen los valores de K_a y de pK_a de los ácidos enumerados.

Algunos ácidos, como los ácidos fosfórico y carbónico, de la Tabla 2.6 pueden perder más de un protón. Estos ácidos se denominan **ácidos polipróticos**. Las disociaciones sucesivas implican distintos pasos, con distintos valores de pK_a. De ahí que estas sustancias puedan existir en varios estados de ionización diferentes.

UN EXAMEN MÁS DETALLADO DE LOS VALORES DE pK_a: FACTORES QUE AFECTAN A LA DISOCIACIÓN DE LOS ÁCIDOS

La tendencia a la disociación de algunos ácidos es el resultado de un equilibrio específico entre los factores que favorecen y que impiden la disociación. Podemos entender algunos de los factores que afectan al pK_a a la luz de la explicación anterior sobre las propiedades del agua como disolvente.

La disociación de un ácido da como resultado la hidratación del protón y, en la mayoría de los casos, también de la base conjugada. Puesto que la hidratación es energéticamente favorable y reduce la atracción entre los iones, favorece la disociación de la mayoría de los ácidos. Las excepciones son los ácidos cargados positivamente, como el $\overset{+}{N}H_4$, que se disocia para dar lugar a una base conjugada sin carga. En estos casos, es el ácido el que se hidrata y, por tanto, se estabiliza. Ésta es una de las razones por las que el $\overset{+}{N}H_4$ es un ácido tan débil.

La atracción electrostática entre el protón y una base conjugada cargada negativamente se opone a la disociación de un ácido. Este efecto puede observarse comparando los valores sucesivos de pK_a en la disociación del ácido fosfórico en la Tabla 2.6. A medida que la carga de la base conjugada aumenta al pasar de $H_2PO_4^-$ a PO_4^{3-}, el pK_a también aumenta. El HPO_4^{2-} es un ácido muy débil.

Estos ejemplos son importantes, puesto que muestran cómo pueden influir sobre los valores de pK_a los efectos del medio. Cuando estudiemos las proteínas, observaremos que los valores de pK_a en grupos supuestamente idénticos pueden tener valores muy diversos, dependiendo del entorno molecular local.

TITULACIÓN DE LOS ÁCIDOS DÉBILES: ECUACIÓN DE HENDERSON-HASSELBALCH

¿Cómo cambia el pH de una disolución de un ácido débil al cambiar la proporción base/ácido? Esta pregunta es importante para los bioquímicos, ya que muchas de las pequeñas moléculas y las macromoléculas de las células se ionizan débilmente. Podemos contestar a esta pregunta tomando el logaritmo negativo en ambos lados de la ecuación (2.8) y reorganizándola:

$$-\log [H^+] = -\log K_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \tag{2.10}$$

Sustituyendo el $-\log [H^+]$ por pH y el $-\log K_a$ por pK_a obtenemos la *ecuación de Henderson-Hasselbalch*, que relaciona el pH de una disolución con la proporción base conjugada/ácido sin disociar:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \tag{2.11}$$

Por ejemplo, si tenemos una disolución de ácido fórmico, la ecuación (2.11) se convierte en

$$pH = 3.75 + \log \frac{[HCOO^-]}{[HCOOH]} \tag{2.12}$$

Si conocemos el pH de la disolución, podemos calcular la proporción base conjugada/ácido sin disociar. También podemos reagrupar la ecuación para utilizar la proporción para calcular el pH de la disolución.

La utilidad de la ecuación de Henderson-Hasselbalch puede observarse en su aplicación a las titulaciones: muestra exactamente cómo cambia el pH cuando se añade la base a una disolución ácida o viceversa. Suponga que queremos titular una disolución 1 M de ácido fórmico con hidróxido sódico. En primer lugar, debemos preguntar: ¿cuál es el pH de la disolución que se forma al disolver 1 mol de ácido fórmico en 1 litro de agua? Puede calcularse a partir de la ecuación (2.8) si observamos que prácticamente todos los H^+ de esta disolución proceden del ácido fórmico, más que del agua, y que la disociación de una molécula de ácido fórmico proporciona un H^+ y un $HCOO^-$. Si indicamos su concentración con x, la ecuación (2.8) se transforma entonces en

La ecuación de Henderson-Hasselbalch describe el cambio de pH durante la titulación de un ácido débil o de una base débil.

$$K_a = 1.78 \times 10^{-4} = \frac{[H^+][HCOO^-]}{[HCOOH]} = \frac{x^2}{1 - x} \tag{2.13}$$

Para tener una respuesta exacta, debemos resolver esta ecuación cuadrática (véase el Problema 4). Sin embargo, para los ácidos débiles, x es mucho menor que la concentración total de ácido añadido (en este caso 1 M). Como consecuencia, en estos casos podemos despreciar x en el denominador, obteniendo como una buena aproximación

$$K_a \cong x^2 \tag{2.14}$$

En este ejemplo, esto da

$$x = [H^+] = [HCOO^-] = 1.33 \times 10^{-2}\ \text{M} \tag{2.15}$$

Obsérvese que sólo se ha disociado alrededor del 1% del ácido, de forma que nuestra aproximación es bastante razonable. No lo sería si el ácido fuera más diluido, ya que se disociaría una fracción mayor.

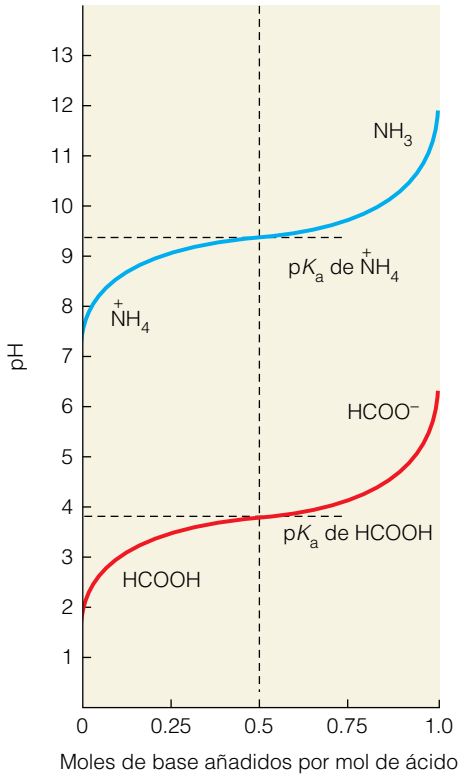


FIGURA **2.17**

Curvas de titulación de los ácidos débiles. Las curvas de titulación del ácido fórmico (HCOOH) y del ion amonio (NH_4^+) muestran el cambio del pH cuando se añaden moles de una base. Obsérvese que en el punto medio de titulación de cada sustancia pH = pK_a. La mayor parte de la titulación tiene lugar dentro de un margen de aproximadamente una unidad de pH por encima o por debajo de este valor. Dentro de este margen, el cambio del pH con los moles de base añadidos es mínimo; de ahí que éste sea el mejor margen de amortiguación.

Las soluciones amortiguadoras funcionan porque el pH de una disolución ácido-base débil es menos sensible a la adición de un ácido o de una base cerca del pK_a.

Los cálculos precedentes nos dicen que el pH inicial es aproximadamente 1.9. ¿Qué pasa cuando comenzamos a añadir una disolución de NaOH? A medida que se añade el NaOH, se disocia totalmente en Na^+ y OH^-. Sin embargo, los iones hidroxilo se encuentran en equilibrio con los protones, de acuerdo con la relación $K_w = [H^+]\,[OH^-]$, de forma que cuando se añaden OH^- se produce la separación de protones de la disolución. Al separarse los protones, debe disociarse más ácido fórmico en un esfuerzo para reemplazarlos y satisfacer la relación de equilibrio de la ecuación (2.13). Esto significa que la proporción $[HCOO^-]/[HCOOH]$ aumenta continuamente. Aplicando la ecuación de Henderson-Hasselbalch (2.11), observamos que el pH también debe aumentar continuamente a medida que se avanza en el proceso de titulación. En el punto medio de la titulación, la mitad del ácido fórmico inicial se ha neutralizado. Esto significa que la mitad está aún presente en forma de ácido y que la otra mitad está presente como base conjugada, de ahí que $[A^-]/[HA] = 1$. Entonces, la ecuación de Henderson-Hasselbalch se convierte en

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log 1 = \text{p}K_a \qquad (2.16)$$

Por tanto, el pH de un ácido débil en el punto medio de su curva de titulación tiene el mismo valor que su pK_a, lo cual puede confirmarse experimentalmente, como muestran las curvas de titulación de dos ácidos, el ácido fórmico y el ion amonio, en la Figura 2.17. Las curvas de titulación de la Figura 2.17 representan el pH medido frente a los *moles de base añadidos por mol de ácido inicialmente presente*. Obsérvese que en la mayor parte de la curva de titulación el pH se encuentra una unidad por encima o por debajo del pK_a. Si conocemos el pK_a de un ácido débil, también sabremos el punto medio de la titulación; esto define el margen de pH en que será necesaria la mayor parte de la adición de la base para completar la titulación.

Debemos resaltar que las curvas de titulación son reversibles. Si tomáramos la solución final, a un pH alto, y empezásemos a añadir un ácido fuerte como el HCl, podríamos volver a trazar la misma curva en sentido opuesto.

SOLUCIONES AMORTIGUADORAS

Si observamos la Figura 2.17 desde otro punto de vista, se aprecia otro hecho importante. En la gama de pH cercana al pK_a, el pH cambia sólo ligeramente con cada incremento de base o de ácido añadido. En realidad, el punto en el que el pH cambia menos con cada incremento de ácido o de base es precisamente el pK_a. Éste es el principio sobre el que se basa el **amortiguamiento** de soluciones con el empleo de mezclas de ácidos y bases débiles, técnica que se utiliza en prácticamente todos los experimentos bioquímicos.

Supóngase que un bioquímico desea estudiar una reacción a pH 4.00. Puede tratarse de una reacción que genere o que consuma protones. Para evitar que el pH se modifique demasiado durante la reacción, el investigador debe utilizar una solución amortiguadora consistente en una mezcla determinada de un ácido débil y su base conjugada. En este ejemplo, una elección acertada sería utilizar un amortiguador ácido fórmico-formiato, puesto que el pK_a del ácido fórmico (3.75) está cerca del valor de pH requerido. Una mezcla ácido acético-acetato no sería tan adecuada porque el pK_a del ácido acético (4.76) es casi una unidad de pH mayor. La proporción ion formiato-ácido fórmico necesaria puede calcularse a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$4.00 = 3.75 + \log \frac{[HCOO^-]}{[HCOOH]} \qquad (2.17)$$

Para calcular la proporción base/ácido, restamos 3.75 de 4.00, y tomamos el antilogaritmo de ambos lados de la ecuación (2.17):

$$\frac{[HCOO^-]}{[HCOOH]} = 10^{0.25} = 1.78 \qquad (2.18)$$

Este amortiguador puede obtenerse, por ejemplo, mezclando volúmenes iguales de ácido fórmico 0.1 M y formiato sódico 0.178 M. También se puede preparar una solución amortiguadora titulando una solución 0.1 M de ácido fórmico hasta pH 4.00 con hidróxido sódico.

Como deben estudiarse muchas reacciones bioquímicas cerca del pH fisiológico, existe una especial necesidad de mezclas que amortigüen el pH en el margen de pH de 6.5 a 8.0. De los pares ácido-base que aparecen enumerados en la Tabla 2.6, únicamente las mezclas de ion dihidrógeno fosfato e ion monohidrógeno fosfato, o posiblemente de ácido carbónico e ion bicarbonato, serían satisfactorias. Los amortiguadores de fosfato se utilizan con frecuencia en experimentos, pero no sirven en todos los casos, puesto que en algunas reacciones bioquímicas se consume o se produce fosfato. Además, tanto las soluciones que contienen fosfato, como las que contienen carbonato, precipitan algunos iones (como por ejemplo el Ca^{2+}) que pueden ser necesarios en la reacción. De ahí que se empleen otros compuestos naturales o sintéticos como amortiguadores en este margen de valores. En la Tabla 2.7 aparecen algunos ejemplos.

Los organismos deben mantener el pH dentro de las células y en la mayoría de los líquidos corporales dentro del estrecho margen de pH de entre 6.5 y 8.0. Anteriormente hemos mencionado ya dos sistemas amortiguadores de gran relevancia para el control del pH biológico. El sistema dihidrógeno fosfato-monohidrógeno fosfato, con un pK_a de 6.86, desempeña un cometido muy importante en el control del pH intracelular, pues el fosfato abunda en las células. En la sangre, que contiene CO_2 disuelto como sustancia de desecho del metabolismo, el sistema ácido carbónico-bicarbonato, $pK_a = 6.37$, proporciona una capacidad de amortiguamiento considerable. El sistema bicarbonato-carbonato es realmente más complejo que lo indicado en la Tabla 2.6, debido a la reacción del CO_2 disuelto:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

Además de este amortiguador y de otros de pequeñas moléculas, las proteínas desempeñan una función muy importante en el control del pH en los organismos. Como veremos en el Capítulo 5, las proteínas contienen muchos grupos débilmente ácidos o básicos, y algunos de ellos poseen unos valores de pK_a próximos a 7.0. Dado que las proteínas son abundantes tanto en las células como en los líquidos corporales como la sangre y la linfa, el amortiguamiento del pH es muy fuerte.

Los organismos utilizan los sistemas amortiguadores para mantener el pH de las células y de los líquidos corporales en el intervalo adecuado.

TABLA 2.7 Algunos amortiguadores utilizados normalmente en los estudios bioquímicos

Sustancia Amortiguadora (Forma Ácida)	Nombre común	pK_a
Ácido cacodílico	—	6.2
2.2-Bis(hidroximetil)2,2′,2″ nitrilotrietanol	BISTRIS	6.5
Piperazina-*N*,*N*′-bis(ácido 2-etanosulfónico)	PIPES	6.8
Imidazol	—	7.0
N′-2-Hidroxietilpiperazina-*N*′, ácido 2-etanosulfónico	HEPES	7.6
Tris(hidroximetil)aminometano	Tris	8.3

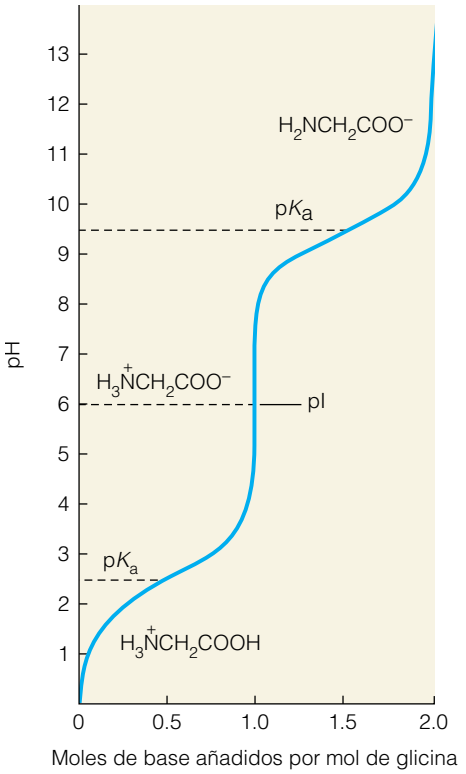


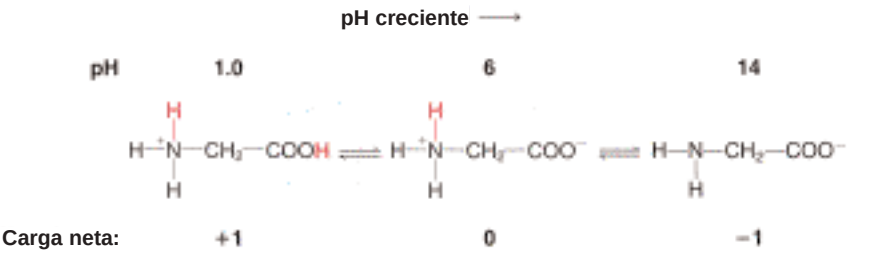
FIGURA **2.18**

Titulación del anfólito glicina. Puesto que se pueden titular dos grupos con valores de pK_a bastante diferentes, ésta es una curva de titulación de dos fases. También se muestra el punto isoeléctrico calculado, pI.

MOLÉCULAS CON GRUPOS IONIZABLES MÚLTIPLES: ANFÓLITOS, POLIANFÓLITOS Y POLIELECTRÓLITOS

Hasta ahora hemos considerado las moléculas que contienen sólo uno o unos pocos grupos débilmente ácidos o básicos. Sin embargo, muchas moléculas contienen varios grupos ionizables y muestran un comportamiento mucho más complejo durante la titulación.

Se denomina **anfólito** a una molécula que contiene grupos con valores de pK_a ácidos y básicos. Considérese, por ejemplo, la molécula de glicina: $H_2N—CH_2—COOH$. La glicina es un α-aminoácido, que pertenece a un grupo importante de aminoácidos que encontraremos en el Capítulo 5 como constituyentes de las proteínas. Los valores de pK_a de los grupos carboxilato y amino de la glicina son 2.3 y 9.6, respectivamente. Si disolvemos glicina en una disolución muy ácida (por ejemplo, con un pH de 1.0), tanto el grupo amino como el carboxilato se protonarán, y la molécula tendrá una carga neta de +1. Si aumentamos el pH (añadiendo NaOH, por ejemplo), la disociación de protones tendrá lugar en la secuencia que sigue:

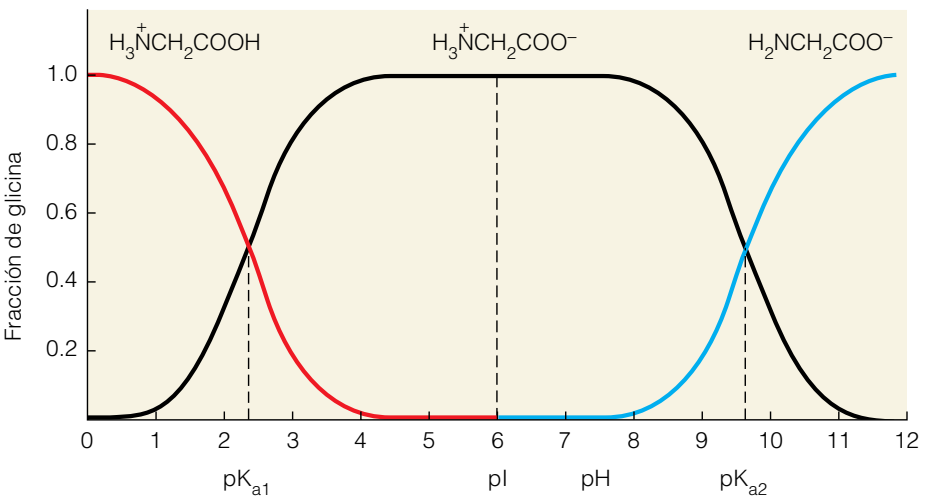


Así pues, la titulación de la glicina tiene lugar en dos pasos, a medida que los grupos carboxilato, más ácidos, y los amino, menos ácidos, pierden sus protones sucesivamente. Por tanto, la glicina puede actuar como un buen amortiguador en dos gamas bastante diferentes de pH, como muestra la Figura 2.18. En cada gama podemos describir la curva de titulación aplicando la ecuación de Henderson-Hasselbalch al grupo ionizable adecuado. A pH bajo, la forma principal de glicina tiene una carga neta de +1; a pH alto, la forma principal tiene una carga neta de –1. Las concentraciones relativas de las tres formas se presentan en la Figura 2.19.

La zona cercana al pH neutro es interesante. En esta zona, la mayor parte de la glicina está en la forma $H_3\overset{+}{N}—CH_2—COO^-$, con una carga neta igual a cero.

FIGURA **2.19**

Concentraciones relativas de las tres formas de glicina en función del pH. Las tres formas son $H_3\overset{+}{N}CH_2COOH$, en rojo; $H_3\overset{+}{N}CH_2COO^-$, en negro; y $H_2NCH_2COO^-$, en azul. Se indican los dos valores de pK_a y el punto isoeléctrico (pI).



Un anfólito que se encuentre en este estado, con igual número de cargas positivas y negativas, se denomina *zwitterion*. Sin embargo, sólo existe un punto dentro de esta zona de pH donde la carga *promedio* de la glicina es cero. A este pH, denominado **punto isoeléctrico** (**pI**), la mayoría de las moléculas de glicina están en forma de zwitterion, con muy pequeñas cantidades de moléculas $H_3\overset{+}{N}-CH_2-COOH$ y $H_2N-CH_2-COO^-$, aunque exactamente iguales. Podemos calcular el punto isoeléctrico aplicando la ecuación de Henderson-Hasselbalch a ambos grupos ionizables. Si denominamos al pH en el punto isoeléctrico pI, tenemos

$$pI = pK_{COOH} + \log \frac{[H_3\overset{+}{N}CH_2COO^-]}{[H_3\overset{+}{N}CH_2COOH]} \tag{2.19a}$$

El punto isoeléctrico de un anfólito es el pH al que la carga promedio para todas las formas de la molécula es cero.

y

$$pI = pK_{\overset{+}{N}H_3} + \log \frac{[H_2NCH_2COO^-]}{[H_3\overset{+}{N}CH_2COO^-]} \tag{2.19b}$$

Sumando estas ecuaciones (recordando que la suma de los logaritmos de dos magnitudes es el logaritmo de sus productos) obtenemos

$$2\,pI = pK_{COOH} + pK_{\overset{+}{N}H_3} + \log \frac{[H_2NCH_2COO^-]}{[H_3\overset{+}{N}CH_2COOH]} \tag{2.20}$$

Pero como $[H_2NCH_2COO^-] = [H_3\overset{+}{N}CH_2COOH]$ en el pI, el término más a la derecha es igual a log 1, es decir, cero. De ahí,

$$pI = \frac{pK_{COOH} + pK_{\overset{+}{N}H_3}}{2} \tag{2.21}$$

En este caso el resultado es sencillo: en una molécula con sólo dos grupos ionizables, el pI es simplemente el promedio de los dos pK_a. Si introducimos los valores que aparecen en la página 52, obtenemos para la glicina un pI = 5.95. Realmente, como muestra la Figura 2.19, la glicina estará casi totalmente en la forma zwitterion, con carga cero, desde alrededor de pH 4 hasta alrededor de pH 8.

Las moléculas grandes como las proteínas pueden tener *muchos* grupos ácidos o básicos. Estas moléculas se denominan **polianfólitos**. Con más de dos grupos cargados, el cálculo del pI es más complejo. Sin embargo, siempre que la molécula tenga grupos cargados positivamente y negativamente, tendrá un punto isoeléctrico en el cual la carga neta promedio es cero. Si predominan los grupos ácidos, el pI será bajo; si predominan los grupos básicos, el pI será alto. En el Capítulo 5 veremos que este hecho es importante al tratar las disoluciones de proteínas.

Se puede determinar experimentalmente el pI de un anfólito o de un polianfólito, utilizando el sencillo método de la *electroforesis*. Cuando se aplica un campo eléctrico a una disolución de estos iones, las moléculas cargadas positivamente se desplazan hacia el cátodo y las que tienen carga negativa lo hacen hacia el ánodo. Un anfólito no se mueve en *ningún* sentido cuando está en su punto isoeléctrico, puesto que tiene una carga neta igual a cero. Con el método denominado **enfoque isoeléctrico**, los anfólitos se mueven a través de un gradiente de pH y se quedan quietos en su punto isoeléctrico. De este modo, se separan los anfólitos y se determinan sus puntos isoeléctricos (véase Herramientas de la Bioquímica 2A).

Algunas macromoléculas, denominadas **polielectrólitos**, tienen múltiplos de carga sólo positiva o sólo negativa. Los polielectrólitos fuertes, como los ácidos nucleicos cargados negativamente (véase el Capítulo 4), están ionizados

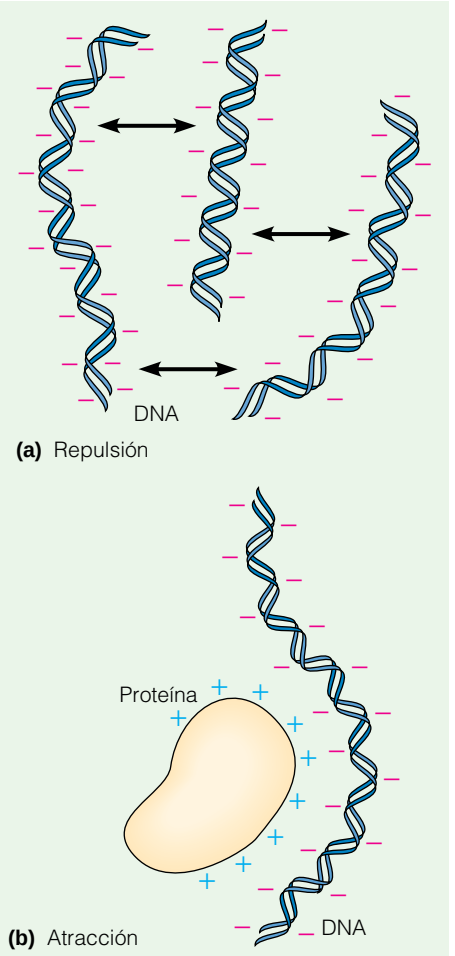
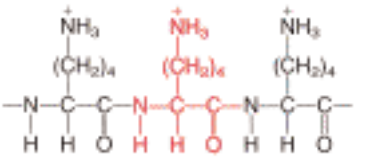


FIGURA **2.20**

Interacciones electrostáticas entre macroiones. **(a)** Repulsión. Las moléculas de DNA, con muchas cargas negativas, se repelen mutuamente con gran fuerza en disolución. **(b)** Atracción. Si se mezcla el DNA con una proteína cargada positivamente, estas moléculas tienen una fuerte tendencia a asociarse.

Las interacciones entre macroiones dependen en gran medida del pH y de los iones pequeños que se encuentran en la disolución.

dentro de un amplio intervalo de pH. Además, existen polielectrólitos débiles como la polilisina, un polímero del aminoácido lisina:



Polilisina

Cuando en la misma molécula existen una serie de grupos ionizables débiles, el pK_a de cada grupo está influido por el estado de ionización de los demás. En una molécula como la polilisina, los primeros protones se eliminan más fácilmente que los últimos, puesto que la fuerte carga positiva sobre la molécula completamente protonada ayuda a eliminar los protones. A la inversa, una molécula que alcanza una fuerte carga negativa cuando pierde los protones entrega los últimos con dificultad, ya que sus valores de pK_a se hacen extremadamente elevados.

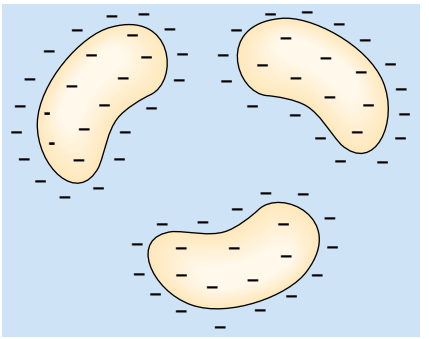
Interacciones entre macroiones en disolución

Los polielectrólitos grandes, como los ácidos nucleicos, y los polianfólitos, como las proteínas, se clasifican juntos como **macroiones**. Dependiendo del pH de la disolución, pueden tener una carga neta considerable. Las fuerzas electrostáticas de atracción o de repulsión entre dichas partículas cargadas son muy importantes en la determinación de su comportamiento en disolución.

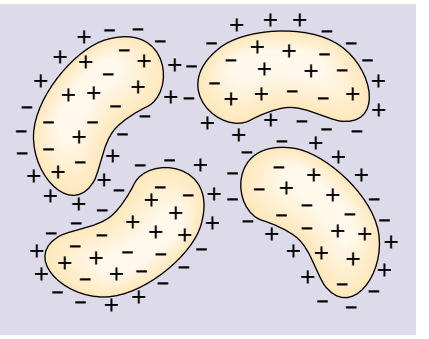
SOLUBILIDAD DE LOS MACROIONES Y PH

Puesto que los macroiones con una carga neta similar se repelen mutuamente, las moléculas de ácidos nucleicos tienden a mantenerse separadas en disolución (Figura 2.20a). Por la misma razón, las proteínas tienden a ser solubles cuando tienen una carga neta, es decir, a valores de pH por encima y por debajo de sus puntos isoeléctricos. En cambio, si se mezclan macromoléculas cargadas positiva y negativamente, la atracción electrostática hace que tiendan a asociarse unas con otras (Figura 2.20b). Muchas proteínas interaccionan fuertemente con el DNA; la mayor parte de ellas están cargadas positivamente (véase la Figura 2.20b). Un magnífico ejemplo de esto se encuentra en los cromosomas de los organismos superiores, en los que el DNA cargado negativamente está fuertemente asociado con proteínas cargadas positivamente, denominadas *histonas*, para formar el complejo denominado cromatina (véase el Capítulo 28).

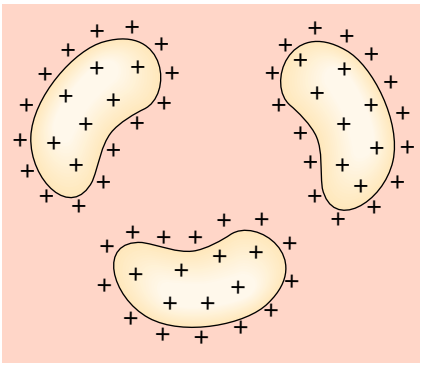
Una clase más sutil de interacción electrostática puede provocar que las moléculas de una proteína determinada se autoasocien al pH isoeléctrico (Figura 2.21). Por ejemplo, la proteína común de la leche, β-lactoglobulina, es un polianfólito con un punto isoeléctrico de aproximadamente 5.3. Por encima o por debajo de este pH, todas las moléculas tienen cargas positivas o negativas y se repelen mutuamente. Por tanto, esta proteína es muy soluble a un pH ácido o básico. En el punto isoeléctrico la carga neta es cero, pero cada una de las moléculas todavía tiene zonas en la superficie con carga positiva y negativa. Las interacciones carga-carga, junto con otras clases de interacciones intermoleculares como las fuerzas de van der Waals, hacen que las moléculas tiendan a aglutinarse y precipitar. Por tanto, la β-lactoglobulina, al igual que otras muchas proteínas, tiene la mínima solubilidad en su punto isoeléctrico (Figura 2.21d).



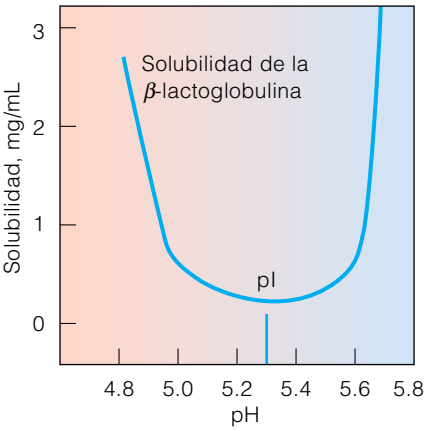
(a) pH elevado: proteína soluble (desprotonada)



(b) Punto isoeléctrico: agregados de proteína



(c) pH bajo: proteína soluble (protonada)



(d) Solubilidad de la β-lactoglobulina

FIGURA **2.21**

Dependencia de la solubilidad proteica con el pH. (a) La mayoría de las proteínas son muy solubles a pH elevado, donde todas sus moléculas están cargadas negativamente. **(b)** En el punto isoeléctrico, donde una proteína no tiene carga *neta*, sus moléculas retienen áreas de carga positiva y negativa en sus superficies, dando lugar a la formación de agregados y a precipitación. **(c)** A pH bajo, las proteínas son solubles debido a su carga positiva. **(d)** Solubilidad de la β-lactoglobulina a distintos valores de pH; la solubilidad mínima tiene lugar en el punto isoeléctrico.

INFLUENCIA DE LOS IONES PEQUEÑOS: FUERZA IÓNICA

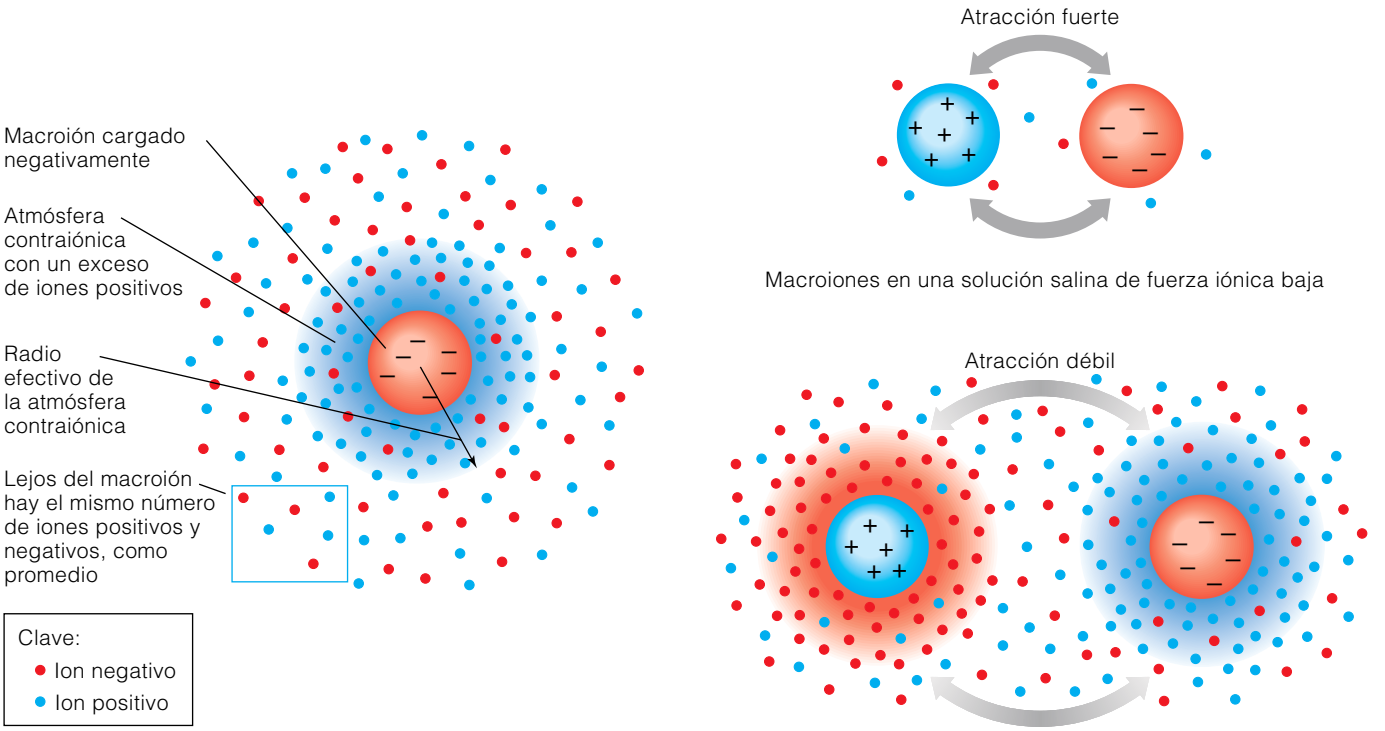
Las interacciones de los macroiones se modifican enormemente por la presencia en la misma disolución de iones pequeños, como los de las sales disueltas. Cada macroión recoge sobre él una **atmósfera contraiónica**, con abundantes iones pequeños con carga opuesta, y esta nube de iones tiende a apantallar las moléculas unas de otras (Figura 2.22a). Obviamente, cuanto más elevada sea la concentración de iones pequeños, más eficaz será este apantallamiento electrostático. Sin embargo, la relación precisa del apantallamiento con la concentración es bastante compleja. Una expresión cuantitativa de este efecto para los macroiones esféricos, propuesta por P. Debye y E. Hückel, se plantea en función de un radio efectivo (r) de la atmósfera contraiónica. Este radio puede tomarse como medida de la distancia a la que dos macroiones "sienten" la presencia mutua. Según la teoría de Debye-Hückel,

$$r = \frac{K}{I^{1/2}} \tag{2.22}$$

donde K es una constante que depende de la constante dieléctrica del medio y de la temperatura, e I es una función de la concentración, denominada **fuerza iónica**. La fuerza iónica se define:

$$I = \tfrac{1}{2} \sum_i \mathrm{M}_i Z_i^2 \tag{2.23}$$

donde la suma incluye todos los iones pequeños de la solución. Para cada clase de ion, M_i es su molaridad y Z_i es su carga estequiométrica. Para un electrólito 1:1 como el NaCl, tenemos $Z_{Na^+} = +1$ y $Z_{Cl^-} = -1$; y puesto que $\mathrm{M}_{Na^+} =$



(a) Atmósfera contraiónica

(b) Influencia de la fuerza iónica

FIGURA **2.22**

Influencia de los iones pequeños sobre las interacciones entre los macroiones. **(a)** Cuando se coloca un macroión (en este ejemplo, cargado negativamente) en una disolución salina acuosa, los iones pequeños con signo opuesto tienden a agruparse a su alrededor, formando una atmósfera contraiónica. Hay más cationes que aniones cerca del macroión que se muestra aquí; lejos del macroión, las concentraciones promedio de cationes y aniones son iguales. **(b)** Cuando la fuerza iónica es baja, la atmósfera contraiónica es difusa e interfiere poco con las interacciones de los macroiones. Cuando la fuerza iónica es elevada, la atmósfera contraiónica se concentra alrededor de los macroiones y reduce en gran medida sus interacciones.

$= M_{Cl^-} = M_{NaCl}$, entonces $I_{NaCl} = M_{NaCl}$. De ahí que la fuerza iónica sea igual a la molaridad de la sal para los electrólitos 1:1, pero esto no es cierto si intervienen iones multivalentes (como Mg^{2+} o SO_4^{2-}). Los iones multivalentes tienen una influencia individual mayor en la atmósfera iónica que los iones monovalentes, como refleja el hecho que se incluya el *cuadrado* de la carga del ion al calcular la fuerza iónica. En estos electrólitos, $I > M$.

Los efectos de la fuerza iónica del medio sobre la interacción entre los macroiones cargados se pueden resumir como muestra la Figura 2.22b. Cuando la fuerza iónica es muy débil, la atmósfera contraiónica es muy extensa y difusa, y el apantallamiento es ineficaz. En dicha solución, los macroiones se atraen o se repelen con fuerza. Si la fuerza iónica aumenta, la atmósfera contraiónica se contrae y se concentra alrededor del macroión, y las interacciones de atracción entre los grupos positivos y negativos se apantallan con eficacia.

El efecto de apantallamiento de la atmósfera contraiónica ayuda a explicar una observación general relacionada con la solubilidad de las proteínas: el aumento de la fuerza iónica (hasta un determinado punto) aumenta la solubilidad, incluso en el punto isoeléctrico. Este efecto de disolver las proteínas incrementando la concentración salina se denomina "**salting in**".

El aumento de la concentración salina hasta niveles muy elevados (por ejemplo, superior a varias unidades molares) causa el efecto opuesto. En soluciones salinas muy concentradas, gran parte del agua que normalmente solvataría y ayudaría a solubilizar la molécula de proteína está enlazada en las capas de hidratación de numerosos iones salinos, impidiendo una hidratación suficiente de la proteína. Así, con concentraciones salinas muy altas, la solubilidad de una proteína disminuye de nuevo, un efecto denominado "**salting out**". Puesto que las diferentes proteínas responden de modo diferente a estos dos

efectos, con frecuencia se utiliza el "salting in" y el "salting out" para purificar las proteínas.

Los efectos de las interacciones iónicas sobre el comportamiento de las macromoléculas biológicas hacen que el bioquímico deba prestar mucha atención tanto a la fuerza iónica como al pH. Generalmente, los investigadores utilizan una sal neutra (como NaCl o KCl) para controlar la fuerza iónica de una disolución, así como un amortiguador para controlar el pH. Para determinar la cantidad de sal que se debe añadir, con frecuencia intentan imitar las fuerzas iónicas de la célula y de los líquidos corporales. Aunque las fuerzas iónicas varían de una clase de célula a otra o de un líquido a otro, un valor de 0.1 a 0.2 M suele ser adecuado en los experimentos bioquímicos.

RESUMEN

En la célula tienen lugar una serie de interacciones no covalentes débiles entre iones, moléculas y partes de las moléculas. Entre estas interacciones, que son de 10 a 100 veces más débiles que la mayoría de las interacciones covalentes, figuran las interacciones carga-carga y las interacciones de dipolos permanentes e inducidos. Las moléculas nunca entran unas dentro de las otras, puesto que la atracción que existe entre ellas se contrarresta por la repulsión cuando sus orbitales electrónicos empiezan a solaparse. El radio de van der Waals de una molécula es su distancia de acercamiento más próximo a otra molécula. El enlace de hidrógeno es la interacción no covalente más fuerte, y comparte algunas características (direccionalidad, especificidad) con los enlaces covalentes.

El agua es el medio esencial para la vida. Gran parte de las propiedades únicas del agua como sustancia se producen gracias a su polaridad y a su capacidad para formar enlaces de hidrógeno, propiedades que también le hacen ser un excelente disolvente. Las sustancias polares, las unidas por enlaces de hidrógeno y las iónicas se disuelven con facilidad en el agua y se denominan hidrófilas, mientras que otros compuestos se disuelven en agua sólo en cantidad limitada y se denominan hidrófobos. Las moléculas anfipáticas, que tienen partes polares y partes no polares, forman estructuras peculiares como monocapas, vesículas y micelas cuando están en contacto con el agua. Estas moléculas forman membranas bicapa que rodean las células y los compartimientos celulares.

La ionización de los ácidos y bases débiles es de una importancia crucial en bioquímica. La mayoría de los procesos relevantes tienen lugar en el intervalo de pH situado entre 6.5 y 8.0, el denominado margen fisiológico. La ecuación de Henderson-Hasselbalch, que relaciona la proporción base conjugada/ácido no disociado con el pH y el pK_a define el comportamiento de los ácidos débiles y de sus bases conjugadas. Las curvas de titulación muestran que el cambio del pH con la adición de un ácido o de una base es más gradual en el margen cercano al pK_a del ácido; éste es el fundamento para la preparación de las soluciones amortiguadoras.

Un anfólito tiene grupos ionizables ácidos y básicos; las moléculas pueden tener una carga neta positiva, cero o negativa, dependiendo del pH de la solución. Un polianfólito tiene muchos grupos ácidos y básicos. El punto isoeléctrico de un anfólito o polianfólito es el pH en el cual la carga neta promedio de las moléculas es cero. Los polielectrólitos tienen múltiples grupos ionizables con una sola clase de carga. El comportamiento de los macroiones (polianfólitos y polielectrólitos) en solución depende del pH y de la presencia de pequeños iones, que apantallan los macroiones de las otras cargas. La magnitud del apantallamiento depende de la fuerza iónica de la solución y está definida cuantitativamente por la teoría de Debye-Hückel.

BIBLIOGRAFÍA

Interacciones no covalentes

Burley, S. K. y G. A. Petsko (1988) Weakly polar interactions in proteins. *Adv. Protein Chem.* 39:125-189. Contiene un tratamiento excelente, aunque bastante complejo, de las interacciones débiles en general.

Eisenberg, D. y D. Crothers (1979) *Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences.* Benjamin/Cummings, Redwood City, Calif. Aparte de contener una completa descripción del enlace covalente, el Capítulo 11 incluye un excelente tratamiento de los momentos dipolares, de la polarizabilidad y de las interacciones no covalentes. El Capítulo 8 contiene información útil sobre las disoluciones de electrólitos a un nivel superior al de este libro. En nuestra opinión, se trata del mejor libro de química física para bioquímicos.

van Holde, K. E., W. C. Johnson y P.-S. Ho (1998) *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J. Cubre la mayor parte de los temas de este capítulo con una mayor profundidad.

Agua

Eigen, M. y L. DeMaeyer (1959) Hydrogen bond structure, proton hydration, and proton transfer in aqueous solutions. En: *The Structure of Electrolyte Solutions*, dirigido por W. J. Hamer, pp. 64-85. Wiley, Nueva York. A pesar de no ser reciente, sigue siendo una revisión excelente e interesante.

Hagler, A. T. y J. Moult (1978) Computer simulation of solvent structure around biological macromolecules. *Nature* 272:222.

Kamb, B. (1968) Ice polymorphism and the structure of water. En: *Structural Chemistry and Molecular Biology*, dirigido por A. Rich y N. Davidson, pp. 507-542. Freeman, San Francisco. Revisión de las teorías de la estructura del agua.

Tanford, C. (1980) *The Hydrophobic Effect. Formation of Micelles and Biological Membranes.* Wiley, Nueva York. Un estudio clásico de la hidrofobicidad.

Equilibrios iónicos

Edsall, J. T. y J. Wyman (1958) *Biophysical Chemistry*, Vol. 1. Academic Press, Nueva York. Tratamiento excelente en profundidad. En esta obra encontrará amplias exposiciones sobre la disociación poliprótica, los puntos isoeléctricos de los polianfólitos, etc.

Williams, V. R., W. L. Mattice y H. B. Williams (1978) *Basic Physical Chemistry for the Life Sciences.* Freeman, Nueva York. El Capítulo 5 contiene un buen tratamiento sobre la medida de pH y sobre amortiguadores.

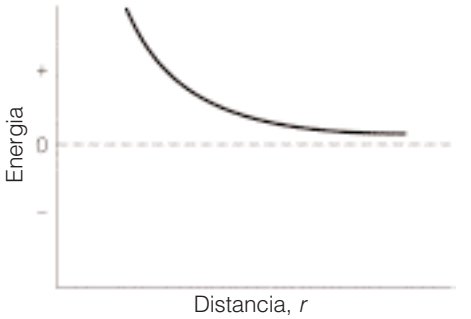
PROBLEMAS

En este capítulo y en los sucesivos, el asterisco señala los problemas más difíciles.

1. Un ion cloruro y un ion sodio están separados por una distancia centro-centro de 0.5 nm. Calcular la energía de interacción (la energía necesaria para separarlos completamente) si el medio entre ellos es: (a) agua y (b) *n*-pentano (véase la Tabla 2.5). Expresar la energía en julios por mol de pares de iones. [Nota: La carga de un electrón es 1.602×10^{-19} C, y el número de Avogadro es 6.02×10^{23} moléculas/mol.]
2. Ordenar las siguientes sustancias en función del momento dipolar esperado y argumentar la elección:

H_2S, CCl_4, $H_3\overset{+}{N}—CH_2—COO^-$, $H_3\overset{+}{N}—CH_2—CH_2—CH_2—COO^-$

3. El siguiente gráfico muestra la energía de interacción entre dos moléculas de agua situadas de tal modo que sus momentos dipolares son paralelos y apuntan en la misma dirección. Trace una curva aproximada para la interacción entre dos moléculas de agua orientadas con momentos dipolares *antiparalelos.*



*4. (a) Resuelva la ecuación cuadrática señalada en la ecuación (2.13) para el caso más general en el que la concentración de ácido ($A_0 = [HA] + [A^-]$) posea cualquier valor de A_0.
(b) Se puede evitar el resolver una ecuación cuadrática utilizando un método de aproximaciones sucesivas, comenzando con $x^2 \cong A_0 K_a$. Explique cómo puede hacerse.

5. ¿Cuál es el pH de cada una de las siguientes soluciones?
(a) Ácido clorhídrico 0.35 M
(b) Ácido acético 0.35 M
(c) Ácido acético 0.035 M
[Obsérvese que el método aproximado empleado en la ecuación (2.14) no da una respuesta adecuada para A_0 bajo.]

6. El ácido débil HA está ionizado (disociado) un 2% en una disolución 0.20 M.
(a) ¿Cuál es la K_a de este ácido?
(b) ¿Cuál es el pH de esta solución?

*7. Calcule los valores del pH y trace la curva de titulación de 500 mL de ácido acético 0.010 M (p*K*a 4.76) con KOH 0.010 M.

8. ¿Cuál es el pH de las siguientes mezclas de disoluciones amortiguadoras?
(a) ácido acético 1 M más acetato sódico 0.5 M
(b) ácido fosfórico 0.3 M más KH_2PO_4 0.8 M

*9. (a) Suponga que quiere conseguir un amortiguador de un pH exactamente 7.00 utilizando KH_2PO_4 y Na_2HPO_4. Si tiene una solución de KH_2PO_4 0.1 M, ¿qué concentración de Na_2HPO_4 necesitaría?
(b) Imagine que quiere conseguir un amortiguador del mismo pH, empleando las mismas sustancias, pero quiere que la molaridad de fosfato total ($[HPO_4^{2-}] + [H_2PO_4^-]$) sea igual a 0.3. ¿Qué concentraciones de KH_2PO_4 y de Na_2HPO_4 utilizaría?

10. Una muestra de 500 mL de un amortiguador formiato 0.100 M, pH 3.75, se trata con 5 mL de KOH 1.00 M. ¿Qué pH se obtiene tras dicha adición?

11. Necesita hacer un amortiguador con un pH 7.0 y puede elegir entre los ácidos débiles que aparecen en la Tabla 2.6 en la página 46. Comente brevemente su elección.

12. Describa la preparación de 2.00 L de amortiguador glicina 0.100 M, pH 9.0, a partir de glicina (peso molecular en forma de zwitterion, 75.07 g/mol) y NaOH 1.00 M. El pK_a de la glicina es 9.6.

13. El dióxido de carbono se encuentra disuelto en la sangre (pH 7.4) para formar una mezcla de ácido carbónico y bicarbonato. Despreciando el CO_2 libre, ¿qué fracción de ácido carbónico se encontrará presente? ¿Esperaría encontrar una cantidad significativa de carbonato (CO_3^{2-})?

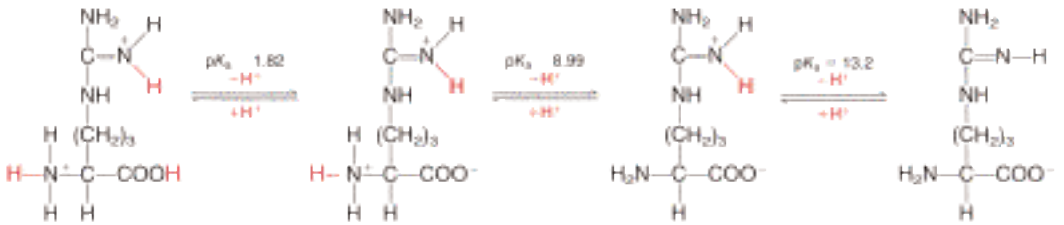
*14. La eficacia de un amortiguador para resistir cambios de pH tras la adición de un ácido o de una base se denomina *capacidad amortiguadora*. Una forma de definir esta magnitud, que llamaremos B, es $B = dx/d\text{pH}$, donde x es el número de moles de ácido o base débil añadidos. Obsérvese que la ecuación de Henderson-Hasselbalch puede escribirse de la forma

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{x}{A_0 - x}$$

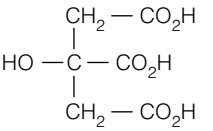
donde A_0 es la concentración total de ácido.
(a) Obtener una expresión de B en términos de A_0 y de la fracción de ácido titulado f, donde $f = x/A_0$. [Pista: Es más fácil determinar $d\text{pH}/dx$ y tomar la inversa.]
(b) ¿A qué valor de f es máxima la capacidad amortiguadora? (La forma más sencilla de determinarlo es representar B frente a f.)
(c) ¿Cuál es el valor máximo de B?
(d) ¿Cuál es el efecto de A_0 sobre B?

*15. El aminoácido *arginina* se ioniza según el siguiente esquema.

Calcule el punto isoeléctrico de la arginina. Puede desdeñar la contribución de la forma I. ¿Por qué?



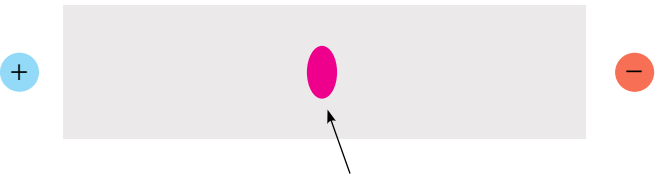
16. Es posible hacer un amortiguador que sea eficaz a un pH próximo a 7, utilizando ácido cítrico, que sólo contiene grupos carboxilato. Explíquelo.



Ácido cítrico

17. Un estudiante está realizando una preparación biológica que necesita NaCl 1 M para mantener una fuerza iónica de 1.0; en su lugar, el estudiante decide emplear sulfato de amonio 1.0 M. ¿Por qué ha cometido un grave error?

*18. ¿Cuál es el pH óptimo para separar una mezcla de lisina, arginina y cisteína mediante electroforesis? Dibuje las estructuras de los tres aminoácidos *en el estado de protonación que predominaría al pH que ha elegido*. Véase la Tabla 5.1 en la página 143. Indique la carga neta al pH elegido para cada aminoácido, así como la dirección en que se desplazará y la movilidad relativa en el campo eléctrico.



19. Suponga que tiene dos variantes genéticas de una proteína grande que difieren únicamente en que una contiene una histidina (pK_a de la cadena lateral 6.4) cuando la otra tiene una valina (cadena lateral sin carga).
(a) ¿Qué sería mejor para la separación, la electroforesis en gel o el enfoque isoeléctrico? ¿Por qué?
(b) ¿Qué pH elegiría para la separación?

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 2A

Electroforesis y enfoque isoeléctrico

Principios generales

Cuando se aplica un campo eléctrico a una solución, las moléculas de soluto con carga neta positiva se desplazan hacia el cátodo y las moléculas con carga neta negativa se desplazan hacia el ánodo. Este desplazamiento se denomina **electroforesis**. La velocidad de las moléculas depende de dos factores. Conduciendo el movimiento está la fuerza $q\mathscr{E}$ ejercida por el campo eléctrico sobre la partícula, donde q es la carga de la molécula (en Culombios) y $\mathscr{E}$ es la fuerza del campo eléctrico (en voltios por metro). Resistiendo el movimiento está la fuer-

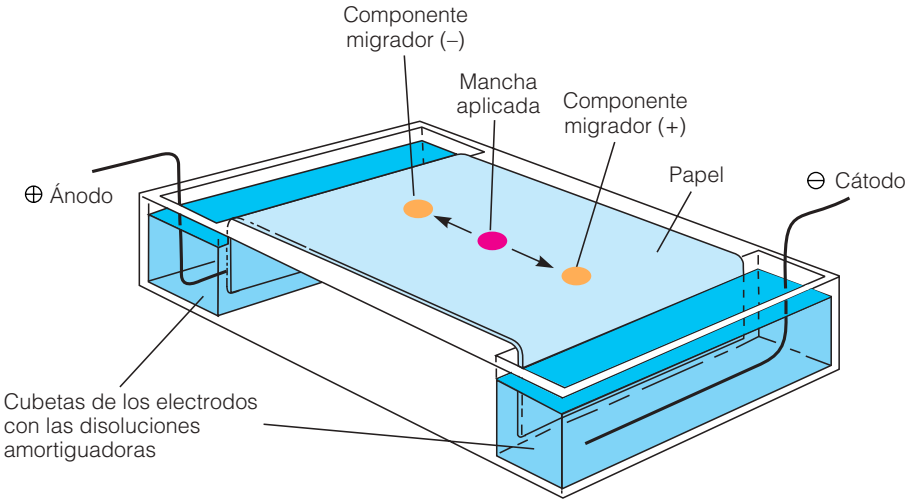


FIGURA **2A.1**
Electroforesis en papel.

za de fricción fv, que ejerce el entorno sobre la partícula, siendo v la velocidad de la partícula y f su **coeficiente de fricción**, que depende del tamaño y de la forma de las moléculas. Las moléculas grandes o asimétricas encuentran más resistencia de fricción que las moléculas pequeñas o compactas, y, por tanto, tienen unos coeficientes de fricción mayores.

Cuando se activa el campo eléctrico, la molécula se acelera rápidamente hasta alcanzar una velocidad en la que estas fuerzas se equilibran y luego se mueve constantemente a esa velocidad. La velocidad constante viene determinada por el equilibrio de las fuerzas:

$$fv = q\mathscr{E} \qquad (2A.1)$$

Podemos escribir de nuevo esta ecuación como $v/\mathscr{E} = q/f$ para expresar la velocidad del movimiento por unidad de fuerza del campo, $v/\mathscr{E}$. Este cociente se denomina **movilidad electroforética** (μ) de la molécula:

$$\mu = \frac{v}{\mathscr{E}} = \frac{q}{f} = \frac{Ze}{f} \qquad (2A.2)$$

En el lado derecho de la ecuación, hemos expresado la carga sobre la molécula como el producto de la unidad de carga del electrón (o protón) (e) por el número de unidades de carga, Z (un número entero positivo o negativo). Puesto que f depende del tamaño y de la forma de la molécula, la ecuación (2A.1) nos indica que la movilidad de una molécula depende de su carga y de las dimensiones moleculares*. Como los iones y los macroiones difieren en ambos aspectos, su comportamiento en un campo eléctrico proporciona una buena manera de separarlos. La separación electroforética es uno de los métodos más utilizados en bioquímica.

* La ecuación (2A.2) es en realidad una aproximación, puesto que no tiene en cuenta los efectos de la atmósfera iónica. Véase van Holde, Johnson y Ho (Bibliografía) para más detalles.

Electroforesis en papel y electroforesis en gel

Aunque la electroforesis pueda llevarse a cabo de modo libre en una disolución, es más conveniente utilizar alguna clase de *medio de soporte*. Los dos medios de soporte más utilizados, el papel y el gel, se muestran en las Figuras 2A.1 y 2A.2. La **electroforesis en papel** (Figura 2A.1) suele emplearse para separar mezclas de moléculas pequeñas cargadas. Se extiende un trozo de papel de filtro humedecido con una solución amortiguadora para controlar el pH, entre dos cubetas que contienen electrodos. Se coloca en el papel una gota de la mezcla que se va a analizar y se aplica la corriente eléctrica. Cuando las moléculas se han desplazado durante un período de tiempo suficiente, generalmente varias horas, se retira el papel, se seca y se tiñe con un colorante que da color a las sustancias que se van a examinar. Cada clase de molécula cargada de la mezcla se habrá desplazado una distancia determinada hacia el ánodo o hacia el cátodo, dependiendo de su carga y dimensiones, y aparecerá como una mancha coloreada en el papel en la nueva posición. Normalmente las manchas suelen identificarse comparándolas con una serie de patrones que han corrido en el mismo papel. Si las sustancias desconocidas son radiactivas, se pueden recortar las manchas y medir su radiactividad mediante recuento de centelleo (véase Herramientas de la Bioquímica 12A).

La **electroforesis en gel** (Figura 2A.2) es una técnica muy utilizada con las proteínas y los ácidos nucleicos. En realidad, es probablemente el método más importante en biología molecular. Se coloca un gel que contenga la solución amortiguadora adecuada a modo de lámina entre dos placas de cristal. Los materiales más corrientes son la poliacrilamida, un polímero entrecruzado soluble en agua, y la agarosa, un polisacárido. La lámina se coloca entre los compartimientos de los electrodos, seleccionando la parte inferior como ánodo o cátodo, dependiendo de si se van a separar aniones o cationes. Con una pipeta, se coloca cuidadosamente una pequeña can-

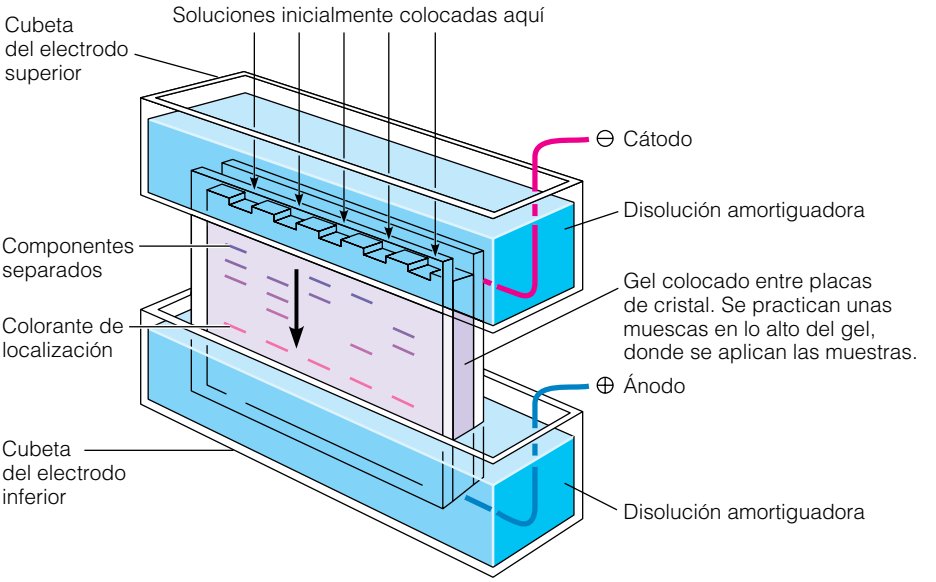


FIGURA **2A.2**
Electroforesis en gel.

tidad de una solución de cada muestra en cada una de las muescas practicadas previamente en la parte superior del gel. Generalmente, se añade a la muestra glicerol y un colorante "de localización" catiónico o aniónico soluble en agua. El glicerol hace que la solución de la muestra sea densa, de modo que no se mezcle con la solución amortiguadora de la cámara del electrodo superior. El colorante se desplaza más rápidamente que la mayoría de los macroiones, de modo que el investigador puede seguir la evolución del experimento con facilidad. La corriente se mantiene conectada hasta que la banda de colorante de localización esté cerca de la parte inferior de la lámina. Entonces se retira el gel de entre las placas de cristal y generalmente se tiñe con un colorante que se une a las proteínas o a los ácidos nucleicos. En este momento, se toma una fotografía del gel para poder guardar la información obtenida. Dado que la mezcla de proteínas o de ácidos nucleicos se aplicó en forma de banda estrecha en la parte superior del gel, los componentes que se desplazan con movilidades diferentes aparecen como bandas estrechas en el gel, aunque las bandas puedan ensancharse en cierta medida por difusión. Algunas técnicas (véase la Bibliografía de las Herramientas de la Bioquímica) permiten estrechar todavía más las bandas, de modo que cada clase de macroiones aparecen como líneas estrechas en el gel; la Figura 2A.3 muestra un ejemplo de separación de fragmentos de DNA con este método. La *movilidad relativa* de cada componente se calcula a partir de la distancia que se ha desplazado con relación al colorante de localización.

Principios de separación en la electroforesis en gel

Cuando la electroforesis se realiza en un gel o en otro medio de soporte, la movilidad es inferior a la que cabría esperar según la ecuación (2A.1) debido a que el gel u otra matriz

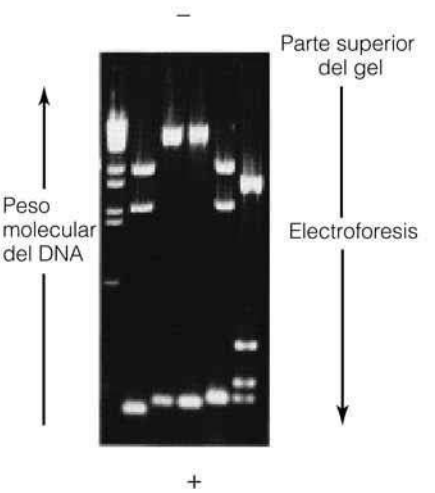
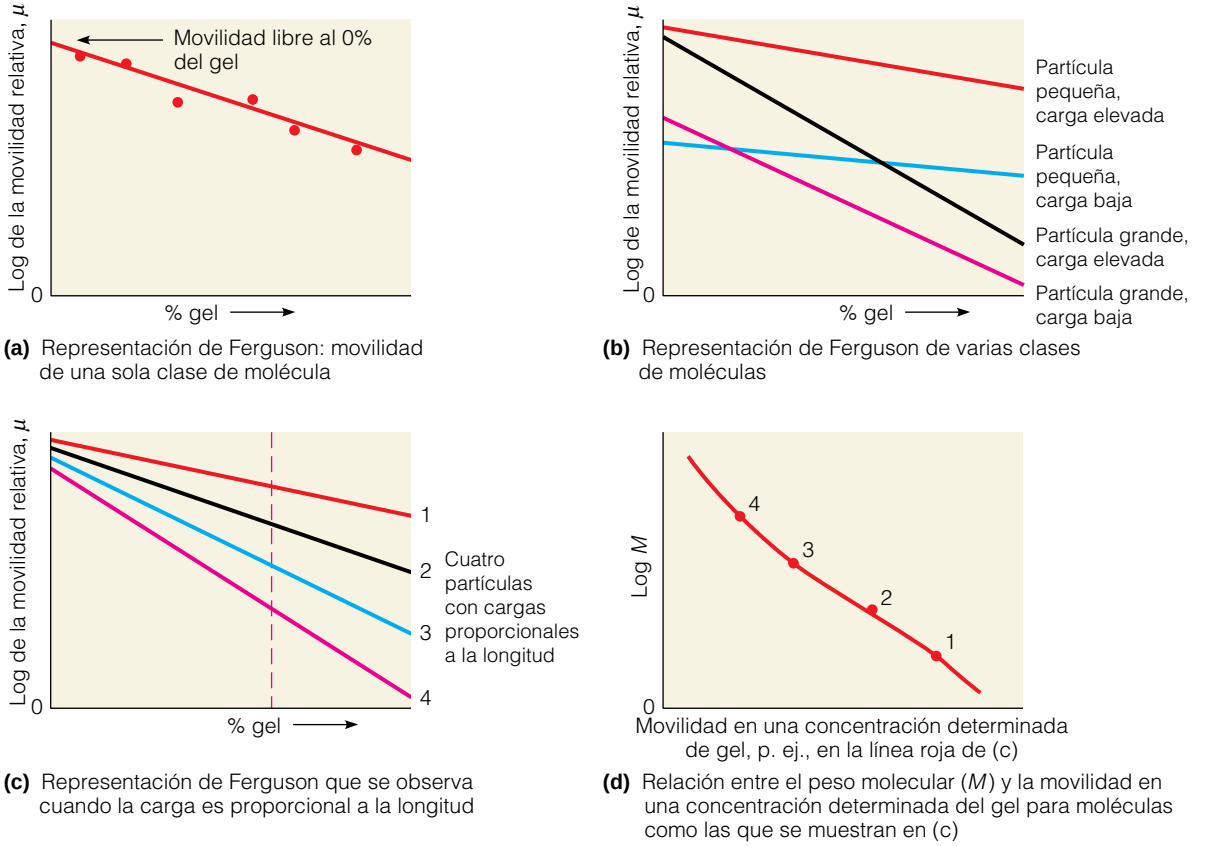


FIGURA **2A.3**
Gel que muestra la separación de fragmentos de DNA.
Cortesía de David Helfman.

muestra un efecto de tamizado molecular. Esto puede verse representando gráficamente la movilidad frente a la concentración del gel (Figura 2A.4a). Generalmente, una gráfica de log μ frente al porcentaje del gel es lineal; esto se denomina **una representación de Ferguson**. La movilidad límite que se alcanza cuando el porcentaje de gel se acerca a cero se denomina **movilidad libre**; se puede determinar, aproximadamente, mediante la ecuación (2A.1). La inclinación de la representación de Ferguson depende del tamaño y de la forma del macroión, puesto que refleja la dificultad que experimenta el macroión cuando pasa a través del entramado molecular del gel.

Como resultado de estos diversos factores, diferentes clases de moléculas pueden mostrar comportamientos muy diferentes en la electroforesis en gel (Figura 2A.4b). Sin embargo, algunos casos simples tienen gran importancia. Los polielec-



(a) Representación de Ferguson: movilidad de una sola clase de molécula

(b) Representación de Ferguson de varias clases de moléculas

(c) Representación de Ferguson que se observa cuando la carga es proporcional a la longitud

(d) Relación entre el peso molecular (*M*) y la movilidad en una concentración determinada del gel para moléculas como las que se muestran en (c)

FIGURA **2A.4**

Movilidad de las partículas en la electroforesis en gel. La movilidad de las partículas toma valores diferentes en función de la concentración del gel. Una representación de Ferguson dispone el log de la movilidad relativa (μ) frente al porcentaje de gel en la matriz. **(a)** Representación de Ferguson para una sola clase de molécula. Si se lleva la representación hasta el 0% de gel, se obtiene la movilidad libre teórica de la molécula. **(b)** Representación de Ferguson para cuatro moléculas con tamaño y carga diferentes. Obsérvese que las movilidades libres dependen más de la carga que del tamaño, mientras que la pendiente depende principalmente del tamaño. **(c)** Representación de Ferguson para moléculas con carga proporcional a su longitud. Las moléculas están numeradas en orden de longitud y carga crecientes. Las movilidades libres de dichas moléculas son casi iguales, pero cuanto más larga es la molécula, más se enlentece al aumentar la concentración del gel. **(d)** Representación de la relación entre el peso molecular y la movilidad. El log del peso molecular (*M*) de las cuatro moléculas que aparecen en (c) está representado frente a sus movilidades a una única concentración de gel. Cuando se prepara esta clase de gráfico a partir de patrones de referencia, puede utilizarse para determinar los pesos moleculares de las moléculas separadas.

trólitos como el DNA o la molécula de polilisina que aparece en la figura de la página 54 tienen una unidad de carga en cada residuo, de modo que cada molécula tiene una carga (*Ze*) proporcional a su longitud molecular. Pero el coeficiente de fricción (*f*) también aumenta con la longitud molecular, de modo que en una primera aproximación, un macroión cuya carga es proporcional a su longitud tiene una movilidad *libre* casi independiente de su tamaño. En una mezcla de esta clase de moléculas, el efecto de tamizado molecular determina las movilidades relativas en cualquier concentración de gel dada (Figura 2A.4c) y el efecto de tamizado es proporcional a la longitud molecular o al peso molecular. Esto significa que, mediante la electroforesis en gel, podemos separar perfectamente dichas moléculas basándose *sólo en su tamaño*, como muestra la Figura 2A.3. Para las moléculas alargadas, como los ácidos nucleicos la movilidad relativa suele ser, aproximadamente, una función lineal del logaritmo del peso molecular (Figura 2A.4d). Normalmente, en una o más calles del gel se colocan patrones de peso molecular conocido. Entonces se puede leer el peso molecular en una gráfica como la de la Figura 2A.4d obtenida a partir de estos patrones de referencia.

Enfoque isoeléctrico

Existe otra técnica de electroforesis en gel, que permite separar las moléculas únicamente según sus características de carga. Un polianfólito se desplazará en un campo eléctrico como otros iones, si tiene una carga neta positiva o negativa. Sin embargo, en su punto isoeléctrico, su carga neta es cero y no es atraído ni hacia el ánodo ni hacia el cátodo. Si empleamos un gel con un gradiente de pH estable que cubra un amplio intervalo de pH, cada molécula de polianfólito se desplaza hacia la posición de su punto isoeléctrico y se acumula en ese lugar. Podemos establecer un gradiente así, utilizando como amortiguador del gel una mezcla de anfólitos de bajo peso molecular. Este método de separación, denominado enfoque isoeléctrico, da lugar a bandas bien diferenciadas de polianfólitos acumulados y puede separar moléculas con diferen-

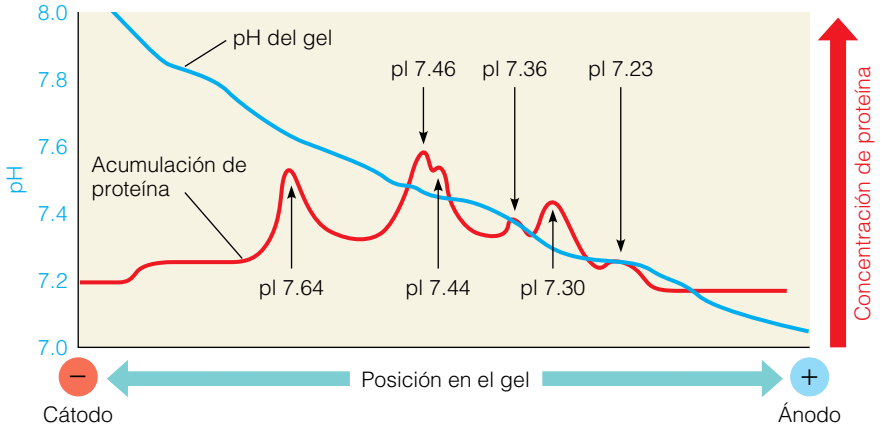


FIGURA **2A.5**
Enfoque isoeléctrico de los polianfólitos. En un gel con un gradiente de pH se coloca una mezcla de variantes del polianfólito hemoglobina. Cuando se aplica un campo eléctrico, cada variante proteica se desplaza hasta su propio punto isoeléctrico.

cias muy pequeñas de punto isoeléctrico (Figura 2A.5). Puesto que se conoce el pH de cada porción del gel, el enfoque isoeléctrico también puede utilizarse para determinar el punto isoeléctrico de un polianfólito concreto.

Otros métodos

Vamos a considerar otras técnicas de electroforesis en capítulos posteriores y en las secciones de Herramientas. Por ejemplo, en Herramientas de la Bioquímica 5C, describimos el empleo de la electroforesis en gel SDS para separar proteínas y determinar su peso molecular. Lo que acabamos de presentar es una perspectiva general de una técnica muy aplicada. Para más información, consulte la siguiente bibliografía.

Bibliografía

Hames, B. D. y D. Rickwood, eds. (1981) *Gel Electrophoresis of Proteins.* IRL Press, Oxford, Washington, D.C., y Rickwood, D. y B. D. Hames, eds. (1982) *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids.* IRL Press, Oxford, Washington, D.C. Estos dos volúmenes son manuales de laboratorio muy útiles para las técnicas de electroforesis en gel.

Osterman, L. A. (1984) *Methods of Protein and Nucleic Acids Research*, Vol. 1, Partes 1 y 2. Springer-Verlag, Nueva York. Completo resumen de la electroforesis y del enfoque isoeléctrico.

van Holde, K. E., W. C. Johnson y P.-S. Ho (1998) *Principles of Physical Biochemistry.* Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J. El Capítulo 5 contiene una exposición más detallada que la que se da aquí.

CAPÍTULO 3

Energética de la vida

UNA CÉLULA VIVA ES UNA ESTRUCTURA DINÁMICA. CRECE, SE MUEVE, SINTETIZA macromoléculas complejas y traslada selectivamente sustancias dentro y fuera de la célula o entre compartimientos. Toda esta actividad requiere energía, por lo que cada célula y cada organismo deben obtenerla de sus alrededores y gastarla de la manera más eficaz posible. Las plantas obtienen la energía de la luz solar; los animales utilizan la energía almacenada en las plantas o en otros animales de los que se alimentan. El procesamiento de esta energía, aprovechándola lo más posible para realizar las funciones que una célula u organismo debe llevar a cabo es una gran parte del tema en el que se centra la bioquímica. En cada célula, la mayor parte de la elegante maquinaria molecular existente está dedicada a esta tarea.

Debido al papel central que desempeña la energía en la vida, resulta adecuado que empecemos el estudio de la bioquímica con una introducción a la **bioenergética**, el análisis cuantitativo de la forma en que los organismos adquieren y utilizan la energía. La bioenergética puede considerarse una parte especial de la ciencia general de las transformaciones energéticas, denominada **termodinámica**. En este capítulo revisaremos tan sólo una pequeña parte de ese campo, eligiendo únicamente los conceptos que son importantes para el bioquímico o el biólogo.

La bioenergética describe la forma en la que los organismos adquieren, canalizan y utilizan la energía.

Energía, calor y trabajo

Una palabra que utilizaremos con frecuencia en nuestra exposición es la de **sistema**. En este contexto, un sistema es la parte del universo que elegimos para el estudio. Puede tratarse de una única célula bacteriana, de una placa de Petri que contenga nutrientes y millones de células, de todo el laboratorio en el que se encuentra la placa, de la tierra o del universo entero. Un sistema debe tener unos límites definidos, pero por lo demás hay pocas restricciones. El sistema puede ser *aislado*, y en consecuencia incapaz de intercambiar energía y materia con sus alrededores; puede ser *cerrado*, capaz de intercambiar energía, aunque no materia; o puede ser *abierto*, de forma que la energía y la materia puedan entrar y salir.

ENERGÍA INTERNA Y ESTADO DE UN SISTEMA

La energía interna de un sistema incluye todas las formas de energía que pueden intercambiarse mediante procesos físicos simples (extranucleares) o reacciones químicas.

Todo sistema contiene una determinada cantidad de **energía interna**, que indicamos con el símbolo *E*. Es importante para entendernos especificar lo que incluye esta energía interna. Los átomos y moléculas del sistema poseen una energía cinética de movimiento y una energía de vibración y rotación. Incluimos, además, toda la energía almacenada en los enlaces químicos existentes entre los átomos y la energía de las interacciones no covalentes entre las moléculas. En realidad, debemos incluir todo tipo de energía que pueda modificarse por procesos químicos o físicos no nucleares. No es necesario incluir la energía almacenada en el núcleo atómico, puesto que ésta no se altera en las reacciones químicas o bioquímicas. La energía interna es una función del **estado** de un sistema. El estado termodinámico se define mediante la indicación de las cantidades de todas las sustancias presentes y dos cualesquiera de las tres variables siguientes: la temperatura (T), la presión sobre el sistema (P) y el volumen del sistema (V). Se trata básicamente de una receta para expresar el sistema de una forma definida. Así por ejemplo, un sistema compuesto por 1 mol de O_2 en estado gaseoso en 1 litro a 273 K, tiene un estado definido y, por tanto, un valor de energía interna definido. Este valor es independiente de cualquier antecedente previo del sistema.

Salvo que un sistema esté aislado, puede intercambiar energía con sus alrededores y modificar, por tanto, su energía interna; definimos este cambio como ΔE. Para un sistema cerrado este intercambio sólo puede producirse de dos formas. En primer lugar, puede transferirse **calor** a un sistema o desde él. En segundo lugar, el sistema puede realizar un **trabajo** sobre sus alrededores o hacer que se realice un trabajo sobre él. El trabajo puede adoptar muchas formas. Puede incluir la expansión del sistema contra una presión externa como la expansión de los pulmones, el trabajo eléctrico como el que realiza una batería o el que es necesario para bombear iones a través de una membrana, la expansión de una superficie contra la tensión superficial, la flexión de un flagelo para impulsar a un protozoo, o el levantamiento de un peso mediante la contracción de un músculo. En todos estos ejemplos, se ejerce una fuerza contra una resistencia para producir un desplazamiento; así se realiza trabajo.

Obsérvese que el calor y el trabajo no son *propiedades* del sistema. Pueden considerarse como una "energía en tránsito" entre el sistema y sus alrededores. Se han adoptado determinados convenios para describir estas formas de intercambio de energía:

1. Designamos el calor mediante el símbolo q. Un valor positivo de q indica que el sistema absorbe calor de sus alrededores. Un valor negativo significa que el calor fluye desde el sistema hacia sus alrededores.
2. Designamos el trabajo con el símbolo w. Un valor positivo de w indica que el sistema realiza trabajo sobre sus alrededores. Un valor negativo significa que los alrededores realizan trabajo sobre el sistema.

Todo esto puede parecer excesivamente abstracto, pero tiene una relación muy directa con el funcionamiento de todos los días de nuestros cuerpos. Cuando ingerimos un alimento como la glucosa, lo metabolizamos y finalmente lo oxidamos hasta CO_2 y agua. La oxidación de un gramo de glucosa se asocia con un cambio de energía definido (ΔE), y parte de la energía liberada está disponible para nuestro uso. Parte de esta energía disponible la gastamos para generar calor (por ejemplo, para mantener la temperatura corporal) y parte en diversas clases de trabajo, entre las que se encuentran no sólo las que son obvias, como caminar y respirar, sino también otras clases más sutiles,

como el envío de impulsos a lo largo de los nervios, el bombeo de iones a través de las membranas, etc.

PRIMERA LEY DE LA TERMODINÁMICA

La energía interna de un sistema sólo puede modificarse mediante el intercambio de calor o trabajo con el entorno. Ésta es la primera ley de la termodinámica.

La energía interna de un sistema sólo puede modificarse mediante intercambios de calor o de trabajo con el entorno, por lo que el *cambio de energía interna* viene dado por

$$\Delta E = q - w \tag{3.1}$$

Esta ecuación, que es válida para todos los procesos, expresa la **primera ley de la termodinámica**. Esta primera ley es simplemente una regla de contabilidad, una afirmación de la conservación de la energía. Cuando se ha producido un proceso físico o una reacción química, podemos sumar los ingresos y los gastos de energía y cuadrar el balance. La energía puede obtenerse y gastarse de distintas formas pero, al menos en los procesos químicos, no puede crearse ni destruirse. Consideremos, por ejemplo, un proceso en el que el sistema absorbe una determinada cantidad de calor, al tiempo que realiza una cantidad exactamente equivalente de trabajo sobre su entorno. En este caso, tanto q como w son positivos, y $q = w$, por lo que $\Delta E = 0$. Esto concuerda con lo que nos indica el sentido común: si ha entrado una determinada cantidad de energía en forma de calor y ha salido una cantidad igual en forma de trabajo, la energía en el interior del sistema no ha cambiado.

Los cambios de energía interna, como los de cualquier función de estado, dependen únicamente de los estados inicial y final del sistema, y son independientes del camino seguido. Sin embargo, las cantidades de calor y de trabajo intercambiados en cualquier proceso dependen en gran medida de las condiciones que impongamos. Para concretar esta idea, consideremos una reacción química determinada, la oxidación completa de 1 mol de un ácido graso como el ácido palmítico:

$$CH_3(CH_2)_{14}COOH\ (\text{sólido}) + 23O_2\ (\text{gas}) \longrightarrow 16CO_2\ (\text{gas}) + 16H_2O\ (\text{líquido})$$

La oxidación del ácido palmítico es realmente una reacción bioquímica importante que se produce de una manera mucho más indirecta, en nuestro cuerpo cuando metabolizamos las grasas. Consideraremos la realización de esta reacción de dos formas diferentes, como se muestra en la Figura 3.1. En la Figura 3.1a, la reacción se lleva a cabo mediante la ignición de la mezcla en un recipiente sellado (una "bomba" calorimétrica) sumergido en un baño de agua. La reacción en estas condiciones tiene lugar a volumen constante. Podemos medir el calor que pasa desde el recipiente de reacción (el sistema) al baño de agua (el entorno) por el cambio de temperatura que se produce en el baño, conociendo la masa de agua y la capacidad de calor (por gramo) del agua. Como el recipiente de reacción tiene un volumen fijo, no se ha realizado trabajo alguno sobre el entorno, ni éste lo ha realizado sobre el sistema. En consecuencia, según la ecuación (3.1),

$$\Delta E = q \tag{3.2}$$

El calor que se desarrolla en una reacción a volumen constante es igual a ΔE.

El calor total que se transfiere desde el recipiente de reacción al entorno es exactamente igual al cambio de energía interna, y ese cambio de energía se debe principalmente a las modificaciones de los enlaces químicos que se han producido durante la reacción. La unidad actualmente aceptada para el calor, el

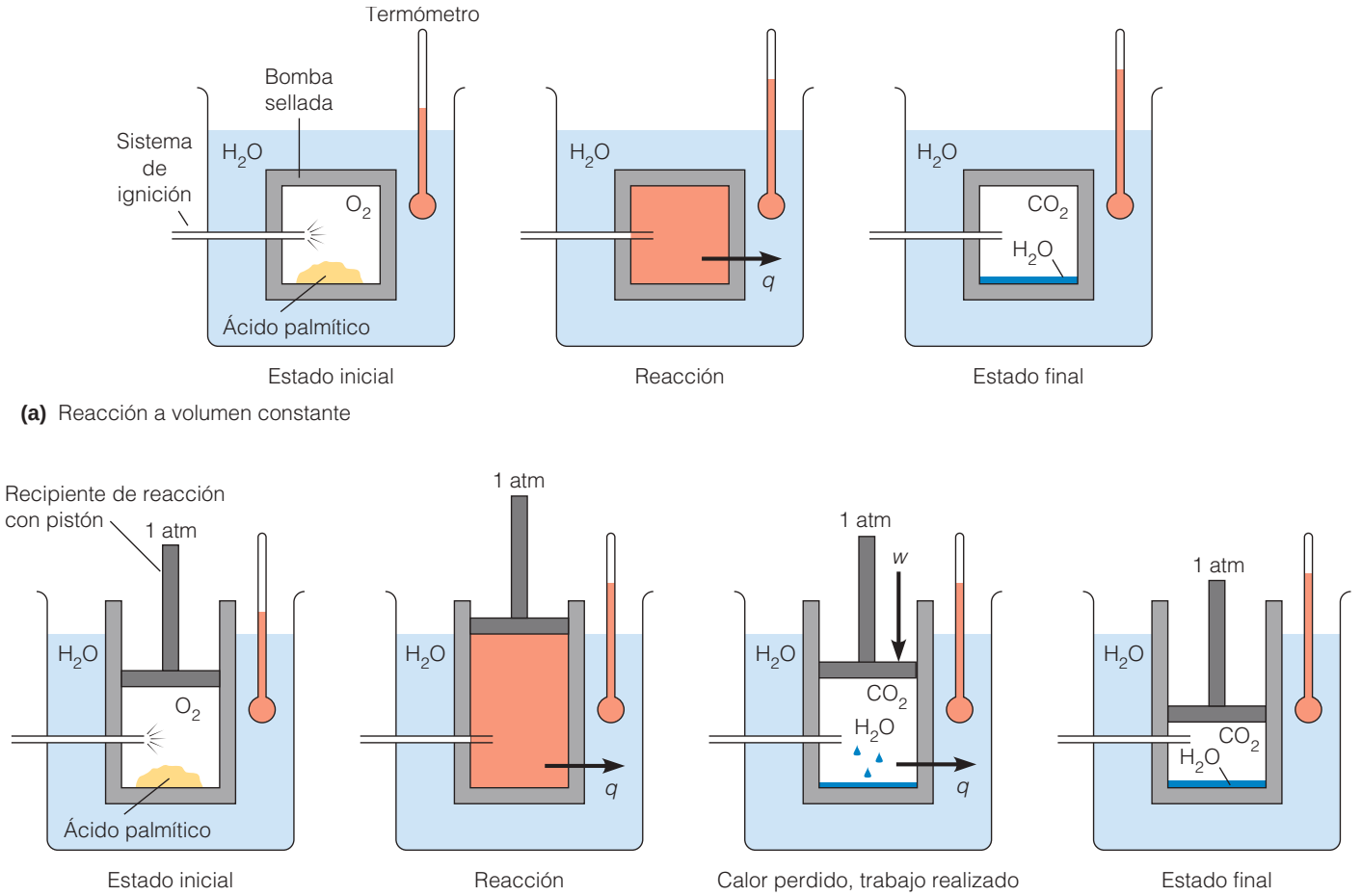


FIGURA **3.1**

Intercambio de calor y trabajo en reacciones a volumen constante y a presión constante. Una misma reacción, la oxidación de 1 mol de un ácido graso, se realiza en dos tipos de condiciones. **(a)** La reacción se produce en un recipiente sellado o "bomba". El calor (q) se transfiere al baño acuoso circundante y se mide por el pequeño aumento de temperatura del agua. No se realiza trabajo alguno, puesto que el sistema tiene un volumen constante. **(b)** El recipiente de reacción lleva acoplado un pistón que se mantiene a una presión de 1 atm. Durante la reacción, el calentamiento del gas en el recipiente empuja el pistón. Sin embargo, la reacción da lugar a una disminución del número de moles de gas, por lo que una vez enfriado el recipiente y el gas a la temperatura del agua, el volumen de gas es inferior al volumen inicial. Así pues, se realiza un trabajo neto *sobre* el sistema, y la cantidad total de calor comunicada al baño es ligeramente superior a la que se produce en (a).

trabajo y la energía es el **julio** (J)*. Para la reacción anterior, el valor observado de ΔE es de –9941.4 kJ/mol. El signo negativo corresponde al hecho de que la reacción libera la energía almacenada en los enlaces químicos. La energía contenida en el sistema ha *disminuido* al transferirse esta energía de los enlaces al entorno en forma de calor.

Supongamos ahora que la misma reacción se lleva a cabo a una presión constante de una atmósfera, como se indica en la Figura 3.1b. En este caso, el sistema puede expandirse o contraerse libremente, y finalmente se contrae en una cantidad proporcional a la disminución del número de moles de gas, que pasan de 23 a 16 moles durante la reacción. (Despreciamos el volumen relativamente pequeño de sólidos y líquidos.) La reducción del volumen de gas significa que el entorno ha realizado una determinada cantidad de trabajo sobre el sistema. Esto puede calcularse de la forma siguiente.

Cuando el volumen (V) se modifica a una presión constante (P),

$$w = P\,\Delta V \tag{3.3}$$

Para calcular w, podemos hacer una a proximación. Supongamos que las temperaturas inicial y final del sistema son prácticamente la misma (digamos 25°C,

* En el pasado, los bioquímicos tendían a expresar la energía, el calor y el trabajo en *calorías* o *kilocalorías*. Sin embargo, las unidades del Sistema Internacional de Unidades (SI) *julio* y *kilojulio* las están sustituyendo actualmente. La conversión es fácil: 1 cal = 4.184 J. De igual modo, 1 kcal (kilocaloría, es decir, 10^3 calorías) = 4.184 kJ (kilojulios). Surge una complicación del hecho de que la "caloría" a la que se refieren los especialistas en nutrición es en realidad una kilocaloría.

o 298 K) y que se trata de gases ideales. Podemos utilizar entonces la ecuación de los gases, $PV = nRT$. Esto nos da

$$\Delta V = \Delta n \frac{RT}{P} \tag{3.4}$$

en donde R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta en Kelvin, y Δn el cambio del número de moles de gases por mol de ácido palmítico oxidado. Sustituyendo en la ecuación (3.3) el valor indicado en (3.4), obtenemos

$$w = \Delta n\, RT \tag{3.5}$$

Puesto que deseamos obtener w en julios por mol, utilizamos $R = 8.314$ J/K·mol en la ecuación (3.5), con lo que se obtiene $w = -17.3$ kJ/mol de palmitato.

El calor generado en esta combustión a presión constante será

$$\begin{aligned} q &= \Delta E + w = \Delta E + P\,\Delta V = \Delta E + \Delta n\, RT \\ &= -9941.4 \text{ kJ/mol} - 17.3 \text{ kJ/mol} = -9958.7 \text{ kJ/mol} \end{aligned} \tag{3.6}$$

La cantidad de calor liberada al entorno es ligeramente superior en estas condiciones de *presión constante* que en las condiciones de *volumen constante* de la Figura 3.1a. La razón debe estar ya clara: en condiciones de presión constante, el entorno puede realizar trabajo sobre el sistema, y este trabajo (denominado trabajo PV) reaparece en forma de calor adicional liberado desde el sistema al entorno.

Aunque el calor y el trabajo intercambiados con el entorno dependen del camino, es importante recordar que ΔE no depende del camino, sino únicamente de los estados inicial y final.

ENTALPÍA

La mayor parte de las reacciones químicas que se realizan en el laboratorio y prácticamente todos los procesos bioquímicos se producen en unas condiciones que se aproximan mucho más a las de presión constante que a las de volumen constante. Si estamos interesados en el calor que puede obtenerse mediante la oxidación del ácido palmítico en un animal, lo que deseamos saber es el calor desarrollado a presión constante. Como hemos indicado en la ecuación (3.6), este calor no es exactamente igual a ΔE debido al trabajo PV realizado.

El calor que se desarrolla en una reacción a presión constante es igual a la entalpía, ΔH.

Por tanto, para expresar el cambio de calor en una reacción a presión constante, necesitamos otra función de estado. Definimos una nueva magnitud, la **entalpía**, cuyo símbolo es ***H***:

$$H = E + PV \tag{3.7}$$

La variación de entalpía de una reacción es para los bioquímicos la variación de energía de mayor interés.

Dado que E y PV son funciones de estado, H también es una función de estado. El cambio ΔH depende tan sólo de los estados inicial y final del proceso para el que se calcula. Para las reacciones a presión constante, ΔH se define de la siguiente forma:

$$\Delta H = \Delta E + P\,\Delta V \tag{3.8}$$

El valor ΔH es el mismo que la cantidad de calor (q) calculada en la ecuación (3.6). En otras palabras, *cuando el calor de una reacción se mide a presión constante, lo que se determina es* ΔH.

Los cambios de energía que encontrará tabulados a lo largo de éste y de otros libros de bioquímica estarán casi siempre en forma de valores de ΔH. Esto es lo

más adecuado puesto que in vivo estas reacciones se producen en unas condiciones de presión casi constante. Así, por ejemplo, si un especialista en nutrición desea conocer la energía que puede obtenerse con la oxidación del ácido palmítico en el organismo, la cantidad adecuada es ΔH.

La medida de los cambios de energía como ΔE y ΔH es práctico para los bioquímicos y los especialistas en nutrición debido a que estas cantidades dependen sólo de los estados inicial y final del sistema. La oxidación de una grasa como el ácido palmítico se produce de forma muy diferente en el cuerpo humano que en un calorímetro como el de la Figura 3.1. Sin embargo, los valores de ΔE y ΔH para el proceso son *exactamente* los mismos en ambos caminos, ya que una magnitud como ΔE o ΔH depende sólo de los estados inicial y final. De esta forma, el calorímetro proporciona una medida exacta de la energía disponible para el ser humano de cada gramo de ácido palmítico.

Un ser humano promedio requiere un gasto de alrededor de 6000 kJ (aproximadamente 1500 Kcal o 1500 de las "calorías grandes" que usan los especialistas en nutrición) para mantener las funciones corporales. Con un ejercicio moderado, estas necesidades pueden duplicarse fácilmente.

Aunque hemos señalado la distinción entre ΔE y ΔH, debemos resaltar que para la mayor parte de las reacciones bioquímicas, la diferencia cuantitativa entre ellos tiene poca relevancia. La mayor parte de estas reacciones se producen en disolución y no comportan el consumo o la formación de gases. Los cambios de volumen son pues extremadamente pequeños, y el valor de $P\Delta V$ es muy bajo en comparación con ΔE o ΔH. Incluso en el ejemplo indicado, la oxidación del ácido palmítico, la diferencia entre ΔH y ΔE es de sólo un 0.2%. Así pues, en la mayoría de los casos está justificado considerar el valor de ΔH como medida directa del cambio de energía en un proceso, y nos referiremos a menudo a ΔH como el cambio de energía.

La entropía y la segunda ley de la termodinámica

DIRECCIÓN DE LOS PROCESOS

Por muy útil que pueda ser la primera ley de la termodinámica para seguir la pista a los cambios de energía de los procesos, no nos proporciona un elemento de información importante: ¿cuál es la *dirección favorecida* de un proceso? No permite responder preguntas como las siguientes:

Colocamos un cubito de hielo en un vaso de agua a temperatura ambiente. Se funde. ¿Por qué en su lugar no se congela el resto del agua?
Colocamos un cubito de hielo en un recipiente con agua cuidadosamente muy enfriada. Se congela todo. ¿Por qué?
Acercamos una cerilla a un pedazo de papel. Éste se quema formando dióxido de carbono y agua. ¿Por qué no podemos formar papel mezclando dióxido de carbono y agua?

Los procesos reversibles se producen siempre cerca de un estado de equilibrio; los procesos irreversibles se dirigen hacia el equilibrio.

Una característica de los procesos de este tipo es su *irreversibilidad* en las condiciones establecidas. Un cubito de hielo en un vaso de agua a temperatura ambiente continuará fundiéndose ya que no hay forma alguna de invertir ese proceso sin que se produzcan cambios importantes en las condiciones utilizadas. Pero *sí* existe una forma *reversible* de fundir el hielo: ponerlo en contacto con agua a 0°C. En ese caso, la adición de un poco de calor producirá un poco de fusión y la extracción de un poco de calor hará que se congele un poco de agua. Un proceso **reversible** como la fusión del hielo a 0°C está casi siempre en equilibrio. Los procesos **irreversibles** que acabamos de describir se producen

cuando los sistemas se sitúan muy lejos del estado de equilibrio. Posteriormente se dirigen *hacia* el estado de equilibrio.

Un proceso irreversible se denomina frecuentemente proceso espontáneo, aunque nosotros preferimos el término *favorable*. La palabra *espontáneo* tiende a implicar, tal vez erróneamente, que el proceso es rápido. La termodinámica no tiene nada que decir sobre la rapidez de los procesos, pero sí puede indicar la dirección favorecida. A 25°C y 1 atm de presión está favorecida la fusión del hielo y no la congelación. En este caso, el resultado concuerda con la intuición; nadie esperaría que se formara un cubito de hielo ni que permaneciera sin fundirse, al colocarlo en agua a 25°C. Ambos resultados constituirían procesos claramente desfavorables.

Es esencial para la bioenergética conocer si un proceso es reversible, favorable o desfavorable. Esta información puede expresarse de manera muy sucinta con la *segunda ley de la termodinámica*, que nos dice los procesos que son favorables termodinámicamente. Para presentar la segunda ley debemos considerar un nuevo concepto, la entropía.

ENTROPÍA

¿Por qué tienen los procesos químicos y físicos una dirección favorecida termodinámicamente? Una primera aproximación a la explicación podría ser que los sistemas simplemente van hacia el estado de menor energía. El agua desciende por la colina, perdiendo energía al caer de manera espontánea en el campo gravitatorio de la tierra; la oxidación del ácido palmítico, como la combustión del papel, libera energía en forma de calor. Ciertamente, la reducción al mínimo de la energía es la clave de la dirección favorecida de *algunos* procesos; pero esto no explica la fusión del hielo a 25°C; en realidad, en ese proceso se *absorbe* energía. Debe actuar otro factor muy diferente, y un experimento sencillo aporta un indicio claro respecto a cuál puede ser ese factor. Si colocamos cuidadosamente una capa de agua pura sobre una solución de sacarosa, observaremos que, a medida que transcurre el tiempo, todo el sistema se va haciendo cada vez más uniforme (Figura 3.2). Finalmente, las moléculas de sacarosa acaban estando distribuidas de manera uniforme en todo el recipiente. Aunque no se produce prácticamente un cambio de energía, el proceso es claramente favorable. Sabemos por la experiencia que el proceso opuesto (la autosegregación de las moléculas de sacarosa en una parte del volumen de la solución) no se produce nunca. Lo que tiene en este caso una importancia clara es que *los sistemas de moléculas tienen una tendencia natural a la aleatorización.*

El grado de aleatoriedad o desorden de un sistema se mide con una función de estado denominada **entropía** (*S*). Existen diversas formas de definir la en-

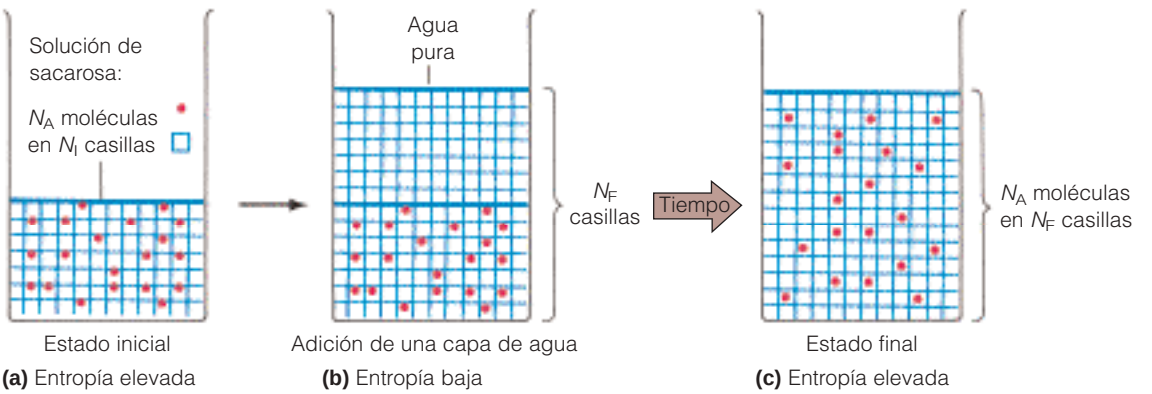


FIGURA **3.2**

La difusión como un proceso impulsado por la entropía. La mezcla gradual de una solución de sacarosa diluida y agua pura es el resultado de un movimiento aleatorio de sus moléculas. Podemos ver el aumento de la entropía si imaginamos el volumen de los dos líquidos formado por casillas, cada una de ellas lo bastante grande como para alojar una molécula de sacarosa. **(a)** Inicialmente, la solución de sacarosa está en equilibrio, ya que sus N_A moléculas se distribuyen aleatoriamente en sus N_i casillas. **(b)** Cuando se añade una capa de agua pura sin mezclar, el sistema deja de estar en equilibrio. Ha pasado a estar más ordenado, con todas las casillas ocupadas situadas en la mitad de la solución. **(c)** A medida que las moléculas de sacarosa y de agua continúan moviéndose al azar, su disposición va siendo menos ordenada, ya que cada casilla tiene la misma probabilidad de ser ocupada. Finalmente, la solución alcanza un nuevo equilibrio, con las moléculas de sacarosa distribuidas aleatoriamente en toda ella. El impulso hacia el equilibrio es consecuencia de la tendencia de la entropía a aumentar. Un sistema nunca evolucionará espontáneamente del estado (c) al estado (b).

La entropía es una medida de la aleatoriedad o desorden que existe en un sistema.

TABLA 3.1 Ejemplos de estados de entropía baja y de entropía elevada

Entropía baja	Entropía elevada
Hielo, a 0°C	Agua, a 0°C
Un diamante, a 0 K	Vapor de carbón a 1 000 000 K
Una molécula proteica, en su estructura nativa regular	La misma molécula proteica en un estado de ovillo aleatorio deplegado
Un soneto de Shakespeare	Una serie aleatoria de letras
La mesa de un director de banco	La mesa de un profesor

La segunda ley de la termodinámica establece que la entropía de un sistema aislado tiende a aumentar hasta un valor máximo.

tropía, pero la más útil para nuestras aplicaciones se basa en el hecho de que un determinado estado termodinámico puede tener muchos *subestados* de la misma energía. Esos subestados corresponden, por ejemplo, a las distintas formas de disponerse o distribuirse las moléculas en el sistema. Si el estado termodinámico tiene un número (W) de subestados de la misma energía, la entropía (S) se define como

$$S = k \ln W \tag{3.9}$$

en donde k es la **constante de Boltzmann**, la constante de los gases R dividida por el número de Avogadro. Una consecuencia de esta definición es que la entropía se considera una medida del desorden, puesto que habrá siempre muchas más formas de colocar un número elevado de moléculas de una forma desordenada que de una forma ordenada. En consecuencia, la entropía de un estado ordenado es inferior a la de un estado desordenado del mismo sistema. De hecho, el valor mínimo de la entropía (cero) se da *únicamente* para un cristal perfecto en el cero absoluto de temperatura (0 K o –273°C). El proceso de difusión iguala las concentraciones en nuestra solución de sacarosa simplemente porque existen más formas de distribuir las moléculas en un volumen elevado que en un volumen pequeño. En la Tabla 3.1 se presentan algunos ejemplos que nos permitirán familiarizarnos algo más con el concepto de entropía.

SEGUNDA LEY DE LA TERMODINÁMICA

En el ejemplo anterior se observa que la fuerza que impulsa a un sistema aislado hacia el equilibrio es simplemente el aumento de la entropía. Esta verdad universal es la **segunda ley de la termodinámica**: *la entropía de un sistema aislado tenderá a aumentar hacia un valor máximo.* La entropía de un sistema de este tipo no se reducirá (la sacarosa no "desdifundirá" nunca para situarse en un rincón de la solución). Esto refleja simplemente nuestra concepción de sentido común de que cuando se dejan solas las cosas no se colocan de una forma más ordenada.

Energía libre: la segunda ley en sistemas abiertos

La forma de enunciar la segunda ley de la termodinámica del apartado anterior no es muy útil para los biólogos y los bioquímicos, puesto que nunca estudiamos sistemas aislados. Todos los sistemas biológicos (por ejemplo células, organismos o poblaciones) están abiertos para intercambiar energía y materia con su entorno. Dado que los sistemas vivos pueden intercambiar energía con su entorno, en muchas reacciones se producirán cambios tanto de energía *como* de entropía, y ambos deben ser importantes para determinar la dirección de los procesos termodinámicamente favorables. Para estos sistemas, necesitamos *una función de estado que incluya tanto la energía como la entropía.* Existen varias funciones de este tipo, pero la de mayor importancia en bioquímica es la **energía libre de Gibbs** (G) o, como la denominaremos nosotros, la **energía libre.** Esta función de estado combina un término de entalpía, que mide el cambio de energía a presión constante, y un término de entropía, que tiene en cuenta la importancia de la aleatorización. La energía libre de Gibbs se define como

$$G = H - TS \tag{3.10}$$

en donde T es la temperatura absoluta. Para un cambio de energía libre ΔG en un sistema a temperatura y presión constantes, podemos escribir

El cambio de energía libre de un proceso a temperatura y presión constantes es $\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S$.

$$\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S \tag{3.11}$$

Podemos comprender parte del significado de la energía libre si consideramos los factores que hacen que los procesos sean favorables según nos indica la ex-

periencia. Hemos dicho que una disminución de la energía (ΔH es negativo), o un aumento de la entropía (ΔS es positivo), o ambos, son característicos de los procesos favorables. Cualquiera de estas condiciones tenderá a hacer que ΔG sea negativo. En realidad, otra forma de enunciar la segunda ley de la termodinámica, que es la más importante para nuestros fines, es la siguiente: *el criterio para que un proceso sea favorable en un sistema sin aislar, a temperatura y presión constantes, es que* ΔG *sea negativo.* Y a la inversa, un ΔG positivo indica que un proceso *no* es favorable, mientras que el *inverso* del mismo *sí* es favorable. Los procesos que se acompañan de cambios de energía libre negativos se denominan **exergónicos**, y los que cursan con ΔG positivo se denominan **endergónicos**. Encontrará estos términos con frecuencia a lo largo de este libro.

Supongamos ahora que los términos ΔH y $T\,\Delta S$ de la ecuación de la energía libre se equilibran entre sí. En este caso $\Delta G = 0$, y el proceso no tiene una dirección favorable en uno ni en otro sentido. En realidad, el sistema está en equilibrio. En estas condiciones, el proceso es reversible; es decir, puede desplazarse en cualquiera de las dos direcciones con un impulso infinitesimal en un sentido u otro. En la Tabla 3.2 se resumen estas reglas sencillas pero importantes con respecto a los cambios de energía libre.

Un proceso favorecido termodinámicamente tiende hacia la dirección que hace mínima la energía libre (dando lugar a un ΔG negativo); ésta es una forma de enunciar la segunda ley de la termodinámica.

TABLA **3.2** **Reglas de la energía libre**

Si ΔG es …	El proceso es …
Negativo	Favorecido termodinámicamente
Cero	Reversible; en equilibrio
Positivo	Desfavorecido termodinámicamente; el proceso inverso está favorecido

UN EJEMPLO DE LA INTERRELACIÓN DE LA ENTALPÍA Y LA ENTROPÍA: LA TRANSICIÓN ENTRE EL AGUA LÍQUIDA Y EL HIELO

Para concretar más estas ideas consideremos con detalle un proceso que hemos mencionado antes, la transición entre el agua líquida y el hielo. Este ejemplo familiar pone de manifiesto la relación entre la entalpía y la entropía para determinar el estado de un sistema. En un cristal de hielo existe un número máximo de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua (véase la página 39 en el Capítulo 2). Cuando el hielo se funde, parte de estos enlaces deben romperse. La diferencia de entalpía entre el hielo y el agua corresponde casi por completo a la energía que debe introducirse en el sistema para romper estos enlaces de hidrógeno. Como se indica en la Figura 3.3, el cambio de entalpía para la transi-

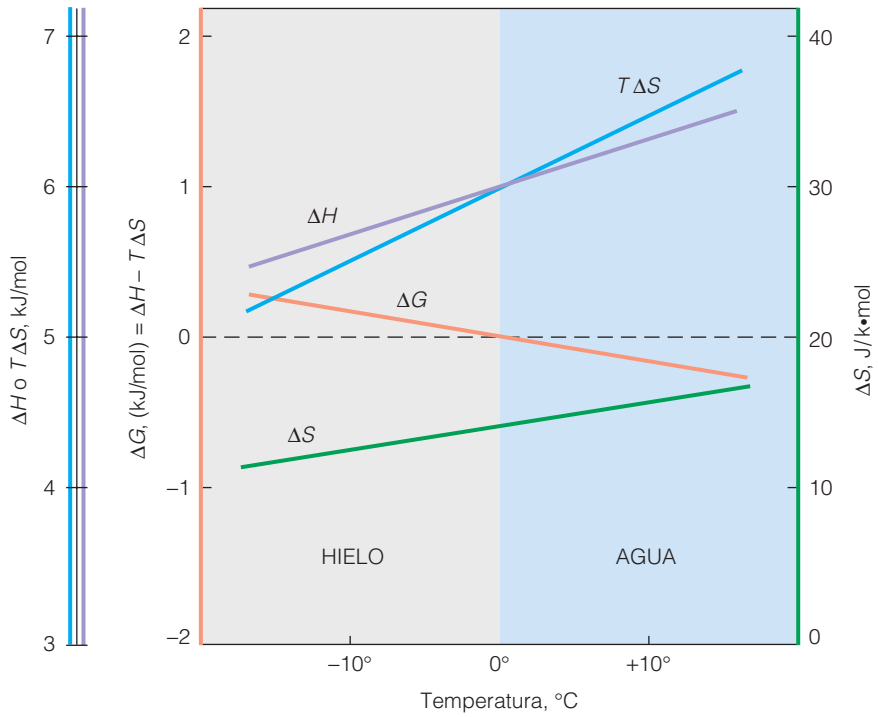


FIGURA **3.3**

Interrelación de la entalpía y la entropía en la transición de hielo a agua. Para la transición de hielo a agua, ΔH y ΔS son ambos positivos y aproximadamente constantes a lo largo de un amplio margen de temperaturas. El aumento de $T\,\Delta S$ al aumentar la temperatura hace que ΔG se reduzca, pasando de un valor positivo a un valor negativo. A 0°C, las curvas de ΔH y de $T\,\Delta S$ se cruzan y ΔG es cero.

En el punto de fusión de cualquier sustancia, la entalpía y la entropía contribuyen al equilibrio de ΔG, y $\Delta G = 0$.

ción hielo ⟶ agua es positivo, como sería de prever según el argumento precedente.

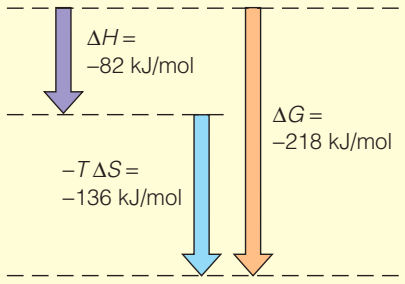
El cambio de entropía de la fusión se debe fundamentalmente a que el agua líquida es una estructura más aleatoria que el hielo. En un cristal de hielo, cada molécula de agua tiene un lugar fijo dentro de la red y se une a su vecina de la misma forma que las demás moléculas de agua. En cambio, las moléculas del agua líquida están en continuo movimiento, intercambiándose las moléculas con las que se establecen los enlaces de hidrógeno a medida que se desplazan (compárense las Figuras 2.10a y 2.10b). En la Figura 3.3 se muestra cómo el cambio de entropía de la fusión del hielo a agua es una cantidad positiva, que corresponde al aumento de la aleatoriedad. Si calculamos el cambio de energía libre ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$) para la transición hielo ⟶ agua, encontramos lo siguiente: a temperaturas bajas, ΔH domina y ΔG es positivo. Así por ejemplo, a –10°C obtenemos un valor de $\Delta G = +213$ J/mol. Esto significa que la transición hielo ⟶ agua *no* es favorable en estas condiciones. La transición inversa (agua ⟶ hielo) *sí* es favorable y, por tanto, irreversible, como podemos observar del comportamiento del agua muy enfriada. Si alteramos el agua muy enfriada o añadimos un cristal de hielo minúsculo para iniciar el proceso de congelación, se congelará la totalidad de la muestra. Este proceso no podrá invertirse por ningún cambio infinitesimal que podamos hacer.

A una temperatura por encima de 0°C, digamos +10°C, un cubito de hielo se fundirá irreversiblemente. De nuevo, este resultado podría predecirse a partir de los datos, puesto que si calculamos el valor de ΔG a +10°C, obtenemos $\Delta G = -225$ J/mol. El signo de ΔG es ahora negativo, ya que el término $-T\Delta S$ domina cuando T es suficientemente grande. A +10°C el proceso (hielo ⟶ agua) es favorable e irreversible.

Pero obsérvese lo que ocurre a 0°C. A esta temperatura, los términos ΔH y $T\Delta S$ se equilibran exactamente, y $\Delta G = 0$. Un valor de cero para ΔG es la condición de equilibrio, y sabemos que el hielo y el agua están en equilibrio a 0°C. El cambio es ahora reversible; cuando el hielo y el agua líquida están juntas a 0°C, podemos fundir algo más de hielo añadiendo una cantidad infinitesimal de calor. Alternativamente, podemos extraer una cantidad minúscula de calor del sistema y congelar un poco más de agua. El punto de fusión de una sustancia es simplemente la temperatura a la que se cruzan las curvas de ΔH y $T\Delta S$; a esta temperatura el proceso de congelación favorecido energéticamente está en equilibrio con el proceso de fusión favorecido entrópicamente. Ni ΔH ni ΔS por sí solos nos pueden indicar lo que ocurrirá, pero su combinación, $\Delta H - T\Delta S$, indica exactamente la forma del agua que es estable a una temperatura determinada.

INTERRELACIÓN DE LA ENTALPÍA Y LA ENTROPÍA: RESUMEN

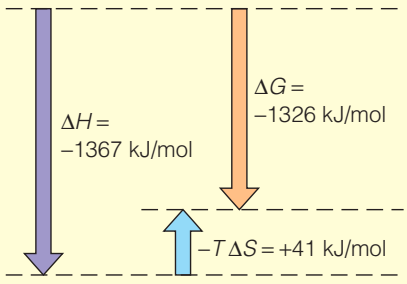
En todos los procesos químicos y físicos, es la competencia entre los términos entalpía y entropía la que determina la dirección favorable. Como indica la Figura 3.4, en algunos procesos domina el cambio de entalpía; en otros es más importante el cambio de entropía. Además, dado que ΔS se multiplica por T en la ecuación (3.11), la dirección favorable dependerá de la temperatura. Hemos visto un ejemplo, la fusión del hielo, pero son posibles otras situaciones bastante diferentes según los signos de ΔH y ΔS. En la Tabla 3.3 se indican las posibilidades. Obsérvese que cuando ΔH es negativo y ΔS es positivo, ΔG debe ser siempre negativo, por lo que la reacción está favorecida a todas las temperaturas. Ocurre lo contrario cuando el valor de ΔH es positivo y el de ΔS es negativo; ΔG es siempre positivo y la reacción no está favorecida a ninguna temperatura.



(a) Fermentación de la glucosa a etanol

$C_6H_{12}O_6(s) \rightarrow 2C_2H_5OH(l) + 2CO_2(g)$

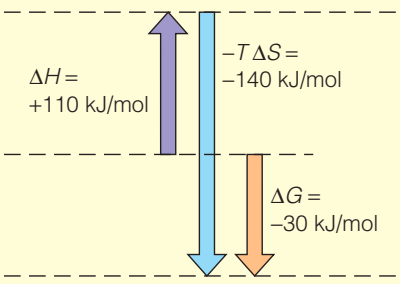
Los cambios tanto de la entalpía como de la entropía favorecen la reacción.



(b) Combustión del etanol

$C_2H_5OH(l) + 3O_2(g) \rightarrow 2CO_2(g) + 3H_2O(l)$

La entalpía favorece la reacción, pero la entropía se opone a ella. Podríamos denominar a esta reacción "impulsada por la entropía". Si el producto fuera *vapor* de agua, un aumento de la entropía favorecería también la reacción.



(c) Decomposición del pentóxido de nitrógeno

$N_2O_5(s) \longrightarrow 2NO_2(g) + 1/2O_2(g)$

Esta reacción química es poco habitual por cuanto está "impulsada por la entropía". La reacción absorbe generalmente calor pero se ve favorecida por el gran aumento de entropía que se produce por la formación de productos gaseosos.

FIGURA **3.4**

Contribución de la entalpía y la entropía en varios procesos. Cada uno de estos procesos tiene un cambio de energía libre negativo, pero el cambio se realiza de diversas formas. (Obsérvese que las flechas de los diagramas no están representadas a escala.) **(a)** ΔH negativo, $-T\,\Delta S$ negativo. Cuando se fermenta la glucosa a etanol, la entalpía disminuye y la entropía aumenta, con lo que tanto el cambio de la entalpía como el de la entropía favorecen esta reacción. **(b)** ΔH negativo, $-T\,\Delta S$ positivo. Cuando se produce la combustión del etanol, tanto la entalpía como la entropía disminuyen. El valor de ΔH negativo favorece esta reacción pero el valor de $-T\,\Delta S$ positivo se opone a ella, por lo que podríamos llamar a ésta una reacción impulsada por la entalpía. Si el producto fuera *vapor* de agua, un aumento de entropía iría a favor de la reacción, ya que el vapor de agua tiene una entropía superior. **(c)** ΔH positivo, $-T\,\Delta S$ negativo. Cuando se descompone el pentóxido de nitrógeno, aumentan tanto la entalpía como la entropía. Esta reacción química es poco habitual, por cuanto está impulsada por la entropía. Aunque la reacción absorbe calor, está favorecida gracias al gran aumento de entropía que se produce por la formación de productos gaseosos.

TABLA **3.3** **De qué forma determinan los signos de ΔH y ΔS el efecto de la temperatura sobre los procesos o reacciones**

ΔH	ΔS	T Baja	T Elevada
+	+	ΔG positivo; no favorecido	ΔG negativo; favorecido
+	−	ΔG positivo; no favorecido	ΔG positivo; no favorecido
−	+	ΔG negativo; favorecido	ΔG negativo; favorecido
−	−	ΔG negativo; favorecido	ΔG positivo; no favorecido

Llegados a este punto, es preciso aclarar dos cuestiones que con frecuencia producen confusión. En primer lugar, debemos resaltar un punto ya mencionado: el que un proceso sea favorable o desfavorable no tiene nada que ver con su velocidad. Los estudiantes suponen con frecuencia que los procesos favorables son rápidos, pero esto no tiene por qué ser así. Una reacción puede tener un cambio de energía libre negativo elevado pero puede producirse a una velocidad muy lenta debido a los obstáculos del proceso cinético de reacción. Un ejemplo sorprendente de esta situación es la reacción sencilla C (diamante) $\longrightarrow$ C (grafito). El cambio de energía libre de esta transformación, a temperatura ambiente, es de –2.88 kJ/mol. Así pues, el diamante es inestable. Sin embargo, la reacción es imperceptiblemente lenta, ya que a la red cristalina rígida le resulta muy difícil cambiar de forma. Los diamantes *no* son para siempre, sino tan sólo para casi siempre. Un catalizador puede aumentar la velocidad de algunas reacciones, pero la dirección favorecida viene dictada siempre por el valor de ΔG y es independiente de si la reacción está catalizada o no. Veremos más adelante que los catalizadores proteicos denominados enzimas seleccionan de entre las diversas reacciones favorables termodinámicamente las que han de catalizarse.

Los procesos favorables no tienen por qué ser rápidos.

En segundo lugar, la entropía de un sistema *abierto* puede disminuir. Acabamos de ver que esto ocurre cuando el agua se congela. Lo más importante para nosotros en este curso es que en los organismos vivos se producen continuamente disminuciones de entropía. Un organismo consume alimentos, a menudo en forma de moléculas pequeñas desorganizadas, y a partir de ellas construye macromoléculas enormes, complejas y muy ordenadas, como las proteínas y los ácidos nucleicos. A partir de estas macromoléculas, construye cé-

La vida comporta una reducción temporal de la entropía, que se compensa con el gasto de energía.

lulas, tejidos y órganos elegantemente estructurados. Toda esta actividad comporta una enorme disminución de entropía. La ecuación (3.11) implica que la entropía puede disminuir en un proceso favorecido, pero únicamente si este cambio se acompaña de una gran disminución de la entalpía. *Es preciso gastar energía para pagar el precio de la organización.* De hecho, la vida consiste fundamentalmente en este intercambio. Los organismos vivos gastan energía para superar la entropía. Para que estos procesos vitales continúen, los cambios de la energía libre *global* en el organismo deben ser negativos. La vida es un proceso irreversible. Un organismo que llega al equilibrio con su entorno está muerto.

La bioenergética tiene una implicación filosófica aún más profunda. El universo en su conjunto es un sistema aislado. *La entropía del universo entero debe estar aumentando.* De ello se deduce que cada uno de nosotros, como organismos vivos que de manera local y temporal reducimos la entropía, debemos producir un aumento de la entropía en algún lugar del mundo que nos rodea. Así, por ejemplo, cuando metabolizamos el alimento, emitimos calor y aumentamos el movimiento molecular aleatorio a nuestro alrededor. En cierto sentido, compramos nuestras vidas mediante la muerte entrópica del universo.

ENERGÍA LIBRE Y TRABAJO ÚTIL

El cambio de energía libre, ΔG, es una medida del máximo trabajo útil que puede obtenerse de cualquier reacción.

¿Por qué se denomina energía *libre* a la magnitud G? La razón es que ΔG representa la porción del cambio energético (ΔH) que está *disponible*, o libre, para realizar trabajo útil (es decir, un trabajo distinto del trabajo $P\Delta V$ de expansión). Es de gran importancia en bioquímica el conocimiento de que ΔG mide la cantidad máxima de trabajo *útil* que puede obtenerse de un proceso químico, puesto que el trabajo útil comprende el trabajo de la contracción muscular y la motilidad celular, el del transporte de iones y moléculas, el de la transmisión de señales y el del crecimiento de los tejidos, por dar algunos ejemplos.

Recuérdese que ΔH es el cambio de energía total de una reacción, incluido el trabajo $P\Delta V$. La ecuación $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ indica que una parte de ΔH se disipa siempre en forma de calor, como expresa el término $T\Delta S$, y no puede utilizarse, por tanto, para realizar otras funciones. Sea cual sea el proceso de que se trate, al menos la cantidad de energía correspondiente a $T\Delta S$ no puede utilizarse. El resto, ΔG, puede utilizarse para otras necesidades, aunque la cantidad que se utiliza realmente para la realización de trabajo depende del camino que siga el proceso. La **eficacia** de un proceso bioquímico se define por el cociente entre el trabajo realmente realizado y el trabajo máximo esperado a partir del cambio de energía libre.

Podemos utilizar el concepto de ΔG como una medida del trabajo útil para mostrar la relación entre el cambio de energía libre de una reacción de oxidación-reducción y el voltaje generado por la célula electroquímica (real o hipotética) en que tiene lugar la reacción. El trabajo realizado para mover una carga de Q culombios contra un potencial negativo ($-E$ voltios) es $W = -QE$. Si la reacción mueve n moles de electrones, el resultado será

$$\Delta G = -nFE \tag{3.12}$$

donde F es el número de culombios por mol de electrones, 96 485 C/mol, o J/V·mol. Si la reacción se lleva a cabo en condiciones estándar (1 M para los reactantes y productos; véase más adelante) la relación entre $\Delta G°$ y el potencial de reducción del estado estándar, E_0, es

$$\Delta G° = -nFE_0 \tag{3.13}$$

En los capítulos siguientes, hablaremos frecuentemente de las reacciones de oxidación-reducción en términos de valores de E_0, que se transforman fácilmente en $\Delta G°$.

Energía libre y concentración

El signo del cambio de energía libre de un proceso nos indica si éste o su inverso son favorables termodinámicamente. La magnitud de ΔG nos indica hasta qué punto el proceso está alejado del equilibrio, y la cantidad de trabajo útil que puede obtenerse de él. Evidentemente, ΔG es una cantidad de importancia fundamental para determinar los procesos que se producirán o no en una célula, y para qué pueden utilizarse. Pero para expresar estas ideas cuantitativamente, en términos de los cambios de concentración de las sustancias, es preciso responder a esta pregunta: ¿de qué forma depende la energía libre de un sistema de las concentraciones de diversos componentes de una mezcla?

POTENCIAL QUÍMICO

La relación entre la energía libre y las concentraciones de los componentes de una mezcla puede expresarse de una forma muy sencilla. Si tenemos una mezcla que contiene a moles del componente A, b moles del componente B, etcétera, podemos escribir

$$G = a\overline{G}_A + b\overline{G}_B + c\overline{G}_C + \cdots \tag{3.14}$$

El potencial químico de una sustancia mide la contribución de esa sustancia a la energía libre del sistema.

Las magnitudes $\overline{G}_A$, $\overline{G}_B$, etc. se denominan **energías libres molares parciales** o **potenciales químicos** de los diversos componentes. Cada una de ellas representa la contribución, por mol, de un componente concreto a la energía libre total del sistema. (En algunos textos, al potencial químico se le asigna el símbolo μ.) Utilizaremos la aproximación, que suele ser válida para las disoluciones diluidas, de que cada uno de los potenciales químicos depende tan sólo de la concentración de la sustancia en cuestión. Para las disoluciones diluidas, $\overline{G}_A$, $\overline{G}_B$, etc., resultan ser funciones logarítmicas simples de las *actividades* de las correspondientes sustancias. La **actividad** (***a***) es una magnitud adimensional que mide la concentración eficaz de una sustancia, que describe su contribución a la energía libre del sistema. Encontramos

$$G_A = G_A^\circ + RT \ln a_A \tag{3.15a}$$
$$G_B = G_B^\circ + RT \ln a_B$$
$$\text{etc.}$$

Para disoluciones diluidas la actividad de cada componente soluto puede considerarse aproximadamente igual a la concentración molar de ese componente. A concentraciones muy bajas son exactamente iguales. Esta aproximación será adecuada para la mayor parte de las aplicaciones bioquímicas. Podemos pues olvidarnos de actividades y volver a escribir la ecuación (3.15a) en términos de concentraciones:

$$G_A = G_A^\circ + RT \ln [A] \tag{3.15b}$$
$$G_B = G_B^\circ + RT \ln [B]$$
$$\text{etc.}$$

en donde $[A]$, $[B]$, etc., son iguales a las concentraciones molares de los componentes. Obsérvese lo que ocurre cuando la concentración es igual a 1 M. El

término logarítmico se anula, ya que (ln 1 = 0) y, por ejemplo, $\overline{G}_A = G^\circ_A$. Esto nos indica el significado de G°_A, G°_B, etc., que son los valores de referencia o de estado estándar del potencial químico. Siempre expresamos los potenciales químicos en relación con un **estado estándar**. En solución, el estado estándar de cada componente *soluto* es una concentración 1 M; el estado estándar del disolvente es el disolvente puro. En cada caso, en el estado estándar $a = 1$. En las ecuaciones (3.15), T es la temperatura absoluta y R es la constante de los gases. En todos los cálculos utilizaremos $R = 8.314$ J/K·mol.

La importancia de las ecuaciones (3.15) radica en que nos permiten aplicar los principios generales de la termodinámica a los problemas prácticos. En concreto, nos permiten predecir las direcciones favorecidas de los procesos reales en unas condiciones definidas. Un proceso bioquímico en el que son especialmente relevantes estos principios es la difusión a través de membranas, un proceso que utilizaremos aquí como ejemplo, y que comentaremos con mayor detalle en capítulos posteriores. La experiencia nos indica que si una sustancia puede difundir a través de una membrana, lo hará en la dirección que iguale las concentraciones existentes a ambos lados de la misma. Veremos ahora si nuestra termodinámica puede justificar este hecho.

UN EJEMPLO DE CÓMO SE UTILIZA EL POTENCIAL QUÍMICO: EXAMEN DETALLADO A LA DIFUSIÓN A TRAVÉS DE UNA MEMBRANA

Supongamos que tenemos dos disoluciones de la sustancia A separadas por una membrana a través de la cual puede pasar A (Figura 3.5). Supongamos que en la zona 1 la concentración es inicialmente $[A]_1$ y en la zona 2 la concentración es $[A]_2$. Para determinar en qué dirección estará favorecida la difusión de A, imaginemos que se transfiere 1 mol de A de la zona 1 a la zona 2. Debemos suponer que los volúmenes de las zonas 1 y 2 son tan grandes que las concentraciones no se modifican de manera apreciable por la transferencia de 1 mol. Calculemos ahora los cambios de energía libre que se producen en las zonas 1 y 2, utilizando la ecuación (3.15b). Recuérdese que estamos extrayendo 1 mol de A de la zona 1, en la que la concentración es $[A]_1$, y lo estamos colocando en la zona 2, en la que la concentración es $[A]_2$. Estamos extrayendo sustancia de la zona 1, por lo que

$$\Delta G_1 = -G^\circ_A - RT \ln[A]_1 \qquad (3.16a)$$

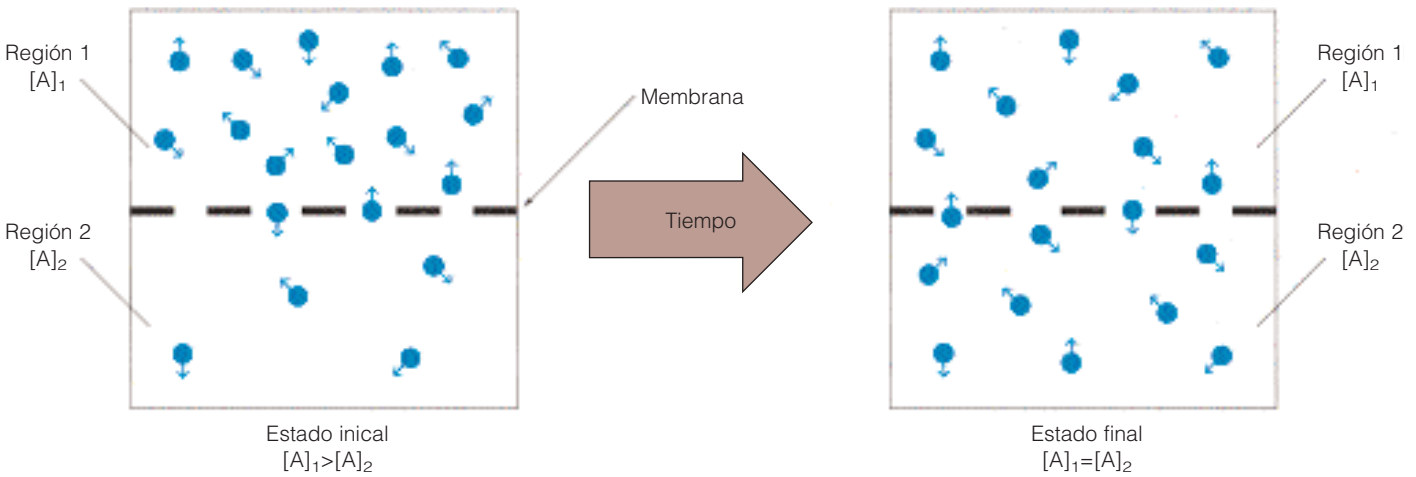


FIGURA **3.5**

Equilibrio a través de una membrana. Dos disoluciones de A, de concentraciones $[A]_1$ y $[A]_2$, están separadas por una membrana a través de la cual puede pasar A en cualquier dirección. Si la concentración inicial es superior en la zona 1, el potencial químico de A será también superior en esa zona, y se producirá un transporte neto desde la zona 1 a la zona 2 hasta que se alcancen unas concentraciones (y potenciales químicos) iguales.

Puesto que introducimos sustancia en la zona 2, tendremos

$$\Delta G_2 = +G^{\circ}_{A} + RT \ln[A]_2 \qquad (3.16b)$$

El cambio de energía libre *total* es de

$$\Delta G = \Delta G_1 + \Delta G_2 = RT(\ln[A]_2 - \ln[A]_1) = RT \ln([A]_2/[A]_1) \qquad (3.17)$$

Obsérvese que los términos $\Delta G°$ se cancelan entre sí.

Volveremos a la ecuación (3.17) en las explicaciones posteriores sobre la transferencia de sustancias a través de las membranas celulares. Por el momento es importante señalar las reglas que establece la ecuación para estas transferencias:

1. Si $[A]_2$ es inferior a $[A]_1$, ΔG es negativo. La transferencia de la zona 1 a la zona 2 es favorable.
2. Si $[A]_2$ es superior a $[A]_1$, ΔG es positivo. La transferencia de la zona 1 a la zona 2 no es favorable, mientras que sí lo es la transferencia en la dirección contraria.

Llegamos, pues, a la siguiente conclusión: si una sustancia puede pasar a través de una membrana, la dirección de transferencia favorable será siempre de la zona de concentración elevada a la zona de concentración baja. De manera más general, podemos afirmar que una sustancia difundirá espontáneamente desde una zona en la que su potencial químico es alto a otra en la que es bajo. Así pues, el potencial químico desempeña para las sustancias químicas un cometido muy similar al que tiene el potencial eléctrico para los electrones: es la fuerza impulsora. Además, supongamos que $[A]_1 = [A]_2$. En este caso, la ecuación (3.17) indica que $\Delta G = 0$. En consecuencia, el proceso es reversible; el sistema está en equilibrio. Así pues, el estado de equilibrio es aquel en el que las concentraciones de A a ambos lados de la membrana se han igualado. A partir de cualquier distribución de A de la que partamos, nos aproximaremos a este estado de equilibrio de igual concentración.

Encontraremos situaciones en las células vivas que, a primera vista, parecen violar esta regla. Hay casos en los que las sustancias pasan con facilidad de zonas de concentración baja a zonas de concentración elevada. Pero veremos que, en estas circunstancias, el precio de energía libre necesario se paga *acoplando* el proceso de transporte con reacciones químicas favorables termodinámicamente. Las células parecen evitar las leyes de la termodinámica, pero en realidad nunca lo hacen.

Energía libre y reacciones químicas: equilibrio químico

CAMBIO DE ENERGÍA LIBRE Y CONSTANTE DE EQUILIBRIO

Quizá la utilidad más importante del potencial químico es describir cuantitativamente los cambios de energía libre que acompañan a las reacciones químicas en diversas condiciones. Somos capaces de predecir, pues, la dirección favorable de las reacciones. Supongamos que tenemos una reacción como la siguiente

$$a\mathrm{A} + b\mathrm{B} \rightleftharpoons c\mathrm{C} + d\mathrm{D}$$

A pesar de que la reacción puede producirse en ambas direcciones, la hemos escrito con C y D en el lado derecho, por lo que denominamos a estas sustancias

productos y a las sustancias A y B *reactantes*. Queremos calcular el cambio de energía libre que se produce cuando *a* moles de A y *b* moles de B forman *c* moles de C y *d* moles de D, cada uno de ellos a una determinada concentración*. Para la reacción inversa no tenemos más que cambiar el signo del cambio de energía libre calculado.

El cambio de energía libre debe ser la energía libre de los productos menos la de los reactantes.

$$\Delta G = G\,(\text{productos}) - G\,(\text{reactantes}) \tag{3.18}$$

Según la regla indicada en la ecuación (3.14), podemos escribir estas energías libres en términos de los potenciales químicos de las sustancias, multiplicando cada uno de ellos por el número de moles. En nuestro ejemplo,

$$\Delta G = c\overline{G}_C + d\overline{G}_D - a\overline{G}_A - b\overline{G}_B \tag{3.19}$$

Aquí afirmamos simplemente que la fuerza impulsora de la reacción es la energía libre total de los productos menos la de los reactantes.

Ahora, utilizando (3.15b), introducimos las expresiones adecuadas para $\overline{G}_C$ y las demás en términos de concentraciones y obtenemos

$$\Delta G = cG^\circ_C + cRT\ln[C] + dG^\circ_D + dRT\ln[D] - aG^\circ_A - aRT\ln[A] - bG^\circ_B - bRT\ln[B] \tag{3.20a}$$

$$\Delta G = cG^\circ_C + dG^\circ_D - aG^\circ_A - bG^\circ_B + RT\ln[C]^c + RT\ln[D]^d - RT\ln[A]^a - RT\ln[B]^b \tag{3.20b}$$

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT(\ln[C]^c + \ln[D]^d - \ln[A]^a - \ln[B]^b) \tag{3.20c}$$

El cambio de energía libre de una reacción química depende del cambio de estado estándar y de las concentraciones de los reactantes y los productos.

Al pasar de (3.20a) a (3.20c) hemos hecho dos cosas: agrupar los términos G° en ΔG° y utilizar reordenamientos como $aRT\ln[A] = RT\ln[A]^a$. El grupo de términos G° (ΔG°) tiene un significado sencillo; dado que G° es la energía libre por mol de sustancia en el estado estándar (1 M), ΔG° corresponde al **cambio de energía libre del estado estándar** de la reacción. Es el cambio de energía libre que se observaría si *a* moles de A y *b* moles de B, ambos a concentración 1 M, formaran *c* moles de C y *d* moles de D, ambos a 1 M. Los términos que contienen logaritmos en la ecuación (3.20c) pueden combinarse, puesto que todos ellos están multiplicados por el mismo factor *RT*. En consecuencia, obtenemos la siguiente expresión para el ΔG total:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT\ln\left(\frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b}\right) \tag{3.21a}$$

Esta expresión es más fácil de recordar de la siguiente forma:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT\ln\frac{[\text{productos}]}{[\text{reactantes}]} \tag{3.21b}$$

si recordamos que cada concentración de producto y de reactante está elevada a una potencia igual a la de su estequiometría en la reacción. La cantidad ΔG corresponde al cambio de energía libre que se produce cuando *a* moles de A (a una concentración [A]) y *b* moles de B (a una concentración [B]) dan origen a *c* moles de C (a una concentración [C]) y *d* moles de D (a una concentración [D]).

* ¿Cómo hacemos que se produzca una cantidad finita de reacción manteniendo constantes las concentraciones tanto de los reactantes como de los productos? Podemos imaginar dos formas. En primer lugar, las cantidades totales de reactantes y productos podrían ser tan grandes que una reacción finita no modificara de manera apreciable las concentraciones. (Hemos optado por este tipo de modelo al comentar la difusión a través de una membrana.) Alternativamente, podríamos imaginar procesos hipotéticos que eliminaran productos y añadieran reactantes, de manera que las concentraciones se mantuvieran inalteradas, lo cual ocurre frecuentemente en las células vivas.

Estas concentraciones pueden tener el valor que deseemos. Cuando todas son 1 M, la ecuación (3.21a) se reduce a $\Delta G = \Delta G°$, como era de prever. La importancia de la ecuación (3.21a) radica en que nos permite calcular ΔG en las condiciones que deseemos.

Supongamos ahora que la reacción ha llegado al equilibrio. En ese caso, deben ser ciertas dos cosas. En primer lugar, las concentraciones en el factor entre paréntesis en la ecuación (3.21a) deben ser concentraciones de equilibrio, y, por tanto, el factor entre paréntesis es ahora la *constante de equilibrio K* de la reacción:

$$K = \left(\frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b}\right)_{eq} \tag{3.22}$$

En segundo lugar, si el sistema está en equilibrio, ΔG debe ser igual a cero. En este caso, la ecuación (3.21a) se reduce a

$$0 = \Delta G° + RT \ln \left(\frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b}\right)_{eq} \tag{3.23}$$

o

$$-\Delta G° = RT \ln K \tag{3.24}$$

Esta expresión puede reordenarse de la siguiente forma

$$K = e^{-\Delta G°/RT} \tag{3.25}$$

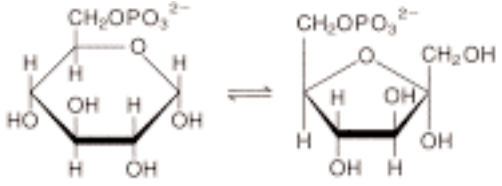
Las ecuaciones (3.24) y (3.25) expresan una relación importante entre $\Delta G°$ y la constante de equilibrio, que utilizaremos muchas veces. Estas ecuaciones hacen posible, por ejemplo, utilizar los datos de las tablas de energía libre de estado estándar, para predecir las constantes de equilibrio de las reacciones.

La constante de equilibrio *K* puede calcularse a partir del cambio de energía libre del estado estándar.

La ecuación (3.21a) es preferible considerarla de la siguiente forma. $\Delta G°$ representa un valor de referencia para el cambio de energía libre, mediante el cual pueden compararse los cambios de energía libre intrínsecos de distintas reacciones en circunstancias equivalentes (concentraciones 1 M). La magnitud de este término nos indica la constante de equilibrio. El segundo término (que depende de la concentración) de la ecuación (3.21a) representa el cambio de energía libre adicional (+ o –) que comporta la realización de la reacción en otras condiciones arbitrarias de concentración. Son frecuentes las tabulaciones de los valores de $\Delta G°$ para distintas reacciones, pero debemos tener siempre en cuenta al aplicar estos datos a los problemas bioquímicos, que es el valor de ΔG, determinado mediante las concentraciones reales de la célula, y no el valor de $\Delta G°$ el que determina que una reacción esté o no favorecida in vivo.

CÁLCULOS DE ENERGÍA LIBRE: UN EJEMPLO BIOQUÍMICO

Para aclarar un poco más la aplicación de estas ideas algo abstractas, consideremos un ejemplo, que es una reacción bioquímica muy sencilla pero importante, la isomerización de la glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato:



Glucosa-6-fosfato **Fructosa-6-fosfato**

que puede escribirse de una manera más compacta de la forma siguiente

$$\begin{array}{lll} \text{Glucosa-6-fosfato} \rightleftharpoons \text{Fructosa-6-fosfato} & \Delta G^\circ = +1.7 \text{ kJ/mol} \\ \text{G6P} \rightleftharpoons \text{F6P} \end{array}$$

Éste es el segundo paso de la ruta glucolítica, que se considerará en el Capítulo 13. La reacción es claramente endergónica en condiciones estándar. En otras palabras, el sistema no está en equilibrio cuando la G6P y la F6P están ambas a una concentración 1 M. De hecho, en estas condiciones es la reacción inversa la que está favorecida, puesto que ΔG° es positivo (+1.7 kJ/mol). En consecuencia, el equilibrio está desplazado hacia la izquierda, con una concentración de G6P superior a la de F6P. Podemos plantear este hecho cuantitativamente mediante el cálculo de la constante de equilibrio a partir de la ecuación (3.25). Utilizando el valor indicado más arriba para ΔG° , y suponiendo una temperatura de 25°C (298 K), obtenemos:

$$K = e^{-\Delta G^\circ/RT} = e^{-(1700 \text{ J/mol})/(8.314 \text{ J/K·mol})(298 \text{ K})} = 0.504 = \left(\frac{[\text{F6P}]}{[\text{G6P}]}\right)_{\text{eq}} \tag{3.26}$$

donde $([\text{F6P}]/[\text{G6P}])_{\text{eq}}$ es el cociente de equilibrio de la concentración de fructosa-6-fosfato respecto a la de glucosa-6-fosfato. El hecho de que $K < 1$ es otra forma de decir que el equilibrio se encuentra desplazado hacia la izquierda. Pero podemos ir más allá y determinar cuál es exactamente la composición de la mezcla en equilibrio. La sustancia total existente en la reacción se distribuye entre F6P y G6P. Podemos escribir

$$K = \frac{[\text{F6P}]_{\text{eq}}}{[\text{G6P}]_{\text{eq}}} = \frac{[\text{F6P}]_{\text{eq}}/\text{concentración total}}{[\text{G6P}]_{\text{eq}}/\text{concentración total}} = \frac{(f_{\text{F6P}})_{\text{eq}}}{(f_{\text{G6P}})_{\text{eq}}} \tag{3.27}$$

donde f_{F6P} y f_{G6P} son las *fracciones* de la sustancia total en cada forma. Dado que

$$f_{\text{G6P}} = 1 - f_{\text{F6P}} \tag{3.28}$$

tenemos

$$K = \frac{(f_{\text{F6P}})_{\text{eq}}}{1 - (f_{\text{F6P}})_{\text{eq}}} \tag{3.29}$$

Utilizando 0.504 como valor de K, podemos resolver la ecuación (3.29), obteniendo $(f_{\text{F6P}})_{\text{eq}} = 0.335$. En otras palabras, en el equilibrio, un 33.5% del azúcar estará en forma de fructosa-6-fosfato, y el 66.5% restante estará en forma de glucosa-6-fosfato.

Otra forma de apreciar la potencia de este análisis nos lo da la aplicación a este problema de la ecuación (3.21):

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[\text{F6P}]}{[\text{G6P}]} \tag{3.30a}$$

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \left(\frac{f_{\text{F6P}}}{1 - f_{\text{F6P}}}\right) \tag{3.30b}$$

Lo que hacemos ahora es calcular el valor de ΔG cuando f_{F6P} (y, por tanto, f_{G6P}) tiene *cualquier* valor que deseemos. Podemos elegir un valor y determinar cuál sería el cambio de energía libre para convertir 1 mol de glucosa-6-fosfato en 1 mol de fructosa-6-fosfato si la fracción f_{G6P} tuviera ese valor. Los resultados se representan gráficamente en la Figura 3.6; su importancia puede apreciarse en los siguientes ejemplos.

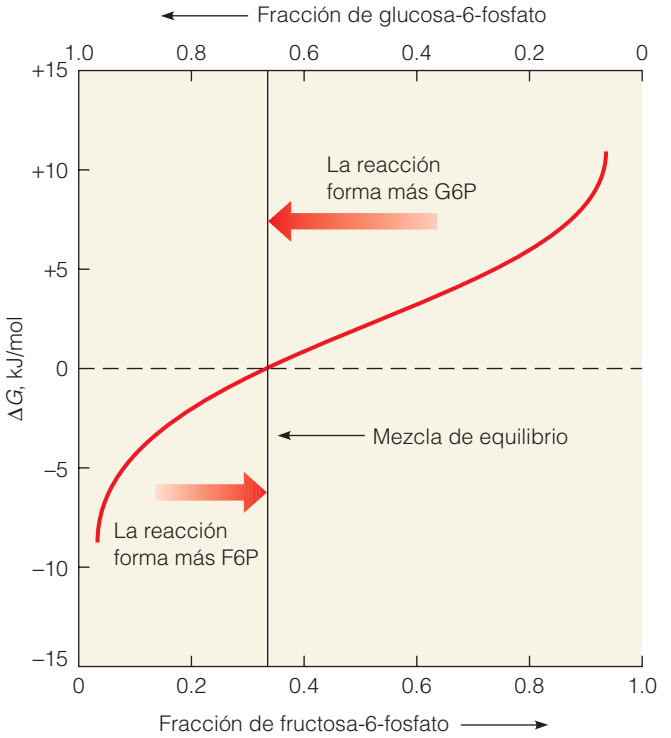


FIGURA **3.6**

El cambio de energía libre como función de la composición de la mezcla de reacción. La curva roja indica el ΔG para la conversión de 1 mol de glucosa-6-fosfato en 1 mol de fructosa-6-fosfato como función de la fracción de cada componente. Si la fracción de fructosa-6-fosfato es inicialmente superior a la de su valor de equilibrio, la reacción se decantará hacia la izquierda (formando más G6P); si la fracción de fructosa-6-fosfato es inicialmente inferior a la de su valor de equilibrio, la reacción se decantará hacia la derecha (formando más F6P). En ambos casos, la reacción evoluciona hacia el equilibrio.

1. Supongamos que hemos preparado una mezcla con una $f_{F6P} = 0.2$. En estas condiciones, la ecuación (3.30b) indica que ΔG es negativo (–1.76 kJ/mol). Termodinámicamente está favorecida la reacción hacia el lado derecho. Se formará fructosa-6-fosfato a costa de glucosa-6-fosfato hasta que la f_{F6P} aumente hasta el valor de equilibrio de 0.335. En este punto, la diferencia de energía libre que impulsa la reacción habrá desaparecido, y el proceso habrá llegado al equilibrio.
2. Si la mezcla inicial se preparara en cambio con una $f_{F6P} = 0.8$, el valor inicial de ΔG sería +5.11 kJ/mol. En este caso, estaría favorecida la reacción inversa, y la fructosa-6-fosfato se convertiría en glucosa-6-fosfato hasta alcanzar el estado de equilibrio.

Este ejemplo pone de manifiesto exactamente la forma en que están relacionados los procesos favorecidos termodinámicamente (irreversibles) con el equilibrio. Siempre que un sistema esté desplazado del equilibrio, evolucionará espontáneamente en la dirección necesaria para dirigirse hacia el estado de equilibrio. Si el sistema no está en equilibrio, cualquier dirección que conduzca al equilibrio tendrá un valor de ΔG negativo. Podemos considerar que el valor de ΔG negativo es la fuerza impulsora de la reacción.

Compuestos de fosfato de energía elevada: fuentes de energía de los sistemas biológicos

Es de gran importancia en bioquímica el cometido fundamental que desempeñan los cambios de energía libre para determinar las direcciones favorables de las reacciones químicas, puesto que globalmente, toda ruta metabólica debe ser un proceso favorable termodinámicamente. De forma semejante, los procesos físicos como el transporte de iones y la contracción muscular requieren

también una fuente de energía libre. Estos últimos pueden considerarse ejemplos del "trabajo útil" que puede proporcionar la energía libre.

Las reacciones desfavorecidas termodinámicamente pueden pasar a ser favorecidas si se acoplan con reacciones muy exergónicas.

Con frecuencia, una reacción o un proceso determinado necesario para la vida es en sí mismo endergónico. Entre otros ejemplos, se encuentran determinadas reacciones químicas y procesos físicos (como el transporte a través de una membrana *en contra* de un gradiente de concentración) que poseen grandes variaciones de energía libre positiva. Estas reacciones intrínsecamente desfavorables pueden hacerse favorables termodinámicamente *acoplándolas* a reacciones muy favorecidas. Supongamos, por ejemplo, que tenemos una reacción que forma parte de una ruta esencial pero que es endergónica:

$$A \rightleftharpoons B \qquad \Delta G^\circ = +10 \text{ kJ/mol}$$

Al mismo tiempo, supongamos otro proceso que es muy exergónico:

$$C \rightleftharpoons D \qquad \Delta G^\circ = -30 \text{ kJ/mol}$$

Si la célula es capaz de *acoplar* estas dos reacciones, el valor de ΔG° para el proceso global será la suma algebraica de los valores individuales:

$$\begin{array}{rl} A \rightleftharpoons B & \Delta G^\circ = +10 \text{ kJ/mol} \\ C \rightleftharpoons D & \Delta G^\circ = -30 \text{ kJ/mol} \\ \hline A + C \rightleftharpoons B + D & \Delta G^\circ = -20 \text{ kJ/mol} \end{array}$$

El equilibrio para el proceso global está ahora muy desplazado hacia la derecha; la consecuencia es que se produce B de manera eficaz a partir de A.

El acoplamiento de reacciones o procesos endergónicos con reacciones exergónicas es uno de los principios más importantes de la bioquímica. El acoplamiento de procesos muy favorecidos con procesos desfavorecidos se utiliza no sólo para impulsar innumerables reacciones, sino también para transportar sustancias a través de membranas, transmitir impulsos nerviosos, contraer los músculos, y llevar a cabo otras transformaciones físicas.

COMPUESTOS DE FOSFATO DE ENERGÍA ELEVADA COMO LANZADERAS DE ENERGÍA

Los compuestos de fosfato de energía elevada tienen una energía libre negativa de hidrólisis muy grande.

El impulso de procesos mediante acoplamiento es tan frecuente que debe implicar que la célula contiene diversos compuestos (como el compuesto hipotético C descrito anteriormente) que pueden experimentar reacciones con cambios de energía libre negativos grandes. En capítulos posteriores se encuentran diversos compuestos de este tipo; entre ellos los anhídridos de fosfato, los enol fosfatos, algunos tioésteres y compuestos que contienen enlaces N—P. Estas sustancias pueden considerarse como lanzaderas de energía libre en la célula. Los más importantes de estos compuestos de energía elevada son determinados fosfatos, que pueden experimentar una liberación hidrolítica de sus grupos fosfato en disolución acuosa. En la Figura 3.7 se muestran diversos compuestos de este tipo y sus reacciones de hidrólisis. Encontrará todas estas sustancias importantes en los capítulos posteriores sobre el metabolismo. Algunas de ellas, como el **fosfoenolpiruvato** (**PEP**), la **creatina fosfato** (**CP**) y el **adenosina trifosfato** (**ATP**), tienen unas energías libres de hidrólisis en estado estándar muy negativas. El ATP es tal vez el más importante de estos compuestos y el que encontrará con más frecuencia en este libro. En la Figura 3.8 se presentan la estructura y las reacciones de hidrólisis del ATP. La hidrólisis del ATP es muy exergónica, con un valor de $\Delta G^{\circ\prime} = -31$ kJ/mol (véase la página 88 para una de-

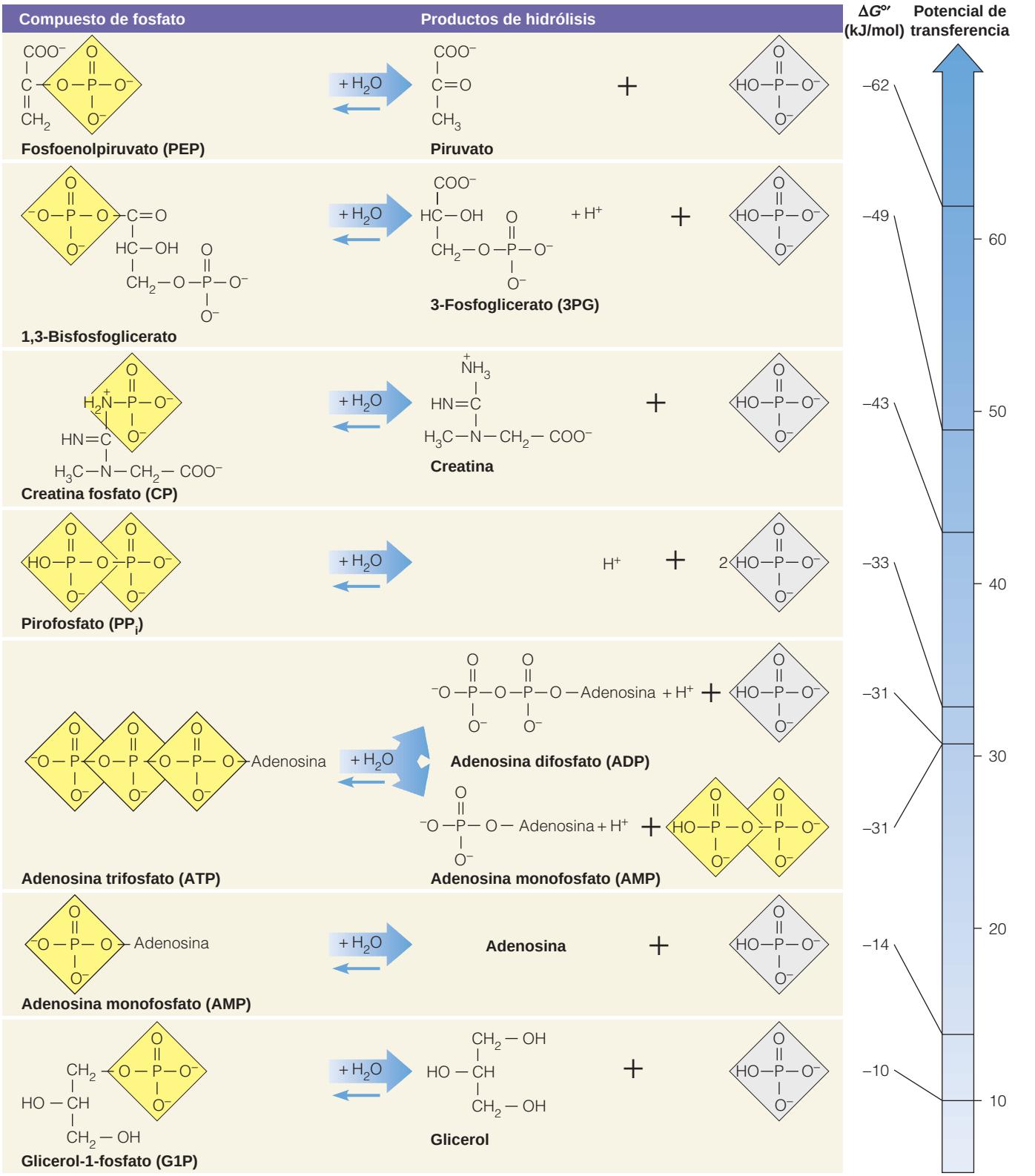
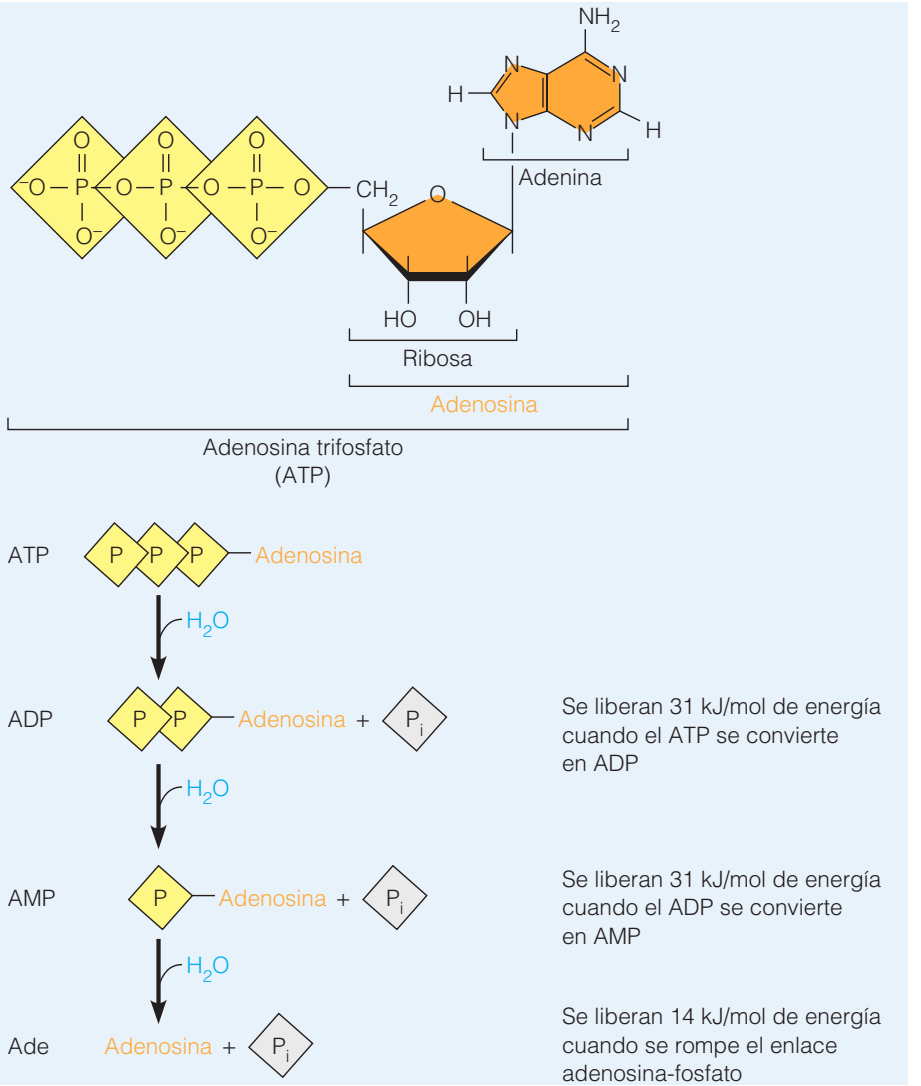


FIGURA **3.7**

Reacciones de hidrólisis de algunos compuestos de fosfato bioquímicamente importantes. El grupo fosfato lábil de cada compuesto se muestra en amarillo. El producto de reacción más estable, P_i, está en gris. A la derecha se muestra una escala de potenciales de transferencia de fosfato.

FIGURA **3.8**

La molécula de ATP y sus reacciones de hidrólisis. A lo largo de todo este libro, el símbolo Ⓟ representa el grupo fosfato tetraédrico.



finición exacta de $\Delta G^{\circ\prime}$). Este valor corresponde a una constante de equilibrio superior a 10^5. Este equilibrio está tan desplazado hacia la derecha que la hidrólisis del ATP puede considerarse prácticamente irreversible.

En la Figura 3.7 se observa también que, aunque algunas de estas reacciones de hidrólisis de fosfato son realmente procesos de energía elevada, otras no lo son. En el pasado, los bioquímicos afirmaban a menudo que compuestos como el fosfoenolpiruvato, la creatina fosfato y el ATP contenían "enlaces fosfato de energía elevada". Sin embargo, ahora sabemos que este concepto no es estrictamente correcto, puesto que no hay nada especial en los enlaces fosfato de estos compuestos. La explicación de las altas energías libres de hidrólisis de algunas de estas sustancias radica más bien en las propiedades especiales tanto de los reactantes como de los productos de las reacciones. Hay diversos factores que contribuyen a hacer que estos cambios de energía libre sean elevados. A continuación, se describen los que parecen ser más importantes.

Estabilización de resonancia de los productos de fosfato

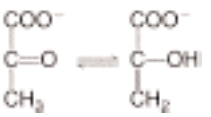
El ion **ortofosfato** (HPO_4^{2-}), que frecuentemente se abrevia con la expresión $\mathbf{P_i}$ (fosfato inorgánico), es capaz de adoptar una amplia gama de formas de resonancia. Tanto el protón ligado como el oxígeno que lo fija han de considerarse

deslocalizados, por lo que es más adecuada la forma de escribir la estructura que se muestra en la Figura 3.9. Estas formas múltiples, que son de una energía igual, contribuyen a la entropía elevada de una estructura de resonancia de este tipo (véase la ecuación (3.9)). No todas estas formas son posibles cuando el fosfato está unido en un éster. Por consiguiente, la liberación del ortofosfato da lugar a un aumento de la entropía en el sistema, y está, por tanto, favorecida. La estabilización de resonancia se da en *todas* las reacciones de hidrólisis de fosfato que se describen en la Figura 3.7.

Hidratación adicional de los productos de hidrólisis
La liberación del residuo de fosfato de su estado unido permite que existan mayores oportunidades de hidratación, especialmente cuando ambos productos están cargados. Recuérdese lo indicado en el Capítulo 2 respecto a que los iones están muy hidratados en una solución acuosa y que esa hidratación es un estado energéticamente favorecido.

Repulsión electrostática entre los productos cargados
En la hidrólisis del fosfoenolpiruvato, el bisfosfoglicerato, el adenosina trifosfato y el pirofosfato, los dos productos de la hidrólisis llevan una carga negativa. La repulsión entre estos productos iónicos favorece intensamente la reacción de hidrólisis.

Estabilización de resonancia potenciada o tautomerización de las moléculas producto
La hidrólisis se ve favorecida a veces no sólo por la estabilización de la resonancia del ortofosfato sino también por la capacidad del otro producto para adoptar más formas moleculares, lo cual contribuye a la hidrólisis del fosfoenolpiruvato ya que el piruvato puede tautomerizarse:

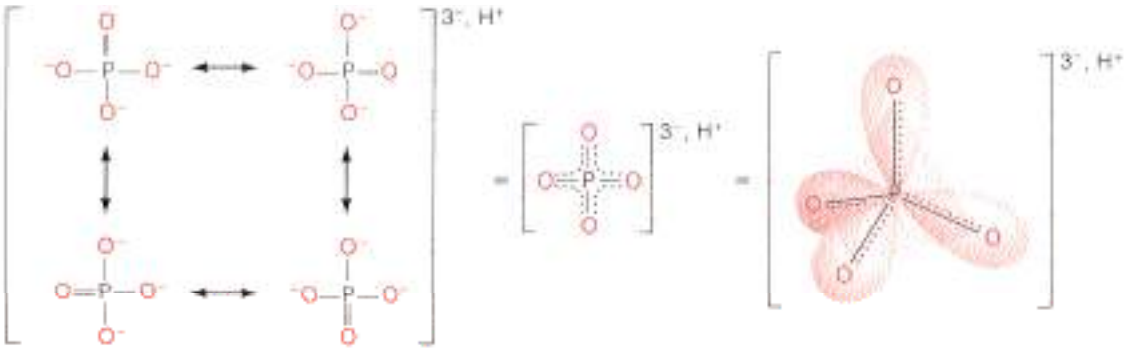


mientras que el PEP no puede sufrir la misma tautomerización.

Liberación de un protón en soluciones amortiguadas
En algunas de las reacciones que se indican en la Figura 3.7 se libera un protón. En consecuencia, la concentración de ion hidrógeno (es decir, el pH) influirá en el equilibrio. Obsérvese que hemos utilizado $\Delta G^{\circ\prime}$ para indicar las energías libres de hidrólisis para el estado estándar en estas reacciones. El superíndice *prima*

FIGURA **3.9**

Estabilización de resonancia del ortofosfato, HPO_4^{2-} (P_i). Se representa aquí de tres formas la deslocalización de resonancia de la carga del ion ortofosfato. **(a)** En esta representación, algo artificial, se muestran las cuatro formas de resonancia del ion fosfato con el H^+ no asignado de forma permanente a ninguno de los cuatro átomos de oxígeno. **(b)** En esta representación más exacta de la resonancia, las líneas discontinuas representan enlaces parciales. **(c)** Esta representación muestra la importancia física de los enlaces parciales. El ion fosfato es una estructura tetraédrica con cuatro enlaces equivalentes.



(a) Estructuras de ion fosfato que contribuyen a la estabilización de resonancia

(b) Híbrido de resonancia

(c) Orbitales moleculares del ion fosfato tetraédrico

significa que el estado estándar se toma a pH 7, cerca del valor de pH de casi todos los procesos fisiológicos (véase el Capítulo 2). Consideremos ahora cómo escribiríamos el valor verdadero de ΔG para una reacción como la hidrólisis del ATP a ADP, en unas circunstancias en las que pudieran variar tanto la concentración de H_2O como la de H^+:

$$ATP^{4-} + H_2O \rightleftharpoons ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+$$

Aplicando entonces la ecuación (3.21), tendremos

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \left(\frac{[ADP^{3-}][HPO_4^{2-}][H^+]}{[ATP^{4-}][H_2O]} \right) \tag{3.31}$$

Pero puesto que las reacciones de hidrólisis in vivo se producen siempre en una solución acuosa muy diluida, a un pH próximo a 7, no es adecuado mantener las concentraciones de H_2O y H^+ como variables. En una disolución diluida, el disolvente (agua) está cerca de su estado estándar, de forma que su actividad es igual a la unidad (véase la página 78). Dado que las células vivas suelen estar amortiguadas a un pH muy próximo a 7.0, podemos considerar que la concentración de ion hidrógeno se mantiene en un valor de aproximadamente 10^{-7} M. Utilizando las propiedades de los logaritmos, la ecuación (3.31) puede volver a escribirse de la forma siguiente

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \left(\frac{[ADP][P_i]}{[ATP]} \right) + RT \ln \frac{(10^{-7})}{(1)} \tag{3.32}$$

El tercer término de la derecha es esencialmente constante. Podemos introducirlo en una ΔG° redefinida a la que denominaremos $\Delta G^{\circ\prime}$:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + RT \ln \left(\frac{[ADP][P_i]}{[ATP]} \right) \tag{3.33}$$

en donde

$$\Delta G^{\circ\prime} = \Delta G^\circ + RT \ln (10^{-7}) \tag{3.34}$$

Los cambios de energía libre estándar de las reacciones bioquímicas están definidos por $\Delta G^{\circ\prime}$, donde la concentración de agua se supone constante y el pH = 7.0.

Esta definición es el verdadero significado de los valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ que se dan en la Figura 3.7. El hecho de que la hidrólisis del ATP se produzca normalmente en presencia de una cantidad enorme de H_2O, y en unas condiciones en las que la concentración de ion hidrógeno se mantiene en valores muy bajos, contribuye enormemente a hacer que la reacción esté favorecida. La primera condición se da en general en las reacciones de hidrólisis, y la última es importante siempre que se liberan protones.

POTENCIAL DE TRANSFERENCIA DE FOSFATO

El potencial de transferencia de fosfato muestra los compuestos que pueden fosforilar a otros en condiciones estándar.

Existe otra forma útil de entender los valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ para diversos compuestos fosfato de energía elevada. Como se observa en la Figura 3.7, estos valores forman una escala de **potenciales de transferencia de fosfato**. El potencial se define simplemente como el valor de $-\Delta G^{\circ\prime}$ de la hidrólisis. Cada compuesto impulsa la fosforilación de los compuestos situados en un lugar más bajo de la escala, siempre que se disponga de un mecanismo de acoplamiento adecuado. Consideremos, por ejemplo, las reacciones siguientes, que se han escrito en la forma algo abreviada que utilizaremos con frecuencia:

(1) Hidrólisis de fosfoenolpiruvato	$PEP \rightleftharpoons$ piruvato + P_i	$\Delta G^{\circ\prime} = -62$ kJ/mol
(2) Fosforilación de adenosina de fosfato	$ADP + P_i \rightleftharpoons ATP$	$\Delta G^{\circ\prime} = +31$ kJ/mol
(1) + (2): Fosforilación acoplado del ADP por el PEP	$PEP + ADP \rightleftharpoons$ piruvato + ATP	$\Delta G^{\circ\prime} = -31$ kJ/mol

Así pues, el fosfoenolpiruvato, que posee un potencial de transferencia de fosfato muy alto, de 62 kJ/mol, es capaz de añadir un grupo fosfato al ADP en un proceso favorecido termodinámicamente. El ATP puede pasar este fosfato a la glucosa, ya que el potencial de transferencia de fosfato de la glucosa-6-fosfato está todavía mucho más abajo en la escala:

(1) Hidrólisis del ATP	$ATP \rightleftharpoons ADP + P_i$	$\Delta G^{\circ\prime} = -31$ kJ/mol
(2) Fosforilación de la glucosa	$Glucosa + P_i \rightleftharpoons glucosa\text{-}6\text{-}fosfato$	$\Delta G^{\circ\prime} = +14$ kJ/mol
(1) + (2): Fosforilación acoplada de la glucosa por el ATP	$ATP + glucosa \rightleftharpoons ADP + glucosa\text{-}6\text{-}fosfato$	$\Delta G^{\circ\prime} = -17$ kJ/mol

Estos ejemplos resaltan la forma en la que el ATP puede actuar como un agente versátil de transferencia de fosfato mediante reacciones acopladas. En cada caso, el acoplamiento se realiza haciendo que las reacciones se produzcan en la superficie de una molécula proteica grande, una enzima. Estudiaremos las enzimas con detalle en el Capítulo 11 y observaremos que pueden facilitar este acoplamiento y acelerar las reacciones. En el Capítulo 12 veremos con mayor profundidad el cometido metabólico del ATP.

RESUMEN

La bioenergética es la rama de la termodinámica que trata de la adquisición, el intercambio y la utilización de la energía en los organismos. La energía interna (E) de un sistema incluye toda la energía que puede intercambiarse mediante procesos extranucleares: la energía del movimiento de los átomos y las moléculas, y la energía de los enlaces químicos y las interacciones no covalentes. E viene dada por el estado del sistema, y puede modificarse únicamente mediante un intercambio de calor o de trabajo con el entorno ($\Delta E = q - w$). Ésta es la primera ley de la termodinámica. En condiciones de volumen constante, $q = \Delta E$. En condiciones de presión constante, $q = \Delta H = \Delta E + P\Delta V$, donde H indica la entalpía ($H = E + PV$). En bioquímica, ΔH es más importante que ΔE.

Los procesos pueden ser reversibles (próximos al equilibrio) o irreversibles (alejados del equilibrio). La dirección de una reacción favorecida termodinámicamente (la dirección que conduce al equilibrio) viene dada por los cambios de la entalpía (H) y la entropía (S, una medida de la aleatoriedad). La energía libre, $G = H - TS$, tiene en cuenta ambos parámetros. El criterio para determinar si un proceso es favorable es que el cambio de energía libre, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, sea negativo; ello constituye una forma de enunciar la segunda ley de la termodinámica. La transición de hielo a agua pone de manifiesto la importancia de la temperatura (T) para determinar la dirección de la reacción. En el punto de fusión, el sólido y el líquido están en equilibrio ($\Delta G = 0$). La entropía de un sistema abierto puede disminuir, como ocurre en la congelación del agua, pero sólo si disminuye la entalpía. Así pues, los organismos deben gastar constantemente energía para mantener la organización. En cada transferencia de energía, se pierde parte de la energía (ΔH) en forma de calor ($T\Delta S$), por lo que ΔG es una medida de la energía de la que potencialmente puede disponerse para un trabajo útil.

Para aplicar las relaciones termodinámicas a los problemas químicos, utilizamos el potencial químico, que relaciona la concentración de cada sustancia con su contribución a la energía libre total del sistema. A partir del potencial químico, obtenemos las ecuaciones que gobiernan los cambios de energía libre de las reacciones químicas:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT \ln \frac{[\text{productos}]}{[\text{reactantes}]}$$

y $\Delta G° = -RT \ln K$. Aquí, $\Delta G°$ es el cambio de energía libre del estado estándar y K es la constante de equilibrio.

Las reacciones que no están favorecidas termodinámicamente pueden estimularse a pesar de ello, si se acoplan a reacciones que tengan valores de ΔG muy negativos. En los sistemas vivos, se utiliza con frecuencia para este fin la hidrólisis de determinados compuestos de fosfato. El potencial de transferencia de fosfato ordena estos compuestos según su capacidad para fosforilar otros compuestos en condiciones estándar. El ATP, que es el más importante de estos compuestos, se genera en las rutas metabólicas de producción de energía y se utiliza para impulsar muchas reacciones.

BIBLIOGRAFÍA

En este capítulo se ha presentado un tratamiento muy abreviado de la termodinámica. Para el estudiante que desee disponer de una mayor base en este campo y de mayor información acerca de sus aplicaciones en bioquímica, recomendamos los libros siguientes:

Eisenberg, D. y D. Crothers (1979) *Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences.* Benjamin/Cummings, Redwood City, Calif. Un texto de química física muy detallado, escrito por dos bioquímicos físicos. Muy recomendado, ya que contiene muchas aplicaciones bioquímicas de los principios físico-químicos que no se encuentran en la mayor parte de los textos de química física.

Klotz, I. (1986) *Introduction to Biomolecular Energetics.* Academic Press, Nueva York. Una introducción breve de la termodinámica para bioquímicos. Contiene algunos ejemplos y explicaciones excelentes.

Morowitz, H. J. (1970) *Entropy for Biologists.* Academic Press, Nueva York. Se trata de un texto de termodinámica bueno y conciso, más amplio de lo que su título sugiere.

van Holde, K. E., W. C. Johnson y P.-S. Ho (1998) *Principles of Physical Biochemistry.* Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J. Los Capítulos 2-4 amplían las aplicaciones de la termodinámica a la bioquímica.

Véase el siguiente artículo para una explicación detallada del efecto de las condiciones iónicas sobre los cambios de energía libre en la hidrólisis de los ésteres de fosfato:

Alberty, R. A. (1992) Equilibrium calculations on systems of biochemical reactions at specified pH and pMg. *Biophys. Chem.* 42:117-131.

PROBLEMAS

1. El cambio de entalpía (calor de fusión, ΔH_f) para la transición hielo $\longrightarrow$ agua a 0°C y a 1 atm de presión es de +6.01 kJ/mol. El cambio de volumen cuando se funde 1 mol de hielo es de $-1.625\ cm^3/mol = -1.625 \times 10^{-6}\ m^3/mol$. Calcular la diferencia entre ΔH_f y ΔE_f para este proceso, y expresarlo como porcentaje de ΔE_f. [Nota: 1 atm = $1.013 \times 10^5\ N/m^2$ en unidades SI.]

*2. Dadas las siguientes reacciones y sus entalpías:

	ΔH (kJ/mol)
$H_2(g) \longrightarrow 2H(g)$	+436
$O_2(g) \longrightarrow 2O(g)$	+495
$H_2(g) + \frac{1}{2}O_2(g) \longrightarrow H_2O(g)$	−242

(a) Diseñar una forma de calcular ΔH para la reacción

$$H_2O(g) \longrightarrow 2H(g) + O(g)$$

(b) A partir de ello, calcular la energía del enlace H—O.

3. La descomposición del N_2O_5 cristalino

$$N_2O_5(s) \longrightarrow 2NO_2(g) + \tfrac{1}{2}O_2(g)$$

es un ejemplo de una reacción favorecida termodinámicamente a pesar de que absorba calor. A 25°C, tenemos los siguientes valores de los cambios de energía libre y de entalpía de estado estándar de la reacción:

$$\Delta H° = +109.6\ kJ/mol$$
$$\Delta G° = -30.5\ kJ/mol$$

(a) Calcular $\Delta S°$ a 25°C.
(b) ¿Por qué es tan favorable el cambio de entropía de esta reacción?
(c) Calcular $\Delta E°$ para esta reacción a 25°C.
(d) ¿Por qué $\Delta H°$ es superior a $\Delta E°$?

4. La combustión de glucosa a CO_2 y agua es una fuente importante de energía en los organismos aerobios. Es una reacción favorecida gracias fundamentalmente a un cambio de entalpía muy negativo.

$$C_6H_{12}O_6(s) + 6O_2(g) \longrightarrow 6CO_2(g) + 6H_2O(l)$$
$$\Delta H° = -2816\ kJ/mol \qquad \Delta S° = +181\ J/K{\cdot}mol$$

(a) A 37°C, ¿cuál es el valor de $\Delta G°$?
(b) En la reacción global del metabolismo aerobio de la glucosa, se producen 38 moles de ATP a partir de ADP por cada mol de glucosa oxidada. Calcular el cambio de energía libre del estado estándar para la reacción *global* cuando la oxidación de la glucosa se acopla a la formación de ATP.
(c) ¿Cuál es la *eficacia* del proceso en términos del porcentaje de cambio de energía libre disponible capturada en el ATP?

*5. La primera reacción de la glucólisis es la fosforilación de la glucosa:

$$P_i + \text{glucosa} \rightleftharpoons \text{glucosa-6-fosfato}$$

Este proceso es desfavorable termodinámicamente, con $\Delta G°' = +14\ kJ/mol$.

(a) En una célula hepática, a 37°C, las concentraciones de fosfato y de glucosa se mantienen normalmente en un valor de

aproximadamente 5 mM cada una. ¿Cuál sería la concentración de *equilibrio* de la glucosa-6-fosfato, según los datos anteriores?

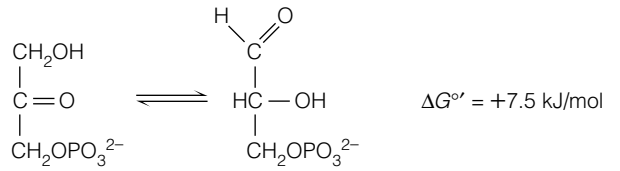
(b) Esta concentración muy baja del producto deseado sería muy desfavorable para la glucólisis. De hecho, la reacción se acopla a la hidrólisis del ATP para dar lugar a la reacción global siguiente:

$$\text{ATP} + \text{glucosa} \rightleftharpoons \text{glucosa-6-fosfato} + \text{ADP}$$

¿Cuál es ahora el valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ para la reacción?

(c) Si, además de las restricciones relativas a la concentración de glucosa que se han indicado antes, tenemos en la célula hepática [ATP] = 3 mM y [ADP] = 1 mM, ¿cuál es la concentración de equilibrio de la glucosa-6-fosfato? La respuesta que se obtendrá es un valor absurdo, muy elevado para la célula, y en realidad nunca se llega a valores próximos al mismo. Explicar por qué.

6. En otra reacción clave de la glucólisis, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) se isomeriza a gliceraldehído-3-fosfato (G3P):



Como $\Delta G^{\circ\prime}$ es positivo, el equilibrio se desplaza hacia la izquierda.

(a) Calcular la constante de equilibrio y la fracción de equilibrio del G3P a partir de lo anterior, a 37°C.

(b) En la célula, el agotamiento de G3P hace que se produzca la reacción. ¿Cuál será el valor de ΔG si la concentración de G3P se mantiene siempre en $\frac{1}{100}$ de la concentración de DHAP?

7. Una molécula proteica, en su estado nativo plegado, tiene *una* conformación favorecida. Pero cuando se desnaturaliza, se convierte en un ovillo aleatorio, con muchas conformaciones posibles.

(a) ¿Cuál debe ser el signo de ΔS para el cambio nativa ⟶ desnaturalizada?

(b) ¿La contribución de ΔS al cambio de energía libre será + o –? ¿Qué exigencia impone esto a la ΔH si las proteínas han de ser estructuras estables?

8. Cuando una sustancia hidrófoba, como un hidrocarburo, se disuelve en agua, se forma una jaula de clarato de moléculas de agua ordenadas a su alrededor (véase la página 43 en el Capítulo 2). ¿Qué signo es de prever que tenga ΔS para este proceso? Explicar la respuesta.

*9. Se observa que la mayor parte de las moléculas de proteínas cuando aumenta la temperatura pasan de su estado plegado definido a un estado desnaturalizado formando un ovillo aleatorio.

(a) Teniendo en cuenta lo que sabe de ΔH y ΔS, explique por qué este hecho es razonable. [Pista: Considere el Problema 7.]

(b) Sin embargo, a veces, las proteínas se desnaturalizan cuando su temperatura *disminuye*. ¿Cómo podría explicarse este hecho? [Pista: Considere el Problema 8.]

*10. Suponga que una reacción tiene unos valores de ΔH° y ΔS° independientes de la temperatura. Demuestre a partir de ello y de las ecuaciones dadas en este capítulo, que

$$\ln K = \frac{-\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

donde K es la constante de equilibrio. ¿Cómo podría utilizar los valores de K determinados a distintas temperaturas para obtener el valor de ΔH° para la reacción?

11. Los siguientes datos proporcionan el producto iónico (K_w, véase la ecuación (2.5) de la página 46) del agua a varias temperaturas:

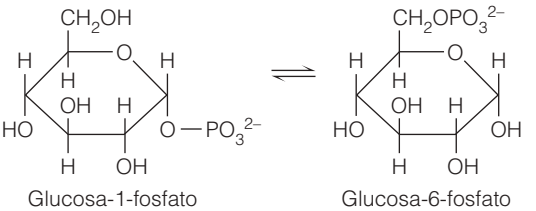
T(°C)	K_w(M^2)
0	1.14×10^{-15}
25	1.00×10^{-14}
30	1.47×10^{-14}
37	2.56×10^{-14}

(a) Utilizando los resultados del Problema 10, calcular ΔH° para la ionización del agua.

(b) Utilizar estos datos, y el producto iónico a 25°C para calcular ΔS° para la ionización del agua.

12. Los potenciales de transferencia de fosfato para la glucosa-1-fosfato y la glucosa-6-fosfato son 21 kJ/mol y 14 kJ/mol, respectivamente.

(a) ¿Cuál es la constante de equilibrio para esta reacción a 25°C?



(b) Si se preparara una mezcla con un contenido de glucosa-6-fosfato 1 M y glucosa-1-fosfato 1×10^{-3} M, ¿cuál sería la dirección de la reacción favorecida termodinámicamente?

13. Damos un valor de –31 kJ/mol al cambio de energía libre del estado estándar para la hidrólisis del ATP (Figura 3.7). ¿Esperaría que el valor fuera el mismo para la reacción $ATP^{4-} + H_2O \longrightarrow ADP^{2-} + P_i^{2-}$? Explíquelo.

14. Al realizar cada respiración, se espiran alrededor de 0.5 L contra una presión de 1 atm.

(a) Si se respira alrededor de 30 veces por minuto, ¿cuánto trabajo se realiza de esta forma cada día? (Despreciar cualquier trabajo realizado en la inhalación.)

(b) Utilizando el valor de ΔG° para la hidrólisis del ATP, ¿cuál es el número mínimo de moles de ATP que se utilizarán diariamente para respirar?

15. Cuando realiza una actividad moderada, una persona de tipo medio generará alrededor de 350 kJ de calor a la hora. Utilizando el calor de combustión del ácido palmítico (ecuación (3.6)) como valor aproximado para las sustancias grasas, calcular los gramos de grasa que se requerirían diariamente para mantener este nivel, si todos se quemaran para generar calor.

*16. La diferencia principal entre una molécula proteica en su estado nativo y en su estado desnaturalizado está en el número de

conformaciones disponibles. El estado nativo plegado puede suponerse que tiene una conformación. El estado desplegado puede estimarse que tiene tres orientaciones posibles sobre cada enlace entre residuos.

(a) Para una proteína de 100 residuos, estimar la variación de entropía por mol en la desnaturalización.

(b) ¿Cuál deberá ser la variación de entalpía que acompañe a la desnaturalización que permita desnaturalizarse a la mitad de la proteína a 50°C?

(c) ¿Aumentará o disminuirá la fracción desnaturalizada al aumentar la temperatura?

17. Una célula se encuentra en una solución de glucosa 0.01 M. La concentración de glucosa dentro de la célula es 0.1 M.

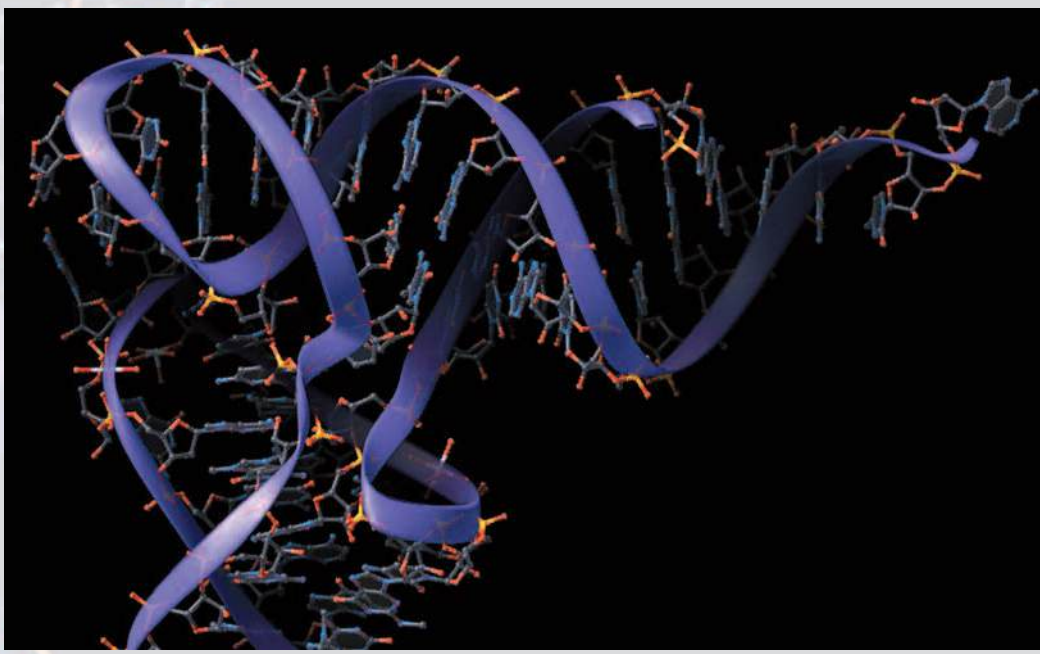
(a) ¿Cuál sería la variación de energía libre para el transporte de 10^{-6} moles de glucosa desde el medio al interior de la célula? Suponer $T = 37°C$.

(b) ¿Cuál sería la variación de energía libre si las concentraciones intracelular y extracelular fueran 1 mM y 10 mM, respectivamente?

(c) Si el proceso estuviera acoplado a la hidrólisis del ATP, ¿cuántos moles de ATP deberían hidrolizarse para hacer favorable a este proceso?

PARTE II

Arquitectura molecular de la materia viva



CAPÍTULO 4

Ácidos nucleicos

En los capítulos que siguen se presentan las tres clases principales de biomoléculas: los ácidos nucleicos, las proteínas y los polisacáridos. Estas sustancias, en conjunto, constituyen una gran parte de la materia viva. Dirigen y realizan el enorme entramado de procesos químicos que constituyen la vida. Aunque estructuralmente son muy diferentes, los ácidos nucleicos, las proteínas y los polisacáridos poseen determinadas características comunes. Como vimos en el Capítulo 1, se trata de sustancias que existen en forma de macromoléculas, algunas de ellas verdaderamente gigantes. Veremos que todas estas macromoléculas son polímeros, donde cada tipo está formado por la unión de un número limitado de clases de unidades monoméricas. En cada caso la secuencia de unidades es específica.

Naturaleza de los ácidos nucleicos

Resulta adecuado iniciar esta sección con los **ácidos nucleicos**, ya que en cierto sentido son los componentes más fundamentales de la célula viva. Parece probable que la vida en sí empezara su evolución con los ácidos nucleicos, puesto que éstas son las únicas sustancias biológicas que poseen la notable propiedad de la autoduplicación. Hoy en día, los ácidos nucleicos actúan como depositarios y transmisores de la información genética de cada célula, tejido y organismo. Los planos para la construcción de un organismo están codificados en su ácido nucleico, en moléculas gigantescas como la que se muestra en la Figura 1.5 (página 11). Gran parte del desarrollo físico de un organismo a lo largo de su vida está programado en estas moléculas. Las proteínas que elaborarán sus células y las funciones que realizarán están todas registradas en esta "cinta" molecular.

En este capítulo, y en los siguientes, describiremos los ácidos nucleicos y aportaremos luego una breve introducción respecto a las formas en las que éstos mantienen y transmiten la información genética. La información detallada de estos procesos se presentará en la Parte V de este libro, pero es importante que consideremos, de entrada, el cometido que desempeñan los ácidos nucleicos en la formación de proteínas y en la estructura celular.

DOS TIPOS DE ÁCIDO NUCLEICO: DNA Y RNA

Existen dos tipos de ácido nucleico, el **ácido ribonucleico** (RNA) y el **ácido desoxirribonucleico** (DNA). Como se indica en la Figura 4.1, cada uno de ellos es una cadena polimérica, en la que las unidades monoméricas están conectadas por enlaces covalentes. Las estructuras de las unidades monoméricas del RNA y DNA son las siguientes:

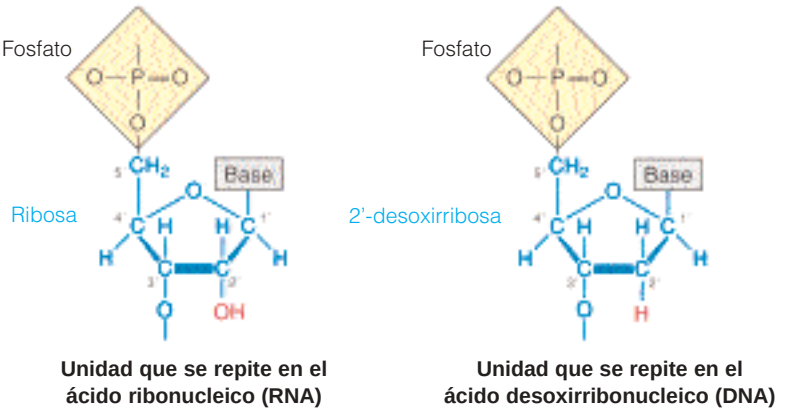
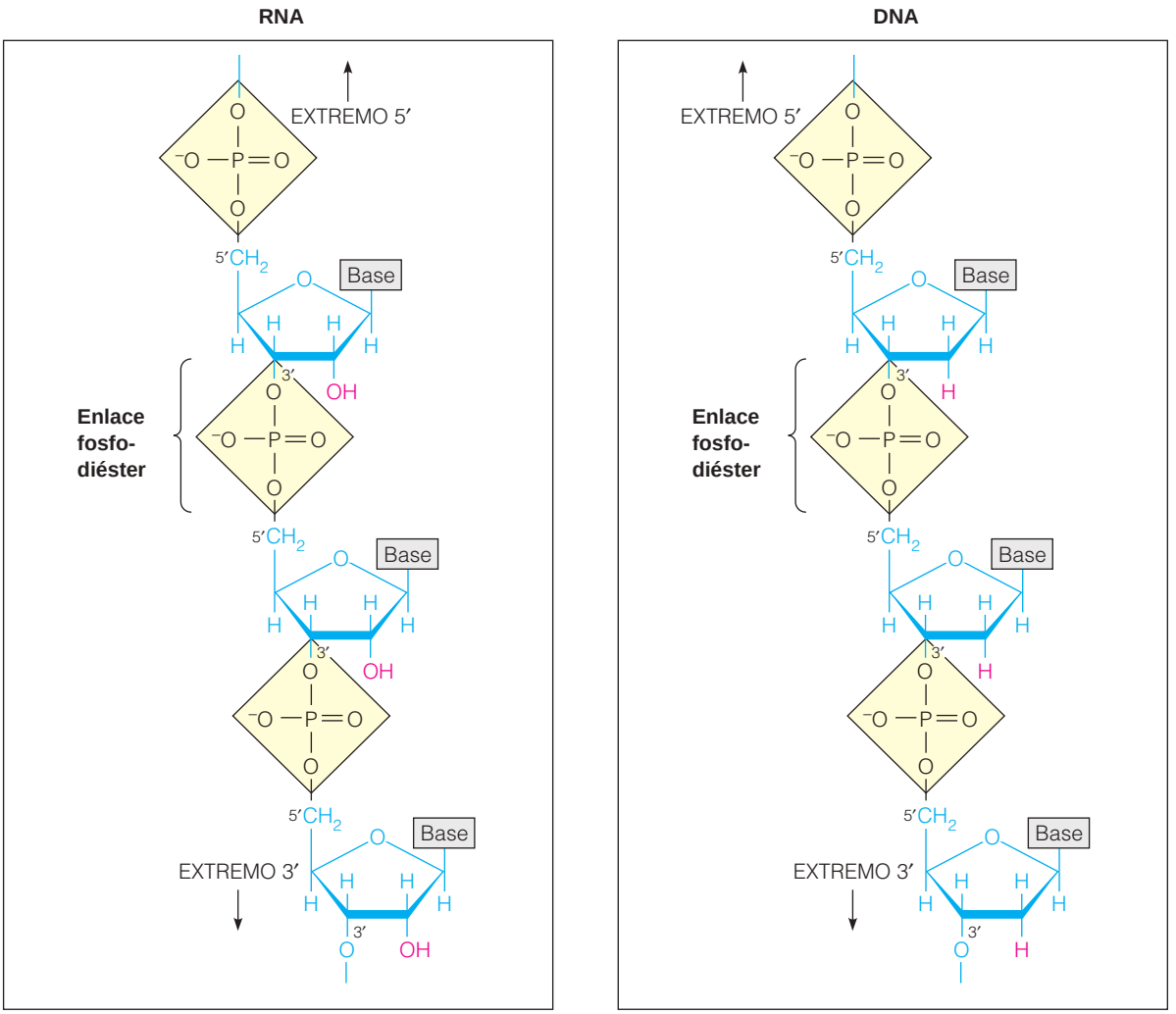


FIGURA **4.1**

Estructuras químicas del ácido ribonucleico (RNA) y del ácido desoxirribonucleico (DNA). Se presenta detalladamente el armazón de ribosa-fosfato o desoxirribosa-fosfato de cada cadena. Las bases que se indican aquí esquemáticamente se muestran con detalle en la Figura 4.2.



En cada caso, la unidad monomérica contiene un azúcar de cinco carbonos, la **ribosa** en el RNA y la **2′-desoxirribosa** en el DNA (que se indican en azul en las estructuras). Los átomos de carbono se designan con primas (1′, 2′, etc.) para diferenciarlos de los átomos de las bases. La diferencia entre los dos azúcares radica únicamente en el grupo hidroxilo 2′ de la ribosa en el RNA, que está sustituido por el hidrógeno en el DNA. La conexión entre las sucesivas unidades monoméricas en los ácidos nucleicos se realiza mediante un residuo fosfato unido al hidroxilo del carbono 5′ de una unidad y al hidroxilo 3′ de la siguiente. Esto forma un **enlace fosfodiéster** entre dos residuos de azúcar (Figura 4.1). De esta forma, se construyen cadenas largas de ácido nucleico, que a veces contienen centenares de millones de unidades. El grupo fosfato es un ácido fuerte, con un valor de pK_a de aproximadamente 1, y ésta es la razón por la que al DNA y al RNA se les denomina *ácidos* nucleicos. A pH fisiológico cada residuo de una molécula de DNA o RNA lleva una carga negativa.

Tanto el DNA como el RNA son polinucleótidos. El RNA tiene el azúcar ribosa y el DNA tiene desoxirribosa.

Los residuos de azúcar unidos mediante enlace fosfodiéster constituyen el armazón de la molécula de ácido nucleico. En sí, el armazón es una estructura repetitiva, incapaz de codificar información. La importancia de los ácidos nucleicos en el almacenamiento y la transmisión de la información deriva de que son **heteropolímeros**. Cada monómero de la cadena contiene una base heterocíclica, que siempre va unida al carbono 1′ del azúcar (véase la Figura 4.1). En la Figura 4.2 se muestran las estructuras de las principales bases existentes en los

Las bases de los ácidos nucleicos son de dos clases: las purinas, adenina y guanina, y las pirimidinas, citosina, timina y uracilo. El RNA y el DNA emplean las mismas bases, excepto que el RNA utiliza uracilo donde el DNA utiliza timina.

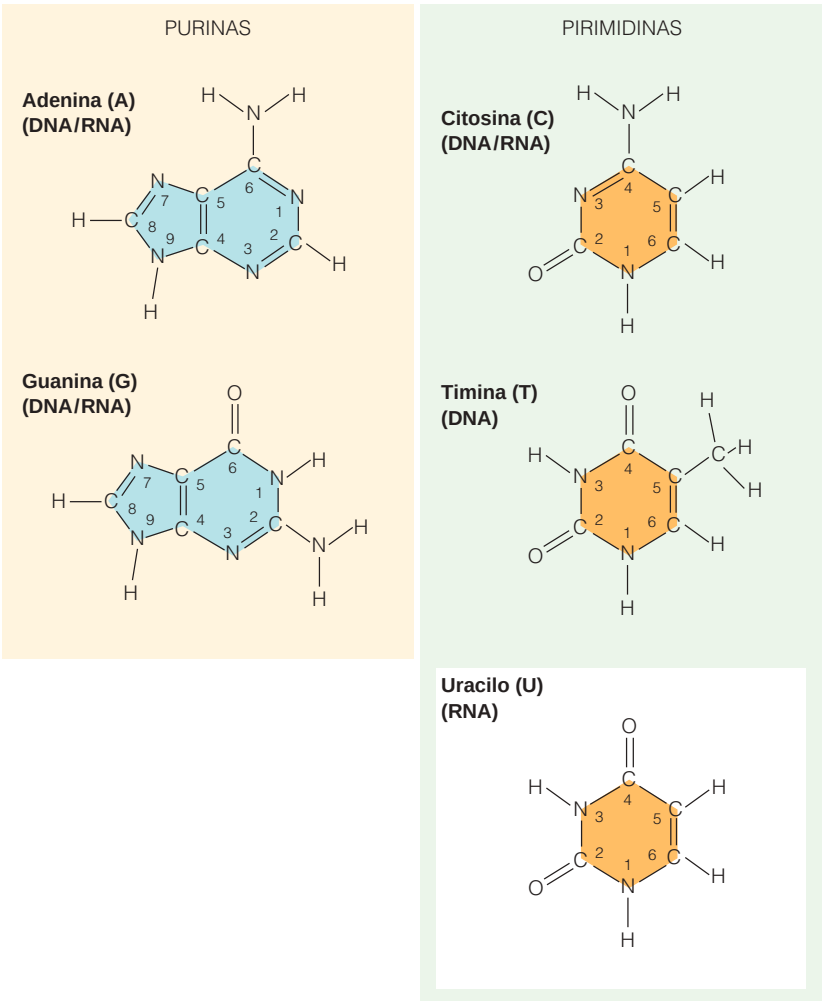


FIGURA **4.2**

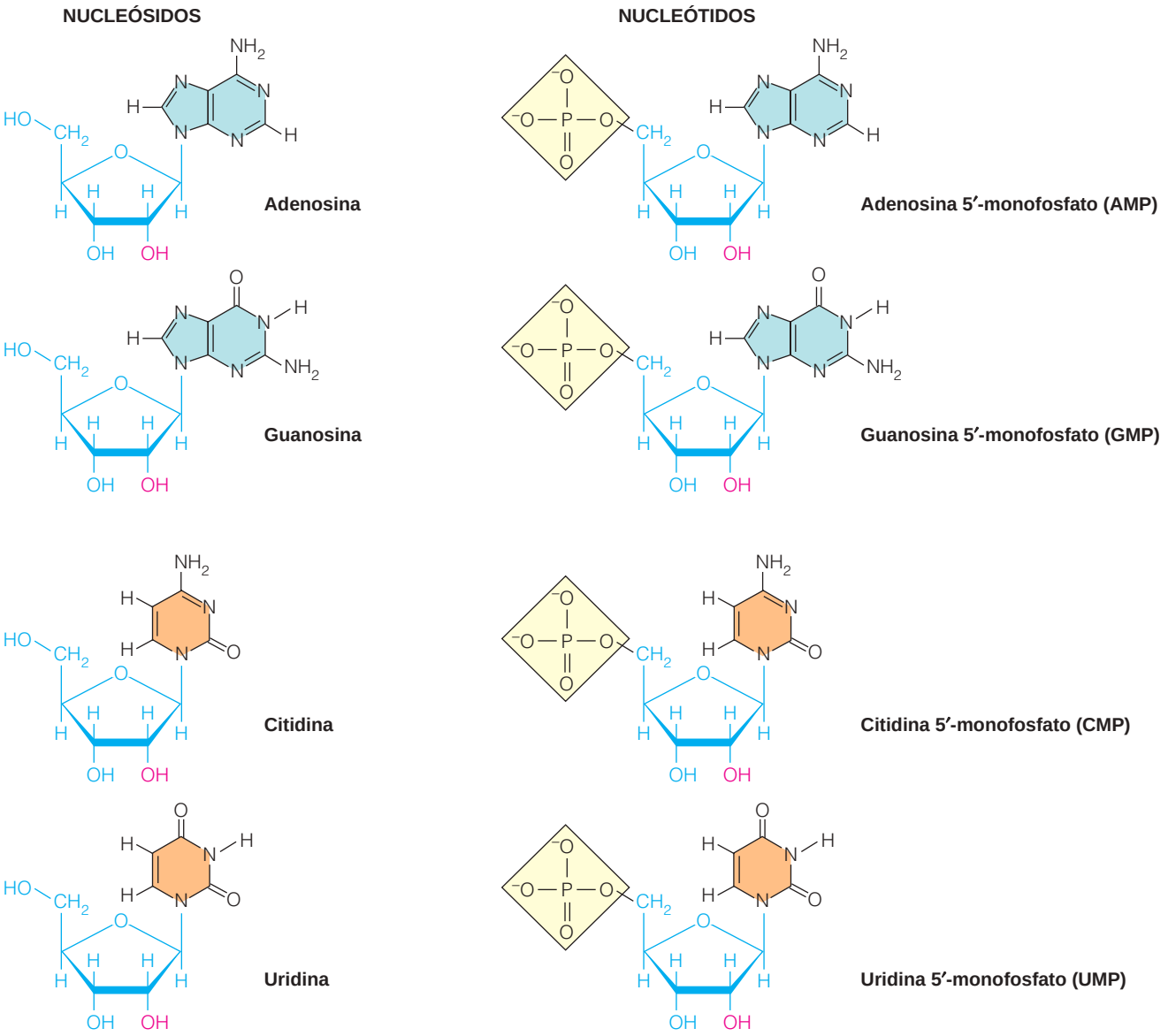
Bases púricas y pirimidínicas que se encuentran en el DNA y el RNA. El DNA contiene siempre las bases A, G, C, T mientras que el RNA tiene siempre A, G, C, U. La timina simplemente es el 5-metiluracilo.

ácidos nucleicos. Existen dos tipos de bases heterocíclicas, que se denominan **purinas** y **pirimidinas**. El DNA tiene dos purinas, **adenina** (**A**) y **guanina** (**G**), y dos pirimidinas, **citosina** (**C**) y **timina** (**T**). El RNA posee las mismas bases, excepto que la timina está sustituida por **uracilo** (**U**). El RNA y, en menor medida, el DNA contienen también una pequeña proporción de bases con modificaciones químicas. Consideraremos estas bases modificadas en apartados posteriores de este capítulo.

El DNA y el RNA pueden considerarse, cada uno de ellos, como un polímero formado con cuatro clases de monómeros. Los monómeros son moléculas de ribosa o desoxirribosa fosforiladas, con bases púricas o pirimidínicas unidas a sus carbonos 1′. En las purinas, la unión se realiza con el nitrógeno 9 y en las pirimidinas con el nitrógeno 1. El enlace entre el carbono 1′ del azúcar y el nitrógeno de la base se denomina **enlace glucosídico**. Estos monómeros se denominan **nucleótidos**. Cada nucleótido puede considerarse el derivado 5′-monofosforilado de un aducto azúcar-base denominado **nucleósido** (Figura 4.3). Así, los nucleótidos pueden también denominarse *nucleósidos 5´-monofosfato*. Hemos en-

FIGURA **4.3**

Nucleósidos y nucleótidos. Se representan los ribonucleósidos y ribonucleótidos; los desoxirribonucleósidos y desoxirribonucleótidos son idénticos, excepto que carecen del grupo 2′OH y excepto que la T del DNA está sustituida por U en el RNA. Cada nucleósido se forma por el acoplamiento de ribosa o desoxirribosa a una base. Los nucleótidos, que pueden considerarse las unidades monoméricas de los ácidos nucleicos, son los 5′-monofosfato de los nucleósidos. Existen nucleósidos fosfato con fosforilación en otros grupos hidroxilo, pero no se encuentran en los ácidos nucleicos.



contrado ya una de estas moléculas en el Capítulo 3: la adenosina 5′-monofosfato o AMP.

Dado que todos los ácidos nucleicos pueden considerarse polímeros de nucleótidos, se les suele asignar la denominación genérica de **polinucleótidos**. Los polímeros pequeños, que contienen tan sólo algunos residuos, se denominan, **oligonucleótidos**.

PROPIEDADES DE LOS NUCLEÓTIDOS

Los nucleótidos son ácidos bastante fuertes, en los que la ionización primaria del fosfato se produce con un valor de pK_a de aproximadamente 1.0. Tanto la ionización secundaria del fosfato como la protonación o desprotonación de algunos de los grupos de las bases de los nucleótidos pueden observarse a valores de pH bastante próximos a la neutralidad (Tabla 4.1). Las bases son capaces también de experimentar una conversión entre formas **tautómeras**. Las formas tautómeras, o **tautómeros**, son isómeros estructurales que se diferencian en la disposición de sus átomos de hidrógeno y los dobles enlaces. Las formas principales son las que se muestran en la Figura 4.2, pero la G, la T y el U pueden isomerizarse parcialmente a formas enol, y la A y la C a formas imino, como se muestra en la Figura 4.4.

Como consecuencia de los sistemas de dobles enlaces conjugados de los anillos de purina y pirimidina, las bases y todos sus derivados (nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos) absorben intensamente la luz en la región del espectro del ultravioleta cercano. Esta absorción depende en parte del pH, debido a las reacciones de ionización de las bases. En la Figura 4.5 se presentan espectros representativos de los ribonucleótidos a pH neutro. Esta intensa absorbancia se utiliza para la determinación cuantitativa de los ácidos nucleicos, ya que permite medir las concentraciones de ácido nucleico con una detección de microgramos/mL mediante espectrofotometría (véase Herramientas de la Bioquímica 6A).

La luz ultravioleta puede tener también efectos dañinos químicos sobre el DNA que dan lugar, por ejemplo, a cáncer de piel.

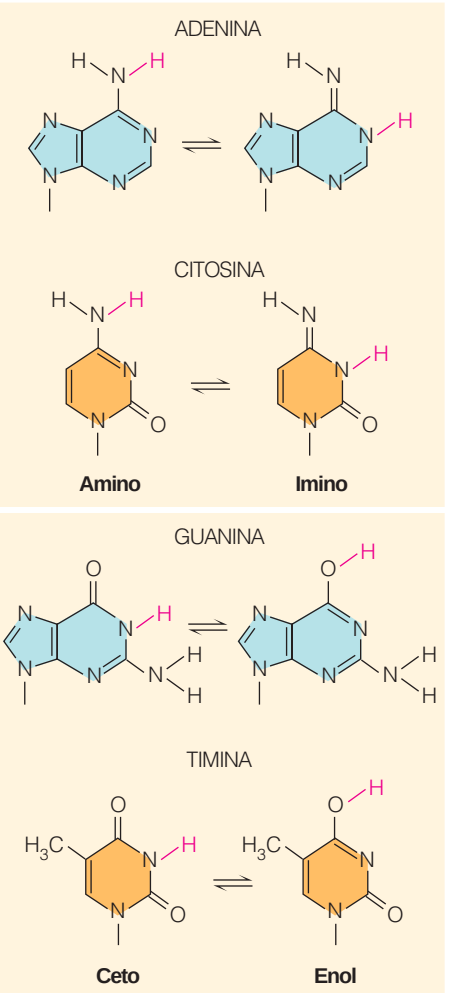


FIGURA **4.4**

Tautomerización de las bases. Se muestran en el lado izquierdo las formas más estables (y, por tanto, frecuentes). Las formas menos frecuentes, imino y enol, que se muestran en el lado derecho, se encuentran en algunas interacciones de bases especiales. También son posibles algunos otros tautómeros (que no se muestran aquí).

ESTABILIDAD Y FORMACIÓN DEL ENLACE FOSFODIÉSTER

Si comparamos las estructuras de los nucleótidos que se muestran en la Figura 4.3 con las cadenas polinucleotídicas de la Figura 4.1, vemos que, en principio, un polinucleótido podría generarse a partir de sus monómeros nucleótidos mediante la eliminación de una molécula de agua entre cada par de monómeros. Es decir, podríamos imaginar la adición de otro residuo nucleótido a una

TABLA 4.1 Constantes de ionización de los ribonucleótidos expresadas en forma de valores de pK_a

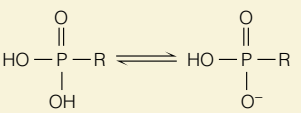
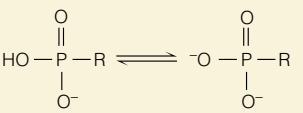
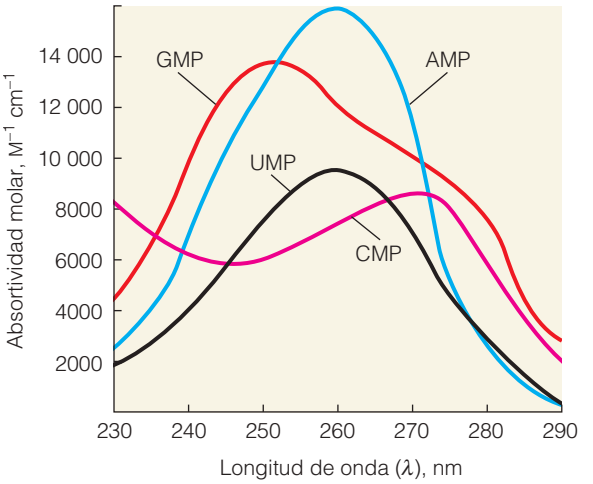
	Fosfato			Base	
	Ionización primaria		Ionización secundaria		
					
	pK_{a1}	+ H^+	pK_{a2}	+ H^+	pK_a	Reacción (en forma de pédida de la forma protonada)
5′ AMP	0.9		6.1		3.8	N-1
5′ GMP	0.7		6.1		2.4	N-7
					9.4	N-1
5′ UMP	1.0		6.4		9.5	N-3
5′ CMP	0.8		6.3		4.5	N-3

FIGURA **4.5**

Espectros ultravioleta de los ribonucleótidos. Las dimensiones de los coeficientes de absorción son M^{-1} cm^{-1}. Por consiguiente, una solución 10^{-4} M de UMP tendría una absorbancia de 0.95 a 260 nm en una cubeta de un grosor de 1 cm. (Absorbancia = absortividad molar x paso de luz en cm x concentración molar; véase Herramientas de la Bioquímica 6A.)

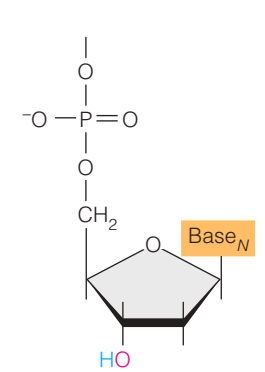
Datos tomados de A. L. Lehninger, D. L. Nelson y M. M. Cox, *Principles of Biochemistry*, 2ª ed. (Nueva York: Worth, 1993). © 1993, 1982 Worth Publishers, Inc. Utilizado con permiso.



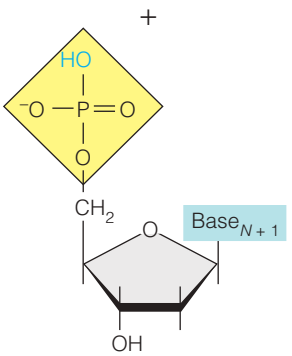
cadena polinucleotídica mediante la reacción de deshidratación que se muestra en la Figura 4.6. Sin embargo, el cambio de energía libre de esta reacción hipotética es bastante positivo, de aproximadamente +25 kJ/mol y, en consecuencia, el equilibrio está muy desplazado hacia el lado de la hidrólisis del enlace fosfodiéster en el medio acuoso de la célula. La hidrólisis de los polinucleótidos a nucleótidos es el proceso favorecido termodinámicamente.

Encontramos aquí el primero de los múltiples ejemplos de **metaestabilidad** de los polímeros con importancia biológica. Los compuestos metaestables tienen favorecida termodinámicamente su ruptura, pero ésta se produce sólo muy lentamente salvo que la reacción esté catalizada. De acuerdo con la variación de energía libre implicada, los polinucleótidos deberían hidrolizarse en las condiciones de las células vivas, pero su hidrólisis es extremadamente lenta, salvo que esté catalizada. Esta característica es de la máxima importancia, puesto que garantiza que el DNA en las células sea suficientemente estable como para cumplir una función útil de depósito de la información genética. En condiciones de deshidratación, el DNA es tan estable que ha sido posible incluso recuperar fragmentos de moléculas de DNA de algunos fósiles antiguos. Sin embargo, cuando hay catalizadores, la hidrólisis puede ser extraordinariamente rápida en disolución acuosa. La catálisis ácida da lugar a la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster en el RNA, produciendo una mezcla de nucleótidos. En ambos, RNA y DNA, el enlace glucosídico entre la base y el azúcar se hidroliza también, dando una mezcla de bases, ácido fosfórico y ribosa (o desoxirribosa). El RNA, pero no el DNA, es también lábil en soluciones alcalinas y el tratamiento con álcali 0.1 M produce una mezcla de 2′ y 3′ nucleósidos fosfato. Por último, y lo más importante desde el punto de vista biológico, las enzimas denominadas **nucleasas** catalizan la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster tanto en el RNA como en el DNA. El organismo es capaz de degradar y utilizar los polinucleótidos de los alimentos consumidos gracias a que el aparato digestivo contiene nucleasas. En el Capítulo 11 se describen ejemplos de enzimas de este tipo.

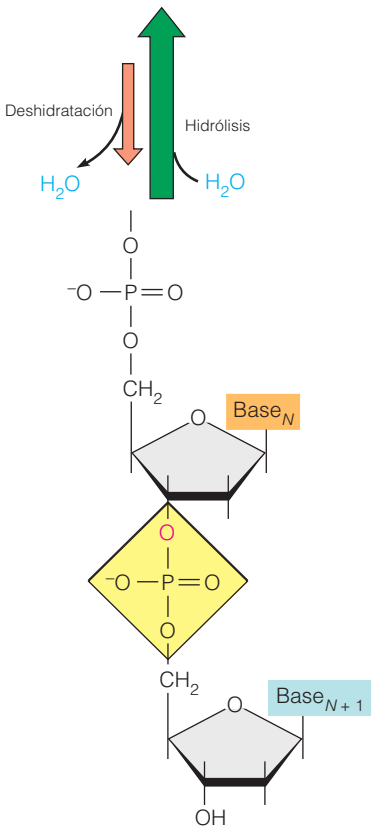
La termodinámica desfavorable de la hipotética reacción de deshidratación que se muestra en la Figura 4.6 nos lleva a plantear la siguiente pregunta: si no pueden sintetizarse in vivo los polinucleótidos por la eliminación directa de agua, ¿cómo se forman realmente? La respuesta es que su síntesis implica a los nucleósidos o desoxinucleósidos *trifosfato* de energía elevada. Aunque el proceso que tiene lugar en las células es bastante complejo, la reacción básica es sencilla. En vez de la reacción de deshidratación de la Figura 4.6, lo que sucede en las cé-



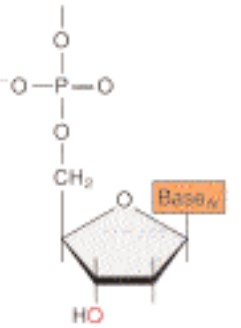
Polinucleótido con *N* residuos



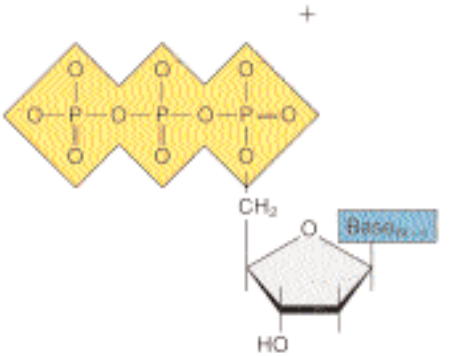
Desoxinucleósido monofosfato



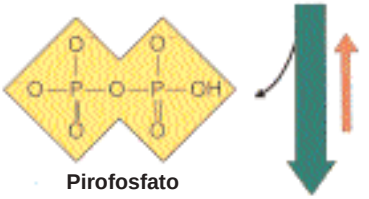
Polinucleótido con *N* + 1 residuos



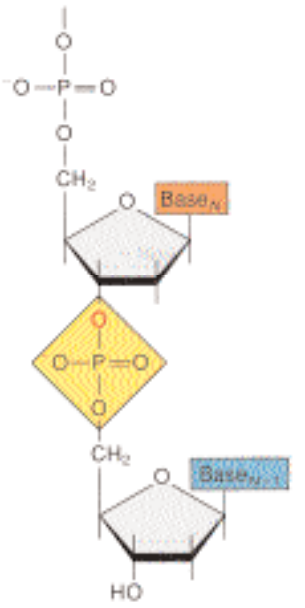
Polinucleótido con N residuos



Desoxinucleósido trifosfato



Pirofosfato



Polinucleótido con N + 1 residuos

FIGURA **4.6** (*izquierda*)

Formación de un polinucleótido mediante una hipotética reacción de deshidratación. Podríamos imaginar que un polinucleótido puede formarse directamente a partir de nucleósidos monofosfato mediante la eliminación de agua, como se indica aquí, pero esta reacción de deshidratación es desfavorable termodinámicamente. La reacción inversa, la hidrólisis, está favorecida. Obsérvese que en esta figura y en las siguientes adoptamos una forma algo más compacta para representar el armazón azúcar-fosfato.

FIGURA **4.7** (*derecha*)

Cómo se forman realmente los polinucleótidos. En esta reacción, cada monómero se presenta en forma de nucleósido trifosfato que se añade a la cadena. La ruptura del nucleósido trifosfato proporciona la energía libre que hace que la reacción sea favorable termodinámicamente. Las enzimas que catalizan estas reacciones se denominan **polimerasas.**

lulas vivas es la reacción que se muestra en la Figura 4.7. El nucleósido monofosfato que se añade a la cadena en crecimiento se presenta en forma de *nucleósido trifosfato*, como el ATP o el desoxi ATP (dATP), y en la reacción se libera pirofosfato. Podemos calcular el cambio de energía libre de esta reacción señalando que puede considerarse la suma de dos reacciones: la hidrólisis de un nucleósido trifosfato y la formación de un enlace fosfodiéster por la eliminación de agua:

				$\Delta G^{o\prime}$
	Nucleósido trifosfato + H_2O	$\rightleftharpoons$	nucleósido monofosfato + pirofosfato (PP_i)	−31 kJ/mol
	(Cadena polinucleótida)$_N$ + nucleósido monofosfato	$\rightleftharpoons$	(Cadena polinucleótida)$_{N+1}$ + H_2O	+25 kJ/mol
Suma:	(Cadena polinucleótida)$_N$ + nucleósido trifosfato	$\rightleftharpoons$	(Cadena polinucleótida)$_{N+1}$ + pirofosfato (PP_i)	−6 kJ/mol

La reacción acoplada es favorable porque el valor *neto* de $\Delta G^{o\prime}$ es negativo. La reacción se ve favorecida también porque la hidrólisis del producto pirofosfato (PP_i) a ortofosfato (P_i) tiene un valor de $\Delta G^{o\prime} = -33$ kJ/mol. Así pues, el pirofosfato se elimina con facilidad, impulsando aún más la reacción de síntesis hacia la derecha y proporcionando un $\Delta G^{o\prime}$ global de –39 kJ/mol. La síntesis de polinucleótidos es un ejemplo de un principio recalcado en el Capítulo 3: el empleo de reacciones favorables para impulsar reacciones que son termodinámicamente desfavorables.

Es importante tener en cuenta la forma en que las características energéticas de estos procesos encajan en el esquema general de la vida. Un organismo obtiene energía, de la fotosíntesis si se trata de una planta, o bien del metabolismo de los alimentos, y almacena parte de esta energía mediante la generación de ATP, GTP, dATP, dGTP y otros compuestos de energía elevada. A su vez, utiliza estos compuestos como fuentes de energía para impulsar la síntesis de macromoléculas como el DNA, el RNA y las proteínas. Este empleo de trifosfatos como moneda de cambio energético de la célula es un tema que se irá repitiendo una y otra vez a lo largo de este libro.

Estructura primaria de los ácidos nucleicos

NATURALEZA Y TRASCENDENCIA DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA

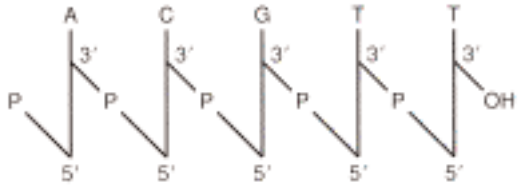
Un examen más detenido de la Figura 4.1 revela dos características importantes de todos los polinucleótidos:

1. Una cadena polinucleotídica posee un *sentido* o *direccionalidad*. El enlace fosfodiéster entre las unidades monoméricas se produce entre el carbono 3′ de un monómero y el carbono 5′ del siguiente. Así pues, los dos extremos de una cadena polinucleotídica lineal son diferenciables. Un extremo lleva normalmente un fosfato 5′ sin reaccionar, y el otro extremo un grupo hidroxilo 3′ sin reaccionar.
2. Una cadena polinucleotídica posee *individualidad*, determinada por la secuencia de sus bases, es decir, la *secuencia de nucleótidos*. Esta secuencia se denomina **estructura primaria** de ese ácido nucleico concreto.

Todos los polinucleótidos existentes en la naturaleza tienen una secuencia definida, su estructura primaria.

Si queremos describir una secuencia polinucleotídica determinada (tanto si se trata de DNA como si es RNA), resulta extremadamente difícil y totalmente innecesario dibujar la molécula en su totalidad, como en la Figura 4.1. Ello ha hecho que se diseñaran algunas nomenclaturas más compactas. Si indicamos que estamos describiendo una molécula de DNA o una molécula de RNA, se

comprende ya la mayor parte de la estructura. Podemos abreviar una molécula pequeña de DNA de la forma siguiente:



Esta notación indica: (1) la secuencia de nucleótidos, mediante sus abreviaturas de una letra (A, C, G, T); (2) que todos los enlaces fosfodiéster son entre hidroxilos 3′ y fosfatos 5′; y (3) que esta molécula concreta tiene un grupo fosfato en su extremo 5′ y un hidroxilo 3′ sin reaccionar en su extremo 3′. También nos dice que es una secuencia de DNA y no RNA, porque tiene T y no U.

Si se supone que todos los enlaces fosfodiéster unen un hidroxilo 3′ a un fosfato 5′ (como suele ocurrir), puede utilizarse una notación más compacta de la misma molécula:

pApCpGpTpT

Se sobrentiende la presencia del grupo 3′ —OH sin reaccionar. Si hubiera un fosfato en el extremo 3′ y un hidroxilo sin reaccionar en el extremo 5′, escribiríamos

ApCpGpTpTp

Por último, si nos interesa *solamente* la secuencia de bases de la molécula, como sucede en muchas ocasiones, podemos utilizar una notación aún más compacta

ACGTT

Obsérvese que, por convenio, la secuencia de una cadena polinucleotídica suele escribirse con el extremo 5′ a la izquierda y el extremo 3′ a la derecha.

La importancia principal de la estructura primaria o secuencia, es que *la información genética se almacena en la estructura primaria del DNA*. Un *gen* no es más que una secuencia concreta de DNA, que codifica la información mediante un lenguaje de cuatro letras, en el que cada "letra" es una de las bases.

La estructura primaria del DNA codifica la información genética.

EL DNA COMO SUSTANCIA GENÉTICA: INDICIOS INICIALES

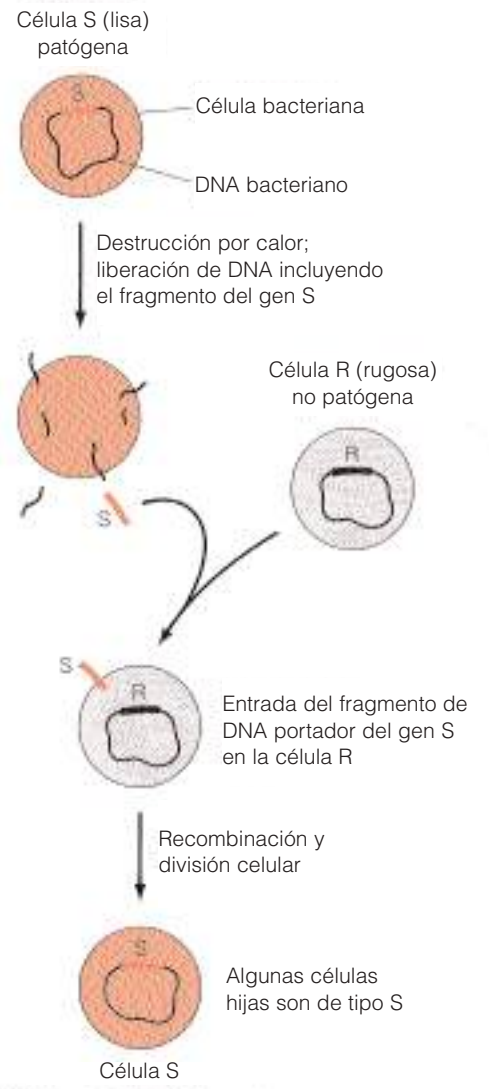
La búsqueda de la sustancia de la que están formados los genes tiene una historia larga. A finales de la primera década del siglo XIX, poco después de que el bioquímico alemán Friedrich Miescher hubiera aislado por primera vez el DNA del esperma de salmón, algunos científicos sospecharon que el DNA podía ser el material genético. Pero los estudios posteriores que indicaron que el DNA contenía tan sólo cuatro clases de monómeros parecieron descartar que pudiera desempeñar este complicado papel. Los primeros investigadores pensaron que era más probable que los genes estuvieran formados por proteínas, ya que estaba empezando a observarse que éstas eran moléculas mucho más complejas. Durante la mayor parte de la primera mitad del siglo XX, los ácidos nucleicos se consideraron simplemente como una clase de sustancia estructural del núcleo celular.

Entre 1944 y 1952, una serie de experimentos cruciales apuntaron claramente al DNA como material genético. En 1944 Oswald Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty descubrieron que el DNA de cepas patógenas de la bacteria

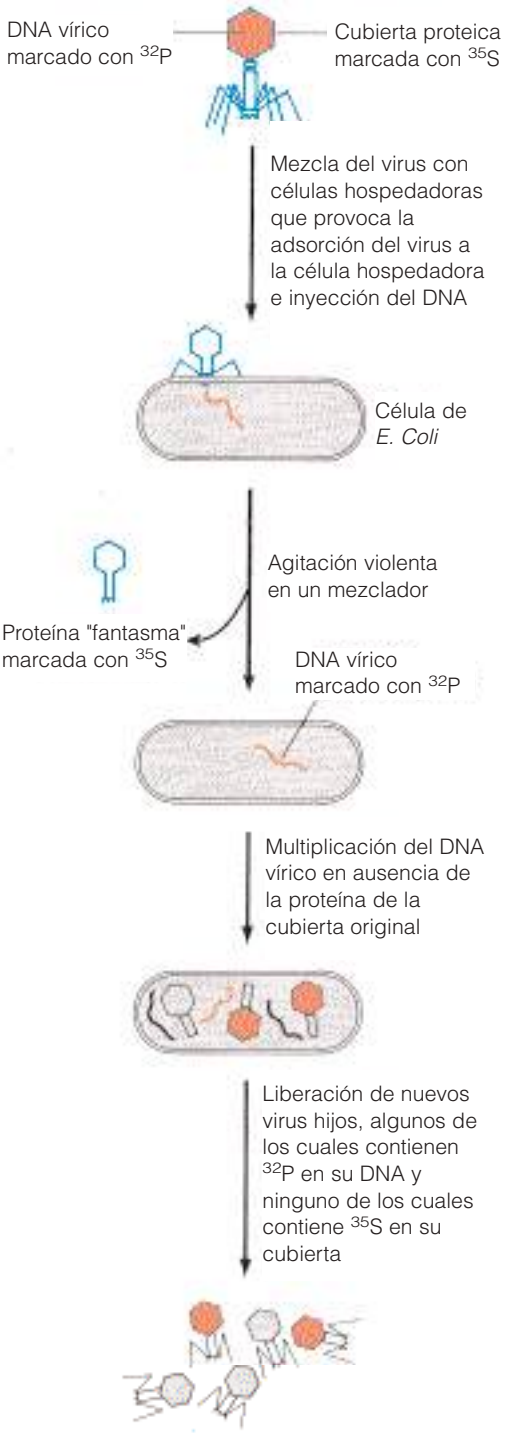
Pneumococcus podía transferirse a cepas no patógenas, haciéndolas patógenas (Figura 4.8a). La transformación era genéticamente estable y las generaciones sucesivas de bacterias conservaban las nuevas características. Sin embargo, fue un elegante experimento realizado por Alfred Hershey y Martha Chase el que convenció finalmente a muchos científicos. Hershey y Chase estudiaron la infección de la bacteria *Escherichia coli* por un virus bacteriano, el bacteriófago T2.

FIGURA **4.8**

Experimentos que demostraron que el DNA es la sustancia genética. **(a)** Avery *et al.* demostraron que los neumococos no patógenos podían hacerse patógenos mediante la transferencia de DNA procedente de una cepa patógena. **(b)** Hershey y Chase demostraron que era la transferencia de DNA vírico de un virus a una bacteria lo que daba origen a nuevos virus.



(a) El DNA bacteriano altera el fenotipo (Avery *et al.*)



(b) El DNA del fago da origen a fagos marcados con ^{32}P (Hershey y Chase)

Aprovechando el hecho de que las proteínas del bacteriófago contienen azufre y poco fósforo y que el DNA del bacteriófago contiene fósforo pero no azufre, estos investigadores marcaron el bacteriófago T2 con los isótopos radiactivos ^{35}S y ^{32}P (Figura 4.8b). A continuación, comprobaron que cuando el bacteriófago se unía a *E. coli*, era principalmente el ^{32}P (y, por tanto, el DNA del bacteriófago) el que se transfería a la bacteria. Aunque la parte proteica residual del bacteriófago se eliminaba de la bacteria, sólo el DNA insertado era suficiente para dirigir la formación de nuevos bacteriófagos.

Mediante estos experimentos y otros similares, en 1952 se había aceptado ya en general que el DNA debía ser la sustancia genética. Pero, ¿cómo podía transportar la enorme cantidad de información que una célula necesitaba, cómo podía transmitir esa información a la célula y, sobre todo, cómo podía reproducirse de manera exacta en la división celular? Las respuestas a estas preguntas vinieron sólo tras uno de los descubrimientos más notables de la historia de la ciencia. En 1953, James Watson y Francis Crick propusieron una estructura para el DNA que abrió todo un mundo nuevo de la biología molecular.

Estructuras secundaria y terciaria de los ácidos nucleicos

LA DOBLE HÉLICE

Watson y Crick buscaron las respuestas a las preguntas planteadas anteriormente en la estructura tridimensional del DNA. Durante un cierto tiempo, diversos laboratorios habían estado investigando las fibras obtenidas a partir de soluciones de DNA concentradas, utilizando la técnica de la **difracción de rayos X** (véase Herramientas de la Bioquímica 4A). Watson y Crick, que trabajaban en la Universidad de Cambridge (Inglaterra), tuvieron acceso a los patrones de difracción del DNA fotografiados por Rosalind Franklin, una investigadora del laboratorio de Maurice Wilkins en el King's College de Londres. Las fotografías cruciales fueron algunos de los mejores patrones que se habían obtenido a partir de fibras húmedas de DNA. En ellas se observaba claramente que el DNA de las fibras debía tener algún tipo de estructura tridimensional repetitiva regular. Nos referiremos a este plegado regular de los polímeros como *estructura secundaria*, para diferenciarla de la estructura primaria, que es simplemente la secuencia de residuos.

Watson y Crick percibieron rápidamente que la difracción de la fibra de DNA mostraba un patrón cruzado característico de una estructura secundaria helicoidal (Figura 4.9). Observaron que, como el espaciamiento de la línea de capa era de una décima parte de la repetición del patrón, debía haber 10 residuos por vuelta (véase Herramientas de la Bioquímica 4A). Los datos relativos a la densidad de la fibra sugirieron que debía haber *dos* cadenas de DNA en cada molécula helicoidal. Hasta entonces, tan sólo se habían realizado deducciones científicas a partir de los datos. El gran golpe intuitivo de Watson y Crick fue el de darse cuenta de que una hélice de doble cadena podía estabilizarse mediante enlaces de hidrógeno entre las bases de las cadenas opuestas si las bases se apareaban de *una* manera concreta: los pares A-T y G-C que se muestran en la Figura 4.10. Con este apareamiento, se forman enlaces de hidrógeno fuertes entre las bases. Además, las distancias entre los carbonos 1′ de las porciones de desoxirribosa de A-T y G-C son las mismas: aproximadamente 1.1 nm en cada caso (Figura 4.10a). Esta disposición apareada implicaba que la doble hélice podía tener un diámetro regular, hecho que era imposible si las purinas se apareaban con purinas o las pirimidinas con pirimidinas.

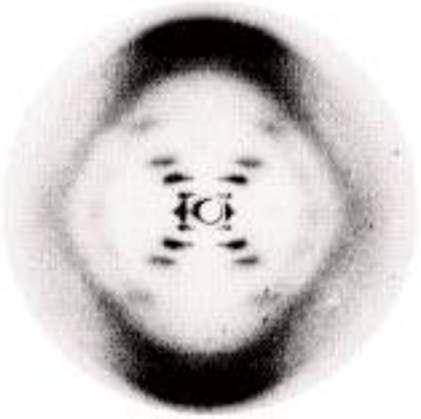


FIGURA **4.9**

Pruebas sobre la estructura del DNA. Esta fotografía, obtenida por Rosalind Franklin, muestra el patrón de difracción de rayos X producido por las fibras de DNA húmedas. Esta imagen desempeñó un papel clave en la elucidación de la estructura del DNA. El patrón en forma de cruz indica una estructura helicoidal, y las manchas intensas en la parte superior e inferior corresponden a una elevación de la hélice de 0.34 nm. El espaciado de las líneas de capa es una décima parte de la distancia existente desde el centro hasta cualquiera de estas manchas, lo cual indica que existen 10 pares de bases por repetición.

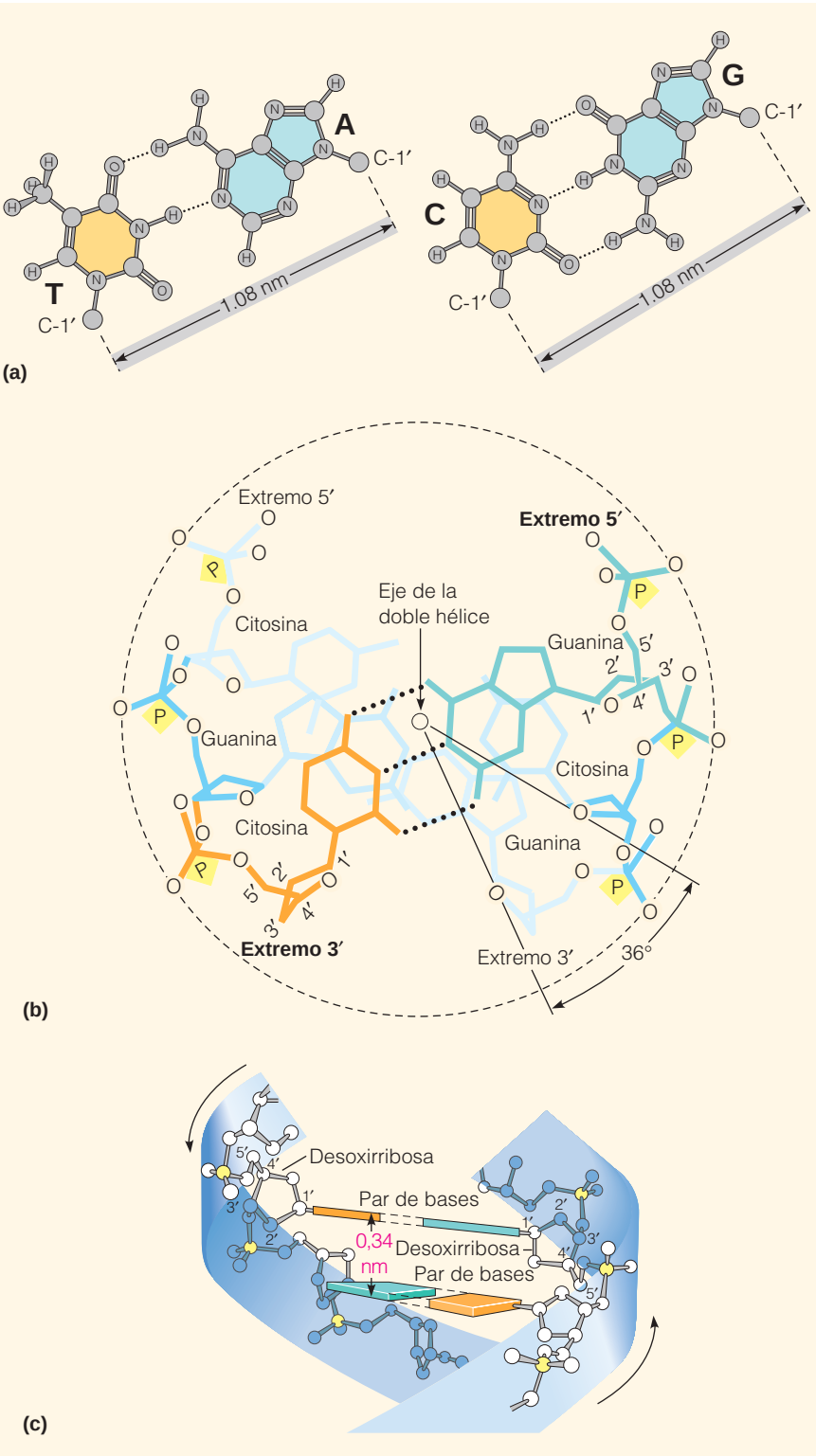
Reproducido con permiso de R. E. Franklin y R. Gosling, *Nature* (1953) 171:740. © 1953 Macmillan Magazines, Ltd.

El modelo de Watson y Crick para el DNA era una doble hélice antiparalela de dos cadenas, con 10 pares de bases por vuelta. El apareamiento era A-T y G-C.

FIGURA **4.10**

Elementos fundamentales de la estructura de la doble hélice del DNA. **(a)** Apareamiento de bases. A-T y G-C son los pares de bases del modelo del DNA de Watson y Crick. Este apareamiento permite que los carbonos C1′ de las dos cadenas estén exactamente a la misma distancia en ambos pares de bases. **(b)** Apilamiento de los pares de bases. Esta imagen del eje de la hélice desde arriba muestra cómo están apilados los pares de bases uno sobre otro, de tal modo que cada par presenta una rotación de 36° respecto al siguiente. **(c)** Distancia entre los pares de bases. Una imagen lateral de los pares de bases muestra la distancia de 0.34 nm entre ellas. Esta distancia se denomina elevación de la hélice.

© Irving Geis.



La estructura complementaria de doble cadena del DNA explica la forma en que puede replicarse el material genético.

En el modelo de Watson y Crick, los armazones hidrófilos de fosfato-desoxirribosa de la hélice se situaban en el exterior, en contacto con el medio acuoso, y los pares de bases se apilaban unos sobre otros con sus planos perpendiculares al eje de la hélice. En la Figura 4.10b y c se presentan dos proyecciones de una estructura de este tipo. (La figura muestra un modelo reciente perfec-

cionado, que se basa en datos mejores que los que tuvieron a su alcance Watson y Crick: las bases no están exactamente perpendiculares al eje de la hélice, y la conformación del azúcar es ligeramente diferente de la propuesta por Watson y Crick.) El apilamiento de las bases, como se muestra en la Figura 4.10b, permite que se produzcan fuertes interacciones de van der Waals entre ellas, lo que a menudo se denomina "interacción de apilamiento". Cada par de bases presenta una rotación de 36°, esto es, 1/10 de una rotación de 360°, respecto a la siguiente, de manera que se acomodan 10 pares de bases en cada vuelta de la hélice. El patrón de difracción mostraba que la distancia de repetición era de aproximadamente 3.4 nm, por lo que la *elevación* de la hélice, es decir, la distancia entre los pares de bases, debía ser aproximadamente 0.34 nm (Figura 4.10c). Esta distancia es exactamente el doble del grosor de van der Waals de un anillo plano (véase la Tabla 2.2 de la página 37), por lo que las bases están estrechamente apiladas dentro de la hélice, como se muestra en un modelo de relleno espacial (Figura 4.11). El modelo indica también que, aunque las bases están en el interior, pueden abordarse a través de dos surcos espirales profundos, denominados surcos *principal* y *secundario*. El surco principal proporciona un acceso más directo a las bases, mientras que el surco secundario está frente al armazón de azúcar. La construcción de modelos moleculares de estructuras de DNA de doble cadena pronto convenció a Watson y Crick de que las cadenas de DNA debían ir en direcciones opuestas. Esta disposición puede observarse claramente en la Figura 4.10c. El modelo que presentaron Watson y Crick era el de una hélice a derechas, aunque en ese momento eran débiles los datos indicativos del sentido (dirección de la vuelta) de la hélice. Sus suposiciones fueron correctas.

Como suele ocurrir con una buena teoría o modelo, la estructura de Watson y Crick explicaba también otros datos que hasta entonces no se comprendían. El bioquímico Erwin Chargaff, que había determinado las cantidades relativas de A, T, G y C en los DNA de muchos organismos, había observado el hecho sorprendente de que A y T estaban presentes casi siempre en cantidades aproximadamente iguales, y que lo mismo sucedía con G y C (Tabla 4.2). Si la mayor parte del DNA de las células era de doble cadena, con el apareamiento de bases de Watson y Crick, la *regla de Chargaff* era una consecuencia natural de ello.

El modelo de Watson y Crick no sólo explicaba la estructura del DNA y la regla de Chargaff, sino que tenía también implicaciones que llegaban al corazón mismo de la biología. Dado que A se aparea siempre con T, y G se aparea siempre con C, las dos cadenas son *complementarias*. Si las cadenas pudieran separarse y se pudiera sintetizar un nuevo DNA a lo largo de cada una de ellas, siguiendo el mismo principio de apareamiento de bases, podrían obtenerse dos moléculas de DNA de doble cadena, cada una de las cuales sería una copia *exacta* del original (Figura 4.12). Esta **autorreplicación** es precisamente la propiedad que el material genético debe poseer: cuando una célula se divide, deben producirse dos copias completas de la información genética que lleva la célula original. En su artículo de 1953 en que anunciaban el modelo (véase la Bibliografía), Watson y Crick expresaban esta idea en lo que puede haber sido la predicción científica más comedida que nunca se haya hecho: "No ha escapado a nuestra apreciación que el apareamiento específico que proponemos sugiere inmediatamente un posible mecanismo para copiar el material genético".

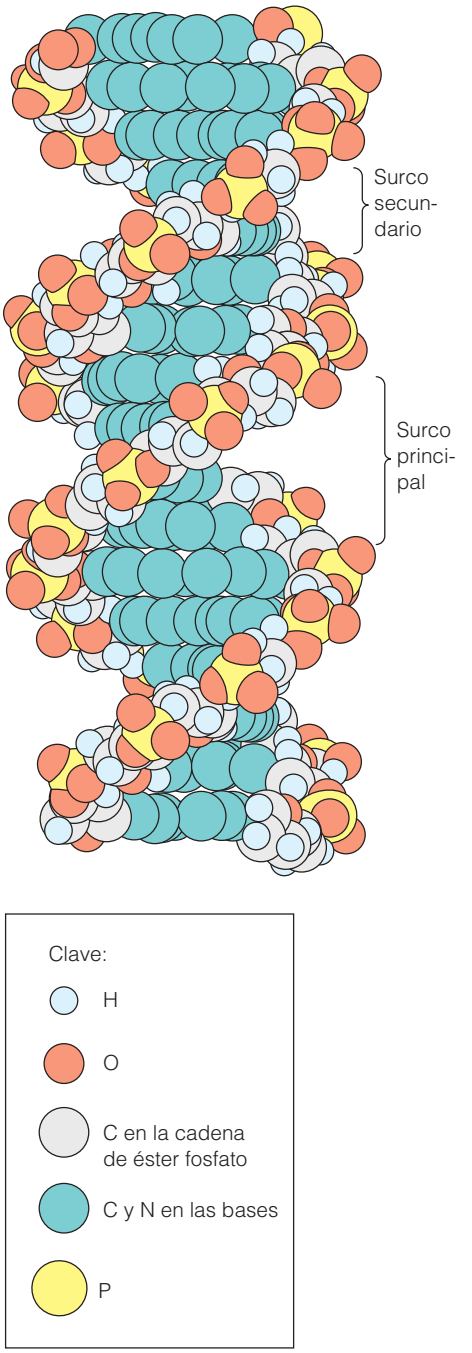


FIGURA **4.11**

Modelo de relleno espacial del DNA. Se muestra la molécula de DNA, según el modelo de Watson y Crick, con cada átomo indicado mediante su radio de van der Waals. En este modelo se aprecia más claramente que en la Figura 4.10 lo densamente empaquetadas que están las bases dentro de la hélice. Se indican asimismo los surcos principal y secundario.

De J. D. Watson, N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz y A. M. Weiner, *Molecular Biology of the Gene*, 4ª ed. (Redwood City, CA: Benjamin/Cummings Publishing Co., 1987). © 1987 James D. Watson.

NATURALEZA SEMICONSERVATIVA DE LA REPLICACIÓN DEL DNA

El mecanismo para copiar el DNA que hemos mencionado comporta el desenrollamiento de las dos cadenas del DNA progenitor, de tal manera que cada cadena sirva de molde para la síntesis de una cadena nueva, complementaria y en-

TABLA 4.2 Composición de bases de los DNA de varios organismos

	% Molar de bases					Proporciones	
Origen	Adenina (A)	Guanina (G)	Citosina[a] (C)	Timina (T)	(G + C)	A/T	G/C
Bacteriófago ϕX174	24.0	23.3	21.5	31.2	44.8	0.77[b]	1.08[b]
Bacteriófago T7	26.0	23.8	23.6	26.6	47.4	0.98	1.01
Escherichia coli B	23.8	26.8	26.3	23.1	53.2	1.03	1.02
Neurospora	23.0	27.1	26.6	23.3	53.8	0.99	1.02
Maíz	26.8	22.8	23.2	27.2	46.1	0.99	0.98
Tetrahymena	35.4	14.5	14.7	35.4	29.2	1.00	0.99
Pulpo	33.2	17.6	17.6	31.6	35.2	1.05	1.00
Drosophila	30.7	19.6	20.2	29.5	39.8	1.03	0.97
Estrella de mar	29.8	20.7	20.7	28.8	41.3	1.03	1.00
Salmón	28.0	22.0	21.8	27.8	44.1	1.01	1.01
Rana	26.3	23.5	23.8	26.8	47.4	1.00	0.99
Pollo	28.0	22.0	21.6	28.4	43.7	0.99	1.02
Rata	28.6	21.4	21.6	28.4	42.9	1.01	1.00
Ternera	27.3	22.5	22.5	27.7	45.0	0.99	1.00
Ser humano	29.3	20.7	20.0	30.0	40.7	0.98	1.04

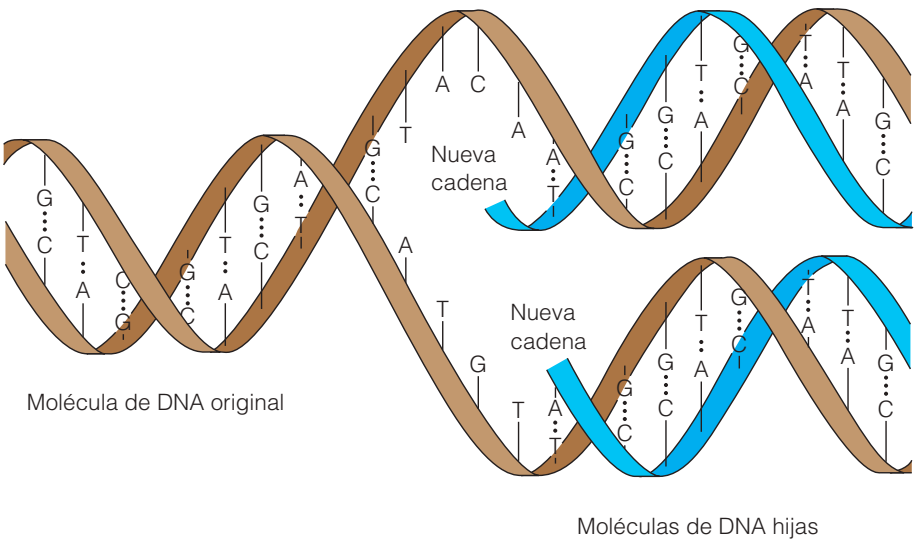
Datos tomados de H. E. Sober (ed.), *Handbook of Biochemistry,* 2ª ed. (Chemical Rubber Publishing Co., 1970). Los valores para los organismos superiores varían ligeramente de un tejido a otro, probablemente como consecuencia del error experimental.

[a] Las cantidades indicadas incluyen, para algunos organismos, un pequeño porcentaje de una base modificada, la 5-metilcitosina.

[b] Este bacteriófago tiene un DNA de una sola cadena, que no tiene que seguir la regla de Chargaff.

FIGURA **4.12**

Modelo de la replicación del DNA. Cada cadena actúa como molde para una nueva cadena complementaria. Cuando el proceso de copiado se ha completado habrá dos moléculas de DNA hijas de doble cadena, cada una de las cuales es de secuencia idéntica a la molécula original. El proceso real es bastante complicado, pero aquí se presenta el principio básico.



Meselson y Stahl demostraron que el DNA se replica de forma semiconservativa.

rollada sobre la cadena progenitora. La replicación completa de una molécula de DNA producirá dos dobles cadenas "hijas", cada una consistente en una mitad de DNA del progenitor (una cadena de la estructura de doble cadena original) y otra mitad de material nuevo. Esta forma de replicación se denomina **semiconservativa**, ya que se conserva la mitad del material original en cada una de las dos copias (Figura 4.13). Se diferencia de otros dos modos posibles, el **conservativo**, en el que una de las dos estructuras de doble cadena hijas es la doble cadena conservada del progenitor, mientras que la otra se sintetiza *de novo*, y el **dispersivo**, en el que el material del progenitor se dispersa por las estructuras de las dobles cadenas hijas.

La primera prueba experimental de este modelo se obtuvo en 1958, cuando Matthew Meselson y Franklin Stahl verificaron que las moléculas cuya densidad difiere en cantidades muy pequeñas podían separarse unas de otras mediante centrifugación en gradientes de densidad. En este método, se crea un gradiente de densidad mediante la centrifugación de una solución concentrada de una sal de un metal pesado, como el cloruro de cesio (CsCl). Si se suspenden moléculas de ácidos nucleicos de distintas densidades en un gradiente de este tipo, cada una migrará hasta el punto en el que la densidad de la solución sea igual a la suya. Esta técnica permitió a Meselson y Stahl rastrear el camino de un DNA marcado por densidad a través de varias tandas de replicación, con los resultados que se presentan en la Figura 4.14. Se aplicó el marcaje de densidad mediante el cultivo de la bacteria *E. coli* en un medio que contenía el isótopo pesado del nitrógeno, ^{15}N , durante muchas generaciones, de manera que el DNA alcanzaba una densidad más alta mediante una sustitución amplia del ^{14}N por ^{15}N en sus bases púricas y pirimidínicas. Al aislarlo y centrifugarlo hasta el equilibro a pH 7.0, este DNA formaba una banda única en una región del gradiente que correspondía a una densidad de 1.724 g/mL (Figura 4.14a, primer gráfico). En cambio, cuando se analizaba de forma similar el DNA de las bacterias que proliferaban en un medio ligero (que contenía ^{14}N), la banda producida tenía una densidad de 1.710 g/mL (Figura 4.14a, segundo gráfico).

Cuando se transferían las bacterias con marcaje de densidad que proliferaban en el medio pesado al medio ligero, el DNA aislado después de una generación de crecimiento producía una banda exclusiva en una densidad intermedia de 1.717 g/mL (Figura 4.14a, tercer gráfico). Este resultado es el esperado si el nuevo DNA replicado es una especie molecular *híbrida*, formada de una mitad de material del progenitor y una mitad de nuevo DNA (sintetizado en el medio ligero). Si estas bacterias se cultivaban durante una generación más en el medio ligero, se observaban dos bandas del mismo tamaño, una ligera y una de densidad híbrida (Figura 4.14a, cuarto gráfico), como era de prever si el DNA de densidad híbrida sufría un segundo ciclo de replicación semiconservativa.

Estos resultados concordaban con la idea de que cada cromosoma replicado contiene una cadena procedente del progenitor y una cadena hija, pero los datos no excluían otras formas alternativas de replicación semiconservativa que implicaran la ruptura de las cadenas de DNA. Estos modelos se descartaron mediante análisis de centrifugación de los DNA marcados por densidad a pH 12, en el que las cadenas de DNA se separan (Figura 4.14b). Cuando se centrifugaba hasta el equilibro después de la proliferación bacteriana en el medio pesado seguido de una generación en el medio ligero, el DNA formaba dos bandas: una ligera (igual a la observada en el análisis de las bacterias que proliferaban en ^{14}N) y una pesada (Figura 4.14b, tercer gráfico). El DNA analizado después de un segundo ciclo de replicación en el medio ligero presentaba tres cuartas partes de material ligero y una cuarta parte de material pesado (Figura 4.14b, cuarto gráfico). La conclusión inevitable era que el híbrido obtenido por replicación contenía una cadena completa de DNA del progenitor y una cadena completa de DNA de nueva síntesis.

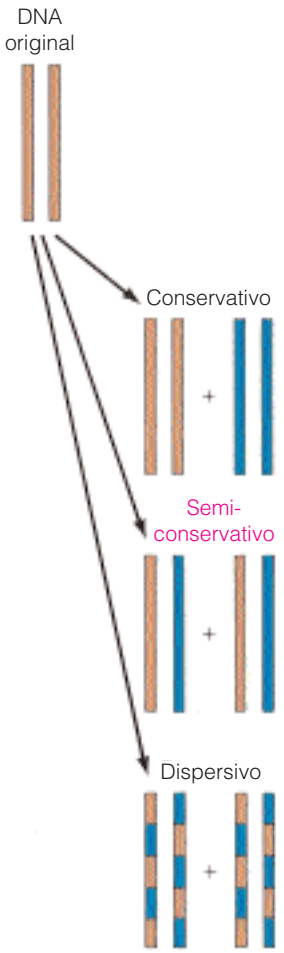


FIGURA **4.13**

Tres modelos de replicación del DNA. Las pruebas experimentales respaldan el modelo semiconservativo. Marrón = DNA progenitor, azul = nuevo DNA.

ESTRUCTURAS ALTERNATIVAS DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS: HÉLICES B Y A

En el momento en el que Watson y Crick propusieron su modelo, se habían obtenido ya para el DNA dos patrones de difracción de rayos X bastante distintos, lo que indicaba que la molécula existe en más de una forma. La **forma B**, que se observa en las fibras de DNA preparadas en condiciones de humedad elevada,

Las dos formas principales de estructura secundaria de los polinucleótidos se denominan A y B. La mayor parte del DNA se encuentra en la forma B; las hélices RNA-RNA y DNA-RNA están en la forma A.

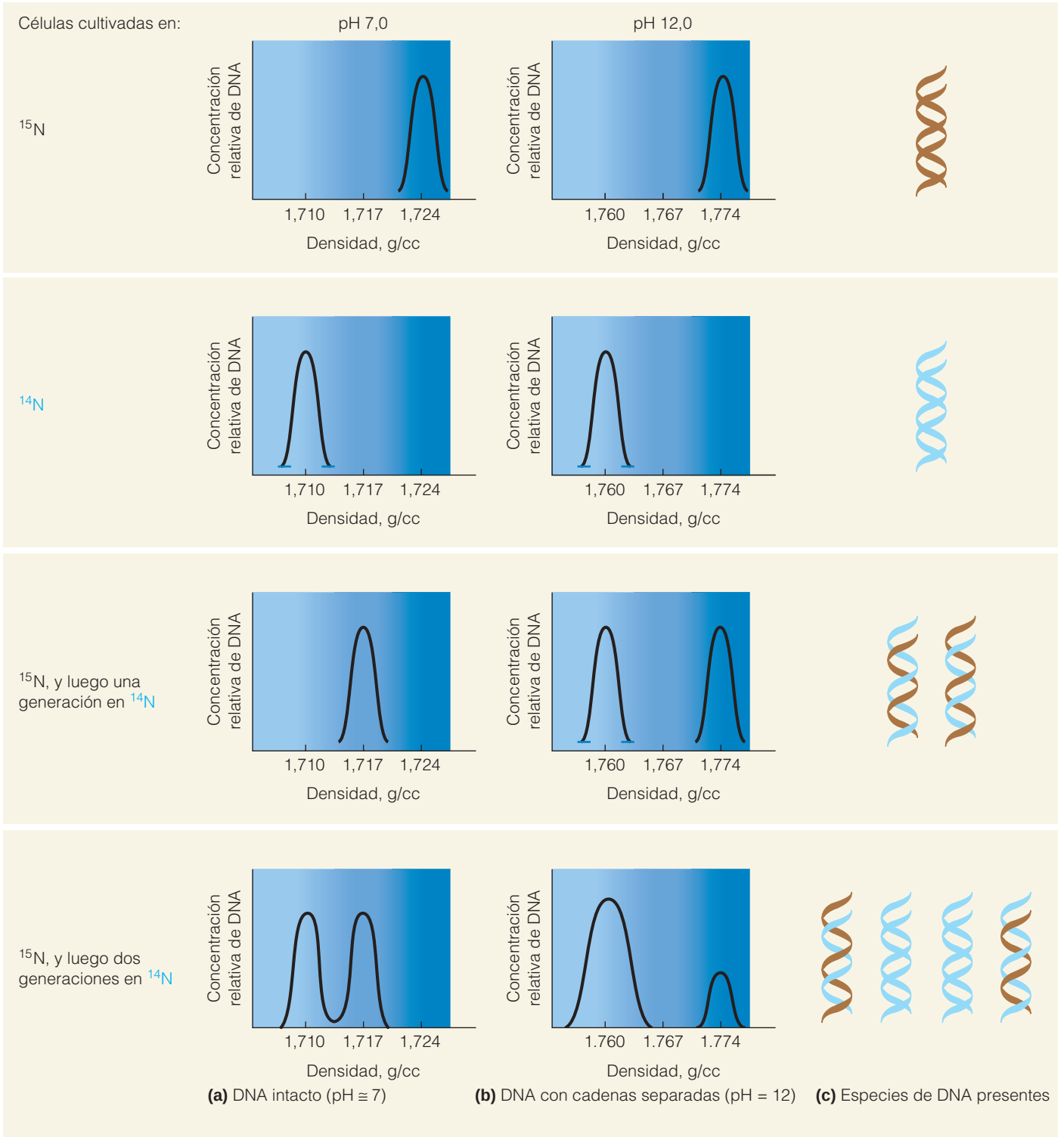
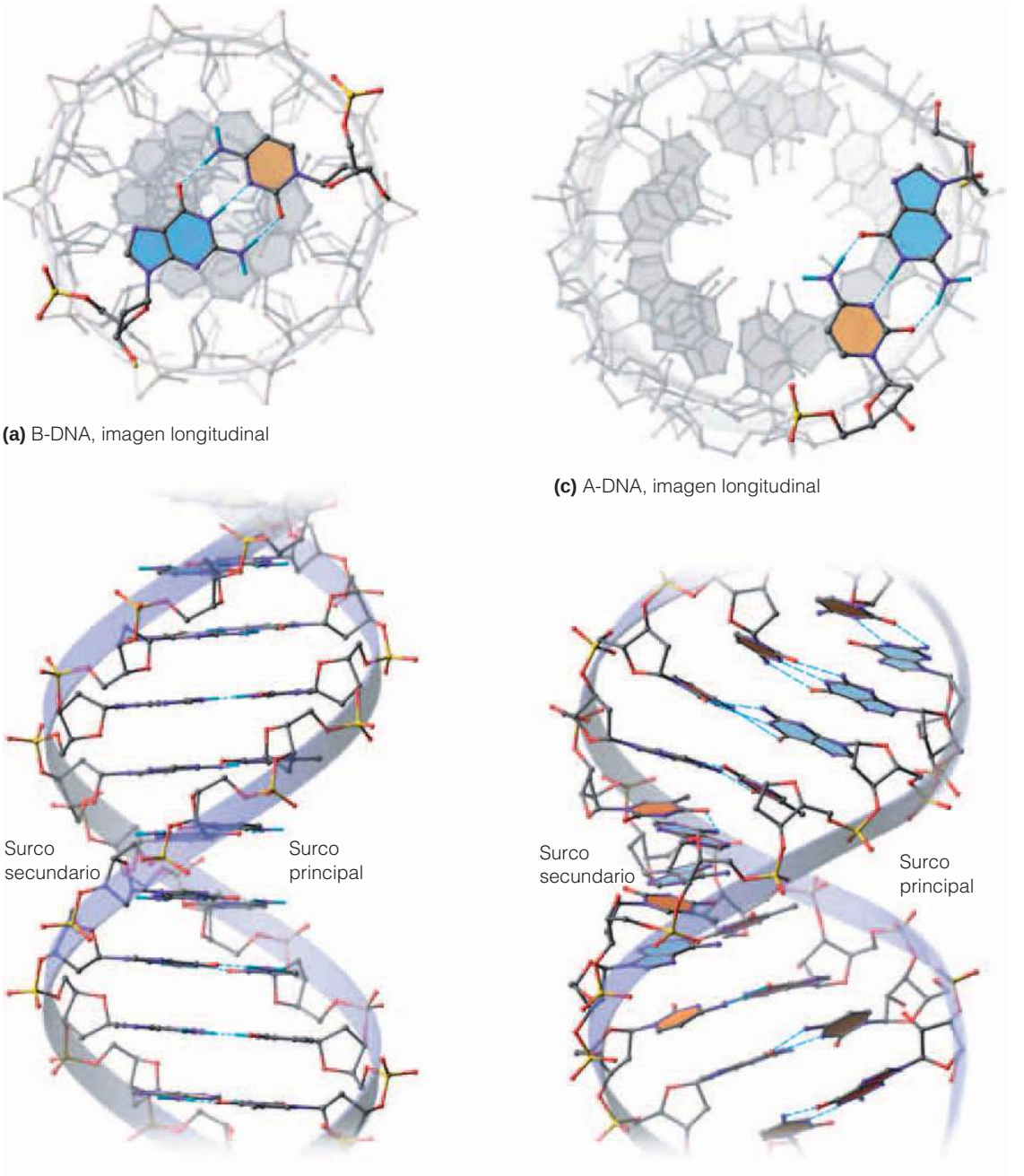


FIGURA **4.14**

El experimento de Meselson-Stahl demuestra que el DNA se replica de forma semiconservativa. Los patrones de bandas que se presentan se obtuvieron en gradientes de densidad en dos condiciones de pH diferentes. A pH 7, el DNA es de doble cadena; a pH 12, las cadenas están separadas.

se muestra en las Figuras 4.10, 4.11, 4.15a y 4.15b. Watson y Crick optaron por estudiar la forma B, ya que correctamente preveían que sería la forma hallada en el medio acuoso de la célula. Las fibras de DNA preparadas en condiciones de humedad baja tienen una estructura diferente, la denominada **forma A** (Figura 4.15c y d). Aunque la hélice B es de hecho la forma de DNA que se halla en las células, la hélice A tiene también importancia biológica. Las moléculas de RNA



(a) B-DNA, imagen longitudinal

(c) A-DNA, imagen longitudinal

(b) B-DNA, imagen lateral

(d) A-DNA, imagen lateral

FIGURA **4.15**

Comparación de las dos formas principales de DNA. Estructuras del B-DNA y del A-DNA deducidas a partir de estudios recientes de difracción de fibras, en proyecciones longitudinales y laterales.

de doble cadena forman siempre la estructura A, y lo mismo ocurre con las **moléculas híbridas DNA-RNA**, que se forman mediante el apareamiento de una cadena de DNA con una de RNA. Así pues, existen dos tipos principales de estructuras secundarias en los polinucleótidos. Como veremos más adelante en este capítulo, son posibles otras clases de estructuras secundarias en circunstancias especiales, como la forma Z a izquierdas que se menciona en la Tabla 4.3.

Como se presenta en la Figura 4.15 y en la Tabla 4.3, las formas A y B son muy distintas, aunque ambas son hélices a derechas. En la hélice B, las bases están próximas al eje de la hélice, que pasa entre los enlaces de hidrógeno (obsérvense las proyecciones desde el extremo de las hélices en la Figura 4.15a y c). En la hélice A, las bases están situadas más externamente y están muy inclina-

TABLA 4.3 Parámetros de las hélices polinucleotídicas

	Forma A	Forma B	Forma Z
Dirección de rotación de la hélice	Derecha	Derecha	Izquierda
Número de residuos por vuelta (n)	11	10	12 (6 dímeros)
Rotación por residuo ($= 360°/n$)	33°	36°	−60° por dímero; ~−30° por residuo
Elevación[a] en la hélice por residuo(h)	0.255 nm	0.34 nm	0.37 nm
Paso[a] de la hélice ($= nh$)	2.8 nm	3.4 nm	4.5 nm

[a] Para las definiciones de elevación y paso de una hélice, véase Herramientas de la Bioquímica 4A.

das con respecto al eje de la hélice. Las superficies de las hélices son también diferentes. En la hélice B, los surcos principal y secundario se diferencian claramente, mientras que en la hélice A los dos surcos tienen una anchura casi igual.

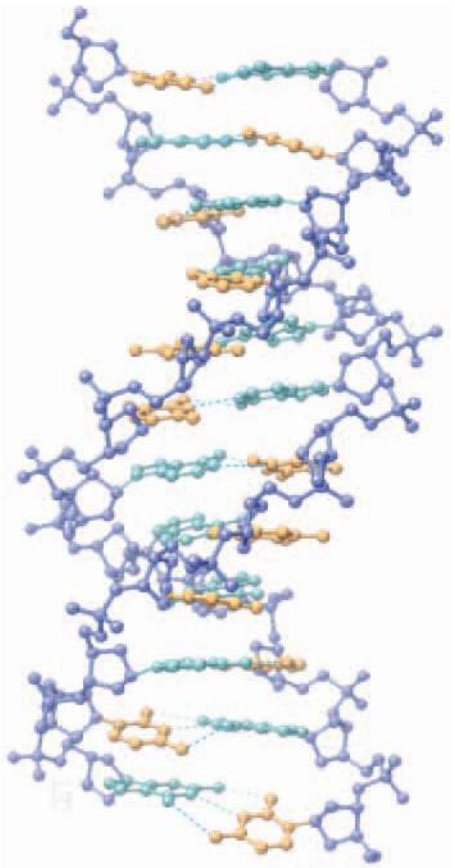
Todos los estudios de difracción de las fibras, incluyendo los que aportaron la información que se ha descrito, tienen una importante limitación. Al analizar los patrones de las fibras, los investigadores no determinan directamente los detalles de la estructura secundaria del ácido nucleico. En su lugar proponen los modelos que mejor expliquen las posiciones y las intensidades de las manchas del patrón de difracción (véase Herramientas de la Bioquímica 4A). Este enfoque es necesario porque las fibras no son nunca cristales perfectos y siempre existe una cierta ambigüedad en la interpretación de sus patrones de difracción. Por tanto, se produjo un importante avance cuando R. E. Dickerson y sus colaboradores lograron *cristalizar* un pequeño fragmento de DNA de doble cadena, que tenía la secuencia

$$\begin{array}{l} {}^{5'}\text{CGCGAATTCGCG}^{3'} \\ \quad\vdots\vdots\vdots\vdots\vdots\vdots\vdots\vdots\vdots\vdots\vdots\vdots \\ {}^{3'}\text{GCGCTTAAGCGC}^{5'} \end{array}$$

La cristalografía molecular de este fragmento y de otros pequeños fragmentos de DNA nos ha proporcionado una información muy detallada de la estructura secundaria de los polinucleótidos. En la Figura 4.16 se presentan los resultados de un estudio de este tipo para el B-DNA. En ella podemos observar las moléculas de DNA con la posición de cada átomo especificada de forma clara.

Un primer punto importante que surge de los estudios de los cristales moleculares es que los modelos elaborados a partir de los patrones de fibras constituyen simplificaciones excesivas de las estructuras. La estructura real del B-DNA implica variaciones locales del ángulo de rotación entre los pares de bases, la conformación del azúcar, la inclinación de las bases e incluso la distancia de elevación. Si se examina cuidadosamente la Figura 4.16, pueden observarse muchas distorsiones respecto a las estructuras idealizadas. La estructura secundaria del ácido nucleico no es homogénea. Varía en respuesta a la secuencia local y puede modificarse mediante la interacción con otras moléculas. Los parámetros de las diversas formas del DNA de la Tabla 4.3 deben considerarse, pues, como valores *promedio*, respecto a los cuales es posible una considerable desviación local.

Si se observan con detalle las estructuras como la de la Figura 4.16, se aprecia otra diferencia con el modelo original de Watson-Crick. Muchas moléculas de DNA están ligeramente *dobladas*; esto es, el eje de la hélice no sigue una línea recta. El grado y las direcciones del doblado dependen, de una forma complicada, de la secuencia de DNA. También pueden estar muy influenciadas por la interacción del DNA con varias moléculas proteicas. Veremos ejemplos de esto en otros capítulos.



B-DNA

FIGURA **4.16**

Estructura del B-DNA según los estudios de cristales moleculares. Obsérvense las distorsiones locales de la estructura idealizada que se muestra en las Figuras 4.11 y 4.15a y b.

Adaptado de R. E. Dickenson, *Sci. Am.* Diciembre 1983, pp. 100-104. © 1983 Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.

Los estudios de cristalografía molecular proporcionan también una posible explicación de por qué la forma B-DNA está favorecida en un medio acuoso. La forma B del DNA, pero no la forma A-DNA, puede acomodar una columna de moléculas de agua situadas en el surco secundario. Los enlaces de hidrógeno entre estas moléculas de agua y el DNA pueden conferir estabilidad a la forma B. Según esta hipótesis, cuando se elimina este agua (como ocurre en las fibras con humedad baja), la forma B se hace menos estable que la forma A.

¿Por qué, pues, adoptan siempre el RNA de doble cadena y las moléculas híbridas DNA-RNA la forma A? La respuesta radica probablemente en el grupo hidroxilo adicional de la ribosa del RNA. Este hidroxilo interfiere estéricamente en la forma B al situarse demasiado cerca del fosfato y del carbono 8 de la base adyacente. En consecuencia, el RNA *no puede* adoptar la forma B, ni siquiera en unas condiciones en las que la hidratación podría favorecerla. En el DNA, el hidroxilo está sustituido por hidrógeno, y no se produce un impedimento estérico de este tipo.

MOLÉCULAS DE DNA Y RNA IN VIVO

La mayor parte de las moléculas de DNA in vivo son de doble cadena; muchas son círculos cerrados. La mayoría de las moléculas de DNA circulares de doble cadena están superenrolladas.

Hemos descrito algunas de las características principales del DNA y el RNA. Pero, ¿en qué formas se encuentran estas moléculas en la célula viva? La mayor parte del DNA en la mayoría de los organismos vivos es de doble cadena, con las dos cadenas complementarias, si bien algunos virus DNA llevan moléculas de DNA de una sola cadena (Tabla 4.4). La prevalencia de las formas B y A de los polinucleótidos in vivo es la que cabría esperar en función de las condiciones en las que son estables estas conformaciones. Dado que las células contienen gran cantidad de agua, cabe prever que la mayor parte del DNA de doble cadena se encuentre en la forma B o alguna muy parecida a ella. Existen pruebas de que el

TABLA 4.4 Propiedades de algunas moléculas de DNA existentes en la naturaleza

Origen	Cadena única (SS) o doble cadena (DS)	Circular o lineal	Número de pares de bases (pb) o bases (b)	Masa molecular (Da)	Longitud[b]	% (G + C)
Virus 40 del mono (genoma)[a]	DS	Circular	5243 pb	3.293×10^6	1.78 μm	40.80
Bacteriófago ϕX174 (genoma)	SS	Circular	5386 b	1.664×10^6	—[d]	44.76
Bacteriófago M13 (genoma)	SS	Circular	6407 b	1.977×10^6	—[d]	40.75
Virus del mosaico de la coliflor (genoma)	DS	Circular	8031 pb	4.962×10^6	2.73 μm	40.19
Adenovirus AD-2 (genoma)	DS	Lineal	35 937 pb	2.221×10^7	12.2 μm	55.20
Virus de Epstein–Barr (genoma)	DS	Circular	172 282 pb	1.065×10^8	58.6 μm	59.94
Bacteriófago T4 (genoma)	DS	Lineal	168 899 pb	1.062×10^8	57.4 μm	35.30
Bacteria *E. coli* (genoma)	DS	Circular	4 639 221 pb	2.869×10^9	1.57 mm	50.80
Mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) (un cromosoma)[c]	DS	Lineal	~6.5×10^7 pb	~4.3×10^{10}	~2 cm	~40

[a] El término *genoma* indica el DNA total que especifica la información genética de un organismo.
[b] Calculada para el DNA de doble cadena de secuencia conocida: 0.34 nm × el número de pares de bases (suponiendo la forma B).
[c] Estas moléculas no se han secuenciado por completo, por lo que el número de pares de bases, la masa molecular y el % (G+C), no pueden indicarse con exactitud.
[d] Las longitudes de los DNA de cadena única no están bien definidas; dependen mucho de las condiciones del disolvente

B-DNA disuelto en solución tiene una conformación sólo un poco diferente de la forma B que se observa en las preparaciones de las fibras, con aproximadamente 10.5 pares de bases por vuelta en vez de los 10.0 esperados. El RNA de doble cadena, como se ha indicado antes, se encuentra siempre en la forma A.

Las moléculas de DNA que se encuentran en los diferentes organismos varían con un margen enorme de tamaños. Algunas bacterias llevan moléculas de DNA *plásmidos* circulares (véase la Figura 4.18) que pueden ser tan sólo de unos miles de pares de bases. En el otro extremo, algunos DNA, como el de los cromosomas eucariotas son moléculas inmensas. El DNA de un cromosoma de *Drosophila* (mosca de la fruta) tiene un peso molecular de aproximadamente 4×10^{10} g/mol y tendría una longitud de 2 cm si se extendiera completamente.

DNA circular y superenrollamiento

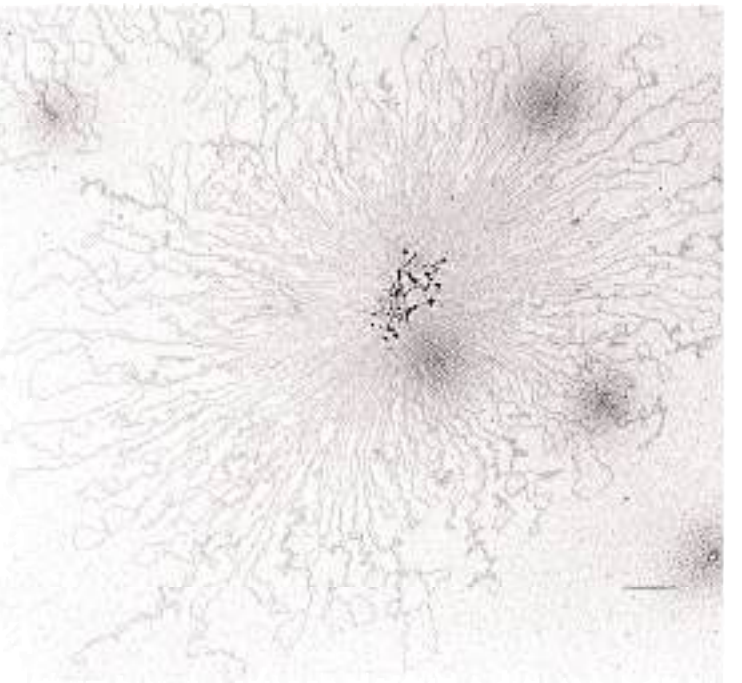
Otro dato importante respecto a las moléculas de DNA naturales es el que se ilustra en la Figura 4.17a y b: muchas de estas moléculas son *circulares*, lo cual significa que no tienen extremos 5′ o 3′ libres. Los círculos pueden ser pequeños, como ocurre en el DNA del bacteriófago ϕX174 (Figura 4.17a), o inmensos, como en el caso del DNA de *E. coli* (Figura 4.17b), y pueden estar formados por una sola cadena o por dos cadenas entrelazadas en una doble hélice en su forma B. Sin embargo, no todas las moléculas de DNA son circulares. En la



(a) DNA vírico de una sola cadena (circular)



(c) DNA de bacteriófago de doble cadena (lineal)



(b) DNA barcteriano de doble cadena (circular)

FIGURA **4.17**

Moléculas circulares y lineales de ácido nucleico tal como se observan con el microscopio electrónico. **(a)** DNA circular de cadena única del pequeño bacteriófago ϕX174. **(b)** DNA circular grande de doble cadena de *E. coli*. Esta molécula se encuentra en forma de varios bucles superenrollados unidos a una matriz proteica. **(c)** Molécula única de DNA lineal de doble cadena del bacteriófago T2. El bacteriófago se ha lisado y su DNA se ha dispersado. Uno de sus dos extremos está fuera de la imagen en la parte inferior derecha. El otro está presumiblemente enterrado en la cabeza del fago.

(a) Cortesía de los Drs. D. Dressler y K. Koths; **(b)** cortesía de R. Kavenoff, Designergenes Ltd./BPS; **(c)** © Biology Media/Photo Researchers.

Figura 4.17c se muestra el DNA lineal de un virus, el bacteriófago T2. Los cromosomas humanos también contienen moléculas de DNA lineal gigantes.

Hay un aspecto especial en las moléculas de DNA circular en el que tal vez no haya pensado: muchas de ellas están **superenrolladas**, cuyo significado puede comprenderse considerando el grupo de moléculas que se muestran en la Figura 4.18. La figura presenta tanto formas relajadas como superenrolladas de moléculas de DNA de plásmidos. Un círculo relajado puede estar aplastado sobre una superficie plana, mientras que una molécula superenrollada no puede estarlo. Además de la torsión de las cadenas de DNA, una alrededor de la otra, una molécula superenrollada tiene otras torsiones adicionales en el propio eje de la hélice (el eje de la hélice se cruza sobre sí mismo una o varias veces). La estructura tridimensional, como el superenrollamiento, que comporta un plegado de orden superior de los elementos de una estructura secundaria regular, se denomina estructura **terciaria** de un polímero.

El plegado de orden superior de la estructura secundaria de un biopolímero se denomina su estructura terciaria.

El superenrollamiento no es en modo alguno un fenómeno raro. Se trata más bien del estado habitual de las moléculas cerradas de DNA circular. La

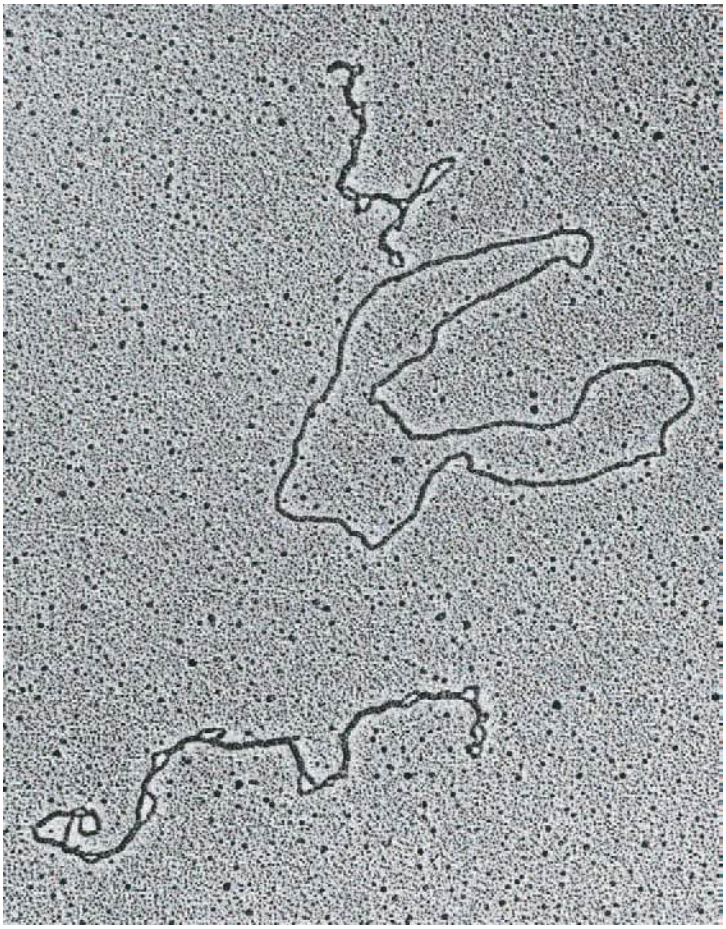


FIGURA **4.18**

Moléculas de DNA relajadas y superenrolladas. Fotografía de microscopia electrónica donde se observan tres moléculas de DNA mitocondrial. Todas ellas son de secuencia idéntica y contienen alrededor de 16 500 pb cada una. Sin embargo, la molécula del centro está relajada, mientras que las de la parte superior e inferior están fuertemente superenrolladas.

Cortesía del Dr. D. A. Clayton.

mayor parte de las moléculas de DNA circular que se encuentran en la naturaleza tienen torsiones superhelicoidales a izquierdas, aunque es posible formar moléculas de DNA con superhélices a derechas. Por convenio, denominamos superenrollamiento **positivo** al que va a derechas y **negativo** al que va a izquierdas.

La mayoría de las moléculas de DNA que se encuentran in vivo son superhélices a izquierdas.

Las moléculas de DNA que se muestran en la Figura 4.18 difieren tan sólo en su topología, por lo que se les denomina **topoisómeros**. Los topoisómeros pueden interconvertirse *únicamente* mediante el corte y la nueva unión del DNA. Las células poseen enzimas que pueden realizar este proceso. Estas enzimas, que se denominan **topoisomerasas**, regulan la superhelicoidalidad de las moléculas de DNA naturales.

Cuando se introducen vueltas superhelicoidales (hacia la izquierda o hacia la derecha) en una molécula de DNA que anteriormente estaba relajada, esta molécula pasa a estar en tensión. En consecuencia, debe gastarse energía para formar una molécula de DNA superenrollada. Las células procariotas como *E. coli* tienen una topoisomerasa especial denominada **DNA girasa**. Esta enzima introduce giros superhelicoidales a izquierdas mediante una reacción impulsada por la hidrólisis del ATP. Algunas topoisomerasas, que sólo pueden relajar el DNA superenrollado, no requieren ATP. Abordaremos con mayor detalle las topoisomerasas en capítulos posteriores. La energía almacenada en los DNA circulares al torsionarlos en superenrollamientos puede tener efectos importantes sobre la conformación del DNA; describiremos estos efectos más adelante en este mismo capítulo, después de presentar una teoría cuantitativa del superenrollamiento.

Estructura de los polinucleótidos de una sola cadena

Las moléculas de polinucleótidos de una sola cadena pueden adoptar diversas estructuras que dependen de sus secuencias y de las condiciones de la disolución. A temperatura elevada o en presencia de sustancias desnaturalizantes, la mayoría se encontrarán en forma de ovillo aleatorio como se muestra en la Figura 4.19a. Esta estructura se caracteriza por flexibilidad y libertad de rotación alrededor de los enlaces del armazón, lo cual lleva a una forma flexible que cambia constantemente. Sin embargo, en condiciones más cercanas a las que se encuentran in vivo, las interacciones de apilamiento tenderán a formar regiones de hélices de una cadena de bases apiladas (Figura 4.19b). Además, la mayoría de las secuencias de los ácidos nucleicos naturales contienen regiones de autocomplementariedad entre las que son posibles apareamientos de bases. Aquí la molécula puede enlazarse sobre sí misma para formar una estructura de doble cadena, como se indica en la Figura 4.19c. En la Figura 4.20 se presenta un

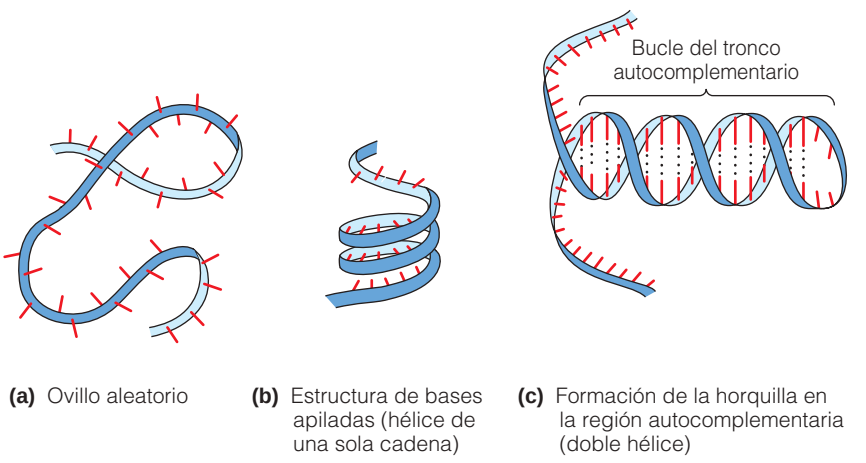


FIGURA **4.19**

Conformaciones de los ácidos nucleicos de cadena única. **(a)** Estructura de ovillo aleatorio de las cadenas simples desnaturalizadas. Existe flexibilidad de rotación de los residuos y una estructura inespecífica. **(b)** Estructura de bases apiladas adoptada por las cadenas sencillas no autocomplementarias en condiciones "nativas". Las bases se apilan para llevar la cadena a una hélice, pero no hay enlaces de H. **(c)** Estructuras de horquilla formadas por secuencias autocomplementarias; la cadena se dobla sobre sí misma para formar una estructura de lazo en vástago.

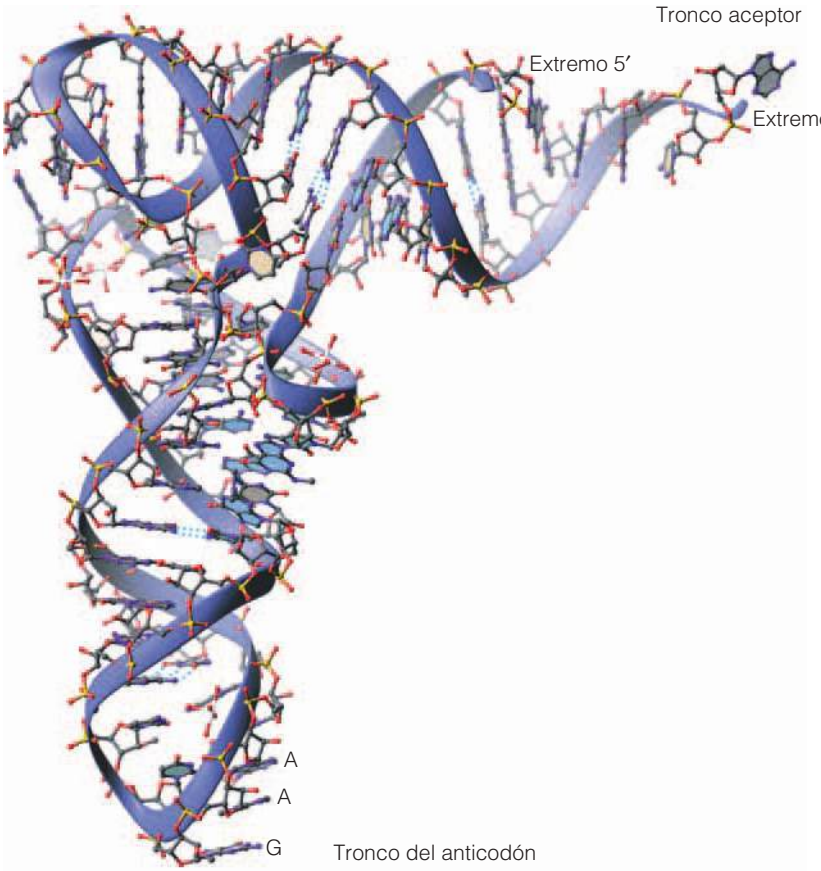


FIGURA **4.20**

Estructura terciaria de una RNA de transferencia según lo determinado mediante difracción de rayos X. Esta molécula es el tRNA que transfiere el aminoácido fenilalanina a las proteínas sintetizadas en las células de levadura. La ruta del armazón de fosfato-ribosa está trazada por la cinta morada. Obsérvese que existen algunas regiones de unión de tres bases.

ejemplo más complejo, que corresponde a la estructura del **RNA de transferencia** (**tRNA**), una clase de RNA que interviene en la síntesis de las proteínas (véase el apartado siguiente). En este caso observamos no sólo una estructura secundaria de tipo A debida al plegado de la cadena sobre sí misma, sino también un plegado más complejo de esas hélices juntas. Así pues, la molécula de tRNA posee una estructura *terciaria* definida, un plegado de orden superior que le proporciona una forma definida y una disposición interna que es necesaria para su función.

La mayor parte de las moléculas de RNA son de una sola cadena, pero muchas de ellas tienen regiones autocomplementarias que forman estructuras en horquilla y algunas poseen estructuras terciarias bien definidas.

Funciones biológicas de los ácidos nucleicos: una visión preliminar de la biología molecular

Hemos resaltado que el cometido fundamental de los ácidos nucleicos es el almacenamiento y la transmisión de la información genética, y continuaremos avanzando en esta idea a lo largo del libro. En la Parte V se describe con detalle la manera en que los ácidos nucleicos pasan de la célula progenitora a la célula hija (o de un organismo a sus descendientes), y la forma en que dirigen los procesos bioquímicos y la formación de otras moléculas complejas, como las proteínas. En este capítulo y en el siguiente, presentaremos una visión general preliminar de estas funciones de los ácidos nucleicos. A partir de ello, se comprenderán algo mejor las relaciones entre las estructuras de los ácidos nucleicos y las proteínas, la evolución a nivel molecular, y nuestra capacidad para modificar los microbios, las plantas y los animales mediante la ingeniería genética.

ALMACENAMIENTO DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA: EL GENOMA

Cada organismo lleva en cada una de sus células al menos una copia de toda la información genética que necesita ese organismo, a lo que se denomina *genoma*. Normalmente, la información genética está codificada en un DNA de doble cadena, aunque algunos virus utilizan DNA de una cadena e incluso RNA (véase la Tabla 4.4). Los genomas varían enormemente de tamaño; los virus más pequeños necesitan sólo unos pocos cientos de bases (b) o pares de bases (pb), mientras que el genoma humano consta de alrededor de 2×10^9 pb de DNA, distribuido en 23 cromosomas.

Los últimos años han visto avanzar notablemente nuestra capacidad para determinar las secuencias de DNA o RNA. En 1977 Maxam y Gilbert (véase la Bibliografía) diseñaron un método de secuenciación química en el que se produce la ruptura selectiva en los residuos A, T, G y C, tras lo que se separan los fragmentos por electroforesis en gel. Esta técnica notable permitió a los investigadores comenzar a explorar la información genómica. El método de Maxam-Gilbert ha sido sustituido en gran parte por una técnica que utiliza enzimas para generar fragmentos de oligonucleótidos que comienzan y acaban en bases específicas. Este método, puesto a punto por Fred Sanger, se describirá con detalle en el Capítulo 25. Actualmente, esta técnica automática tremendamente rápida permite secuenciar grandes genomas. Como muestra la Tabla 4.4, se conoce la secuencia completa del genoma de *E. coli* (4 693 221 pb). Aún más notable es la secuenciación reciente del genoma de la levadura que contiene 12 147 777 pb distribuidos entre 16 cromosomas y la mitocondria. En proceso de secuenciación se encuentran los genomas de otros muchos organismos entre los que está el ser humano.

En cada organismo, una fracción sustancial del DNA genómico es capaz de transcribirse o "leerse" para permitir la expresión de su información y dirigir la síntesis de moléculas de RNA y de proteínas. Los segmentos que pueden transcribirse se denominan **genes**. El DNA de cada célula de cada organismo contiene al menos una copia (y algunas veces varias) del gen que lleva la información para fabricar cada proteína que requiere el organismo. Además, existen genes (a menudo reiterados muchas veces) para las numerosas moléculas funcionales de RNA específicas, como los RNA de transferencia (tRNA) de la Figura 4.20. Igual que las proteínas, estos RNA desempeñan funciones específicas formando parte de la maquinaria celular. (Véase la Tabla 4.5.)

REPLICACIÓN: DNA A DNA

La replicación del DNA es el proceso esencial para la vida continuada de cada organismo y para la continuación de la vida sobre la tierra. La replicación pasa la información genética de célula a célula y de generación a generación. En la Figura 4.12 se esquematiza el fundamento del proceso: se construye una copia complementaria de cada una de las dos cadenas del DNA, lo que normalmente da lugar a dos copias idénticas de la original. El proceso es muy exacto, cometiéndose menos de 1 error por cada 10^8 bases, aunque en ocasiones se producen equivocaciones, que contribuyen a las mutaciones que han permitido la evolución de la vida hacia formas cada vez más complejas.

La replicación es la copia de las dos cadenas de un DNA de doble cadena para dar dos DNA de doble cadena idénticos.

La replicación del DNA se produce mediante un complejo de enzimas. Éstas se describirán con detalle en capítulos posteriores. Cada complejo enzimático, concentrado sobre una proteína denominada *DNA polimerasa*, posee múltiples funciones. Abre el DNA de doble cadena y guía el apareamiento de cada desoxirribonucleósido trifosfato que se incorpora con su pareja complementaria sobre la cadena que va a copiarse. A continuación, cataliza la formación del en-

TABLA 4.5 Propiedades de algunas moléculas de RNA existentes en la naturaleza

Origen (organismo)	Designación	Función	Tamaño (b o pb)
tRNA (RNA de transferencia)			
E. coli	$tRNA^{Leu}$	Transfiere leucina en la síntesis de proteínas	87 b
Levadura	$tRNA^{Phe}$	Transfiere fenilalanina en la síntesis de proteínas	76 b
Rata	$tRNA^{Ser}$	Transfiere serina en la síntesis de proteínas	85 b
rRNA (RNA ribosómico)			
E. coli	5S RNA	Parte de la estructura del ribosoma	120 b
	16S RNA	Parte de la estructura del ribosoma	1542 b
	23S RNA	Parte de la estructura del ribosoma	2904 b
mRNA (RNA mensajero)			
Pollo	$mRNA_{LYS}$	RNA mensajero para la proteína lisozima	584 b
Rata	$mRNA_{SA}$	RNA mensajero para la proteína albúmina sérica	~2030 b
vRNA (RNA vírico)			
Virus de la polio	RNA de la polio	Genoma del virus	7440 b
Virus de polihedrosis citoplasmática de la mariposa *Orgyia*	RNA del VPC	Genoma del virus	Diez moléculas de doble cadena, ~890 a ~5150 pb

lace fosfodiéster para ligar este residuo a la nueva cadena que crece. En muchos casos, el complejo enzimático también comprueba, o "lee las pruebas" de la adición antes de proceder a añadir el siguiente residuo, lo cual contribuye a la elevada exactitud global de la replicación. La replicación del DNA se considerará con mucho más detalle en los Capítulos 24 y 28.

TRANSCRIPCIÓN: DEL DNA AL RNA

La transcripción es el proceso por el que se copia una cadena de DNA en una molécula de RNA complementaria.

La **expresión** de la información genética comporta siempre un primer paso de **transcripción** de los genes en moléculas de RNA complementarias. Es fácil comprender esta producción de moléculas de RNA específicas. De la misma forma que una cadena de DNA puede dirigir la replicación, también puede dirigir la transcripción que es la formación de una cadena de RNA complementaria (Figura 4.21). Naturalmente, los monómeros necesarios para la transcripción son diferentes de los que se emplean para la replicación. En lugar de desoxirribonucleósidos trifosfato, son necesarios los ribonucleósidos trifosfato, ATP, GTP, CTP y UTP, para formar el RNA. (Obsérvese que U en el RNA nuevo se aparea con A en el DNA molde.) La transcripción del DNA, igual que la replicación del DNA, requiere un conjunto especial de enzimas catalizadoras que se denominan *RNA polimerasas*. En los Capítulos 24, 25, 26 y 28 consideraremos estas enzimas y presentaremos una información detallada de los procesos que catalizan.

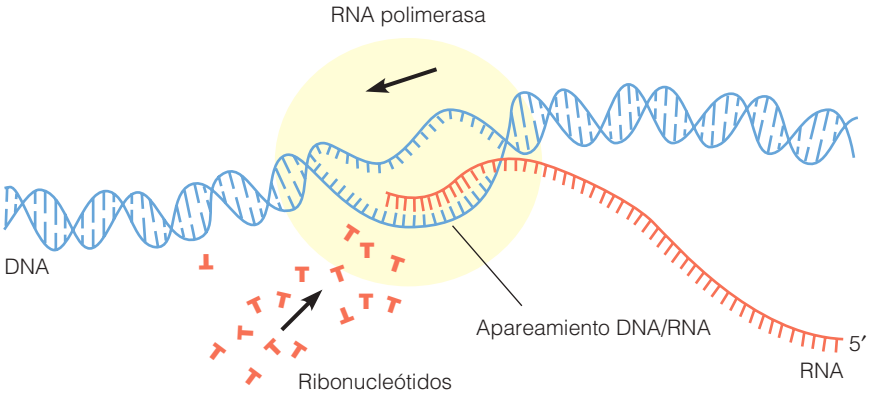


FIGURA **4.21**

Principio básico de la transcripción. Una enzima (RNA polimerasa) se desplaza a lo largo de una molécula de DNA, abriendo la doble cadena y elaborando un transcrito de RNA mediante la adición de un ribonucleótido cada vez. La enzima copia la secuencia oligonucleotídica de tan sólo una de las dos cadenas de DNA. Tras el paso de la enzima, el DNA vuelve a enrollarse.

TRADUCCIÓN: DEL RNA A LA PROTEÍNA

La transcripción por sí sola es suficiente para la producción de las múltiples moléculas de RNA funcionales de la célula, como los tRNA o los RNA ribosómicos que se indican en la Tabla 4.5. Sin embargo, la síntesis de proteínas específicas, bajo la dirección de genes específicos, es una cuestión más compleja. El problema, como veremos en el Capítulo 5, es que las proteínas son polímeros formados por 20 clases distintas de monómeros de aminoácidos. Dado que sólo existen cuatro tipos distintos de monómeros de nucleótidos en el DNA, no puede establecerse una relación de uno a uno entre la secuencia de nucleótidos de una molécula de DNA y la secuencia de aminoácidos de una proteína. En vez de ello, la secuencia lineal de bases que constituye la información que codifica la proteína se "lee" por la célula en bloques de tres residuos de nucleótidos, o **codones**, cada uno de los cuales especifica un aminoácido diferente. Se denomina **código genético** al conjunto de reglas que especifican los codones de los ácidos nucleicos que corresponden a cada aminoácido. En el Capítulo 5 se describirá este código tras haber presentado los aminoácidos y la estructura de las proteínas.

Aunque la información de todas las secuencias proteicas está codificada en el DNA, la elaboración de las proteínas no tiene lugar directamente desde el DNA. La conversión de la información de las secuencias de DNA de los genes en las secuencias de aminoácidos de las proteínas utiliza como intermediarias unas moléculas de RNA especiales. A partir del DNA se transcriben copias complementarias de los genes que se van a expresar, en forma de moléculas de **RNA mensajero** (**mRNA**) (véase la Tabla 4.5), a las que se da este nombre porque transportan la información desde el DNA a la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula. La maquinaria para la fabricación de proteínas incluye moléculas de tRNA, enzimas especiales y **ribosomas**, que son complejos de RNA y proteínas en los que se produce el ensamblaje de las nuevas proteínas. Esta **traducción** de la información del RNA se esquematiza en la Figura 4.22. (En el Capítulo 5 se presentarán las principales características de la traducción y en los Capítulos 27 y 28 se describirán detalladamente.) El esquema sencillo de la Figura 4.23 resume el flujo de información genética en la célula.

En la traducción, una secuencia de RNA dicta una secuencia proteica.

Como se describirá en los capítulos siguientes, las proteínas son las principales moléculas estructurales y funcionales en la mayor parte de las células. La apariencia de una célula y lo que es capaz de hacer dependen en gran parte de las proteínas que contiene. Estas vienen dadas, a su vez, por la información almacenada en el DNA de la célula, que se transcribe al mRNA y se expresa mediante la maquinaria de síntesis de proteínas. Si utilizamos la analogía de la célula como una fábrica, las proteínas constituyen la maquinaria de trabajo. Los planos maestros de esta maquinaria están almacenados en un depósito central

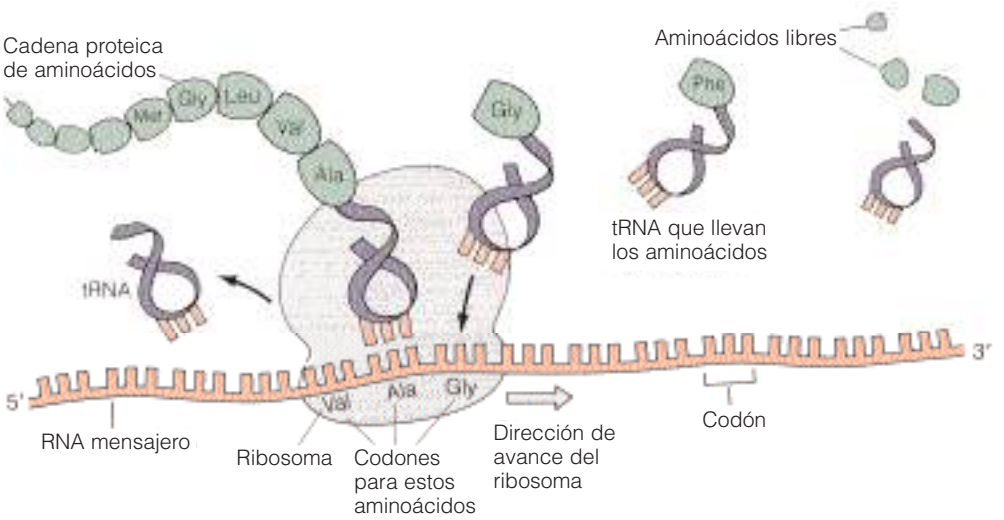


FIGURA **4.22**

Principio básico de la traducción. Una molécula de RNA mensajero se une a un ribosoma y las moléculas de RNA de transferencia llevan los aminoácidos al ribosoma de uno en uno. Cada tRNA identifica el codón apropiado en el mRNA y añade este aminoácido a la cadena proteica en crecimiento. El ribosoma se desplaza a lo largo del mRNA, con lo que el mensaje genético puede leerse y traducirse en una proteína.

(el DNA del núcleo celular). De vez en cuando y a medida que se necesita una maquinaria nueva o la sustitución de la existente se van enviando copias de determinados planos (mRNA). Además, existe continuamente la necesidad de RNA especializados como los tRNA.

MANIPULACIÓN DEL DNA

Como observadores de las operaciones de la célula, los científicos han aprendido a leer los planos del DNA y actualmente conocen el código mediante el cual se traducen. Este conocimiento nos ha proporcionado la posibilidad de introducir modificaciones genéticas en los organismos vivos, mediante técnicas de **DNA recombinante**. Estas técnicas, que comportan la inserción de DNA nuevo en el genoma de un organismo, han revolucionado completamente la biología y la bioquímica. Analizarlas con detalle en este punto sería prematuro, puesto que dependen de procesos enzimáticos complicados que aún no hemos descrito. Encontrará una descripción detallada de la tecnología del DNA recombinante en el Capítulo 25. Sin embargo, sí es adecuado indicar aquí algunas de las cosas que actualmente pueden realizarse con estos métodos:

1. Pueden recuperarse genes concretos u otras secuencias de DNA que se desee a partir de cualquier parte del genoma de un organismo superior y **clonarse** (reproducirse de manera idéntica) en bacterias como *E. coli*. Esta técnica permite la producción a gran escala de regiones concretas de DNA, que pueden utilizarse, por ejemplo, para la determinación de las secuencias de nucleótidos del DNA. Casi todo nuestro conocimiento de las secuencias del DNA se basa en esta técnica.
2. Puede fabricarse un DNA que transporte genes específicos de organismos superiores para dirigir la expresión de proteínas en bacterias, con lo que es posible producir grandes cantidades de algunas proteínas eucariotas que normalmente se purifican con dificultad. Entre los ejemplos de importancia médica se encuentran la insulina y los factores de la coagulación de la sangre, que actualmente pueden fabricarse de manera menos costosa y más segura.
3. Pueden modificarse de la forma deseada los DNA clonados y estudiarse sus productos de traducción modificados, lo cual nos ayuda a comprender el funcionamiento de las proteínas.

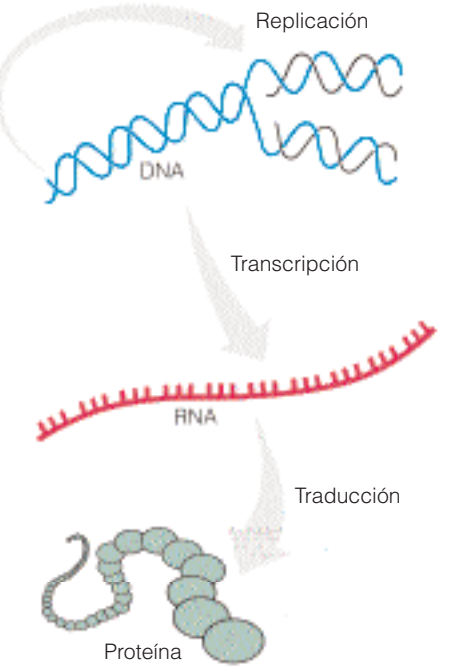


FIGURA **4.23**

Flujo de información genética en una célula característica. El DNA puede replicarse o transcribirse en RNA. Los RNA mensajeros se traducen en secuencias proteicas.

4. En algunos casos, pueden reinsertarse de nuevo en el organismo del que proceden los genes modificados, lo cual permite estudiar los efectos fisiológicos y bioquímicos de la modificación de las proteínas que codifican.
5. Pueden insertarse los genes de un tipo de organismo en el genoma de otro tipo para producir rasgos nuevos.

Las técnicas de DNA recombinante nos permiten modificar el contenido genético de los organismos.

Es evidente que estos métodos harán, y han hecho ya, aumentar enormemente nuestro conocimiento de los procesos bioquímicos y biológicos. Mayor trascendencia puede tener aún a largo plazo la posibilidad que plantean de manipulación humana de la información genética de las bacterias, las plantas y los animales. Ya se han clonado organismos tan complejos como los ratones y las ovejas. Probablemente es posible la clonación humana. Como la mayor parte de los grandes avances técnicos, la ingeniería genética puede utilizarse bien o mal. Las cuestiones éticas que implica deberán debatirse durante mucho tiempo. Sea cual sea la resolución que se dé a estos debates, el conocimiento ya existe y la humanidad, de hecho la vida misma, ha traspasado un nuevo umbral. Por primera vez en la larga historia de la evolución, podemos controlar ahora de manera consciente y precisa el propio proceso de la evolución.

Plasticidad de la estructura secundaria y terciaria del DNA

En los apartados anteriores hemos descrito las formas B y A del DNA, y hemos mencionado brevemente el superenrollamiento del DNA circular. Actualmente se acepta que existen diversas estructuras secundarias y terciarias especiales. Estas estructuras dependen en muchos casos de la presencia de estructuras primarias especiales, y en algunos casos pueden estabilizarse por la presencia de superenrollamiento. Así pues, de entrada debemos examinar con mayor detalle la naturaleza del DNA superenrollado.

CAMBIOS DE LA ESTRUCTURA TERCIARIA: UN EXAMEN MÁS DETENIDO DEL SUPERENROLLAMIENTO

Para obtener una impresión cuantitativa de lo que significa el superenrollamiento, examinemos el "experimento imaginario" que se describe en la Figura 4.24. Consideremos la molécula de DNA lineal de la Figura 4.24a. Como contiene un número de pares de bases suficiente para realizar 10 vueltas completas de la hélice decimos que tiene una **torsión** (T) = 10. Supongamos que cogemos esta molécula de DNA, la colocamos plana sobre una superficie, y juntamos los extremos 5′ y 3′ de cada cadena (Figura 4.24a). Como la molécula de DNA contiene un número de pares de bases suficiente para dar 10 vueltas completas de la hélice, los extremos 5′ y 3′ de cada cadena estarían en posición de encontrarse y podríamos unirlos de forma covalente. (Determinadas enzimas denominadas *ligasas* pueden realizar esta unión en las células.) Esta conexión crearía un círculo relajado que podría estar aún aplastado sobre la superficie (Figura 4.24b). La molécula cerrada de forma covalente tiene ahora otra propiedad: las cadenas están entrelazadas 10 veces. Decimos que tiene un **número de ligazón** (L) de 10.

Supongamos ahora que, antes de que se unan los extremos de esta doble hélice a derechas, realizamos una vuelta a la izquierda, desenrollando una vuelta, reduciendo así el número de ligazón a 9. Este cambio impondría una tensión sobre el DNA circular, que podría responder de dos maneras:

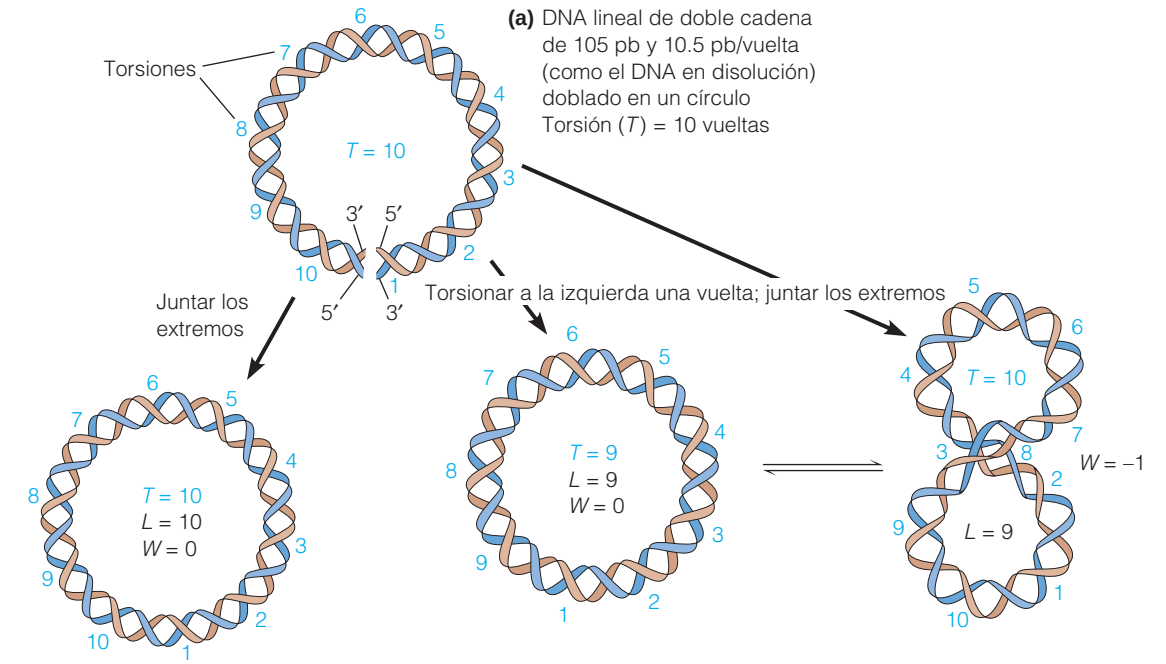


FIGURA **4.24**

Formación de un DNA superenrollado. Podemos imaginar la construcción de un DNA circular lineal de diversas formas. **(a)** Se coloca un DNA lineal plano. Tiene 105 pares de bases y 10.5 pb/vuelta, por lo que hay 10 vueltas; $T = 10$. **(b)** Dado que hay un número entero de giros, podemos unir los extremos 5′ y 3′ sin provocar una vuelta, de manera que se forme un círculo relajado colocado plano. El número de ligazón es $L = 10$ y el de retorcimiento es $W = 0$. **(c)** Si reducimos el número de vueltas antes de unir los extremos, desenrollando el DNA una vuelta, el círculo cerrado tendrá $L = 9$. Si continuamos exigiendo que la molécula de DNA esté plana, la torsión de la hélice debe cambiar. Tenemos ahora que $L = 9$, $T = 9$ y $W = 0$. Con $T = 9$ en 105 pb, el DNA se ve forzado a adquirir una conformación con 105/9 = 11.67 pb/vuelta. **(d)** En vez de cambiar su torsión, la molécula de DNA tensada puede retorcerse o superenrollarse, de manera que $L = 9$, $T = 10$ y $W = –1$. Las moléculas tensadas suelen superenrollarse en lugar de cambiar su torsión.

1. La molécula podría continuar plana sobre la superficie, con una reducción de su torsión a 9 ($T = 9$, como se muestra en la Figura 4.24c). El valor normal de 10.5 pares de bases por vuelta de la hélice aumentaría hasta 11.67. La tensión sobre esta molécula de DNA se expresa en su torsión "no natural"; se dice que está *infraenrollada*. (Si hubiéramos añadido una vuelta adicional a la derecha en vez de a la izquierda, el círculo estaría también tensado, pero estaría *sobreenrollado*, con 11 torsiones y 9.54 pares de bases/vuelta.)
2. La molécula podría recuperar su torsión original ($T = 10$) envolviéndose sobre sí misma en una vuelta superhelicoidal negativa (a izquierdas), como se muestra en la Figura 4.24d. El número de vueltas superhelicoidales de este tipo se denomina **retorcimiento** (W, *writhe*); en este caso $W = –1$. (Si hubiéramos añadido una vuelta a la derecha, la molécula podría formar un retorcimiento positivo, o a derechas, con $W = +1$; en la primera respuesta, sin superenrollamiento, $W = 0$.)

Cuando desenrollamos una vuelta y luego juntamos, producimos una molécula en la que las dos cadenas están entrelazadas sólo 9 veces; $L = 9$. La magnitud L permanecerá inalterada aunque podemos distribuir la tensión de infraenrollamiento entre la torsión y el retorcimiento. De esta manera, las dos formas de la Figura 4.24c y 4.24d tienen ambas un $L = 9$.

Obsérvese que en cada caso, el número de ligazón es la suma algebraica de T y W:

$$L = T + W \tag{4.1}$$

La única manera de cambiar L es cortando, retorciendo y volviendo a unir la molécula circular, por ejemplo, mediante topoisomerasas. Cuando añadimos el

El número de ligazón es siempre la suma algebraica de la torsión y el retorcimiento.

giro adicional hacia la izquierda al inicio de nuestro experimento, cambiamos el valor de L en –1 ($\Delta L = -1$). La tensión impuesta al añadir ΔL vueltas adicionales en la hélice del DNA se distribuye a sí misma entre un cambio de la torsión y un cambio del retorcimiento:

$$\Delta L = \Delta T + \Delta W \tag{4.2}$$

donde ΔL es positivo o negativo en función de que las torsiones adicionales (ΔT) y las vueltas superhelicoidales adicionales (ΔW) sean a derechas (positivas) o a izquierdas (negativas).

La densidad superhelicoidal, σ, es una medida cuantitativa de la intensidad del superenrollamiento.

La superhelicoidalidad de las moléculas de DNA se expresa a menudo mediante la **densidad superhelicoidal**, $\sigma = \Delta L/L_0$, donde L_0 es el número de ligazón para el DNA en estado relajado. Muchas de las moléculas de DNA naturales tienen densidades superhelicoidales de aproximadamente –0.06. Para hacernos una idea de lo que esto significa, consideremos una molécula de DNA hipotética de 10 500 pb, que se encuentre en la forma B "clásica", con 10.5 pb/vuelta. En este caso L_0 es 10 500 pb/(10.5 pb/vuelta), es decir, 1000 vueltas. Cada cadena de DNA se cruza con la otra 1000 veces en el círculo relajado. Si la topoisomerasa girasa (véase la página 114) torsionara la molécula hasta una densidad superhelicoidal de –0.06, entonces $\Delta L = -0.06\ L_0$, es decir, $\Delta L = -60$. Este cambio podría acomodarse, por ejemplo, mediante un retorcimiento del eje de la hélice sobre sí mismo 60 veces hacia la izquierda, lo cual correspondería a $\Delta W = -60$, $\Delta T = 0$; la molécula tendría 60 vueltas superhelicoidales a izquierdas. De otra forma, la torsión de la molécula podría cambiar de manera que tuviera 940 vueltas en 10 000 pb ($T = 940$), o 10 500/940 = 11.2 pb/vuelta. Esto correspondería a $\Delta W = 0$, $\Delta T = -60$. Aunque podría producirse cualquier combinación de ΔT y ΔW que sumara –60, las moléculas reales liberan la tensión principalmente mediante el retorcimiento en vueltas superhelicoidales, ya que es más fácil doblar un DNA largo que desenrollarlo. Esto explica las estructuras contorneadas de las moléculas de DNA circulares de doble cadena de las Figuras 4.17b y 4.18.

Las diferencias de superenrollamiento pueden detectarse mediante electroforesis en gel. Como se describe en Herramientas de la Bioquímica 2A, la velocidad con la que se desplaza una molécula mediante electroforesis en una matriz de gel depende de sus dimensiones, por lo que las formas superhelicoidales más compactas se desplazarán con mayor rapidez que las formas relajadas. En la Figura 4.25 se muestran los patrones electroforéticos de las moléculas de

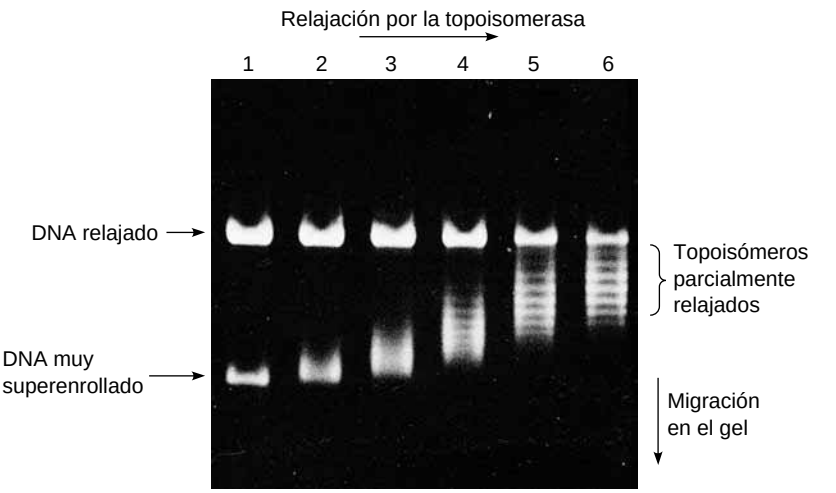


FIGURA **4.25**

Electroforesis en gel en la que se demuestra el superenrollamiento del DNA. Calle 1: una mezcla de DNA relajado y muy superenrollado. Calles 2 a 6: progresión de la relajación catalizada por la enzima topoisomerasa. Se han tomado las muestras a tiempos sucesivos tras añadir la enzima. Los topoisómeros individuales se separan en bandas individuales en el gel. El material muy superenrollado, que forma una serie densa de bandas solapadas en la parte inferior, desaparece gradualmente.

Cortesía de J. C. Wang.

DNA superenrolladas que se van relajando progresivamente mediante la acción de la enzima topoisomerasa. Así pues, la electroforesis en gel nos permite separar los topoisómeros de un determinado DNA.

ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DEL DNA POCO HABITUALES

La mayor parte del DNA y del RNA de las células puede describirse con una de las tres estructuras secundarias siguientes: ovillo aleatorio (que, en realidad, es una carencia de estructura secundaria), forma B y forma A. Pero estas tres formas no agotan las posibilidades de conformación de estas moléculas extraordinarias. En el resto de este capítulo consideraremos algunas de las estructuras más exóticas que se han identificado en los últimos años, y examinaremos las condiciones en las que se producen las transiciones de conformación entre ellas. Veremos que el superenrollamiento desempeña a menudo un papel dominante en estas transiciones.

DNA a Izquierdas (Z-DNA)

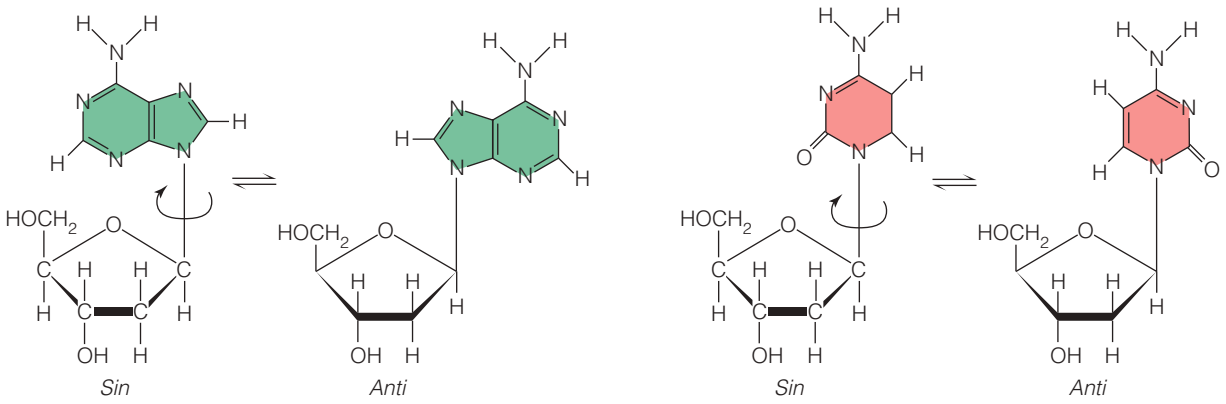
El Z-DNA es una hélice a izquierdas con las bases purina/pirimidina alternadas en una conformación *sin*/*anti* alternada.

Dado que las hélices polinucleotídicas de las formas A y B son a derechas (véase la Figura 4.15), el descubrimiento en 1979 de una forma a izquierdas produjo una sorpresa considerable. Alexander Rich y sus colaboradores realizaron estudios de difracción de rayos X de cristales del pequeño desoxioligonucleótido

$$\begin{matrix} {}^{5'}\text{CGCGCG}^{3'} \\ \vdots\vdots\vdots\vdots\vdots\vdots \\ {}^{3'}\text{GCGCGC}^{5'} \end{matrix}$$

y determinaron que se trataba de una hélice de doble cadena con un apareamiento de bases G-C, tal como esperaban. Sin embargo, los datos sólo eran compatibles con una estructura peculiar de hélice *a izquierdas* a la que denominaron **Z-DNA**. En la Figura 4.26 se presenta un modelo para una molécula de DNA larga en la conformación Z.

Además del sentido inverso de la hélice, el Z-DNA presenta otras peculiaridades estructurales. En los polinucleótidos hay dos orientaciones más estables de las bases respecto a sus anillos de desoxirribosa. Se denominan *sin* y *anti*:



En los polinucleótidos de las formas A y B, todas las bases se encuentran en la orientación *anti*. Sin embargo, en el Z-DNA, las *pirimidinas* están siempre en *anti* y las *purinas* están siempre en *sin*. Dado que el Z-DNA se encuentra, la mayor parte de las veces, en los polinucleótidos con purinas y pirimidinas alternadas en cada cadena (como el que se ha indicado antes), se alternarán las orientaciones de las bases. Los parámetros del Z-DNA (véase la Tabla 4.3, página 112) reflejan esta característica, por cuanto la unidad de repetición no es un par de bases

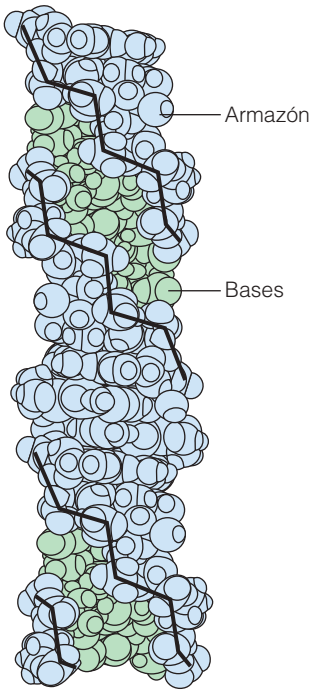


FIGURA **4.26**

Z-DNA. Estructura del Z-DNA determinada mediante estudios de difracción de rayos X de un cristal simple. Compárese esta forma a izquierdas del DNA con el modelo de relleno espacial similar del B-DNA de la Figura 4.11. El único surco del Z-DNA se indica en verde. La línea negra sigue el armazón de fosfato en zigzag.

Cortesía del Dr. A. H.-J. Wang de *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* (1982) 47:41.

sino dos pares de bases. Además, esta alternancia proporciona a los fosfatos un patrón de zigzag; de ahí la denominación de Z-DNA (véase la Figura 4.26).

Existen pruebas abundantes de que el Z-DNA existe in vivo. Sin embargo, la función exacta del Z-DNA in vivo es aún una cuestión abierta. Tal vez sea significativo el hecho de que la metilación de las citosinas en el carbono 5, una modificación bastante frecuente in vivo, favorece la formación de Z-DNA.

Horquillas y cruces

Hemos encontrado ya ejemplos de estructuras de "horquilla", primero en la Figura 4.19c y luego en el RNA de transferencia que se muestra en la Figura 4.20. En cada una de estas moléculas de una sola cadena, la autocomplementariedad de la secuencia de bases permite que la cadena se pliegue sobre sí misma y forme una hélice antiparalela de bases apareadas. La estructura esquemática de un tRNA que se muestra en la Figura 4.27 indica la forma de realizar este plegado de una secuencia de bases concreta.

En algunas secuencias de DNA pueden formarse horquillas dobles, a las que se denomina estructuras **cruciformes**, para lo cual es necesario un tipo especial de secuencia a la que se denomina secuencia **palindrómica**. Este término, de origen literario, indica una frase que se lee igual hacia delante que hacia atrás. Tal como se emplea en las descripciones del DNA, el término señala segmentos de cadenas complementarias que son el inverso exacto (o casi exacto) uno de otro. En la Figura 4.28 se muestra una secuencia de DNA de este tipo, junto con las dos conformaciones que puede adquirir. En la mayor parte de los casos, la formación de la estructura cruciforme deja algunas bases sin aparear en los extremos de las horquillas, lo cual significa que, en circunstancias normales, la estructura cruciforme será menos estable que la estructura extendida. Como veremos más adelante en este capítulo, un efecto de la tensión superhelicoidal es la estabilización de las estructuras cruciformes.

Triples hélices y H-DNA

Se sabe desde hace bastante tiempo que determinados homopolímeros pueden formar *triples* hélices. La primera que se descubrió fue la estructura del ácido ribonucleico

poli(U) · poli(A) · poli(U)

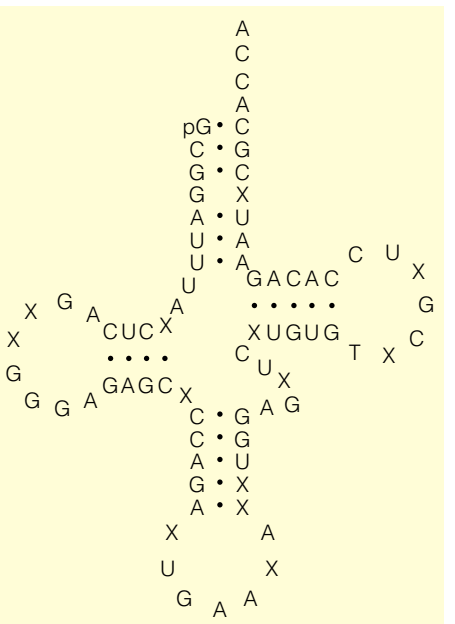


FIGURA **4.27**

La autocomplementariedad determina la estructura terciaria del tRNA. Representación esquemática del tRNA que se muestra en la Figura 4.20. Las X corresponden a bases poco habituales o modificadas (véase el Capítulo 27). La molécula tiene tres brazos en horquilla debidos a la autocomplementariedad. Estos brazos se pliegan en la estructura terciaria de la Figura 4.20.

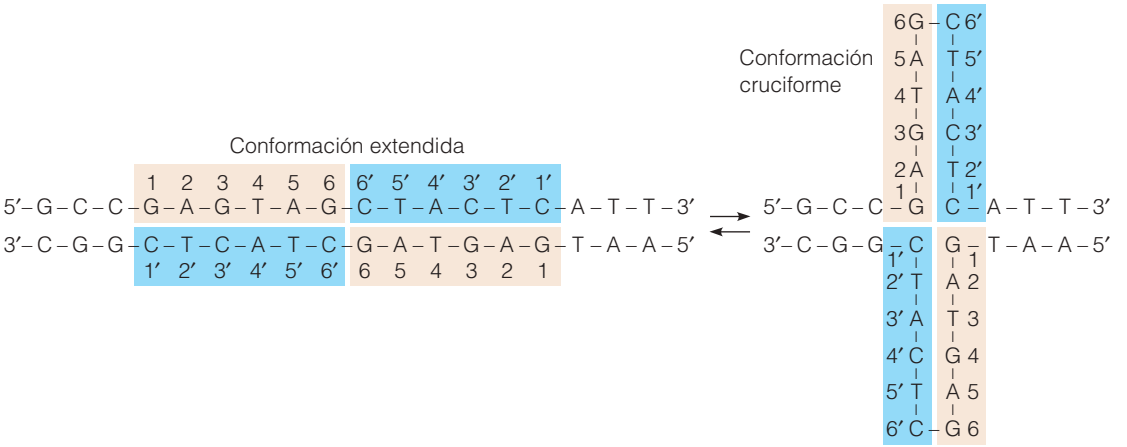


FIGURA **4.28**

Secuencia palindrómica de DNA. Una estructura palindrómica es una tira simétrica respecto a un centro de simetría. Obsérvese que en la parte marrón y azul, los dos segmentos azules dan la misma lectura 5′ ⟶ 3′, que los dos segmentos marrones. La secuencia se presenta en sus conformaciones extendida y cruciforme. A dos bases que se aparean entre sí en la conformación cruciforme se les asigna el mismo número.

Posteriormente se observó que podían formarse tripletes desoxi, como T · A · T y C^+ · G · C (en donde C^+ es una citosina protonada). En estas estructuras, además del apareamiento normal de Watson-Crick, se produce el apareamiento de bases de *tipo Hoogsteen* que se muestra en la Figura 4.29. Actualmente se acepta que muchas cadenas polinucleotídicas, incluyendo parte de la secuencia que no se repite, pueden adoptar estas formas de triple hélice. Recientemente se ha descubierto una estructura poco común que se muestra en la Figura 4.30. Se denomina H-DNA y requiere una molécula que posea una cadena sólo con pirimidinas (Pi) y la otra sólo con purinas (Pu). En el ejemplo mostrado, la estructura

TCTCTCTCTCTC···
···AGAGAGAGAGAG···

puede existir en la forma normal de doble cadena, o bien con una cadena doblada hacia atrás para formar una triple hélice (con los tripletes C^+ · G · C^+ y G · A · G), con lo que queda la otra cadena (Pu) desapareada. De nuevo, la pérdida del apareamiento de bases debe hacer que esta estructura sea inestable, excepto en las situaciones en las que la tensión en la molécula de DNA la favorezca.

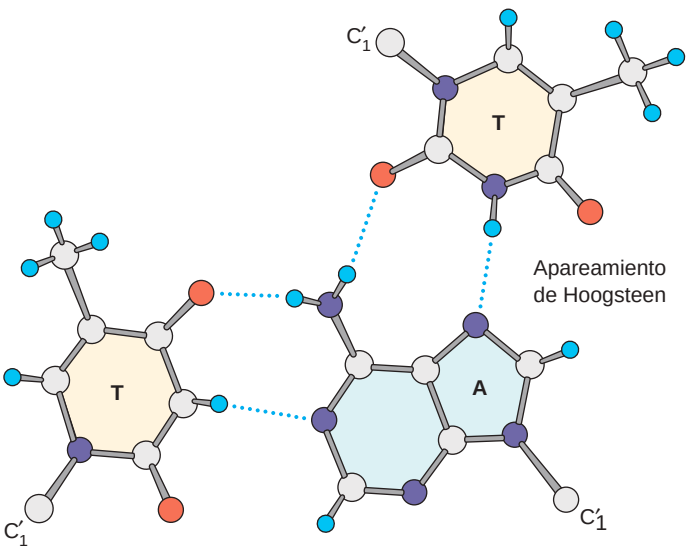


FIGURA **4.29**

Apareamiento de bases en un tipo de triple hélice de DNA. En el mismo residuo A se produce un apareamiento de Watson-Crick normal y el apareamiento poco frecuente de Hoogsteen.

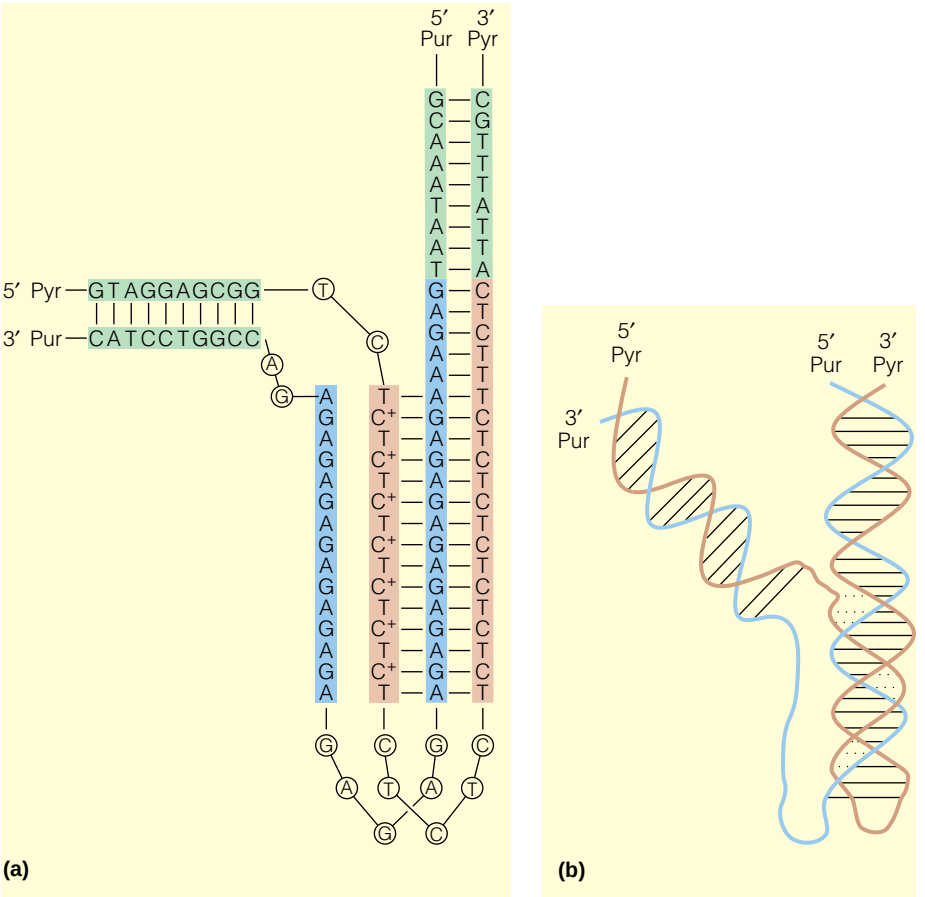


FIGURA **4.30**

H-DNA. Una región de H-DNA tiene una cadena con sólo purinas (azul) y una cadena con sólo pirimidinas (marrón), lo cual le permite formar una hélice de triple cadena al doblarse hacia atrás. Algunos segmentos contienen purinas y pirimidinas (verde). **(a)** La secuencia de nucleótidos que se muestra aquí podría dar origen al H-DNA. Se muestra un segmento de la cadena de purinas unido a dos segmentos diferentes de la cadena de pirimidinas. **(b)** La unión que se muestra en (a) da origen a una hélice de triple cadena, que se muestra aquí de manera esquemática.

Adaptado de E. Palecek, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, G. D. Fasman, ed. (1991) 26, 2:151-226. (Boca Raton, FL: CRC Press, 1991), con permiso.

Ni siquiera estas estructuras tan extrañas como el H-DNA agotan el repertorio de los polinucleótidos. Así, por ejemplo, hay pruebas de la existencia de estructuras de cuatro cadenas que participan en la recombinación del DNA. Sin embargo, dejamos el análisis de estas estructuras para la Parte V.

Estabilidad de las estructuras secundaria y terciaria

TRANSICIÓN HÉLICE-OVILLO ALEATORIO: DESNATURALIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Las estructuras secundarias principales de los polinucleótidos (las formas A y B) son relativamente estables en condiciones fisiológicas para el RNA y el DNA, respectivamente. Sin embargo, no deben ser *demasiado* estables, ya que algunos procesos bioquímicos muy importantes, como, por ejemplo, la replicación y la transcripción del DNA, requieren que se abra la estructura de doble hélice. Esta pérdida de la estructura secundaria cuando se produce en regiones grandes se denomina **desnaturalización** (Figura 4.31). Existen diversos factores que compiten entre sí y crean un equilibrio entre las formas estructurada y no estructurada de los ácidos nucleicos.

Hay dos factores importantes que favorecen la disociación de las dobles hélices en cadenas simples enrolladas de forma aleatoria. El primero es la repulsión electrostática entre las cadenas: a pH fisiológico, cada residuo de una molécula de DNA o de RNA es portador de una carga negativa en el grupo fosfato. Aunque esta carga está neutralizada en parte por contraiones pequeños (como

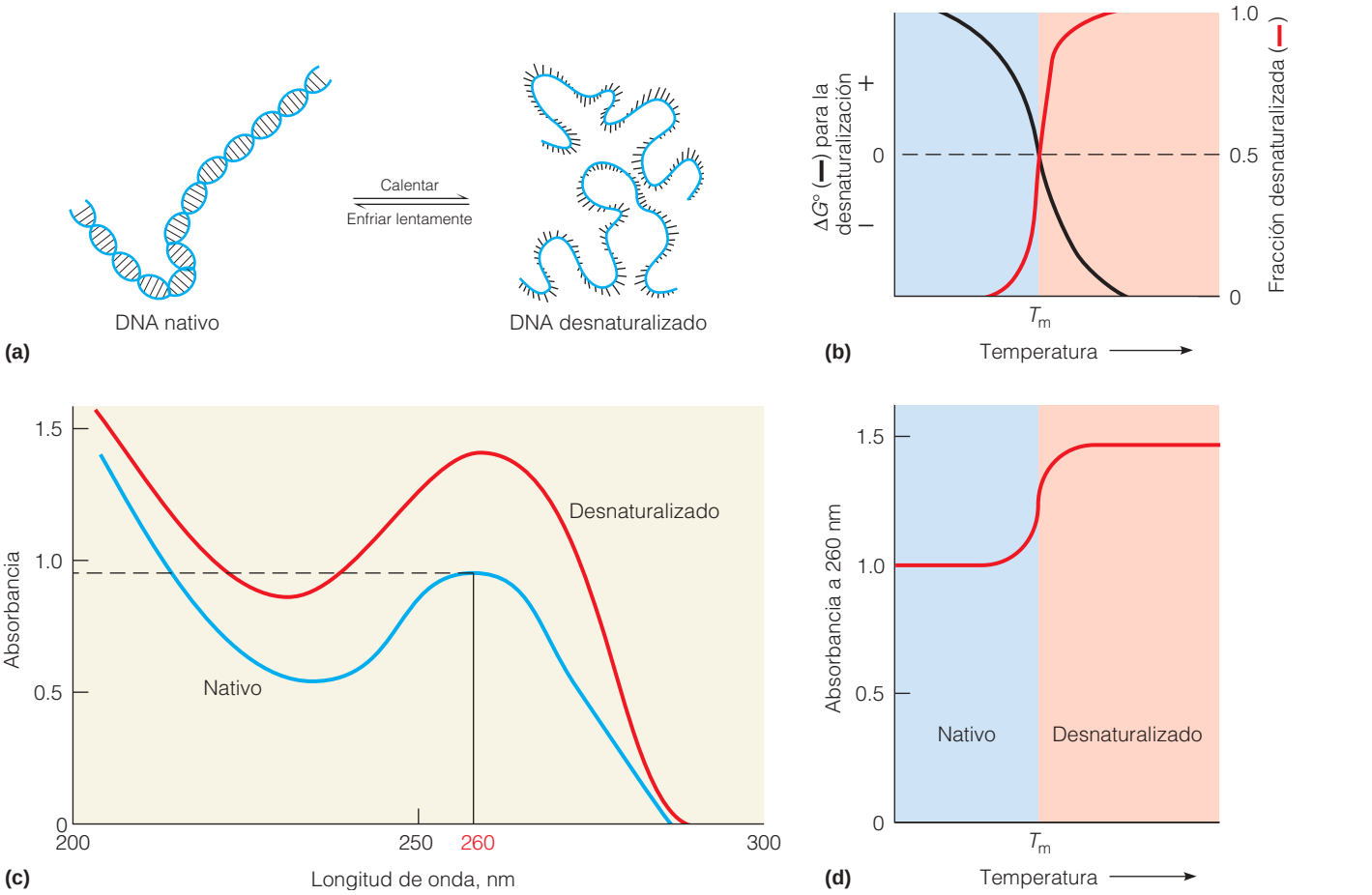


FIGURA **4.31**

Desnaturalización del DNA. **(a)** Cuando el DNA nativo (de doble cadena) se calienta por encima de su temperatura de "fusión", se desnaturaliza (se separa en cadenas simples). Las dos cadenas en ovillo aleatorio tienen una entropía superior a la de la doble hélice. **(b)** A un valor bajo de T, ΔG es positivo y la desnaturalización del DNA no está favorecida. A medida que aumenta T, $-T\,\Delta S$ supera a ΔH con lo que ΔG pasa a ser negativo y la desnaturalización es favorable. El punto medio de la curva señala la temperatura de "fusión", T_m, del DNA. **(c)** Los espectros de absorbancia del DNA nativo y desnaturalizado indican que el DNA nativo absorbe menos luz que el DNA desnaturalizado con una diferencia máxima que se produce a una longitud de onda de 260 nm. Esta hipocromicidad del DNA de doble cadena puede utilizarse para diferenciar las formas nativa y desnaturalizada. **(d)** El cambio de absorbancia puede utilizarse para seguir la desnaturalización del DNA a medida que aumenta la temperatura. A T_m se produce un aumento brusco de la absorbancia correspondiente a la "fusión" brusca del DNA.

K^+, Na^+ y Mg^{2+}) presentes en el medio, continúa existiendo una carga negativa neta considerable en cada cadena de la hélice, que tiende a apartar una cadena de la otra. Por tanto, la fuerza iónica elevada tiende a estabilizar la doble hélice.

Un factor más sutil que favorece la desnaturalización es que la estructura de ovillo aleatorio posee una entropía más alta. Esta mayor entropía se debe al mayor grado de aleatoriedad de la forma desnaturalizada, con sus múltiples configuraciones posibles. Consideremos la ecuación (3.9) de la página 72 ($S = k \ln W$). Si una doble hélice rígida se separa en dos ovillos aleatorios flexibles, el número de configuraciones a las que la molécula puede acceder aumenta enormemente (Figura 4.31a); en consecuencia, la entropía aumenta. El cambio de energía libre que se produce al pasar de una estructura secundaria polinucleotídica de doble cadena (como la forma B del DNA) a cadenas individuales con ovillo aleatorio viene dado por la fórmula habitual:

$$\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S \qquad \text{(hélice} \rightleftharpoons \text{ovillo aleatório)} \qquad (4.3)$$

Dado que ΔS es positivo, el término $(-T\,\Delta S)$ proporciona una contribución negativa al cambio de energía libre, favoreciendo la desnaturalización.

Así pues, hay dos factores que favorecen la transición hélice ⟶ ovillo: la mayor aleatoriedad del ovillo aleatorio ($\Delta S > 0$) y la repulsión electrostática entre las cadenas ($\Delta H_{el} < 0$). Si la estructura helicoidal de doble cadena ha de mantenerse estable en cualquier situación, el valor de ΔG para la reacción de desplegado debe ser positivo. Por tanto, deberemos buscar una contribución po-

sitiva grande de ΔH para compensar los factores que acabamos de mencionar. Las fuentes de este ΔH positivo son los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases y las interacciones de van der Waals entre las bases apiladas. De hecho, las bases planas se apilan una sobre otra en el contacto de van der Waals. Debe emplearse gran cantidad de energía para romper estos enlaces e interacciones y, por tanto, el ΔH total es positivo.

Dado que los valores de ΔH y ΔS de la ecuación (4.3) son ambos positivos, el signo de ΔG cambiará al aumentar T. A baja temperatura, el término $T\,\Delta S$ será menor que el ΔH. El valor de ΔG será > 0, y la hélice será estable. Pero al aumentar la temperatura, $T\,\Delta S$ pasará a ser mayor que ΔH, y ΔG pasará a ser negativo. Así pues, a temperaturas elevadas, la estructura de doble cadena se hace inestable y se separará (Figura 4.31b).

Es posible seguir este proceso de desnaturalización observando la absorbancia de la luz ultravioleta de una longitud de onda de aproximadamente 260 nm en una disolución de DNA. Como se ha indicado en la página 100, todos los nucleótidos y los ácidos nucleicos absorben luz intensamente en esta región del espectro. Cuando los nucleótidos están polimerizados en un polinucleótido, y las bases empaquetadas en una estructura helicoidal, hay poca absorción de luz (Figura 4.31c). Este fenómeno, denominado *hipocromismo*, se debe a la interacción estrecha de los anillos de purina y pirimidina que absorben luz. Si se pierde la estructura secundaria, la absorbancia aumenta y se aproxima más a la de una mezcla de los nucleótidos libres. En consecuencia, el aumento de la temperatura de una solución de DNA, con la consiguiente pérdida de la estructura secundaria, dará lugar a un cambio de la absorbancia como el que se muestra en la Figura 4.31d.

El hecho destacable de esta transición de hélice a ovillo aleatorio es que sea tan brusca. Se produce en un margen de temperatura muy pequeño, casi similar a la fusión del hielo para producir agua, que se describió en el Capítulo 3. Por este motivo, a la desnaturalización de los ácidos nucleicos se la denomina a veces *fusión* de la doble hélice polinucleotídica, a pesar de que este término no sea técnicamente correcto. En el Capítulo 6 encontraremos cambios de configuración bruscos de este tipo en las proteínas. Son siempre característicos de lo que se denominan **transiciones cooperativas**. El significado de este término en el caso del DNA o del RNA es que una doble hélice no puede fusionarse trozo a trozo. Si se examinan las estructuras que se muestran en las Figuras 4.11 y 4.20, puede observarse que sería muy difícil que una sola base se apartara de la estructura apilada unida con enlaces de hidrógeno. Lo que ocurre es que toda la estructura se mantiene unida hasta llegar al límite de la inestabilidad y se desnaturaliza entonces en un margen de temperatura muy estrecho.

Las regiones con AT abundante se funden con mayor facilidad que regiones con GC abundante

La "temperatura de fusión" (T_m) de un polinucleótido depende de su proporción de (G + C)/(A + T). Debido a que cada par de bases G-C forma tres enlaces de hidrógeno y cada par A-T forma tan sólo dos, el valor de ΔH es mayor para la fusión de los polinucleótidos con un contenido elevado de GC. La mayor energía de apilamiento de los pares G-C contribuye también a producir esta diferencia. El valor de T_m corresponde a la temperatura a la que $\Delta G = 0$ (véase la Figura 4.31b y d). Así pues,

$$0 = \Delta H - T_m\,\Delta S \tag{4.4}$$

es decir,

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S} \tag{4.5}$$

A igualdad de número de pares de bases, el valor de ΔS es el mismo para todos los polinucleótidos, pero el ΔH depende de la composición de bases, como acabamos de describir. Ésta es la causa de que T_m aumente al elevarse el contenido de G + C. En la Figura 4.32 se presenta un gráfico de T_m frente al porcentaje de (G + C) para diversos DNA existentes en la naturaleza.

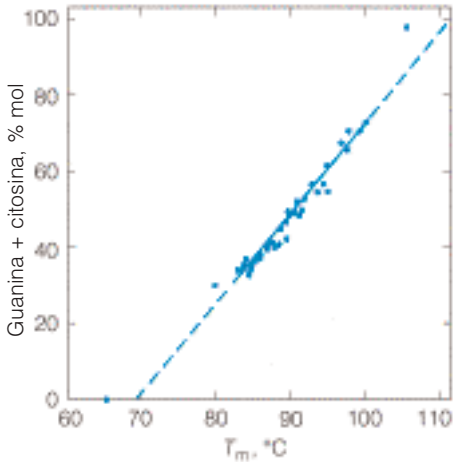


FIGURA **4.32**

Efecto de la coomposición de pares de bases sobre la temperatura de desnaturalización del DNA. En el gráfico se muestra el aumento de la temperatura de "fusión" del DNA a medida que aumenta su porcentaje de (G + C).

Datos tomados de J. Marmur and P. Doty, *J. Mol. Biol.* (1962) 5:120.

ENERGÍA SUPERHELICOIDAL Y CAMBIOS DE LA CONFORMACIÓN DEL DNA

El almacenamiento de energía en el superenrollamiento del DNA es análogo a la energía que se requiere para enrollar (superenrollar) bandas de goma elástica. Esto es, las primeras vueltas resultan fáciles, pero la energía necesaria para cada vuelta aumenta a medida que el enrollamiento va siendo más tenso. De hecho, para el DNA, la cantidad de energía libre almacenada en el superenrollamiento (ΔG_{SC}) es proporcional al *cuadrado* de la densidad superhelicoidal σ:

$$\Delta G_{sc} = K\sigma^2 \qquad (4.6)$$

donde K es una constante. Obsérvese que ΔG_{sc} es cero cuando el DNA está relajado ($\sigma = 0$) y aumenta con un superenrollamiento positivo o negativo. Además, como participa el cuadrado de σ, la energía necesaria para añadir una vuelta adicional aumenta con cada vuelta que se añade, y llega a ser aproximadamente igual a la energía que puede proporcionar un ATP cuando $\sigma \cong \pm 0.06$. Ésta es al menos una de las causas por las que la densidad superhelicoidal está limitada in vivo a alrededor de este valor. El DNA muy superenrollado tiene una gran cantidad de energía almacenada, que puede reducirse mediante *cualquier* proceso que disminuya la densidad superhelicoidal. Por ejemplo, supongamos que tenemos una molécula de DNA circular con vueltas superhelicoidales negativas. Si se quisiera desenrollar y fundir localmente una repetición de la hélice de DNA (10 pares de bases), este cambio equivaldría a un ΔT de –1. Por lo tanto, para compensarlo, tendrá que eliminarse una vuelta superhelicoidal negativa ($\Delta W = +1$): esto es, parte del retorcimiento quedaría compensado por el desenrollamiento local. La conversión de un segmento de B-DNA en Z-DNA sería aún más eficaz y requeriría menos energía. Cada 10 pares de bases de DNA que pasan de la forma B a la Z van desde una torsión de +1 (una torsión a la derecha) a aproximadamente –1 (una torsión a la izquierda). Este cambio simple asciende a $\Delta T = -2$, lo cual permitiría una relajación de 2 vueltas superhelicoidales negativas ($\Delta W = +2$).

La formación de estructuras cruciformes relaja también el DNA superhelicoidal, porque cada par de bases colocado en una horquilla cruciforme se elimina prácticamente de la tensión superhelicoidal. De igual modo, la formación de H-DNA, que deja parte de una cadena sin aparear, tiene el mismo efecto.

En otras palabras, la imposición de un alto grado de torsión superhelicoidal a una molécula de DNA puede fomentar cualquiera de los siguientes cambios: fusión local, formación de Z-DNA, extensión cruciforme, formación de regiones de H-DNA y formación muy probable de algunas otras conformaciones especiales que no se han descubierto aún. Se producirá uno u otro fenómeno en función de las secuencias especiales existentes en el círculo de DNA en tensión. Así por ejemplo:

- La presencia de regiones con abundancia de AT, que funden con mayor facilidad que las zonas con abundancia de GC, puede favorecer la fusión local.
- Las zonas con alternancia purina/pirimidina (como ···CGCGCG···) favorecen la formación de Z-DNA, especialmente si las C están metiladas en el carbono 5.

La energía almacenada en el DNA superenrollado puede utilizarse para impulsar una transformación estructural.

- Las estructuras palindrómicas permitirán la extensión cruciforme.
- Un segmento compuesto fundamentalmente por purinas en una cadena y pirimidinas en la otra puede permitir la formación de H-DNA.

La tensión superhelicoidal está muy extendida y controlada en las moléculas de DNA que se encuentran en las células. Como veremos en capítulos posteriores, las estructuras especiales descritas aquí desempeñan diversos cometidos en la regulación de la expresión de los genes. Resulta atrayente la idea de que los genes puedan activarse y desactivarse mediante cambios del superenrollamiento.

RESUMEN

Existen dos clases de ácidos nucleicos, el DNA y el RNA. Cada uno de ellos es un polinucleótido, un polímero de cuatro tipos de nucleósidos 5′-fosfato, conectados mediante enlaces entre hidroxilos 3′ y fosfatos 5′. El RNA tiene el azúcar ribosa, mientras que el DNA posee desoxirribosa. La unión fosfodiéster es intrínsecamente inestable, pero sólo se hidroliza lentamente en ausencia de catalizadores. Todos los ácidos nucleicos existentes en la naturaleza tienen una secuencia definida o estructura primaria. Los datos iniciales indicaban que el DNA podría ser el material genético, pero hasta que Watson y Crick determinaron en 1953 su estructura secundaria de doble cadena no se puso claramente de manifiesto la manera en la que el DNA podría dirigir su propia replicación. La estructura propuesta por estos autores se basaba en un apareamiento específico entre A y T y entre G y C. La hélice es a derechas, con 10 pares de bases por vuelta. Una estructura de este tipo puede replicarse de una forma semiconservativa, como demostraron en 1958 Meselson y Stahl. Existen otras formas de estructuras polinucleotídicas, la más importante de las cuales es la forma A, que se encuentra en dobles hélices RNA-RNA y DNA-RNA. In vivo, la mayor parte del DNA es de doble cadena; algunas moléculas son circulares. La mayor parte de las moléculas de DNA circular que se encuentran en la naturaleza están superenrolladas. La mayor parte del RNA es de una sola cadena, pero puede plegarse sobre sí mismo para formar horquillas y otras estructuras terciarias bien definidas.

Las funciones biológicas de los ácidos nucleicos pueden resumirse brevemente de la siguiente forma: el DNA contiene la información genética, que se transcribe al RNA. Algunas de estas moléculas de RNA actúan como mensajeros dirigiendo la síntesis de proteínas. El RNA mensajero se traduce en una partícula denominada ribosoma, utilizando el código genético, para producir proteínas. Las técnicas modernas de biología molecular nos permiten manipular el DNA para fabricar nuevas proteínas y modificar las existentes.

El superenrollamiento del DNA puede expresarse mediante la torsión (T) y el retorcimiento (W). Estos términos están relacionados con el número de ligazón (L) mediante la expresión $L = T + W$. Para formar un enrollamiento superhelicoidal se requiere un gasto de energía del ATP, utilizando una enzima denominada girasa. Esta enzima forma parte de una clase de topoisomerasas; otras enzimas relajan el DNA superenrollado.

Los polinucleótidos pueden formar diversas estructuras poco comunes, como el DNA a izquierdas (Z-DNA), las estructuras cruciformes y, en algunos casos, las hélices triples. Las estructuras secundarias de los polinucleótidos pueden modificarse de diversas formas. La hélice puede "fundirse", lo cual implica una separación de las cadenas. Este cambio resulta más fácil en las regiones con abundantes pares A-T. La energía almacenada en el DNA superhelicoidal puede fomentar la fusión local del DNA o el cambio a diversas estructuras alternativas, como la Z-DNA, las estructuras cruciformes o un tipo especial de estructura de triple hélice denominada H-DNA.

BIBLIOGRAFÍA

General

Bates, A. D. y A. Maxwell (1993) *DNA Topology.* Oxford University Press, Nueva York. Un libro pequeño claro y útil.

Dickerson, R. E. (1983) The DNA helix and how it is read. *Sci. Am.* 249(6):94-111. Una descripción breve, con un lenguaje sencillo, pero muy lúcida, de la estructura del DNA.

Saenger, W. (1984) *Principles of Nucleic Acid Structure.* Springer-Verlag, Nueva York. En esta referencia se incluye una información más detallada respecto a la estructura de los ácidos nucleicos que la que se presenta en este libro.

van Holde, K. E., W. C. Johnson y P.-S. Ho (1998) *Principles of Physical Biochemistry.* Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J. Tiene mucho más sobre la estabilidad de los ácidos nucleicos y las transiciones estructurales.

Watson, J. D., N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz y A. M. Weiner (1987) *Molecular Biology of the Gene*, 4ª ed. Benjamin/Cummings, Redwood City, California. Una referencia general precisa.

Histórica

Avery, O. T., C. M. MacLeod y M. McCarty (1944) Studies on the chemical transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 79:137-158. El estudio pionero que dio credibilidad a la idea de que el DNA es la sustancia genética.

Hershey, A. D. y M. Chase (1952) Independent function of viral protein and nucleic acid on growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36:39-56. La prueba convincente de que el DNA es el material genético.

Judson, H. (1979) *The Eighth Day of Creation.* Simon & Schuster, Nueva York. Una presentación detallada y fascinante del desarrollo de las ideas modernas acerca de los ácidos nucleicos.

Maxam, A. M. y W. Gilbert (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560-564.

Meselson, M. y F. Stahl (1958) The replication of DNA in *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44:671-682. Un ejemplo de un experimento diseñado y ejecutado con elegancia.

Sayre, A. (1978) *Rosalind Franklin and DNA.* W. W. Norton, Nueva York. Una descripción de las aportaciones realizadas por esta notable investigadora.

Watson, J. D. (1968) *The Double Helix.* Atheneum, Nueva York (trade and paperback editions); New American Library, Nueva York (paperback). Una narración deliciosa y esclarecedora de la manera en que se determinó la estructura del DNA.

Watson, J. D. y F. H. C. Crick (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738. Dos páginas que revolucionaron al mundo.

Artículos especializados importantes

Bauer, W. R., F. H. C. Crick y J. H. White (1980) Supercoiled DNA. *Sci. Am.* 243(1):118-133. Una descripción del superenrollamiento, de fácil lectura.

Lilley, P. M. J. (1984) DNA: Sequence structure and supercoiling. *Biochem. Soc. Trans.* 12:127-140. Un análisis de los efectos del superenrollamiento.

Maniatis, T. R., C. Hardison, E. Lacey, J. Lauer, C. O'Connell, D. Quon, G. K. Sim y A. Efstratiadis (1978) The isolation of structural genes from libraries of eukaryotic DNA. *Cell* 15:687-701. Un trabajo pionero sobre la manipulación génica.

Palecek, E. (1991) Local supercoil-stabilized DNA structures. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26:161-226. Una revisión muy completa, pero de fácil lectura.

Saenger, W., W. N. Hunter y O. Kennard (1986) DNA conformation is determined by economics in the hydration of phosphate groups. *Nature* 324:385-388.

Vologodskii, A. V. y N. R. Cozzarelli (1994) Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:609-643.

Wells, R., D. A. Collier, J. C. Hanvey, M. Shimizu y F. Wohlrab (1988) The chemistry and biology of unusual DNA structures adopted by oligopurine-oligopyrimidine sequences. *FASEB J.* 2:2939-2949. Se describen las estructuras H-DNA y similares.

Wing, R. M., H. R. Drew, T. Takano, C. Brodka, S. Tanaka, K. Itakura y R. E. Dickerson (1980) Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. *Nature* 287:755-758. Primer estudio cristalográfico de una estructura B-DNA.

PROBLEMAS

1. Se analiza un DNA vírico y se observa que tiene la siguiente composición de bases, en porcentaje molar: A = 32, G = 16, T = 40, C = 12.
   (a) ¿Qué conclusión puede extraerse de inmediato acerca de este DNA?
   (b) ¿Qué tipo de estructura secundaria cree que tendrá?

2. Dada la siguiente secuencia correspondiente a una cadena de un oligonucleótido de doble cadena:

   $^{5'}$ACCGTAAGGCTTTAG$^{3'}$

   (a) Escriba la secuencia de la cadena de DNA complementaria.
   (b) Suponga que sabe que la cadena de arriba tiene fosfato en ambos extremos. Escriba la secuencia para indicar este hecho utilizando una nomenclatura aceptada.
   (c) Escriba la secuencia del RNA complementario de la cadena mostrada.

*3. Algunas secuencias polinucleotídicas existentes en la naturaleza son *palindrómicas*, es decir, son autocomplementarias respecto a un eje de simetría. Un ejemplo de secuencia de este tipo es la siguiente:

   ···TCAAGTCCATGGACTTGG

   AGTTCAGGTACCTGAACC

   Indique de qué manera podría formar esta estructura una conformación de doble horquilla, o cruciforme. Indique el centro de simetría de la secuencia y las uniones cruciformes.

4. El genoma de *E. coli* tiene una densidad superhelicoidal in vivo de alrededor de –0.06. Suponiendo que el DNA tiene 10.5 pb/vuelta, ¿cuál es el número de retorcimiento esperado del genoma de *E. coli*?

*5. Dada la siguiente secuencia de una molécula de RNA, encuentre una estructura secundaria que tenga la máxima estabilidad.

GUCCAGCCAUUGCGUUCGCAAUGGC

6. La mayor de las moléculas de RNA de doble cadena del virus de polihedrosis citoplasmática contiene 5150 pares de bases (véase la Tabla 4.5). ¿Qué longitud cabría prever que tuviera esta molécula si se colocara extendida?

7. Un DNA circular de doble cadena contiene 2100 pares de bases. Las condiciones de la disolución son tales que el DNA tiene 10.5 pares de bases por vuelta.
   (a) ¿Cuál es el L_0 de este DNA?
   (b) Se observa que el DNA tiene 12 vueltas superhelicoidales a la izquierda. ¿Cuál es la densidad superhelicoidal σ?

*8. En un DNA superenrollado, un segmento de unos 20 pares de bases pasa de la forma B a la forma Z. ¿Cuál es el cambio de (a) T, (b) L y (c) W?

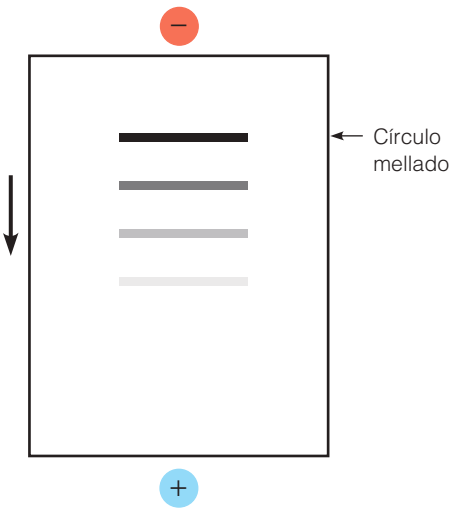
9. De las moléculas de DNA que se indican en la Tabla 4.4, ¿cuál cabría prever que tuviera el valor máximo y el valor mínimo de T_m?

10. Una investigadora aísla el genoma de DNA de un virus. Intenta realizar un análisis de fusión, pero obtiene tan sólo un 10% de hipocromicidad.
   (a) Sugiera una explicación para este valor bajo.
   (b) ¿Por qué cree que obtiene *esta* cantidad?

11. Un determinado DNA de doble cadena tiene un punto de fusión de 94°C en las condiciones utilizadas en la Figura 4.32. Estime la composición de bases (en porcentaje molar) de este DNA.

*12. Se ha descrito la existencia de una variante de la forma B del DNA en presencia de iones Li^+. Mediante difracción de rayos X, se observa que esta forma, denominada C-DNA, tiene 9 $^1/_3$, pares de bases por vuelta.
   (a) ¿Cuántos pares de bases hay en una repetición de esta estructura? ¿Cuántas vueltas hay en una repetición?
   (b) ¿Se encuentra el C-DNA torsionado más o menos estrechamente que el B-DNA?
   (c) ¿Favorecería o no una densidad superhelicoidal elevada al C-DNA respecto al B-DNA?

*13. Un DNA circular cerrado superenrollado se relaja mediante el tratamiento con una topoisomerasa. Sea cual sea la cantidad de enzima utilizada o el tiempo de realización del experimento, el investigador encuentra siempre un patrón de electroforesis en gel que indica algo de DNA con una, dos y tres vueltas de superhélice, además del círculo relajado (mellado) (véase la figura). Sugiera una explicación para esta observación.



*14. El colorante etidio es una molécula plana que puede *intercalarse* en los DNA de doble cadena. Esto significa que se desliza entre los pares de bases apilados adyacentes y al hacerlo desenrolla la hélice de DNA alrededor de 26° por cada etidio unido.
   (a) Si se añade etidio a un DNA circular cerrado relajado, ¿sería negativo o positivo el retorcimiento? Explíquelo.
   (b) ¿Cuál sería el efecto del retorcimiento si el DNA estuviera mellado en una cadena?
   (c) Se ha observado que la adición progresiva de etidio a un DNA superenrollado de forma negativa tiene un efecto peculiar: primero desciende la movilidad electroforética, pero al añadir más etidio, de nuevo aumenta. Explíquelo.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 4A

Introducción a la difracción de rayos X

Hace tan sólo unas décadas, no se conocía prácticamente nada de las estructuras tridimensionales de los ácidos nucleicos, las proteínas y los polisacáridos. En la actualidad, y en gran parte como resultado de la técnica de difracción de rayos X, muchas de estas moléculas se conocen con un grado de detalle que habría dejado atónitos a los bioquímicos de 1950. El método es complicado y sólo puede presentarse aquí una breve introducción al mismo, describiendo lo que mide y lo que puede obtenerse con él.

Cuando una radiación de cualquier tipo pasa a través de una estructura repetitiva regular, se observa *difracción*. Esto significa que la radiación dispersada por los elementos repetitivos de la estructura presenta un refuerzo de las ondas dispersadas en determinadas direcciones específicas y un debilitamiento de las ondas que van en otras direcciones. En la Figura 4A.1 se presenta un ejemplo sencillo, en el que se indica la radiación dispersada por una hilera de átomos espaciados de manera uniforme. Tan sólo en determinadas direcciones

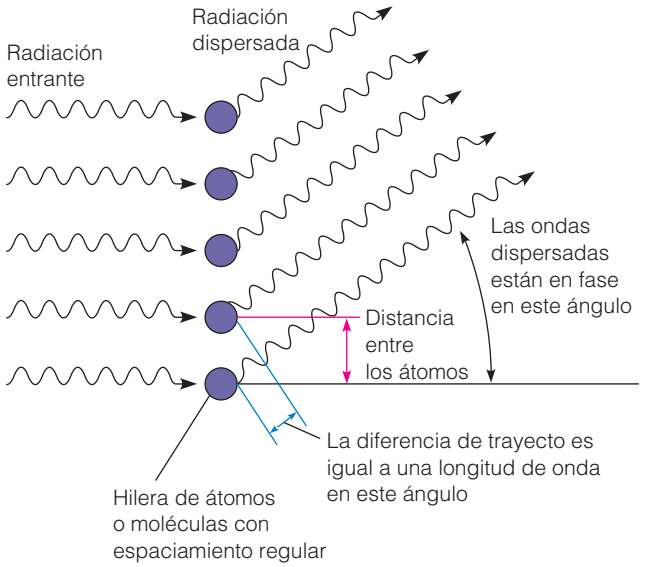


FIGURA **4A.1**
Difracción de una estructura muy sencilla, una hilera de átomos o moléculas.

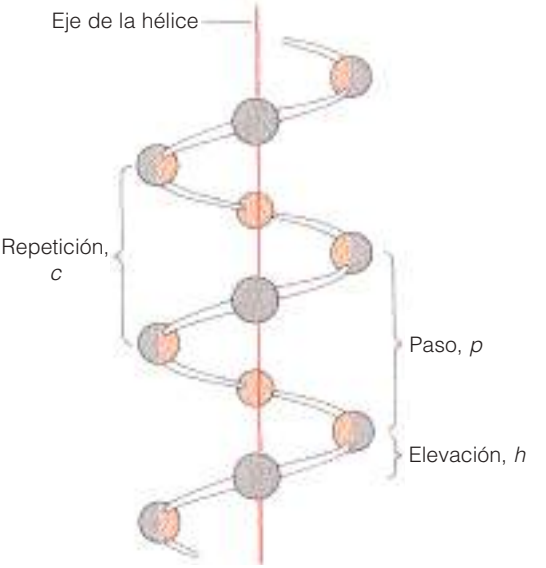


FIGURA **4A.2**
Molécula helicoidal simple.

estarán las ondas dispersadas en fase y se interferirán, por tanto, de manera constructiva (se reforzarán) entre sí. En todas las demás direcciones las ondas estarán fuera de fase y se interferirán de manera destructiva entre sí. Se genera, pues, un **patrón de difracción**. Para que el patrón de difracción esté bien delimitado, es esencial que la longitud de onda de la radiación utilizada sea algo inferior al espaciamiento regular que existe entre los elementos de la estructura. Ésta es la causa de que se utilicen rayos X en el estudio de las moléculas, puesto que los rayos X se caracterizan por tener una longitud de onda de tan sólo décimas de nanómetro. Si el espaciamiento regular existente en el objeto que se estudia es grande (como en una persiana de una ventana), podemos observar exactamente el mismo fenómeno con la luz visible, que tiene una longitud de onda miles de veces superior a la de los rayos X. Observaremos que un motivo puntual, visto a través de la persiana de la ventana, produce un patrón de difracción rectangular de manchas.

La regla que relaciona los espaciamientos periódicos de un objeto con el patrón de difracción es sencilla: a los espaciamientos cortos en la estructura periódica les corresponden espaciamientos grandes en el patrón de difracción, y viceversa. Además, mediante la determinación de las intensidades relativas de las diferentes manchas, podemos determinar cómo está distribuida la materia dentro de cada repetición de la estructura.

Difracción de fibras

Consideraremos en primer lugar la difracción producida por moléculas helicoidales, alineadas de manera aproximadamente paralela al eje de una fibra tensada. Una molécula helicoidal, como la que se representa esquemáticamente en la Figura 4A.2, se caracteriza por determinados parámetros:

La *repetición* (c) de la hélice es la distancia paralela al eje en la que la estructura se repite exactamente. La repetición contiene un número entero (m) de residuos del polímero. En la Figura 4A.2, $m = 4$.

El paso (p) de la hélice es la distancia paralela al eje de la hélice en la que ésta realiza una vuelta completa. Si hay un número entero de residuos por vuelta (como en este caso), el paso y la repetición son iguales.

La *elevación* (h) de la hélice es la distancia paralela al eje, que va desde el nivel de un residuo hasta el siguiente, es decir, $h = c/m$. Si pensamos en una escalera de caracol como ejemplo de una hélice, la elevación es la altura de cada peldaño y el paso es la distancia desde el lugar en el que uno se encuentra hasta el lugar correspondiente situado directamente encima.

Supongamos que deseamos investigar un polímero con la estructura helicoidal que se muestra en la Figura 4A.2. Se extrae una fibra de una disolución concentrada del polímero. El estiramiento adicional de la fibra producirá un alineamiento aproximado de las moléculas helicoidales largas con el eje de la fibra. A continuación, se coloca la fibra en un haz de rayos X y se sitúa una película fotográfica por detrás de la misma, como se indica en la Figura 4A.3a. El patrón de difracción, que está formado por manchas puntuales o pequeños arcos, tendrá el aspecto de la Figura 4A.3b. Puede leerse de la siguiente forma: según la teoría de la difracción, una hélice produce siempre un patrón de este tipo en forma de cruz. Por tanto, sabemos que nos encontramos ante una estructura helicoidal. Todas las manchas se encuentran en líneas perpendiculares al eje de la fibra; estas líneas se denominan **líneas de capa**. El espaciado entre estas líneas es inversamente proporcional a la repetición de la hélice, c, que en este caso es igual al paso. Obsérvese que el patrón cruzado se repite cada cuarta línea de capa. Este patrón de repetición nos indica que hay exactamente 4.0 residuos

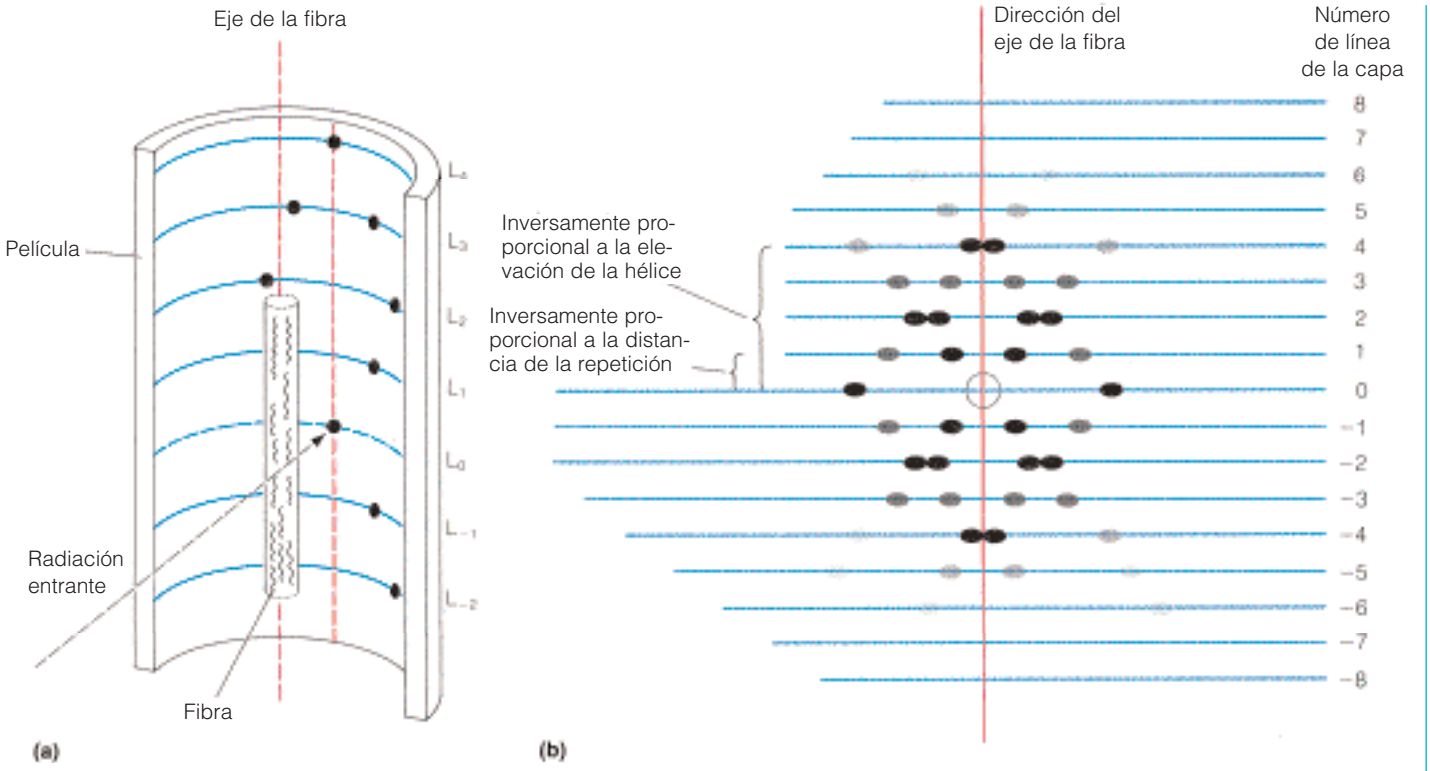


FIGURA **4A.3**

Difracción de fibras. **(a)** Una fibra en un haz de rayos X. **(b)** Patrón de difracción.

por vuelta de la hélice. Así pues, la elevación de la hélice es de *c*/4. Éste es el tipo de prueba que llevó a Watson y Crick a deducir que el B-DNA era una hélice con 10 residuos por vuelta.

La información indicada la proporciona directamente el patrón. Para averiguar la forma exacta en la que están dispuestos los átomos de cada residuo en cada repetición, es necesario un análisis más detallado. Generalmente se establece un modelo utilizando la repetición, el paso y la elevación correctos. El establecimiento del modelo se simplifica porque conocemos las longitudes de enlace aproximadas y los ángulos existentes en muchos enlaces químicos. El modelo ha de inspeccionarse también para comprobar que no hay dos átomos que se aproximen más de lo que permiten sus radios de van der Waals. A partir de un modelo de este tipo, es posible predecir las intensidades de las diversas manchas. Estas predicciones se comparan con las intensidades observadas, y se reajusta el modelo hasta obtener el mejor ajuste posible. La determinación inicial de la estructura del DNA se realizó exactamente así. Como puede observar en la Figura 4.9, los patrones de difracción real de las fibras no están tan bien definidos como los del ejemplo ideal presentado, debido principalmente a una alineación incompleta de las moléculas.

Difracción de cristales

En el estudio de los cristales moleculares, como los formados por pequeños oligonucleótidos, moléculas del tipo del tRNA y proteínas globulares, el investigador se enfrenta con un problema distinto al del estudio de las fibras helicoidales y actúa de una forma bastante diferente. En la Figura 4A.4 se presenta un esquema de un cristal de este tipo. La unidad que se repite es ahora la **celda unitaria**, que puede contener una, dos o más moléculas. La celda unitaria puede considerarse la unidad de construcción básica del cristal. La repetición de la celda unitaria en tres dimensiones (que se indican en la figura mediante flechas) crea el cristal completo. Un análogo bidimensional sen-

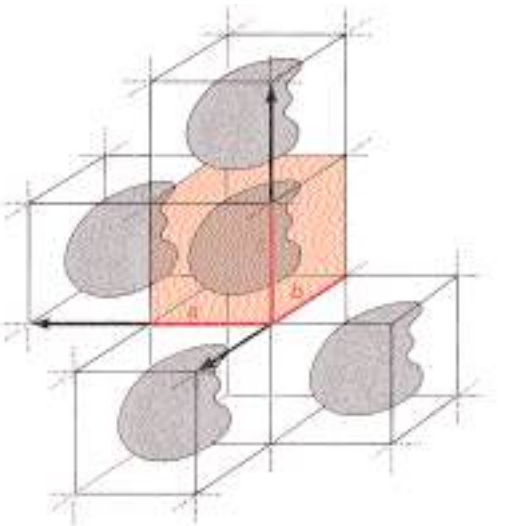


FIGURA **4A.4**

Representación esquemática de un cristal molecular.

cillo de la celda unitaria del cristal es el patrón de repetición del papel de pared. Por muy aleatorio que pueda parecer el patrón de un papel de pared, si uno se fija lo suficiente, siempre puede encontrar una unidad que, por repetición, llena toda la pared.

Al igual que en la difracción de fibras, el paso de un haz de rayos X a través de un cristal molecular produce un patrón de difracción. El patrón que se observa en la Figura 4A.5 se obtuvo a partir de un cristal de un DNA pequeño. De nuevo, el espaciado de las manchas nos permite determinar las distancias que se repiten en la estructura periódica: en este caso, las dimensiones *x*, *y*, *z* de la celda unitaria, que se indican en la Figura 4A.4 con *a*, *b*, *c*. Pero la información importante en los estudios de difracción de cristales es cómo están colocados los átomos *dentro* de cada celda unitaria, ya que esa disposición describe la molécula. De nuevo, esta información está contenida en las intensidades relativas de las manchas de difracción existentes en un patrón como el que se muestra en la Figura 4A.5. Sin embargo, de la difracción de cristales puede extraerse una información más exacta que la del patrón de difracción de una fibra, ya que las moléculas correspondientes de cada celda unitaria del cristal tienen la misma forma y están orientadas de la misma manera. En la difracción de fibras, las moléculas helicoidales pueden tener los ejes apuntando en la misma dirección, pero tienen rotaciones aleatorias alrededor de estos ejes. Esta diferencia en la exactitud de la disposición puede apreciarse comparando la nitidez del patrón de difracción de un cristal que se muestra en la Figura 4A.5 con el patrón de una fibra que se muestra en la Figura 4.9.

Después de obtener el patrón de difracción de un cristal molecular, el investigador mide las intensidades de un gran número de manchas. Si la molécula que se está estudiando es pequeña, es posible proceder de una manera muy similar a la utilizada para los patrones de fibras. Se propone una posible estructura y se calculan las intensidades esperadas, que se comparan con las intensidades observadas. Se perfecciona la estructura hasta que se predicen de manera correcta las intensidades relativas de todas las manchas. Sin embargo, un método de ese tipo no da resultado con una molécula tan compleja como el tRNA que se muestra en la Figura 4.20, puesto que simplemente no es posible imaginar un modelo para una estructura de este tipo.

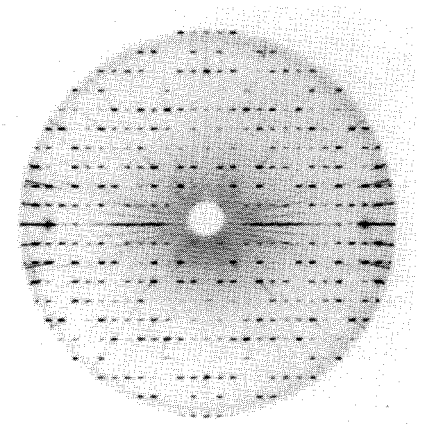


FIGURA **4A.5**

Patrón de difracción producido por un cristal molecular de un DNA pequeño.

Cortesía de C. A. Frederick.

¿Por qué no pasar directamente de las intensidades de las manchas a la estructura? La dificultad radica en que parte de la información contenida en las intensidades de las manchas está oculta. Simplificando enormemente un problema complejo, podríamos decir que es como si las cantidades que el investigador necesitara para deducir la estructura (que se denominan **factores de estructura**) fueran las raíces cuadradas de las intensidades*. Si la intensidad tiene un valor de, por ejemplo, 25, el investigador sabe que el número que necesita es +5 o –5, pero, ¿cuál de los dos? Este tipo de dilema es el fundamento del *problema de la fase*, que impidió durante muchos años el avance de la cristalografía de moléculas grandes. A comienzos de los años 1950 se descubrió una forma de solucionar este problema. Supongamos que puede introducirse un átomo de un metal pesado en algún punto de la molécula, de tal forma que no se alteren la molécula y el cristal. Este proceso se denomina **sustitución isomorfa**. Supongamos ahora que el metal pesado contribuye con un valor de +2 al factor de estructura de la mancha que estábamos comentando. Si el valor original era de +5, el nuevo valor será +7 y el cuadrado será 49. Si el valor original era –5, el valor actual será –3 y el cuadrado será 9. El investigador obtiene una fotografía de difracción del cristal con el metal pesado introducido en el mismo. Si el nuevo cristal tiene una intensidad de 9 para esta mancha, el factor de estructura original debía ser –5 y no +5. Aunque se trata de una simplificación excesiva, este ejemplo nos proporciona el fundamento del método. Generalmente son necesarias muchas sustituciones isomorfas para determinar las fases de los factores de estructura.

Una vez conocidos los factores de estructura de todas las manchas, el investigador puede calcular las posiciones de todos los átomos de la celda unitaria. Lo que se calcula realmente es una distribución de **densidad electrónica** (Figura 4A.6), pero esto representa lo mismo, ya que las regiones de densidad electrónica elevada están donde se encuentran los átomos. En la imagen concreta que se muestra en la Figura 4A.6, estamos viendo un "corte" bidimensional a través de la distribución de densidad electrónica tridimensional.

Conviene revisar ahora los pasos que deben seguirse para determinar la estructura tridimensional de una macromolécula a partir de los estudios de difracción de cristales:

1. Obtener cristales satisfactorios. Este paso es con frecuencia la parte más difícil del procedimiento, ya que los cristales deben ser de buena calidad y han de tener al menos unas décimas de milímetro en su dimensión mínima. Los cristales demasiado pequeños no producen unos patrones de difracción nítidos. Conseguir que las

* Para el lector con una mayor base matemática, señalaremos que los factores de estructura son generalmente números complejos y pueden representarse, por tanto, por vectores en el plano complejo. Lo que determinan las intensidades son sus *amplitudes*, pero no se conocen sus *fases*.

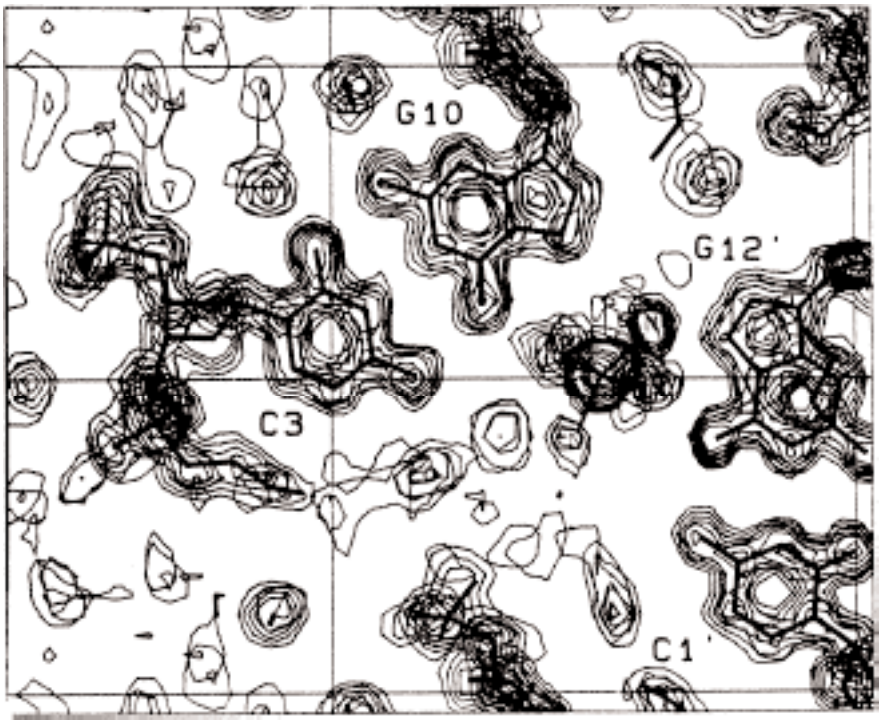


FIGURA **4A.6**

Parte de un mapa de densidad electrónica obtenido a partir del patrón de difracción del cristal de DNA de la Figura 4A.5.

Reproducido con permiso de F. L. Suddath, *Nature* (1974) 248:20-24, fig. 3, p. 22. © 1974 Macmillan Magazines, Ltd.

macromoléculas cristalicen bien continúa siendo más un arte que una ciencia.

2. Registrar el patrón de difracción del cristal, y medir las intensidades de muchas de las manchas.
3. Encontrar alguna forma de realizar sustituciones isomorfas en la molécula. Generalmente son necesarias dos o más sustituciones.
4. Repetir los pasos 1 y 2 para cada derivado isomorfo.
5. Calcular los factores de estructura y, a partir de ellos, la distribución de densidad electrónica. Estos cálculos suelen hacerse en un gran ordenador.

En la mayor parte de los casos, el investigador realizará primero este análisis con un número relativamente reducido de manchas, lo que le proporcionará una estructura de *baja resolución*. Si todo va bien, se miden luego otras manchas y se perfeccionan los cálculos para obtener una resolución mayor. Con los mejores cristales, actualmente es posible obtener resoluciones de alrededor de 0.10 nm. Esta resolución es suficiente para identificar grupos concretos e incluso algunos átomos y para mostrar cómo interactúan unos con otros. En la Figura 4A.7 se muestra detalladamente el anillo fenólico de una cadena lateral de una proteína observada a distintas resoluciones.

La mayor parte de las estructuras tridimensionales detalladas de las macromoléculas biológicas que se muestran en este libro se han determinado mediante estudios de difracción de rayos X de cristales. En la actualidad se conocen centenares de estructuras de este tipo. Este conocimiento representa una enorme cantidad de trabajo de muchos laboratorios, pero los resultados nos permiten comprender la función macromolecular a un nivel que hubiera resultado increíble hace bien poco tiempo.

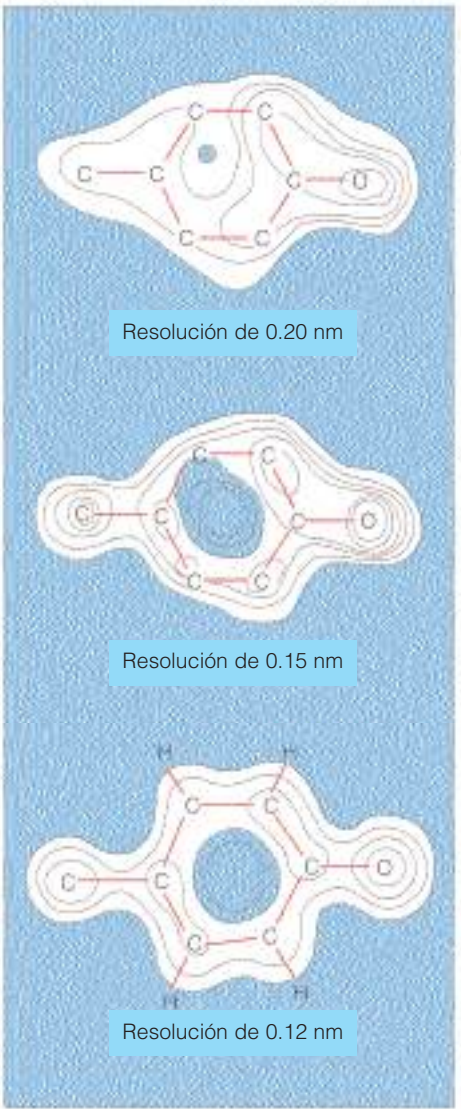


FIGURA **4A.7**

Efecto del aumento de la resolución sobre el detalle molecular observado mediante difracción de rayos X.

De K. D. Watenpaugh, L. K. Sieker y L. H. Jensen, *J. Mol. Biol.* (1980) 138:615-633. © 1980 Academic Press.

Bibliografía

van Holde, K. E., W. C. Johnson y P.-S. Ho (1998) *Principles of Physical Biochemistry*, Capítulo 6. Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J. Un tratamiento más detallado de la difracción de rayos X de los biopolímeros.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 4B

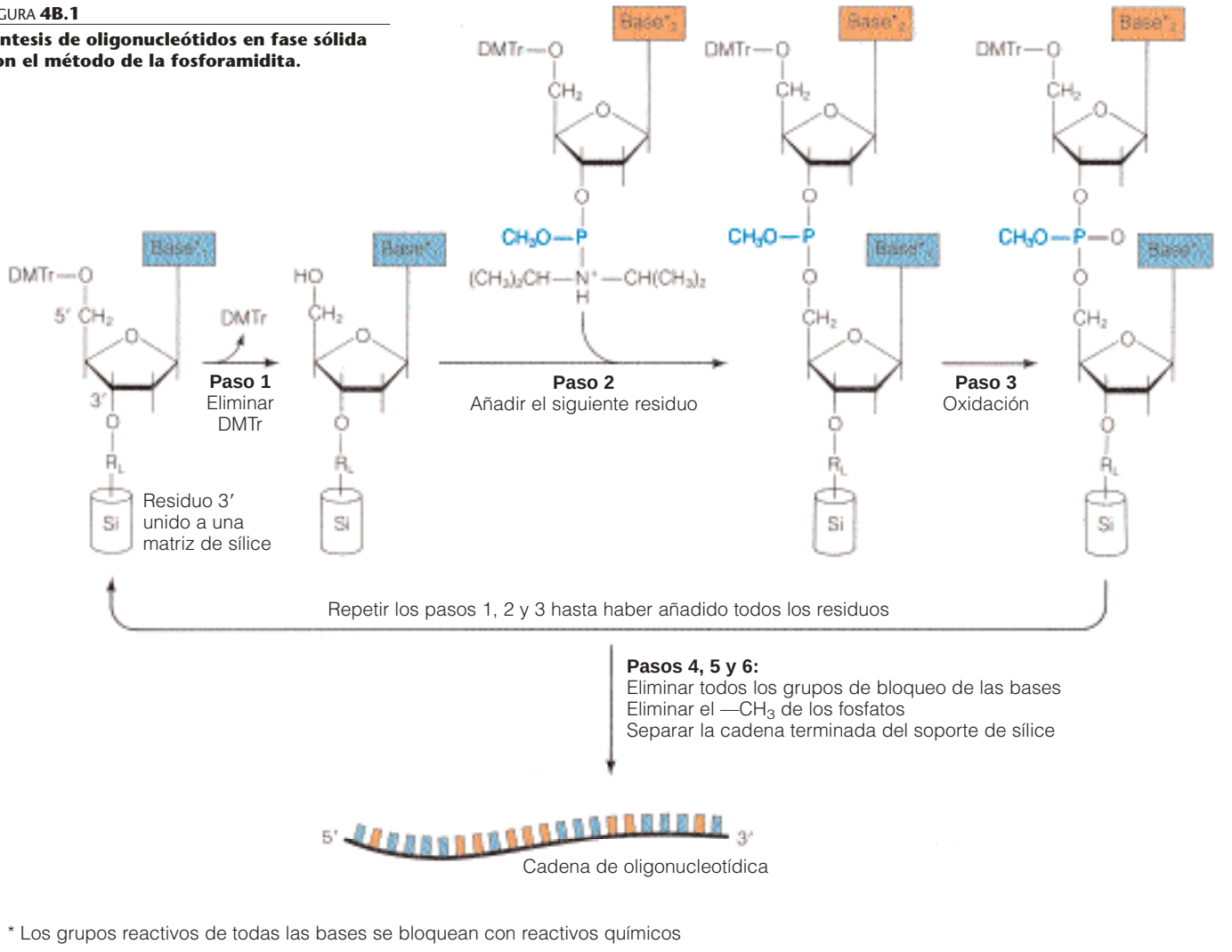
Síntesis química de oligonucleótidos

La biología molecular moderna ha recibido un gran estímulo con la posibilidad reciente de sintetizar en el laboratorio oligonucleótidos de secuencia definida. Estos oligonucleótidos se han utilizado en los estudios de rayos X de la estructura del DNA, en la modificación de los genes y como cebadores para la determinación de la secuencia del DNA (véase el Capítulo 25, Método didesoxi). Actualmente existen varios métodos para realizar estas síntesis, y algunos de ellos permiten preparar polinucleótidos puros de más de 100 bases de longitud. Describiremos una técnica de este tipo, que puede utilizarse en **sintetizadores de DNA** automáticos o "máquinas génicas".

En primer lugar, es preciso satisfacer varios requisitos para obtener un producto puro en una cantidad elevada:

1. Los residuos han de añadirse uno tras otro, y las reacciones deben ser muy eficaces. Aunque sean pocas las cadenas en crecimiento existentes en la mezcla de reacción que no incorporen el residuo previsto en cada paso, se producirá un producto impuro.
2. Deben encontrarse las condiciones que hagan las reacciones favorables termodinámicamente. Esto puede conseguirse con disolventes no acuosos y con formas

FIGURA **4B.1**
Síntesis de oligonucleótidos en fase sólida con el método de la fosforamidita.



* Los grupos reactivos de todas las bases se bloquean con reactivos químicos

$R_L = -C(=O)-(CH_2)_2-C(=O)-NH-(CH_2)_3-O-Si$

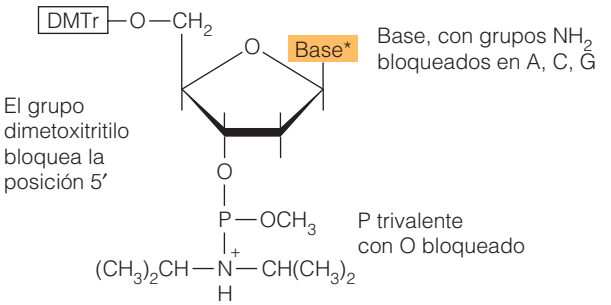
activadas, muy reactivas, de los nucleótidos. También pueden facilitarse las reacciones con el empleo de agentes de condensación para eliminar el agua que pueda producirse en la reacción.

3. Con objeto de evitar reacciones colaterales no deseadas, deben bloquearse químicamente todos los grupos potencialmente reactivos de las moléculas, excepto aquellos cuya reacción se desea obtener.

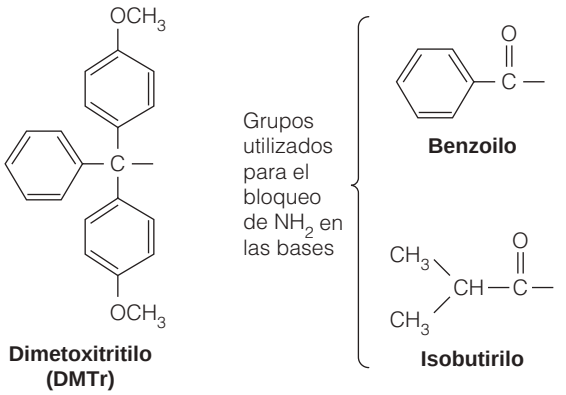
Supongamos que deseamos sintetizar un ácido desoxirribonucleico con una secuencia específica, como por ejemplo,

ATTGACTTAGCC

En la Figura 4B.1 (página 139) se ilustra un método para conseguirlo. Los monómeros utilizados son *fosforamiditas*, moléculas muy reactivas con fósforo *trivalente*.



Obsérvese que los grupos potencialmente reactivos están bloqueados, de manera que no se producirán reacciones colaterales. Las estructuras de los grupos de bloqueo que se utilizan habitualmente son las siguientes



Como se indica en la Figura 4B.1, el nucleótido seleccionado para ocupar el extremo 3′ de la cadena se acopla mediante su hidroxilo 3′ a un soporte de sílice sólido. En el primer paso de la síntesis, se desprende el grupo DMTr. A continuación se añade el siguiente monómero en una forma protonada. Para estabilizar el producto, se oxida el fósforo trivalente al estado pentavalente, formando un *fosfotriéster*. Este proceso se repite, de una forma totalmente automatizada, hasta haber completado la secuencia completa. Finalmente, se eliminan los grupos bloqueantes y se hidroliza la cadena separándola de su soporte de sílice.

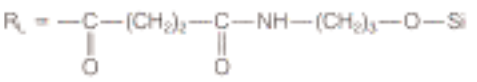
La necesidad de obtener rendimientos de reacción elevados en cada paso puede apreciarse con el siguiente cálculo. En el ejemplo anterior, son necesarios 11 pasos de adición. Si el rendimiento fuera del 90% en cada paso, el rendimiento final del producto deseado sería tan sólo del 31%. En la práctica, habitualmente pueden conseguirse rendimientos de cada paso de alrededor del 98%, con lo que se obtiene un rendimiento final del 80%.

Bibliografía

Beaucage, S. L. y M. H. Caruthers (1981) Deoxynucleoside phosphorimidates: A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 22:1859-1862.

Mattencci, M. D. y M. H. Caruthers (1981) Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185-3191.

* Los grupos reactivos de todas las bases se bloquean con reactivos químicos



CAPÍTULO 5

Introducción a las proteínas: nivel primario de la estructura proteica

COMO HEMOS VISTO, UNA CLASE DE BIOPOLÍMEROS, LOS ÁCIDOS NUCLEICOS, almacena y transmite la información genética de la célula. Gran parte de esa información se expresa en otra clase de biopolímeros, las **proteínas**. Las proteínas desempeñan una enorme variedad de funciones: unas transportan y almacenan moléculas pequeñas; otras constituyen gran parte de la organización estructural de las células y los tejidos. La contracción muscular, la respuesta inmunitaria y la coagulación de la sangre se producen todas ellas mediante proteínas. Quizá las más importantes de todas las proteínas sean las **enzimas**, los catalizadores que facilitan la enorme variedad de reacciones que canalizan el metabolismo en rutas esenciales. Para cumplir esta diversidad de funciones cada tipo de célula en cada organismo posee varios miles de clases de proteínas.

Las proteínas son moléculas extremadamente complejas con el fin de mantener la multiplicidad de sus funciones. Esto puede observarse en la Figura 5.1, que representa la estructura molecular de la mioglobina, una proteína que se utiliza para almacenar oxígeno en los tejidos animales. En este capítulo y en los tres siguientes analizamos con detalle la estructura de algunas proteínas, entre ellas la mioglobina. Veremos que cada proteína tiene una estructura funcional lógica y propia, así como determinadas características comunes con todas las demás proteínas. Las estructuras que pueden parecer excesivamente complejas se comprenden fácilmente cuando se entiende el modo en el que están dictadas sus formas por sus funciones. Empezamos con una descripción de las unidades de estructura química comunes a todas las proteínas, los aminoácidos.

Aminoácidos

ESTRUCTURA DE LOS α-AMINOÁCIDOS

Las proteínas son polímeros de 20 α-aminoácidos distintos.

Todas las proteínas son polímeros, y los **α-aminoácidos** son los monómeros que se combinan para formarlas. En la Figura 5.2a se muestra un α-aminoácido representativo, la valina. El grupo amino está unido al carbono α, el carbono contiguo al grupo carboxilo; de aquí proviene el nombre de α-aminoácido. Al carbono α de cada aminoácido también están unidos un *átomo de hidrógeno* y

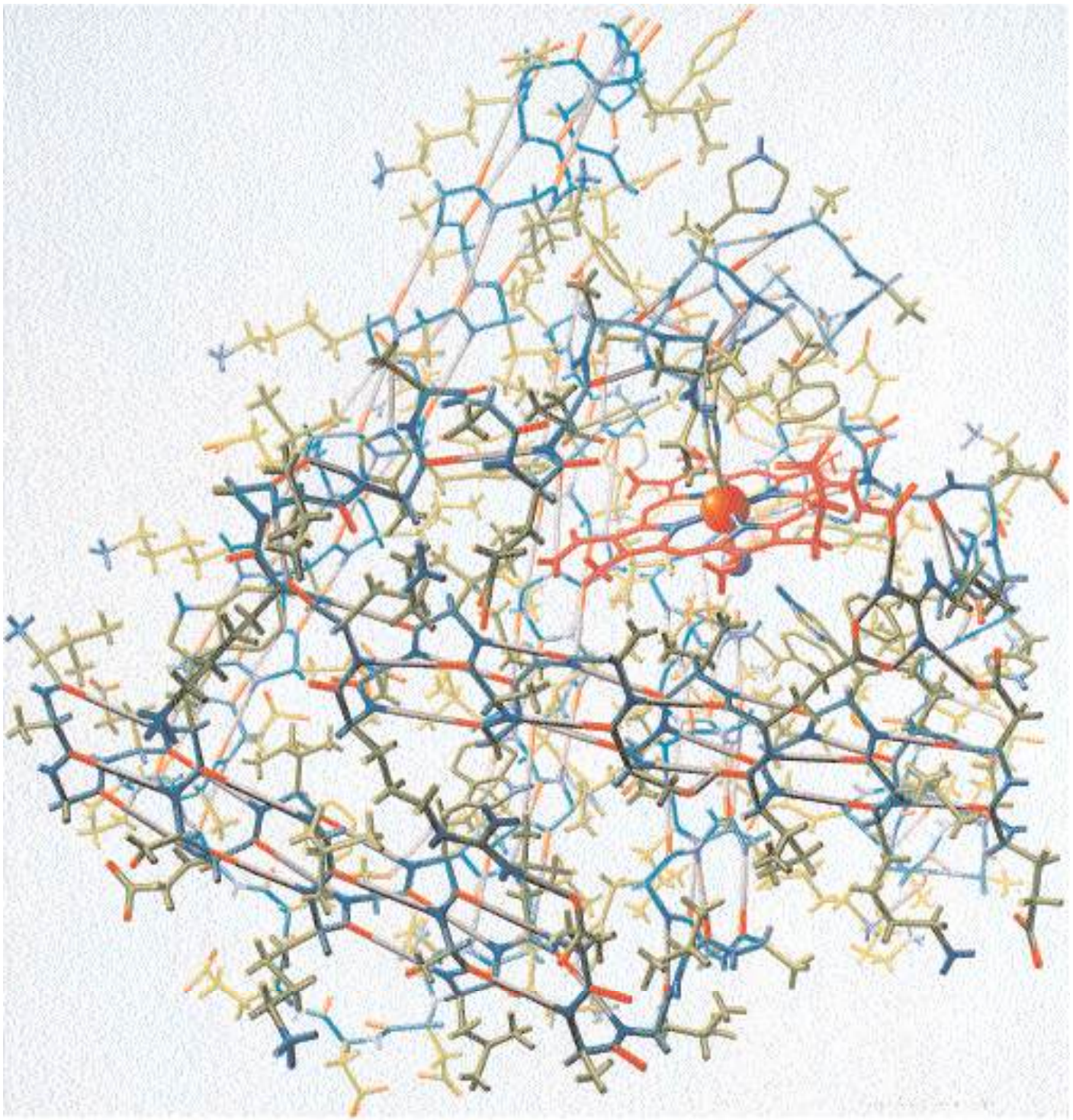
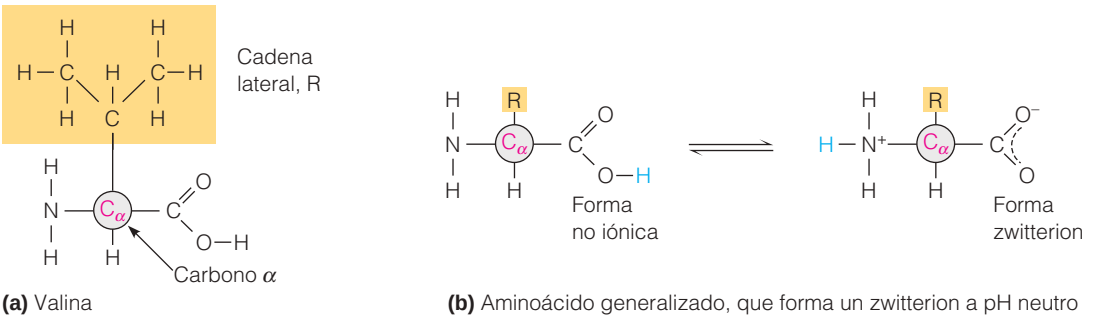


FIGURA **5.1**

Estructura tridimensional de la mioglobina. Este dibujo histórico, de Irving Geis en colaboración con John Kendrew, representa en forma de modelo de bastones la primera proteína cuya estructura se dedujo mediante difracción de rayos X (la mioglobina de cachalote). Por tanto, representa nuestra primera indicación de la complejidad y especificidad de la estructura tridimensional de las proteínas.

© Irving Geis.



(a) Valina **(b)** Aminoácido generalizado, que forma un zwitterion a pH neutro

FIGURA **5.2**

Estructura de los α-aminoácidos. **(a)** La valina, un α-aminoácido representativo, tiene un grupo carboxilo, un grupo amino y un hidrógeno en el carbono α, así como una cadena lateral (R) que le proporciona sus propiedades distintivas. **(b)** Este α-aminoácido generalizado se presenta tanto en su forma no iónica como en la forma zwitterion, a pH neutro. En condiciones fisiológicas, los aminoácidos se encuentran como formas zwitterion en las que el grupo carboxilo ha perdido un protón y el grupo amino ha ganado uno. Obsérvese que la carga negativa en el carboxilo se encuentra deslocalizada entre los dos átomos de oxígeno.

una *cadena lateral* (R). Los distintos α-aminoácidos se diferencian por sus cadenas laterales. La estructura general de un α-aminoácido puede escribirse de la forma que se muestra a la izquierda en la Figura 5.2b. No obstante, esta representación, a pesar de que es químicamente correcta, no tiene en cuenta las condiciones in vivo. Tal como se señaló en el Capítulo 2, la mayor parte de la bioquímica se produce en el margen de pH fisiológico próximo a la neutralidad. El pK_a de los grupos carboxilo y amino de los α-aminoácidos es aproximadamente 2 y 10, respectivamente. Por consiguiente, en la proximidad del pH neutro, el grupo carboxilato habrá perdido un protón y el grupo amino habrá captado un protón, para dar la forma *zwitterion* que se presenta a la derecha en la Figura 5.2b. Se trata de la forma en que por regla general escribiremos las estructuras de los aminoácidos.

En los genes de todos los organismos están codificados veinte aminoácidos diferentes que se incorporan a las proteínas. En la Figura 5.3 se presentan las estructuras completas de estos aminoácidos; en la Tabla 5.1 se dan otros datos im-

TABLA **5.1** **Propiedades de los aminoácidos de las proteínas**

Nombre	Abreviaturas	pK_a del grupo α-COOH	pK_a del grupo α-NH_3^+	pK_a de la cadena lateral[a] ionizable	Masa del Residuo[b] (dalton)	Aparición[c] en las proteínas (% mol)
Alanina	A, Ala	2.3	9.7	—	71.08	9.0
Arginina	R, Arg	2.2	9.0	12.5	156.20	4.7
Asparagina	N, Asn	2.0	8.8	—	114.11	4.4
Ácido aspártico	D, Asp	2.1	9.8	3.9	115.09	5.5
Cisteína	C, Cys	1.8	10.8	8.3	103.14	2.8
Glutamina	Q, Gln	2.2	9.1	—	128.14	3.9
Ácido glutámico	E, Glu	2.2	9.7	4.2	129.12	6.2
Glicina	G, Gly	2.3	9.6	—	57.06	7.5
Histidina	H, His	1.8	9.2	6.0	137.15	2.1
Isoleucina	I, Ile	2.4	9.7	—	113.17	4.6
Leucina	L, Leu	2.4	9.6	—	113.17	7.5
Lisina	K, Lys	2.2	9.0	10.0	128.18	7.0
Metionina	M, Met	2.3	9.2	—	131.21	1.7
Fenilalanina	F, Phe	1.8	9.1	—	147.18	3.5
Prolina	P, Pro	2.0	10.6	—	97.12	4.6
Serina	S, Ser	2.2	9.2	—	87.08	7.1
Treonina	T, Thr	2.6	10.4	—	101.11	6.0
Triptófano	W, Trp	2.4	9.4	—	186.21	1.1
Tirosina	Y, Tyr	2.2	9.1	10.1	163.18	3.5
Valina	V, Val	2.3	9.6	—	99.14	6.9

[a] Valores aproximados observados para las cadenas laterales de los aminoácidos *libres*.
[b] Para obtener la masa del aminoácido en sí, añadir la masa de un mol de agua, 18.02 g. Los valores que se dan son los de las cadenas laterales neutras; para valores de pH en los que se han ganado o perdido protones de las cadenas laterales, se aplican valores ligeramente diferentes.
[c] Promedio para un gran número de proteínas. Las proteínas individuales pueden presentar variaciones importantes respecto a estos valores.

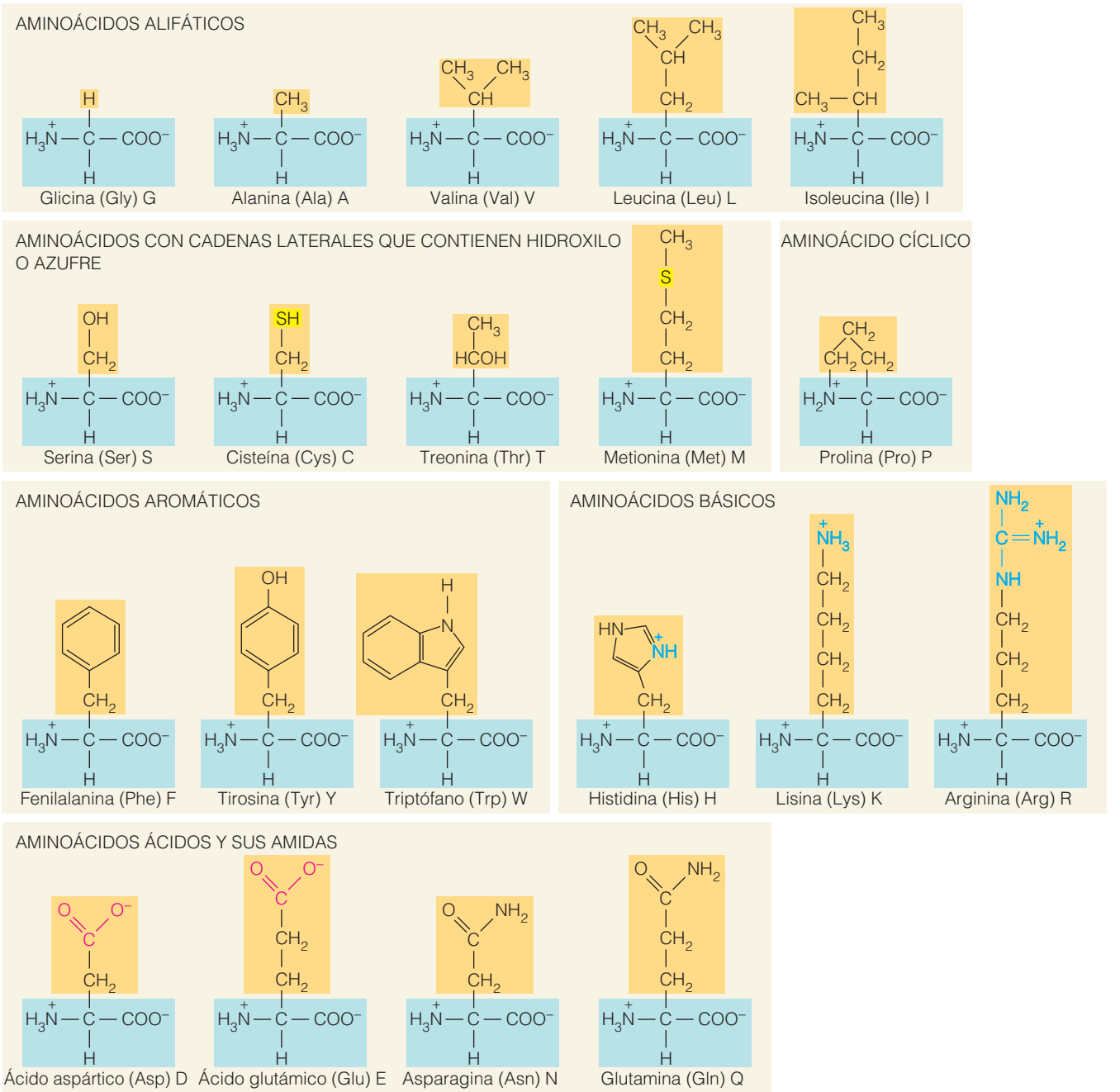


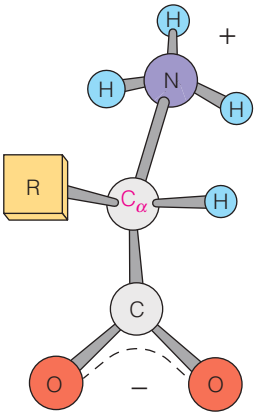
FIGURA **5.3**

Aminoácidos que se encuentran en las proteínas. Los 20 α-aminoácidos que se incorporan a las proteínas se encuentran aquí dispuestos en el orden que se comenta en el texto. Debajo de cada aminoácido está su nombre, su abreviatura de tres letras y su abreviatura de una letra.

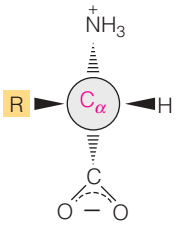
portantes. Obsérvese que la prolina se ha puesto aparte en la Figura 5.3. La prolina es un aminoácido cíclico, porque la cadena lateral está enlazada de nuevo con el átomo de nitrógeno, formando un anillo. En ocasiones se la denomina incorrectamente un iminoácido.

ESTEREOQUÍMICA DE LOS α-AMINOÁCIDOS

Las fórmulas en el plano, como las que se presentan en la Figura 5.3, no evidencian algunas de las características importantes de la estructura de los aminoácidos. Los enlaces alrededor del carbono α son tetraédricos, como sería de esperar, por lo que la representación tridimensional de un aminoácido que se presenta en la Figura 5.4a es más realista. La misma característica puede repre-



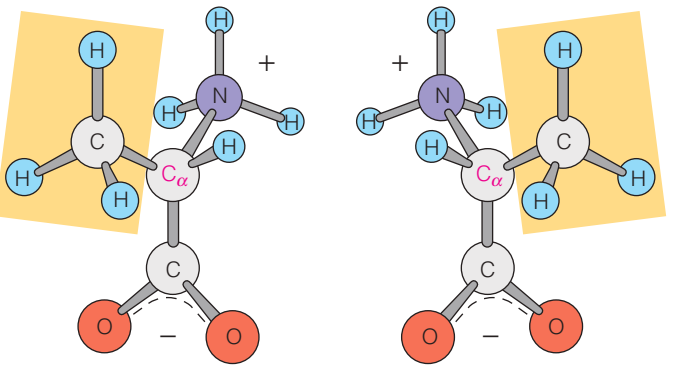
(a) α-Aminoácido



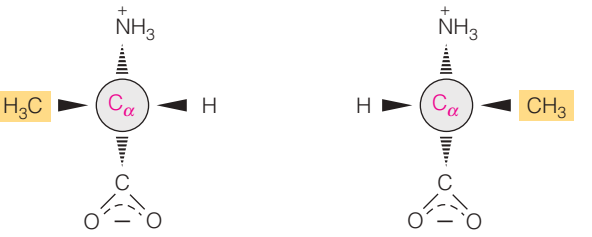
(b) Representación compacta

FIGURA **5.4**

Representaciones tridimensionales de los α-aminoácidos. **(a)** Este modelo de bolas y bastones presenta los ángulos de enlace y la disposición tridimensional de los átomos. El carbono α es quiral, con enlaces tetraédricos. **(b)** En esta presentación compacta, las cuñas sólidas representan enlaces que sobresalen y las cuñas sombreadas representan enlaces retraídos.



(a) L-Alanina D-Alanina



(b) L-Alanina D-Alanina

FIGURA **5.5**

Estereoisómeros de los α-aminoácidos. **(a)** La L-alanina y su enantiómero la D-alanina se presentan en modelos de bolas y bastones. La cadena lateral de la alanina es $—CH_3$. Los dos modelos son imágenes especulares, que no pueden superponerse. **(b)** Los mismos dos enantiómeros en una representación más compacta.

sentarse de forma más compacta del modo que se muestra en la Figura 5.4b. Aquí, las cuñas sólidas representan enlaces que sobresalen de la página, mientras que las cuñas rayadas representan enlaces que se extienden hacia el fondo de la página.

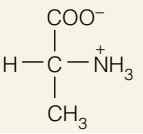
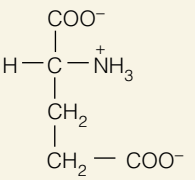
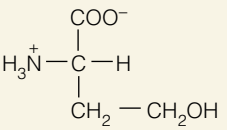
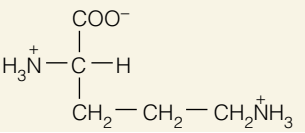
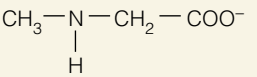
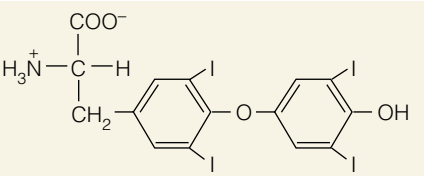
Cuando un átomo de carbono tiene cuatro sustituyentes distintos fijados a él, formando una molécula asimétrica, se dice que el carbono es **quiral**, un **centro de quiralidad** o un **estereocentro**. También se le suele llamar simplemente **carbono asimétrico**. Si una molécula contiene un carbono asimétrico, existen dos **estereoisómeros** distinguibles; se trata de imágenes especulares que no se pueden superponer una a la otra, o **enantiómeros**, como se muestra en la Figura 5.5. Las formas de la alanina que se muestran en esa figura se denominan enantiómeros L y D*. Los enantiómeros L y D pueden distinguirse entre sí experimentalmente debido a que sus soluciones rotan el plano de la luz polarizada en direcciones opuestas. Por esta razón, los enantiómeros se llaman a veces **isómeros ópticos**. Todos los aminoácidos, excepto la glicina, pueden existir en las formas D y L, ya que en todos los casos el carbono α es quiral. La única excepción es la glicina, dado que dos de los grupos unidos al carbono α son iguales (H), con lo que se elimina la quiralidad.

* Quienes estén familiarizados con la química orgánica moderna sabrán que existen dos sistemas para distinguir los estereoisómeros: el anterior sistema D-L y el sistema R-S, más reciente y de mayor alcance. En el Capítulo 9 se comentarán los dos con más detalle.

Todos los α-aminoácidos menos la glicina contienen un carbono α asimétrico y en consecuencia tienen enantiómeros L y D. En las proteínas sólo se encuentran los enantiómeros L.

Para nuestros fines, el hecho importante es que *todos los aminoácidos que incorporan los organismos a las proteínas son de la forma* L. Aunque es evidente que las mezclas aleatorias de los aminoácidos D y L no podrían formar estructuras proteicas tan precisas como la de la Figura 5.1, es sorprendente la preferencia absoluta del isómero L. De hecho, veremos que cada una de las tres clases principales de macromoléculas biológicas tiene una fuerte preferencia por una u otra clase de estereoisómero. La mayor parte de los polisacáridos naturales emplean azúcares D, y asimismo lo hacen el DNA y el RNA. Puede ser que la interacción mutua entre estas sustancias haya establecido estas relaciones muy pronto durante la evolución de la vida. Pero, ¿por qué se eligió un conjunto determinado de enantiómeros? Es difícil ver cómo los aminoácidos L tienen alguna superioridad intrínseca sobre sus isómeros D en lo que se refiere a la función biológica. De hecho, los aminoácidos D existen en la naturaleza, y algunos desempeñan funciones bioquímicas importantes (en la Tabla 5.2 se presentan algunos ejemplos), pero nunca se hallan en las proteínas.

TABLA 5.2 Algunos aminoácidos con importancia biológica que no se hallan en las proteínas

Nombre	Fórmula	Origen bioquímico, función
β-Alanina	$H_3\overset{+}{N}-CH_2-CH_2-COO^-$	Se encuentra en la vitamina ácido pantoténico y en algunos péptidos naturales
D-Alanina		En polipéptidos de algunas paredes celulares bacterianas
Ácido γ-aminobutírico	$H_3\overset{+}{N}-CH_2-CH_2-CH_2-COO^-$	Cerebro, otros tejidos animales; actúa como neurotransmisor
Ácido D-glutámico		En polipéptidos de algunas paredes celulares bacterianas
L-Homoserina		Muchos tejidos; un intermediario del metabolismo de los aminoácidos
L-Ornitina		Muchos tejidos; un intermediario de la síntesis de arginina
Sarcosina		Muchos tejidos; un intermediario de la síntesis de los aminoácidos
L-Tirosina		Glándula tiroides; es la hormona tiroidea (I = yodo)

Muchos científicos han intentado dar explicaciones a esta "preferencia de lateralidad" en biología. La mayoría de ellos apuntan hacia una asimetría intrínseca en el comportamiento de las partículas subnucleares, un tipo de asimetría que proporciona a los electrones que se emiten en la desintegración β un espín preferente a izquierdas. Dichas influencias son muy débiles pero podrían, en una competición entre organismos primitivos que utilizaran proteínas L o D, dar una ligera ventaja a uno u otro. Tras miles de millones de generaciones, hasta una pequeña ventaja puede ser aplastante.

Recientemente, utilizando métodos modernos de síntesis, como los que se describen en Herramientas de la Bioquímica 5D, se ha logrado sintetizar "proteínas" utilizando todos los aminoácidos D. Estas estructuras son las imágenes especulares de las proteínas naturales correspondientes. Una de estas proteínas D sintetizadas es la imagen especular de una proteasa (una enzima fragmentadora de proteínas) del virus de la inmunodeficiencia humana, VIH (véase la Bibliografía). Mientras que su equivalente natural L fragmenta las proteínas naturales L, esta enzima sintética fragmentará tan sólo las que contienen aminoácidos D. Por consiguiente, sería posible la "vida D".

Para la mayor parte de nuestras consideraciones en este capítulo y en los siguientes, la quiralidad de los aminoácidos no es un punto vital. En consecuencia, no dibujaremos sus estructuras indicando la quiralidad sino que, como en el caso de la Figura 5.3, las escribiremos con el grupo amino a la izquierda, el carboxilo a la derecha y el grupo R en la parte superior.

PROPIEDADES DE LAS CADENAS LATERALES DE LOS AMINOÁCIDOS: CLASES DE α-AMINOÁCIDOS

Los 20 aminoácidos contienen, en sus 20 cadenas laterales diferentes, una notable colección de grupos químicos. Es esta diversidad de los monómeros la que permite a las proteínas exhibir una variedad tan grande de estructuras y propiedades. Si examinamos la Figura 5.3, resulta evidente que existen varias clases diferentes de cadenas laterales, que se distinguen por sus características químicas dominantes. Estas características incluyen el carácter hidrófobo o hidrófilo, la naturaleza polar o no polar, y la presencia o ausencia de grupos ionizables. Se han propuesto muchas formas de clasificar los aminoácidos, pero ninguna de ellas resulta totalmente satisfactoria. Comentaremos los aminoácidos en un orden que permita recordarlos con facilidad: la disposición que muestra la Figura 5.3, que va desde el más simple al más complejo.

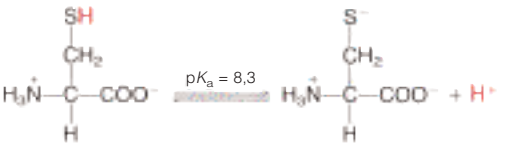
La variedad de cadenas laterales de los aminoácidos permite que las proteínas gocen de una gran versatilidad estructural.

Aminoácidos con cadenas laterales alifáticas

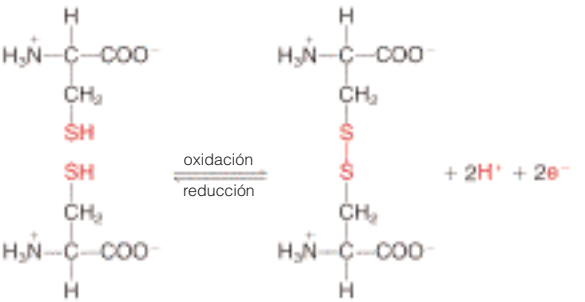
Glicina, alanina, valina, leucina e **isoleucina** poseen cadenas laterales alifáticas, o **alcanos**. A medida que progresamos desde la izquierda hacia la derecha a lo largo de la fila superior de la Figura 5.3, el grupo R se extiende más y se hace más hidrófobo. La isoleucina, por ejemplo, tiene una tendencia mucho mayor a pasar desde el agua a un disolvente de hidrocarburos, que la glicina. Los aminoácidos más hidrófobos, como la isoleucina, se encuentran normalmente *en el interior* de las moléculas proteicas, donde están protegidos del agua. La **prolina**, que es difícil de encajar en alguna categoría, comparte muchas propiedades con los aminoácidos alifáticos. A pesar de que se trata de un aminoácido cíclico, su cadena lateral tiene un carácter principalmente alifático. Sin embargo, la rigidez del anillo, en comparación con la flexibilidad de la mayoría de las cadenas laterales de los aminoácidos, suele dificultar el plegado de los residuos de prolina en las estructuras proteicas.

Aminoácidos con cadenas laterales que contienen hidroxilo o azufre

En esta categoría podemos situar a la **serina, cisteína, treonina** y **metionina**. Estos aminoácidos, debido a que sus cadenas laterales son débilmente polares, son en general más hidrófilos que sus análogos alifáticos, a pesar de que la metionina es bastante hidrófoba. En este grupo, puede destacarse la cisteína en dos aspectos. En primer lugar, la cadena lateral puede ionizarse a pH ligeramente elevado:



En segundo lugar, puede producirse una oxidación entre pares de cadenas laterales de cisteína para formar un **enlace disulfuro**:

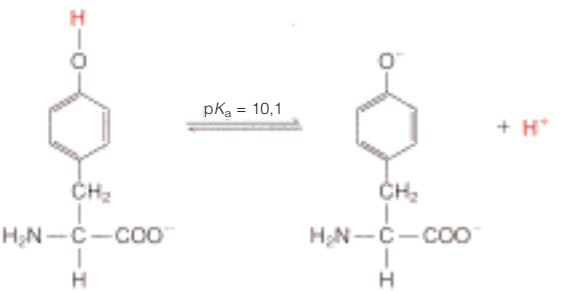


Cisteína **Cistina**

El producto de esta oxidación recibe el nombre de **cistina**. No la hemos incluido entre los 20 aminoácidos porque la cistina se forma siempre por oxidación de dos cadenas laterales de cisteína y no está codificada por el DNA. La presencia de estos enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína en las proteínas suele desempeñar un papel estructural importante.

Aminoácidos aromáticos

Existen tres aminoácidos, **fenilalanina, tirosina** y **triptófano**, que presentan cadenas laterales aromáticas. La fenilalanina, junto con los aminoácidos alifáticos valina, leucina e isoleucina, es uno de los aminoácidos más hidrófobos. La tirosina y el triptófano también presentan un carácter ligeramente hidrófobo, aunque atenuado por los grupos polares de sus cadenas laterales. Además, la tirosina puede ionizarse a pH elevado:



Los aminoácidos aromáticos, como la mayoría de los compuestos que llevan anillos conjugados, absorben luz con fuerza en la región del espectro ultravioleta cercano (Figura 5.6). Esta característica se usa con frecuencia para la detección analítica de las proteínas, midiendo la absorción a 280 nm.

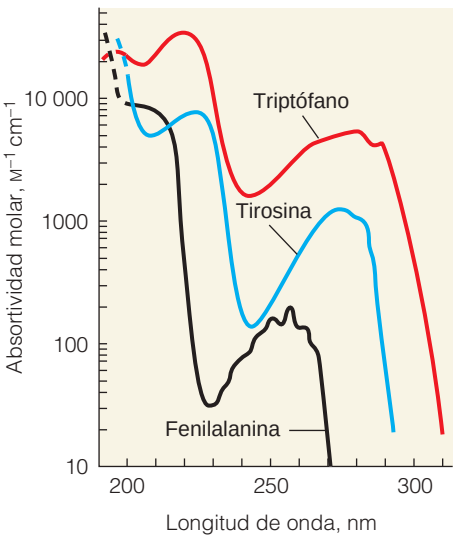


FIGURA **5.6**

Espectros de absorción de los aminoácidos aromáticos en la región del ultravioleta cercano. El triptófano (rojo) y la tirosina (azul) dan cuenta de la mayoría de la absorbancia UV de las proteínas a alrededor de 280 nm. Obsérvese que la escala de absortividad es logarítmica; el triptófano absorbe con una intensidad centenares de veces superior a la de la fenilalanina (negro). No obstante, comparados con los ácidos nucleicos, los aminoácidos sólo absorben débilmente en el UV; véase la Figura 4.5 para la comparación.

Tomado de D. Wetlaufer, *Adv. Protein Chem.* (1962) 17:303–390. © 1962 Academic Press.

Aminoácidos básicos

Histidina, lisina y **arginina** llevan grupos básicos en sus cadenas laterales. Están representados en la Figura 5.3 en la forma que existen a valores de pH próximos a la neutralidad. La histidina es el menos básico de los tres y, como muestra su curva de titulación (Figura 5.7a), el anillo imidazol de la cadena lateral del aminoácido libre pierde su protón a un pH de aproximadamente 6. (En la Tabla 5.1 se presentan los valores de pK_a de las cadenas laterales de los aminoácidos libres.) Cuando la histidina se incorpora a las proteínas, el pK_a se eleva hasta aproximadamente 7 (Tabla 5.3). Dado que la cadena lateral de la histidina puede intercambiar protones cerca del pH fisiológico, suele participar a menudo en la catálisis enzimática que comporta la transferencia de protones. La lisina y la arginina son aminoácidos más básicos y, como indican sus valores de pK_a (Tablas 5.1 y 5.3), sus cadenas laterales están siempre cargadas positivamente en condiciones fisiológicas.

Los aminoácidos básicos son muy polares y en consecuencia suelen hallarse normalmente en las superficies exteriores de las proteínas, donde pueden hidratarse por el entorno acuoso que les rodea.

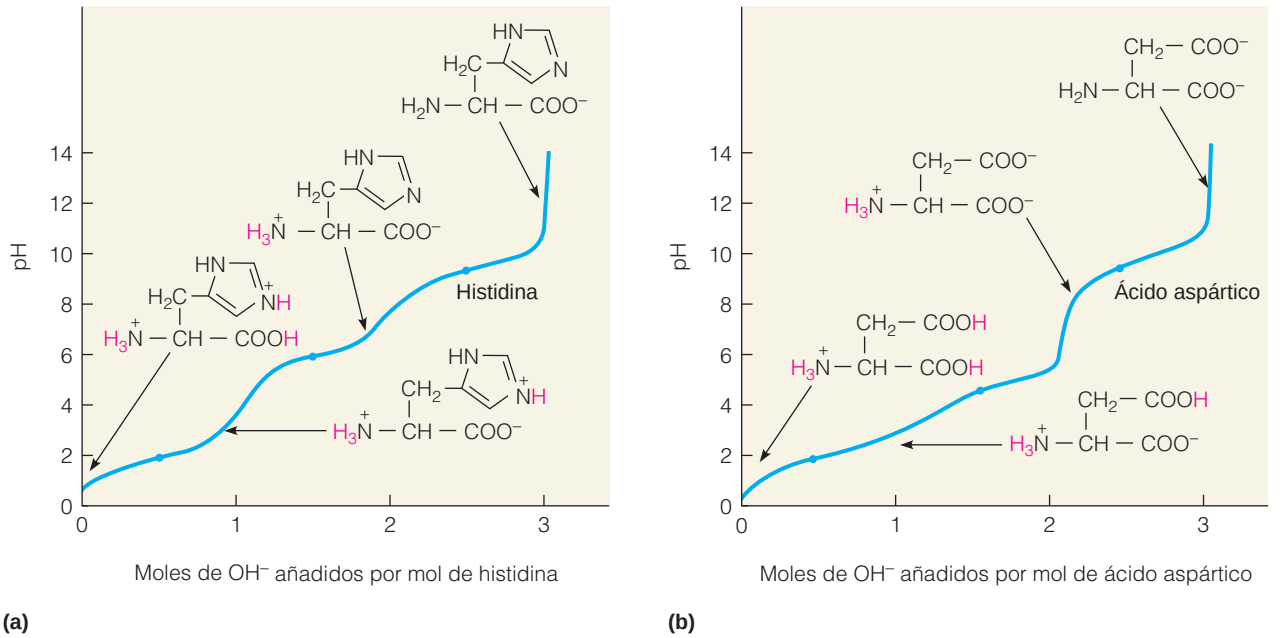
Aminoácidos ácidos y sus amidas

El **ácido aspártico** y el **ácido glutámico** son los únicos aminoácidos que llevan cargas negativas a pH 7; en la Figura 5.3 están representados en las formas aniónicas. La curva de titulación del ácido aspártico se presenta en la Figura 5.7b. Los valores de pK_a de los aminoácidos ácidos son tan bajos (véase la Tabla 5.3) que incluso cuando los aminoácidos se incorporan a las proteínas, la carga negativa de la cadena lateral se conserva en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, se suele denominar a estos residuos de aminoácidos **aspartato** y **glutamato** (esto es, sus bases conjugadas en lugar de los ácidos).

TABLA 5.3 Márgenes habituales observados para los valores de pK_a de los grupos existentes en las proteínas

Tipo de grupo	Margen de pK_a habitual[a]
α-Carboxilo	3.5-4.0
Carboxilos de las cadenas laterales de los ácidos aspártico y glutámico	4.0-4.8
Imidazol (histidina)	6.5-7.4
Cisteína (—SH)	8.5-9.0
Fenólico (tirosina)	9.5-10.5
α-Amino	8.0-9.0
Cadena lateral amino (lisina)	9.8-10.4
Guanidinilo (arginina)	~12

[a] Se observan valores que se encuentran fuera de estos márgenes. Por ejemplo, se han descrito carboxilos de cadena lateral con valores de pK_a de hasta 7.3.



(a) (b)

FIGURA **5.7**

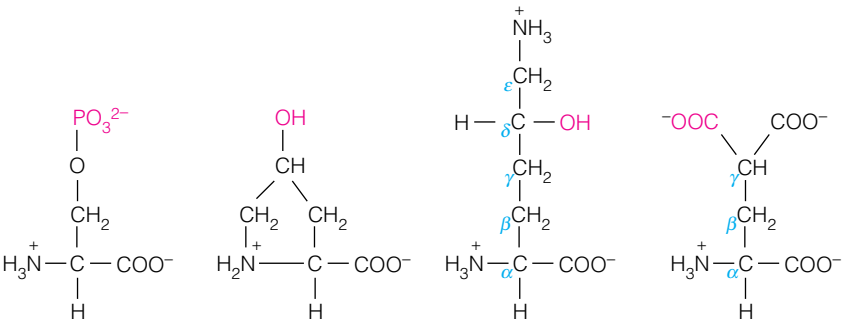
Curvas de titulación de los aminoácidos con cadenas laterales ionizables. Los puntos corresponden a valores de pK_a y se presentan las formas predominantes a distintos valores de pH. Los hidrógenos lábiles aparecen en rojo. **(a)** Histidina. **(b)** Ácido aspártico. En cada caso se supone que la solución de partida se ha ajustado a pH < 2 añadiendo H^+ al aminoácido disuelto.

Los ácidos aspártico y glutámico están acompañados por sus amidas, la **asparagina** y la **glutamina**. A diferencia de sus análogos ácidos, la asparagina y la glutamina tienen cadenas laterales sin carga, aunque son claramente polares. Como los aminoácidos básicos y los ácidos, también son claramente hidrófilos y tienden a encontrarse en la superficie de las moléculas de proteína, en contacto con el agua que los rodea.

AMINOÁCIDOS MODIFICADOS

En ocasiones las cadenas laterales de los aminoácidos se modifican tras su incorporación a una proteína.

Hasta el momento hemos considerado los 20 aminoácidos que están codificados en el DNA y que se incorporan directamente a las proteínas. No obstante, el repertorio de grupos de las cadenas laterales en las proteínas resulta adornado por la capacidad de algunos aminoácidos de modificarse químicamente una vez se han ensamblado en las proteínas. A continuación, se dan las representaciones de algunos de estos *aminoácidos modificados*, con el grupo modificador en rojo.



Volveremos a estudiarlos cuando nos encontremos con proteínas específicas en las que se haya producido esta modificación.

Los aminoácidos de las proteínas no son en modo alguno los únicos que se encuentran en los organismos vivos. Muchos otros aminoácidos desempeñan cometidos importantes en el metabolismo. En la Tabla 5.2 se presenta una lista parcial. Obsérvese que no todos son α-aminoácidos, y que no todos los α-aminoácidos son los enantiómeros L. En capítulos posteriores nos encontraremos de nuevo con todos los aminoácidos de esta tabla.

Péptidos y enlace peptídico

PÉPTIDOS

Los aminoácidos pueden unirse entre ellos de modo covalente por formación de un **enlace amida** entre el grupo α-carboxilo de un aminoácido y el grupo α-amino de otro. Este enlace suele denominarse **enlace peptídico**, y los productos que se forman a partir de esta unión se llaman **péptidos**. En la Figura 5.8 se presenta la formación de un enlace peptídico entre la glicina y la alanina. En este caso el producto se llama un **dipéptido**, porque se han combinado dos aminoácidos. La reacción puede considerarse una simple eliminación de una molécula de agua entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del otro. Obsérvese que la reacción de la Figura 5.8 aún deja un grupo $H_3\overset{+}{N}$— disponible en un extremo del dipéptido, y un grupo carboxilo sin reaccionar en el otro. En consecuencia, en principio la reacción puede continuarse añadiendo,

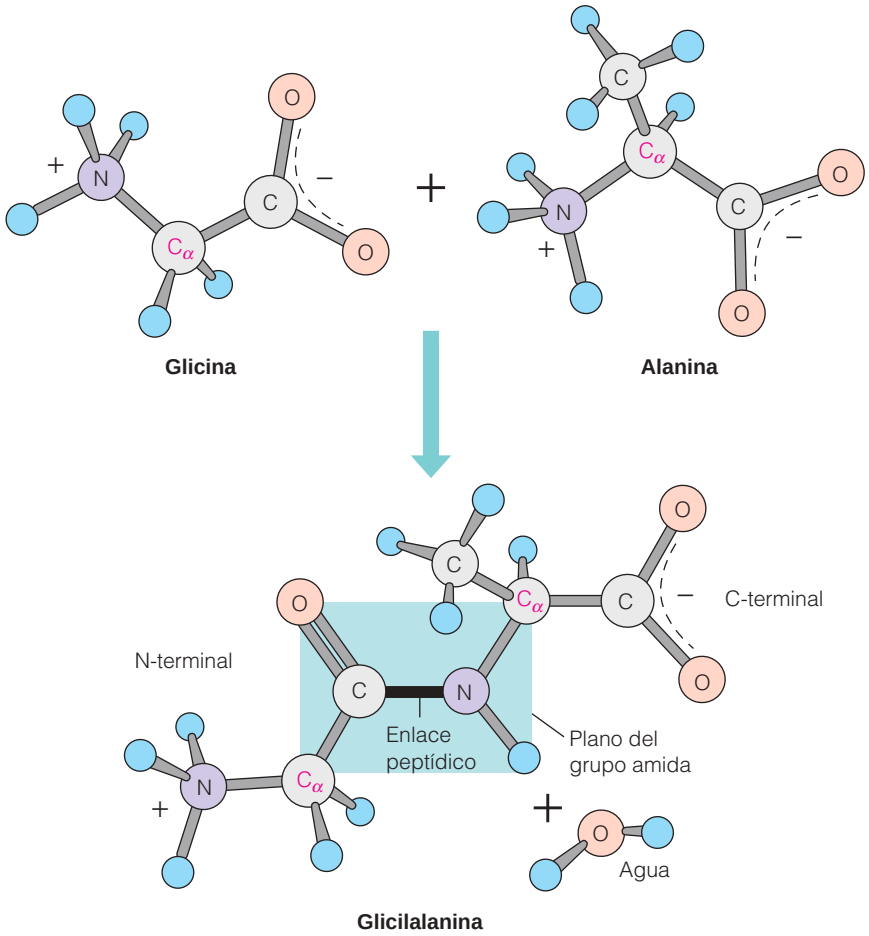
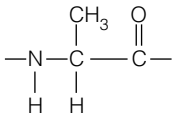


FIGURA **5.8**

Formación de un péptido. Cuando se unen dos aminoácidos, se forma un enlace peptídico. Aquí se representa el dipéptido glicilalanina (Gly-Ala) que se forma cuando la glicina se une a la alanina con la eliminación de una molécula de agua.

por ejemplo, un ácido glutámico a un extremo y una lisina al otro para producir el **tetrapéptido** que aparece en la Figura 5.9. Cada vez que se añade un aminoácido a la cadena, debe eliminarse otra molécula de agua. La porción de cada aminoácido que permanece en la cadena se denomina **residuo de aminoácido**. De este modo, el residuo alanilo en el tetrapéptido de la Figura 5.9 es



Colectivamente, las cadenas que sólo contienen unos pocos residuos de aminoácidos (como un tetrapéptido) se denominan **oligopéptidos**. Si la cadena es muy larga, se llama **polipéptido**. La mayoría de los oligopéptidos y los polipéptidos conservan un grupo amino que no ha reaccionado en un extremo (que se llama **amino terminal** o **N-terminal**) y un grupo carboxilo sin reaccionar en el otro extremo (el **carboxilo terminal** o **C-terminal**). Las excepciones son algunos **oligopéptidos cíclicos** pequeños, en los que se han unido los N-terminales y los C-terminales. Además, muchas proteínas tienen los N-terminales bloqueados por grupos *N*-formilo o *N*-acetilo, y unos pocos tienen carboxilos C-terminales que se han modificado a amidas (Figura 5.10).

Al escribir la secuencia de un oligopéptido o polipéptido, resultaría problemático deletrear todos los nombres de los residuos de aminoácidos. Por este motivo, los bioquímicos suelen escribir estas secuencias mediante las abrevia-

Los oligopéptidos y los polipéptidos se forman por polimerización de los aminoácidos. Todas las proteínas son polipéptidos.

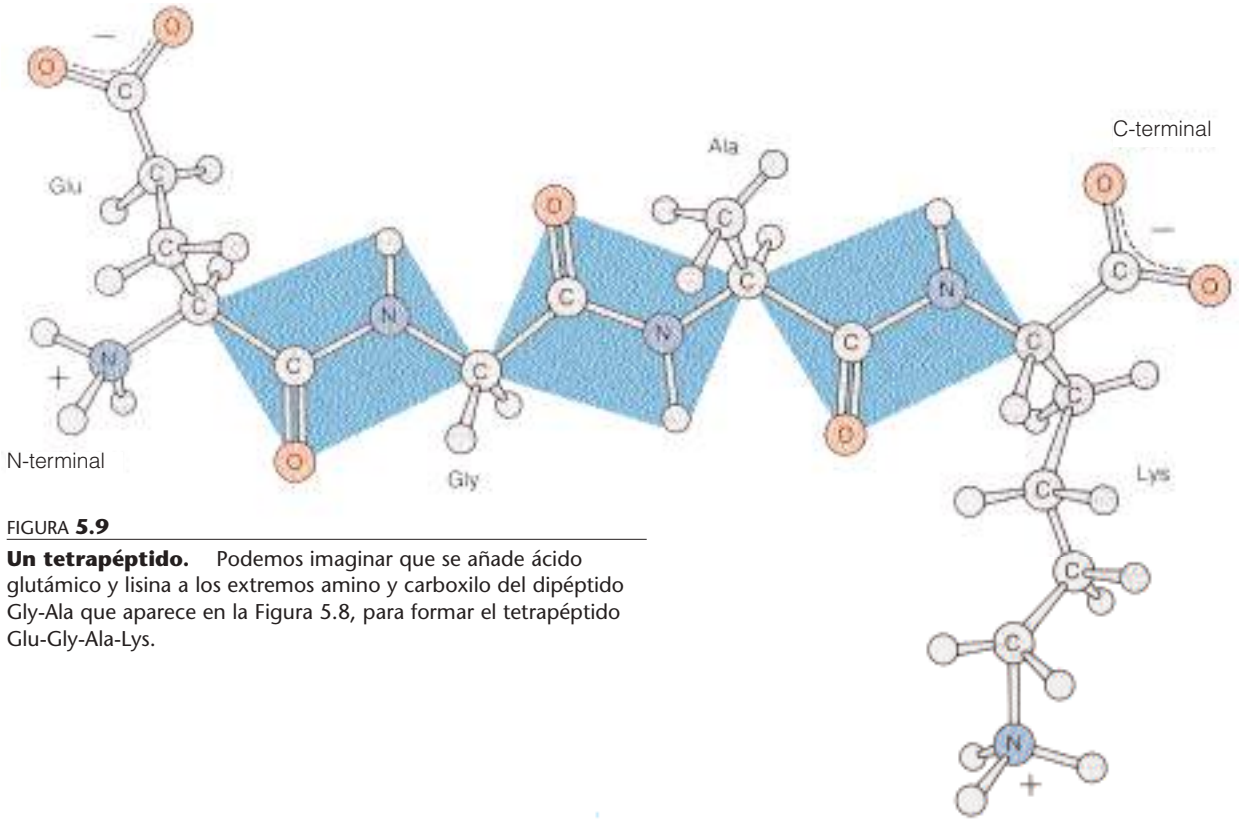


FIGURA **5.9**

Un tetrapéptido. Podemos imaginar que se añade ácido glutámico y lisina a los extremos amino y carboxilo del dipéptido Gly-Ala que aparece en la Figura 5.8, para formar el tetrapéptido Glu-Gly-Ala-Lys.

turas de tres letras o de una letra que se presentan en la Figura 5.3. Por ejemplo, el oligopéptido que aparece en la Figura 5.9 podría escribirse como

Glu–Gly–Ala–Lys

o

E G A K

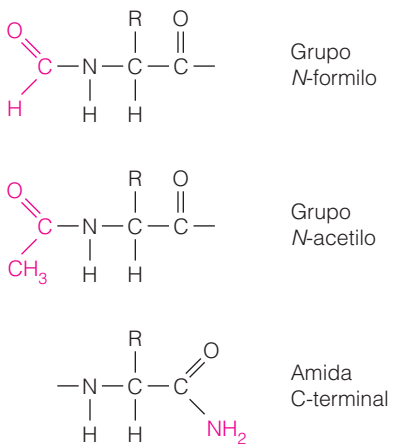


FIGURA **5.10**

Grupos que pueden bloquear los N- o C-terminales en las proteínas. El bloqueo del N-terminal por parte de un grupo formilo o acetilo es más común que la modificación del C-terminal para dar lugar a una amida.

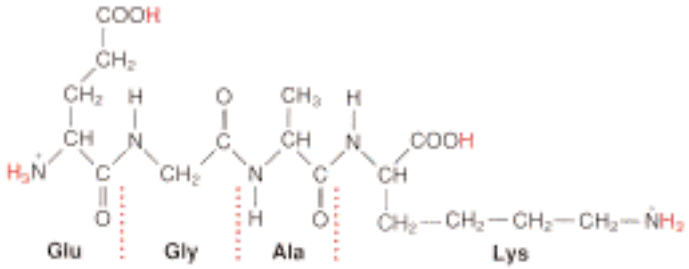
Obsérvese que el convenio consiste en escribir *siempre* el N-terminal a la izquierda y el C-terminal a la derecha.

Todas las proteínas son polipéptidos. Por este motivo, el conocimiento de la naturaleza de los polipéptidos y del enlace peptídico es una parte tan importante de la bioquímica.

LOS POLIPÉPTIDOS COMO POLIANFÓLITOS

Además del grupo amino libre en el N-terminal y el grupo carboxilo libre en el C-terminal, los polipéptidos suelen contener algunos aminoácidos que tienen grupos ionizables en sus cadenas laterales. Estos distintos grupos poseen una amplia gama de valores de pK_a, como se observa en la Tabla 5.3, pero son todos grupos débilmente ácidos o básicos. Por esto, los polipéptidos son ejemplos excelentes de los polianfólitos descritos en el Capítulo 2.

El tipo de comportamiento que se observa durante la titulación de un oligopéptido o un polipéptido está ejemplificado por el tetrapéptido (Glu-Gly-Ala-Lys) de la Figura 5.9. Podemos imaginar que empezamos con el tetrapéptido en una disolución muy ácida, por ejemplo a pH 0. A este pH, que se encuentra por debajo del pK_a de cualquiera de los grupos presentes, todos los residuos ionizables estarán en sus formas protonadas:



Todos los grupos amino están cargados positivamente, y todos los carboxilos tienen una carga igual a cero. Por consiguiente, el conjunto de la molécula tiene una carga de +2 a este pH.

Si ahora imaginamos que se eliminan los protones de la disolución (por ejemplo, por titulación con NaOH), los diversos grupos perderán los protones a valores de pH cercanos a sus valores de pK_a. En la Figura 5.11 se representa la evolución de esta titulación. A medida que se eliminan los protones, elevándose el pH, más grupos quedan desprotonados. Disminuye la carga positiva y pasa por cero en el punto isoeléctrico (véase la página 52 en el Capítulo 2). Al añadirse más base la molécula pasa a tener carga negativa, llegando finalmente a una carga neta de –2 a un pH muy elevado.

Veremos que estos efectos del cambio de pH son importantes en la bioquímica en general, y en la química de las proteínas en particular. En ocasiones, incluso un pequeño cambio de pH modificará significativamente la constelación de cargas con la que una molécula de proteína se enfrenta a su entorno, y en consecuencia modificará significativamente su comportamiento. La solubilidad de muchas proteínas es mínima en el punto isoeléctrico, puesto que las moléculas ya no se repelen unas a otras cuando su carga neta es igual a cero (véase la Figura 2.21).

El hecho de que las distintas proteínas y oligopéptidos tengan distintas cargas netas a un pH determinado suele aprovecharse para su separación, bien por electroforesis (véase Herramientas de la Bioquímica 2A), o por cromatografía de intercambio iónico (véase Herramientas de la Bioquímica 5A).

Los aminoácidos, los péptidos y las proteínas son anfólitos; cada uno de ellos tiene un punto isoeléctrico.

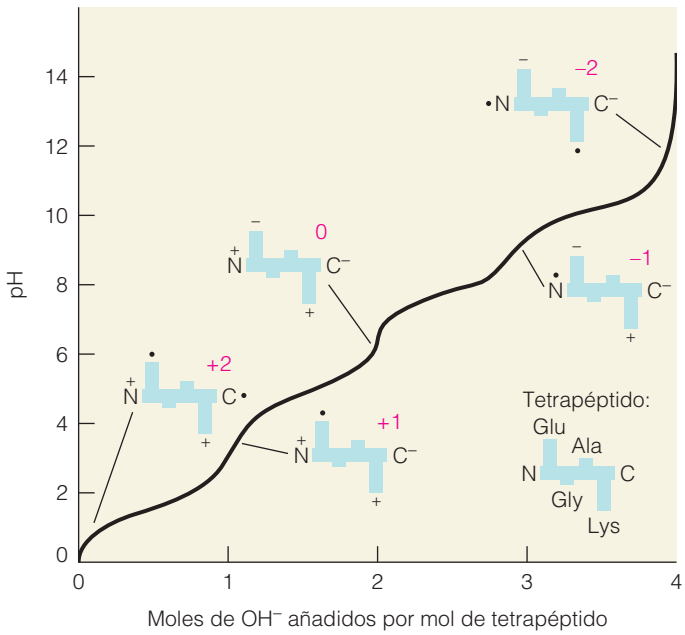


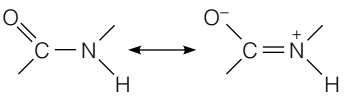
FIGURA **5.11**

Comportamiento polianfolítico de un tetrapéptido. Esta curva de titulación para el tetrapéptido Glu-Gly-Ala-Lys (Figura 5.9) muestra las formas principales presentes a varios valores de pH. Los grupos que pueden cargarse están indicados por +, − , o •, según lleven una carga positiva, negativa o cero a un pH determinado. Las cargas netas aparecen en rojo.

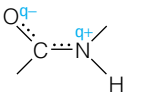
ESTRUCTURA DEL ENLACE PEPTÍDICO

El enlace peptídico es casi plano y está favorecida la forma *trans*.

A continuación, pasamos a examinar la naturaleza del enlace que se ha formado uniendo los aminoácidos. En el dipéptido de la Figura 5.8 (Gly-Ala), la porción sombreada de azul contiene el enlace peptídico. Este enlace amida, que se halla entre todos los pares de residuos de una proteína, tiene algunas propiedades muy importantes para la estructura proteica. Por ejemplo, casi invariablemente los enlaces —C═O y —N—H son aproximadamente paralelos; de hecho, los átomos O, C, N y H son habitualmente coplanares. Hay poca posibilidad de giro alrededor del enlace C—N porque el enlace peptídico tiene una parte importante de carácter de doble enlace. El enlace peptídico puede considerarse un híbrido de resonancia de dos formas:

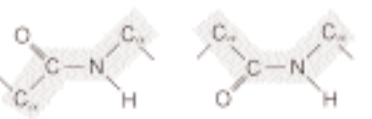


o



En la Figura 5.12a aparece una representación esquemática de la densidad electrónica alrededor del enlace peptídico, y en la Figura 5.12b se presentan las longitudes y los ángulos de enlace.

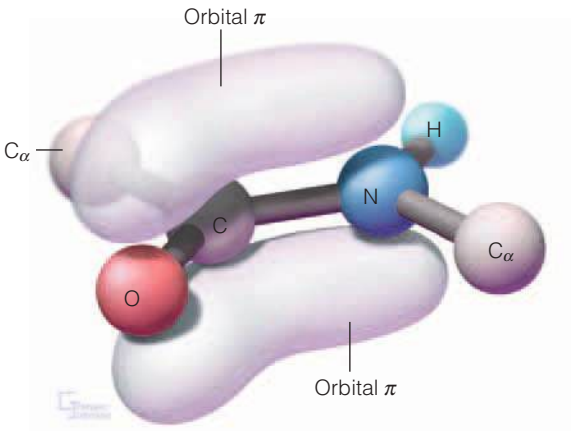
Siendo coplanares, el grupo de átomos alrededor del enlace peptídico puede adquirir dos configuraciones posibles, *trans* y *cis*:



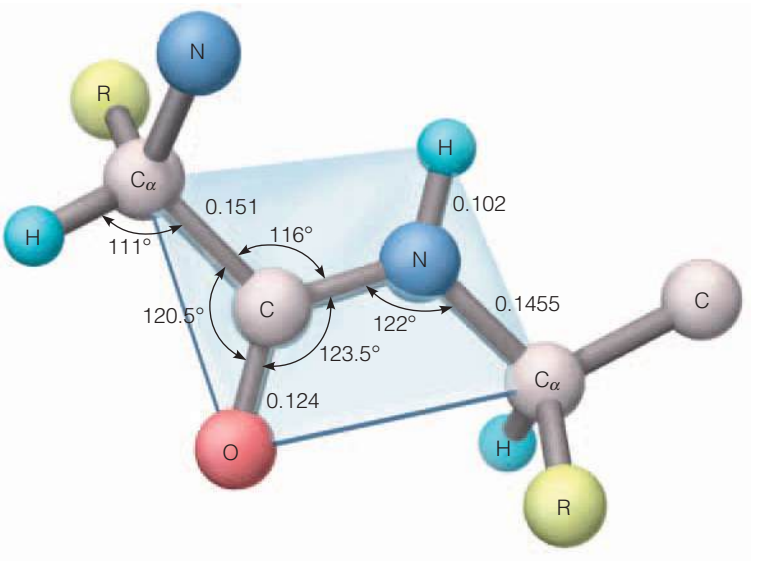
trans *cis*

FIGURA **5.12**

Estructura del enlace peptídico. **(a)** La deslocalización de los orbitales electrónicos π sobre O—C—N explica el carácter parcial de doble enlace del enlace C—N. **(b)** Aquí se presentan los valores aceptados actualmente para las longitudes y ángulos de enlace. Las longitudes de enlace están en nanómetros (nm).



(a) Carácter parcial de doble enlace de un enlace peptídico



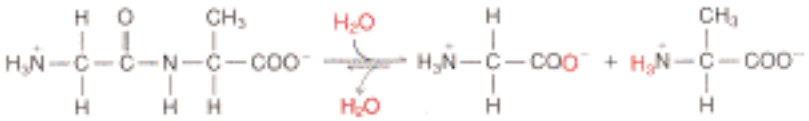
(b) Longitudes y ángulos de enlace

En realidad, suele estar favorecida la forma *trans*, dado que en la configuración *cis* pueden interferir estéricamente los grupos R voluminosos sobre los carbonos α adyacentes. La excepción más importante es el enlace en la secuencia X—Pro, donde X es cualquier otro aminoácido. En este enlace, en ocasiones se permite la configuración *cis*, a pesar de que la configuración *trans* aún resulta favorecida en una proporción de 4:1.

ESTABILIDAD Y FORMACIÓN DEL ENLACE PEPTÍDICO

El enlace peptídico es metaestable. Las proteínas se hidrolizan en disolución acuosa cuando está presente un catalizador.

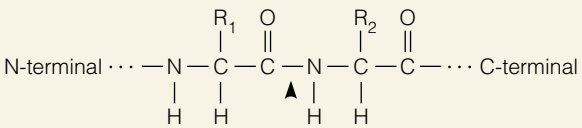
La Figura 5.8 y nuestro comentario sobre ella implicaban que un enlace peptídico puede formarse por eliminación de una molécula de agua entre dos aminoácidos. En realidad, en un entorno acuoso este proceso no está favorecido termodinámicamente. El cambio de energía libre de esta reacción a temperatura ambiente en solución acuosa es de aproximadamente +10 kJ/mol. Por consiguiente, la reacción favorecida en estas condiciones es la *hidrólisis* del enlace peptídico:



y el equilibrio se encuentra muy desplazado hacia la derecha. No obstante, la reacción sin catalizar es sumamente lenta a pH y temperatura fisiológicos. Como los polinucleótidos, los polipéptidos son metaestables, y sólo se hidrolizan rápidamente en condiciones extremas o cuando están presentes catalizadores.

La hidrólisis peptídica puede catalizarse de distintas maneras. Un método general, que fragmenta todos los enlaces peptídicos, consiste en calentarlos en un ácido mineral fuerte (normalmente HCl 6 M). Se logra una catálisis más específica mediante **enzimas proteolíticas** o **proteasas**. Muchas de estas enzimas son específicas con relación a los enlaces que fragmentan; varias de ellas se muestran en la Tabla 5.4. Algunas de estas enzimas se secretan al tubo digesti-

TABLE 5.4 Especificidades de secuencia de algunas enzimas proteolíticas



Enzima	Lugar preferido[a]	Origen
Tripsina	R_1 = Lys, Arg	De los sistemas digestivos de los animales, muchos otros orígenes
Quimotripsina	R_1 = Tyr, Trp, Phe, Leu	Igual que la tripsina
Trombina	R_1 = Arg	De la sangre; toma parte en la coagulación
Proteasa V-8	R_1 = Asp, Glu	De *Staphylococcus aureus*
Prolilendopeptidasa	R_1 = Pro	Riñón de cordero, otros tejidos
Subtilisina	Muy poca especificidad	De varios bacilos
Carboxipeptidasa A	R_2 = aminoácido C-terminal	De los sistemas digestivos de los animales
Termolisina	R_2 = Leu, Val, Ile, Met	De *Bacillus thermoproteolyticus*

[a] Los residuos indicados son los próximos donde la rotura es más probable. Obsérvese que, en algunos casos, la preferencia está determinada por el residuo del lado N-terminal del enlace roto (R_1) y, algunas veces, por el residuo del lado C-terminal. Generalmente, las proteasas no rompen donde la prolina está al otro lado del enlace. Ni aun la prolilendopentidasa rompe si R_2 = Pro.

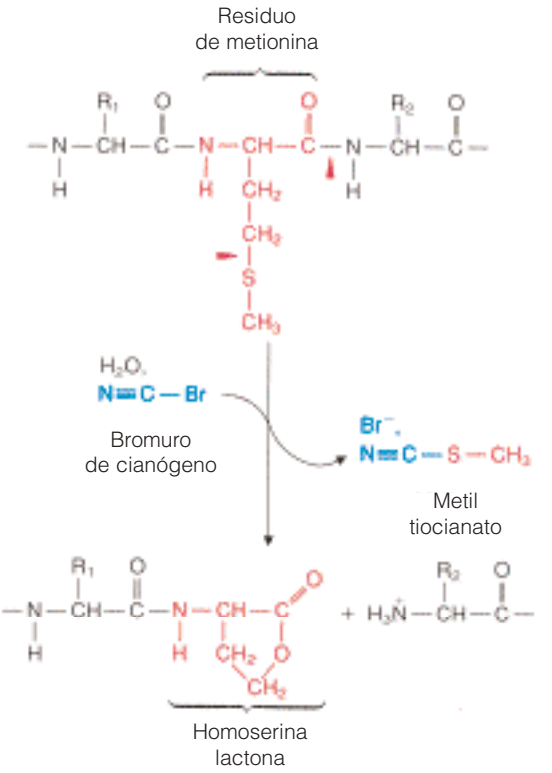


FIGURA **5.13**

Reacción del bromuro de cianógeno. Esta reacción rompe específicamente el enlace peptídico en el lado del carboxilo de la metionina de cualquier polipéptido y convierte la Met en homoserina lactona, un éster interno en el que interviene el carboxilo y los grupos hidroxilo de la homoserina. Los lugares de ruptura están indicados por un ▲.

vo de los animales, donde fragmentan las proteínas para su posterior digestión. Otras, como la papaína, se encuentran en algunos tejidos vegetales. La existencia de un conjunto de estas enzimas con lugares de corte específico es muy útil para el bioquímico, ya que permiten la fragmentación de los polipéptidos de un modo bien definido. Una reacción no enzimática que rompe un enlace peptídico específico utiliza el reactivo bromuro de cianógeno (BrC≡N). Éste rompe específicamente el enlace peptídico por el lado del carboxilo de los residuos de metionina (Figura 5.13). Más tarde veremos la forma en que estas reacciones específicas de rotura pueden ayudar en la determinación de la secuencia de residuos de una proteína.

Como en el caso de los polinucleótidos, la inestabilidad termodinámica de los polipéptidos plantea la cuestión de cómo pueden sintetizarse en el medio acuoso de la célula. Puede que ya hayan adivinado la respuesta: se precisa el acoplamiento de la reacción de síntesis con la hidrólisis de compuestos de fosfato de energía elevada. De hecho, todos los aminoácidos deben activarse por una reacción dirigida por el ATP antes de que puedan incorporarse a las proteínas. Más adelante, en este capítulo, presentaremos un breve esbozo del proceso. Antes es conveniente describir la clase de polipéptidos más importante: las proteínas.

Proteínas: polipéptidos de secuencia definida

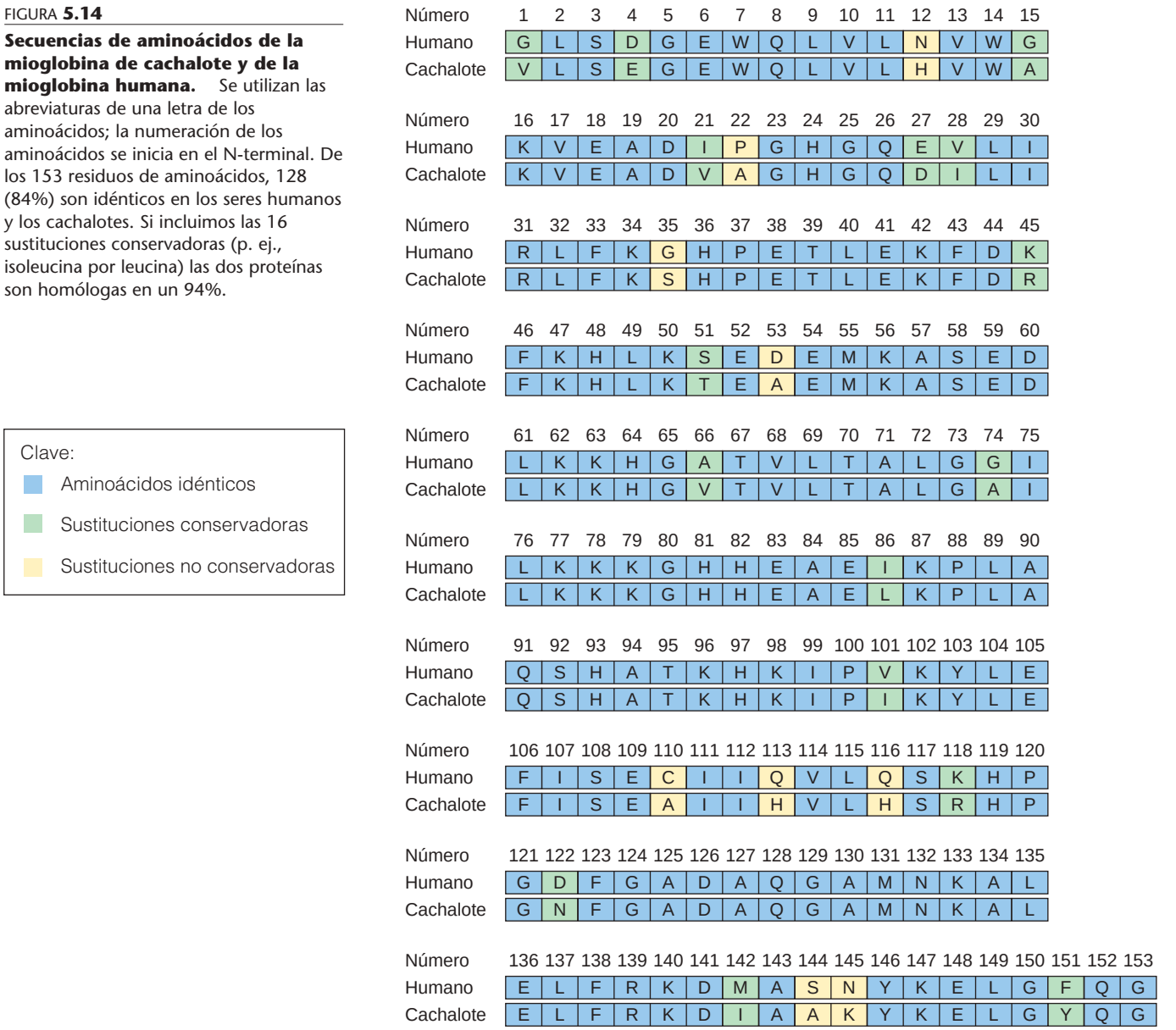
Cada proteína tiene una secuencia de aminoácidos única y definida, su estructura primaria.

Las proteínas no son sólo polipéptidos: son polipéptidos de secuencia definida. Cada proteína tiene un orden definido de residuos de aminoácidos. Como en el caso de los ácidos nucleicos, esta secuencia se denomina *estructura primaria* de la proteína. En capítulos posteriores veremos que éste es el nivel fundamental de estructura sobre el que se basan los niveles de organización más elevados.

La Figura 5.14 presenta la secuencia de aminoácidos de la *mioglobina* de cachalote, la proteína cuya estructura tridimensional vimos en la Figura 5.1. También se indica la secuencia de la mioglobina humana, la proteína que realiza la misma función de almacenamiento de oxígeno en el ser humano. Del examen de estas secuencias son evidentes dos cosas. En primer lugar, las proteínas son polipéptidos *largos*. La mioglobina de cachalote contiene 153 aminoácidos, igual que la mioglobina humana. No obstante, se encuentran entre las proteínas más pequeñas; algunas proteínas tienen secuencias que incluyen muchos cientos o incluso miles de residuos de aminoácidos. En segundo lugar, a pesar de que las dos secuencias de mioglobina son similares, no son idénticas. Su similitud es suficiente para que cada una de ellas realice la misma función bioquímica; por tanto, las llamamos a cada una *mioglobina*. Pero no son totalmente iguales, puesto que han pasado muchos millones de años desde que los cachalotes y los seres humanos tuvieron un antepasado común. Las proteínas

FIGURA **5.14**

Secuencias de aminoácidos de la mioglobina de cachalote y de la mioglobina humana. Se utilizan las abreviaturas de una letra de los aminoácidos; la numeración de los aminoácidos se inicia en el N-terminal. De los 153 residuos de aminoácidos, 128 (84%) son idénticos en los seres humanos y los cachalotes. Si incluimos las 16 sustituciones conservadoras (p. ej., isoleucina por leucina) las dos proteínas son homólogas en un 94%.



evolucionan, y lo hacen mediante cambios de sus secuencias de aminoácidos. Algunos de estos cambios se llaman **conservadores**: conservan la naturaleza de la cadena lateral (por ejemplo, Asp por Glu). Otros, los cambios **no conservadores** (por ejemplo, Asp por Ala) pueden tener consecuencias más graves.

También es preciso resaltar la singularidad de una proteína determinada en una especie concreta. Todas las muestras de mioglobina de cachalote, obtenidas de cualquier cachalote, tienen la misma secuencia de aminoácidos (a no ser que, por una rara coincidencia, se obtenga una muestra de un cachalote que tenga un gen de mioglobina mutado).

Los bioquímicos han llegado a conocer poco a poco una estructura tan compleja como la molécula de mioglobina, analizando los niveles sucesivos de complejidad cada vez más elevados de la estructura proteica. Para iniciar cualquier estudio de este tipo de una proteína, es preciso preparar la proteína de forma pura, sin contaminación por otras proteínas u otras sustancias celulares. Los métodos para conseguirlo se describen en Herramientas de la Bioquímica 5A. Tradicionalmente, el paso siguiente tras purificar una proteína sería determinar su composición de aminoácidos, esto es, las cantidades relativas de los distintos aminoácidos que se encuentran en la proteína. La Tabla 5.1 presenta los resultados promedio de un gran número de proteínas, aunque las diversas proteínas son muy distintas en cuanto a su composición. Para determinar la composición de aminoácidos de una proteína, se hidroliza el polipéptido en sus aminoácidos constituyentes mediante el tratamiento con ácido clorhídrico 6 M a 105°C. La mezcla de aminoácidos puede separarse posteriormente por cromatografía de intercambio iónico y se mide la cantidad de cada uno. En Herramientas de la Bioquímica 5B se describe la forma de hacerlo.

La determinación de la composición proporciona una información limitada sobre una proteína. Lo que es mucho más importante para el bioquímico o biólogo es la *secuencia* de los aminoácidos. Se han puesto a punto métodos que permiten determinar rápidamente las secuencias de cantidades muy pequeñas (microgramos) de proteínas purificadas. El más importante se basa en la reacción de **degradación de Edman** que se describirá con detalle en Herramientas de la Bioquímica 5C. En pocas palabras, se trata de una serie de reacciones secuenciales que eliminan los residuos de la cadena polipeptídica de uno en uno. Las reacciones y el aislamiento de los aminoácidos producto son muy adecuadas para una operación automatizada. Sin embargo, el método no puede aplicarse a cadenas largas, de forma que los polipéptidos largos deben cortarse en trozos más cortos específicos. Para esto, pueden emplearse reacciones como las que se describen en la Tabla 5.4.

Algunas proteínas contienen dos o más cadenas polipeptídicas que se mantienen juntas mediante fuerzas no covalentes o covalentes.

Cuando la proteína que se estudia contiene más de una cadena polipeptídica surge una complicación. Las cadenas pueden mantenerse unidas mediante fuerzas no covalentes, como en la *hemoglobina*, que está formada por cuatro cadenas semejantes a la mioglobina (véase el Capítulo 7). Otra posibilidad es que la conexión de las cadenas puede producirse mediante enlaces covalentes, como los enlaces disulfuro. Un ejemplo de una proteína así es la hormona **insulina** (Figura 5.15). En Herramientas de la Bioquímica 6B se describirán métodos para detectar estas proteínas con varias cadenas y cómo separarlas. Si los enlaces son covalentes, es necesaria una ruptura química; en Herramientas de la Bioquímica 5C se presenta un ejemplo.

Aunque la secuenciación directa de las proteínas, tal y como se describe aquí, ha proporcionado un banco enorme de secuencias proteicas, los bioquímicos utilizan para esta información cada vez más la secuenciación de los genes. Tal como se explicó en el Capítulo 4, la estructura primaria de cada proteína está determinada por un gen concreto. Como conocemos el código que relaciona la



FIGURA **5.15**

Estructura primaria de la insulina bovina. Esta proteína está compuesta por dos cadenas polipeptídicas (A y B) unidas por enlaces disulfuro. La cadena A también contiene un enlace disulfuro interno.

secuencia de DNA con la secuencia de proteína, la determinación de la secuencia de nucleótidos de un gen (o con mayor frecuencia, la secuencia del RNA mensajero leído a partir de ese gen), nos permite leer la correspondiente secuencia proteica. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la secuenciación del gen sólo nos indica la secuencia *tal como se sintetiza*. Como veremos, con frecuencia se producen modificaciones de la cadena polipeptídica posteriores a la síntesis que no aparecen de esta forma y que sólo pueden encontrarse mediante la secuenciación directa.

En la Parte V de este libro se comentarán las técnicas para identificar las secuencias que definen las proteínas en el genoma, y las utilizadas para recuperar, clonar y secuenciar los genes.

Del gen a la proteína

CÓDIGO GENÉTICO

El código genético especifica los tripletes de RNA que corresponden a cada residuo de aminoácido.

En el Capítulo 4 hemos expuesto que las secuencias de DNA de los genes se transcriben a moléculas de RNA mensajero, que a su vez se traducen a proteínas. Pero sólo existen 4 clases de nucleótidos en el DNA, cada uno de los cuales se transcribe en un nucleótido concreto en el RNA, y existen 20 clases de aminoácidos. Obviamente, resulta imposible una correspondencia 1:1 entre nucleótidos y aminoácidos. En realidad, se utilizan tripletes de nucleótidos (**codones**) para codificar cada aminoácido, lo cual permite 4^3, o sea, 64, combinaciones distintas. Este número es más que suficiente para codificar 20 aminoácidos, por lo que la mayoría de los aminoácidos tienen múltiples codones. El código genético es casi universal, esto es, prácticamente todos los organismos utilizan los mismos codones para traducir sus genomas a proteínas. Las pocas excepciones están dispersas a lo largo de los reinos biológicos. Consideraremos éstos y otros detalles del código genético en el Capítulo 27.

La Figura 5.16 representa el código genético en términos de los tripletes de mRNA que corresponden a los distintos residuos de aminoácidos. Tres tripletes, UAA, UAG y UGA, no codifican ningún aminoácido, sino que funcionan como señales de "parada" para finalizar la traducción en el C-terminal de la cadena. El codón AUG, que normalmente codifica metionina, también funciona como señal de "comienzo". Cuando comienza una cadena polipeptídica, AUG dirige la colocación de *N*-formilmetionina (en los procariotas) o metionina (en los eucariotas) en la posición N-terminal (Figura 5.17). La consecuencia es que todas las proteínas procariotas deberían empezar con *N*-formilmetionina y las proteínas eucariotas con metionina. Esto suele ser así, aunque en muchos casos se separa el residuo N-terminal o incluso varios residuos en la célula, por acción de proteasas específicas durante o inmediatamente después de la traducción.

FIGURA **5.16**

Código genético. La tabla está dispuesta de modo que los usuarios puedan encontrar rápidamente cualquier aminoácido a partir de las tres bases del codón del mRNA (escrito en la dirección 5′ ⟶ 3′). Por ejemplo, para hallar el aminoácido correspondiente al codón 5′ AUC 3′, primero lo buscamos en la fila A, después en la columna U, y a continuación en el espacio C, y encontramos que el aminoácido es Ile.

Primera posición	Segunda posición: U	Segunda posición: C	Segunda posición: A	Segunda posición: G	Tercera posición
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Parada	UGA Parada	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Parada	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met/inicio	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

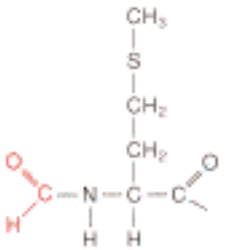


FIGURA **5.17**

***N*-Formilmetionina.** Este aminoácido inicia la traducción procariota. Está codificado por AUG cuando este triplete aparece cerca del inicio de un mensaje.

La Figura 5.18 presenta la relación entre el DNA, el mRNA y las secuencias polipeptídicas para la porción N-terminal de la mioglobina de foca. En este caso se ha eliminado la metionina N-terminal.

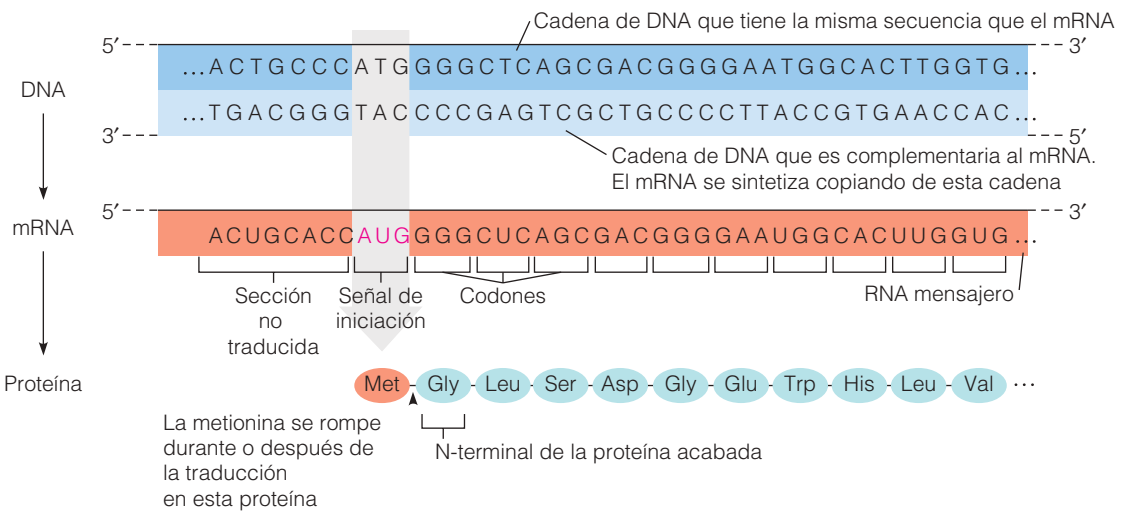


FIGURA **5.18**

Relaciones del DNA con el mRNA y con la cadena polipeptídica. Se presentan estas relaciones para los primeros 10 residuos de la mioglobina de foca. Obsérvese que la cadena de DNA que se transcribe es complementaria con el mRNA.

De Blanchetot, *Nature* (1983) 301:732–734. © 1983 Macmillan Magazines Ltd.

TRADUCCIÓN

Estamos ya en disposición de comentar el proceso de traducción del mRNA a proteínas con algo más de detalle que en el Capítulo 4. Con anterioridad ya observamos en este capítulo que la termodinámica de la formación del enlace peptídico requiere que los aminoácidos se activen antes de que puedan añadirse a una cadena polipeptídica. Se logra esta activación acoplando cada aminoácido al extremo 3′ de un RNA de transferencia adecuado para dar un **aminoacil-tRNA**, como se muestra en la Figura 5.19. (La estructura del tRNA se presenta en la Figura 4.20.) Este acoplamiento está catalizado por enzimas específicas denominadas **aminoacil-tRNA sintetasas**, cada una de las cuales reconoce un aminoácido concreto y su tRNA adecuado. La fuente de energía libre para la reacción es la hidrólisis de ATP a AMP y pirofosfato.

La traducción requiere que se activen los aminoácidos, acoplándolos con tRNA específicos.

En la Figura 5.20 se presenta la síntesis de un polipéptido. Cada tRNA contiene, en una región conocida como **bucle del anticodón**, una secuencia de nucleótidos denominada **anticodón**, que es complementaria del codón adecuado del mensaje. El RNA mensajero se ha unido a un ribosoma, como se menciona en el Capítulo 4. Los aminoacil tRNA también se unen aquí, uno a uno, acoplando sus anticodones a los codones correspondientes en el mensaje, tal como se muestra en la Figura 5.20, paso 1. El aminoácido transportado por cada tRNA que entra se transfiere a la cadena peptídica en crecimiento (paso 2). A continuación, se libera el primer tRNA, y el ribosoma se mueve un codón a lo largo del mensaje, permitiendo de este modo que el siguiente tRNA llegue a su lugar, transportando *su* aminoácido (paso 3). Una vez más, es preciso obtener energía de la hidrólisis de ATP en cada paso del movimiento. El ribosoma se mueve a lo largo del RNA mensajero hasta que, finalmente, encuentra un codón de "parada". En este punto, se libera la cadena polipeptídica. El paso 4 presenta una proteína completada (aunque es demasiado corta para ser real). En todas las células de cualquier tipo de organismo, esta extraordinaria maquinaria traslada la información codificada en miles de genes distintos a miles de proteínas diferentes. En los Capítulos 27 y 28 se tratarán los detalles del modo en que se inicia, desarrolla, finaliza y obtiene su energía el proceso de traducción.

Los aminoacil tRNA se unen a los ribosomas por apareamiento del anticodón del tRNA con un codón específico del mRNA.

Las células no son las únicas que sintetizan polipéptidos. Los bioquímicos también lo hacen, a fin de fabricar péptidos específicos que se requieren como reactivos en el laboratorio. Este proceso se describe en Herramientas de la Bioquímica 5D.

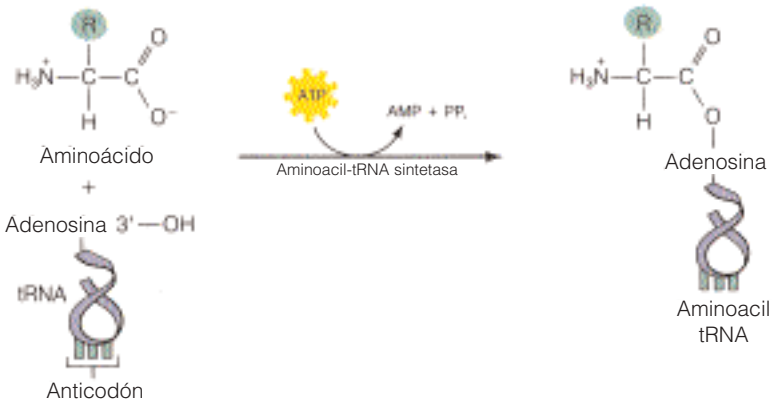
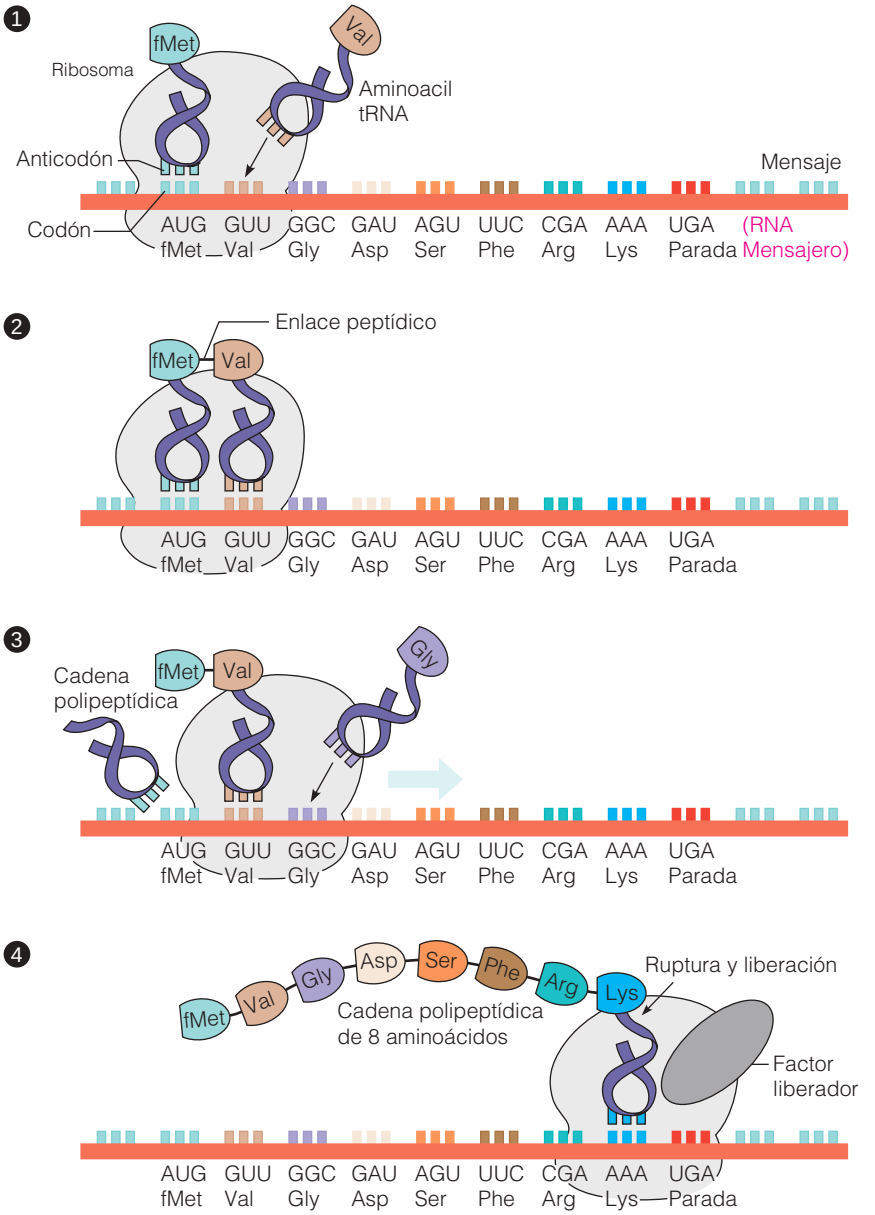


FIGURA **5.19**

Activación de los aminoácidos para su incorporación a las proteínas. La enzima aminoacil-tRNA sintetasa reconoce a un aminoácido concreto y al tRNA que transporta el anticodón correspondiente. Esta sintetasa cataliza la formación de un aminoacil tRNA, acompañada por la hidrólisis de un ATP.

FIGURA **5.20**

Traducción de un mensaje de RNA en una proteína. A medida que el ribosoma se mueve a lo largo del mensaje, acepta sucesivamente aminoacil tRNA específicos, seleccionándolos mediante comparación del anticodón del tRNA con el codón del mensaje del RNA (paso 1). El aminoácido (en este caso, el segundo de la cadena, Val) se transfiere a la cadena polipeptídica en crecimiento (paso 2), y el ribosoma se mueve al siguiente codón para repetir el proceso, mientras libera el penúltimo tRNA añadido (paso 3). Se repiten los pasos precedentes, añadiendo más aminoácidos a la cadena hasta que se lee una señal de parada (paso 4), en la que un factor liberador proteico provoca la liberación tanto del polipéptido como del mRNA. El polipéptido que se presenta aquí es demasiado corto para ser real; ello se debe a que se quiere ilustrar tanto el inicio como la terminación. Se han omitido aquí muchos detalles de la traducción que se presentarán en los Capítulos 27 y 28.



PROCESAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS TRAS LA TRADUCCIÓN

Después de la traducción a partir del mRNA, una proteína puede modificarse de muchas maneras.

Cuando se libera una cadena polipeptídica desde un ribosoma, no está necesariamente acabada. Debe plegarse en su estructura tridimensional correcta y en algunos casos es preciso que se formen enlaces disulfuro. Las enzimas de la célula pueden actuar sobre algunos residuos de aminoácidos para producir, por ejemplo, los tipos de modificaciones que se presentan en la página 150.

Muchas proteínas se modifican posteriormente mediante fragmentación proteolítica específica que acorta la longitud de la cadena. En la síntesis de la insulina hallamos un ejemplo notable (Figura 5.21). Hemos encontrado a la insulina como una proteína con dos cadenas que se mantienen juntas mediante enlaces disulfuro (Figura 5.15). En realidad la insulina se sintetiza como una cadena polipeptídica única mucho más larga, llamada **preproinsulina** (Figura 5.21, paso 1). Los residuos del N-terminal de la molécula (el número exacto varía según la especie) sirven como un "péptido señal" (también denominado

secuencia líder) para facilitar el transporte de la molécula de preproinsulina a través de las membranas celulares hidrófobas. Este transporte es esencial, dado que la insulina pertenece a una clase de proteínas que realizan su función fuera de las células en las que se sintetizan. Se separa la secuencia líder mediante una proteasa específica, con lo que queda **proinsulina** (paso 2). La proinsulina se pliega formando una estructura tridimensional específica, que facilita la formación de los enlaces disulfuro correctos (paso 3). A continuación, se corta la secuencia de conexión entre la cadena A y la cadena B mediante una nueva acción proteásica, dando lugar a la molécula de insulina acabada (paso 4). Esto proporciona una ventaja fisiológica importante. Como la proinsulina no es una hormona activa, puede encontrarse presente en los tejidos a concentraciones elevadas. Estas concentraciones de insulina activa serían tóxicas. Sin embargo, la proinsulina puede convertirse en insulina rápidamente cuando la necesite el organismo.

La estructura primaria de una molécula proteica es una secuencia de *información*. Las 20 cadenas laterales de los aminoácidos pueden considerarse como palabras de una frase larga. Estas palabras se han traducido de otra lengua, la lengua de las secuencias de ácido nucleico almacenadas en los genes y copiadas en el RNA mensajero. Después de la traducción, la frase se corrige, modificando algunas palabras y borrando otras en el procesamiento tras la traducción. En el próximo capítulo veremos que la información que contiene la "frase" de una secuencia proteica dicta el modo en que la proteína se pliega formando una estructura en tres dimensiones. A su vez, este plegado dicta la función de la proteína, el modo en que interactúa con las moléculas pequeñas y los iones, con otras proteínas y con sustancias como los ácidos nucleicos, los hidratos de carbono y los lípidos. La información expresada en las secuencias proteicas desempeña un cometido básico que determina el funcionamiento de las células y los organismos.

RESUMEN

Las proteínas son polímeros de L-α-aminoácidos. En los genes están codificados veinte aminoácidos distintos que se incorporan a las proteínas. Existen otros aminoácidos (no proteicos) y también hay aminoácidos modificados que se hallan en las proteínas. La variedad de cadenas laterales (hidrófilas, hidrófobas, ácidas, básicas, neutras) permite una gran complejidad funcional en las proteínas. Es posible realizar variaciones adicionales modificando algunos aminoácidos después que se han incorporado a las proteínas. La presencia de cargas positivas y negativas en las cadenas laterales hace que las proteínas sean polianfólitos.

Los oligopéptidos y los polipéptidos se forman por la polimerización de los aminoácidos mediante enlaces peptídicos. El enlace peptídico se encuentra en un plano, y la forma *trans* es la favorecida. Este enlace es metaestable y puede hidrolizarse fácilmente en presencia de catalizadores. La secuencia definida y única de los aminoácidos en cada proteína constituye su estructura primaria, dictada por su gen. Algunas proteínas contienen varias cadenas polipeptídicas, que se mantienen juntas por fuerzas covalentes o no covalentes. Las proteínas se sintetizan en la célula por un proceso denominado traducción que requiere ATP. El RNA mensajero correspondiente a una proteína se une a una partícula denominada ribosoma. Cada aminoácido específico se acopla a una determinada molécula de tRNA. Un triplete anticodón del tRNA se empareja con un triplete codón en el mRNA. A medida que el ribosoma se mueve a lo largo del mRNA, los aminoácidos se transfieren, uno a uno, a la cadena polipeptídica en

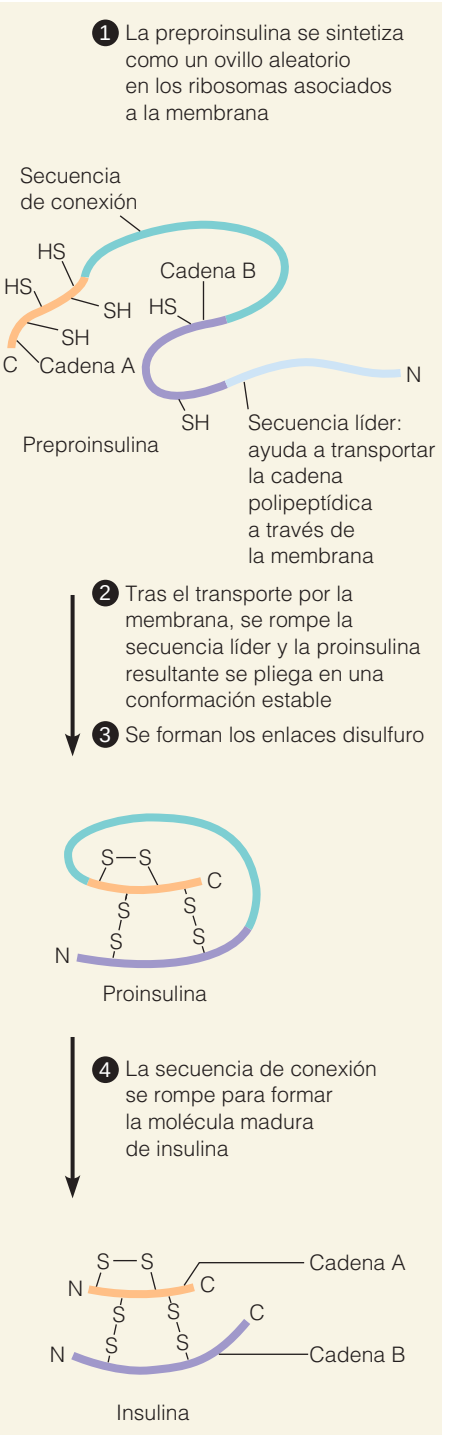


FIGURA **5.21**

Estructura de la preproinsulina y su conversión en insulina.

crecimiento. La longitud de la cadena está limitada por tripletes específicos de "iniciación" y "parada" en el código genético.

Incluso cuando ya se ha completado la traducción, la molécula proteica puede seguir modificándose de modo covalente, por la fragmentación de porciones concretas o por la modificación de algunas cadenas laterales de los aminoácidos.

BIBLIOGRAFÍA

General

Hay varios libros excelentes que proporcionan información más detallada o complementaria sobre la estructura de las proteínas. Recomendamos particularmente los siguientes para completar nuestros Capítulos 5, 6 y 7.

Branden, C. y J. Tooze (1991) *Introduction to Protein Structure*. Garland, Nueva York, Londres. Gran cantidad de información en todos los niveles de estructura. Ilustraciones excelentes.

Creighton, T. E. (1993) *Proteins: Structure and Molecular Properties*, 2ª ed. Freeman, San Francisco. Exposición elegante, completa y actual, de todos los aspectos de la química proteica. Muy buenas referencias a lo largo del texto.

Dickerson, R. E. e I. Geis (1981) *The Structure and Action of Proteins*, 2ª ed. Benjamin/Cummings, Redwood City, Calif. Conciso, bien escrito y bien ilustrado.

Hirs, C. H. W. y S. N. Timasheff, eds. (1983) *Enzyme Structure*, Parte 1, en *Methods in Enzymology*, Vol. 91. Academic Press, Nueva York. Contiene varios capítulos útiles sobre los métodos analíticos de las proteínas.

Kyte, J. (1995) *Structure in Protein Chemistry*. Garland, Nueva York. Junto con el de Creighton, los mejores tratados contemporáneos.

Revisiones y trabajos sobre temas especiales

Blake, C. C. F. y L. N. Johnson (1984) Protein structure. *Trends Biochem. Sci.* 9:147-151.

Dayhoff, M. O. (1972) *Atlas of Protein Sequence and Structure*. National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. (Véanse también los suplementos de este volumen publicados los años posteriores.)

Doolittle, R. (1985) Proteins. *Sci. Am.* 253(4):88-96.

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

Hegstrom, R. A. y D. K. Kondepudi (1990) The handedness of the universe. *Sci. Am.* Enero:98-105. Un claro planteamiento de las teorías de la preferencia espacial.

Milton, R. C. deL., Milton, S. C. F. y Kent, S. B. H. (1992) Total chemical synthesis of a D-enzyme: The enantiomers of HIV-1 protease show demonstration of reciprocal chiral substrate specificity. *Science* 256:1445-1448.

Rose, G. D., A. R. Geselowitz, G. J. Lesser, R. H. Lee y M. H. Zehfus (1985) Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins. *Science* 229:834-838.

Wilbur, P. J. y A. Allerhand (1977) Titration behavior and tautomeric states of individual histidine residues of myoglobin. *J. Biol. Chem.* 252:4968-4975.

PROBLEMAS

1. Utilizando los datos de la Tabla 5.1, calcular el peso *promedio* de los residuos de aminoácidos de una proteína de composición característica. Es útil conocer este número para unos cálculos aproximados.
2. La hormona peptídica estimulante de los melanocitos, α-*melanotropina*, tiene la siguiente secuencia:

   Ser–Tyr–Ser–Met–Glu–His–Phe–Arg–Trp–Gly–Lys–Pro–Val

   (a) Escribir la secuencia utilizando las abreviaturas de una letra.
   (b) Calcular el peso molecular de la α-melanotropina utilizando los datos de la Tabla 5.1. ¿Por qué este resultado no es exactamente correcto a pH neutro?

*3. (a) Esbozar la curva de titulación que sería de prever para la α-melanotropina (Problema 2). (Suponga valores de pK_a en la parte central de las gamas de valores dadas en la Tabla 5.3.)
   (b) ¿Qué carga sería de esperar aproximadamente a valores de pH de 11, 5 y 1?
   (c) Calcular el punto isoeléctrico de la α-melanotropina.

4. ¿Qué péptidos cabe prever que se produzcan cuando la α-melanotropina (Problema 2) se fragmenta por (a) tripsina, (b) bromuro de cianógeno y (c) termolisina? (Véase la Tabla 5.4.)
5. Existe otra hormona estimulante de los melanocitos denominada β-*melanotropina*. La fragmentación de la β-melanotropina con tripsina produce los siguientes péptidos y ácido aspártico libre.

   WGSPPK DSGPYK MEHFR

   Si se supone una homología de secuencia máxima entre la α-melanotropina y la β-melanotropina, ¿cuál debe ser la secuencia de esta última?
6. Dado el péptido siguiente:

   Ser–Glu–Pro–Ile–Met–Ala–Pro–Val–Glu–Tyr–Pro–Lys

   (a) Calcular la carga neta a pH 7 y a pH 12.
   (b) ¿Cuántos péptidos se producirían si este péptido se tratase con: (1) bromuro de cianógeno, (2) tripsina y (3) quimotripsina?
   (c) Sugerir un método para separar los péptidos producidos por el tratamiento con quimotripsina.

*7. Una forma mutante de la hormona polipeptídica angiotensina II tiene la *composición* de aminoácidos siguiente

   (Asp, Arg, Ile, Met, Phe, Pro, Tyr, Val)

Se realizan las siguientes observaciones:

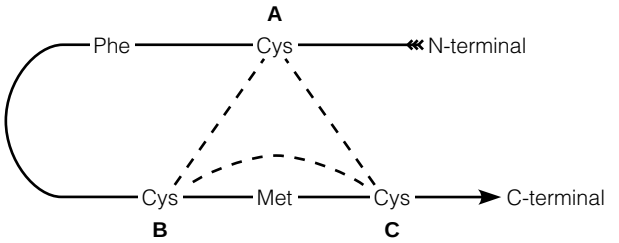
- La tripsina produce un dipéptido que contiene Asp y Arg, y un hexapéptido que contiene todo el resto.
- La fragmentación con bromuro de cianógeno produce un dipéptido que contiene Phe y Pro, y un hexapéptido que contiene todos los demás.
- La quimotripsina fragmenta la hormona en dos tetrapéptidos con la siguiente composición

  (Asp, Arg, Tyr, Val) y (Ile, Met, Phe, Pro)

- El dipéptido de composición (Pro, Phe) no puede fragmentarse por la quimotripsina ni por la carboxipeptidasa.

¿Cuál es la secuencia?

8. Se ha secuenciado una proteína tras la destrucción de los enlaces —S—S—. Se sabe que contiene 3 residuos de Cys, situados del modo que se muestra a continuación. Sin embargo, sólo uno de ellos es un —SH libre; dos de ellos forman parte de un enlace S—S.



La única metionina y el único aminoácido aromático (Phe) de esta proteína se encuentran en las posiciones indicadas. La fragmentación de la proteína *intacta* (con el puente —S—S— intacto) con bromuro de cianógeno o quimotripsina *no* divide la proteína en dos péptidos. ¿Dónde está el puente —S—S— (AB, BC o AC)?

9. La *apamina* es una pequeña toxina proteica presente en el veneno de las abejas. Su secuencia es la siguiente

CNCKAPETALCARRCQQH

(a) Se sabe que la apamina no reacciona con yodoacetato. ¿Cuántos enlaces disulfuro están presentes?

(b) Suponga que la fragmentación con tripsina produce dos péptidos. ¿Dónde está (o están) el enlace o los enlaces S—S?

10. (a) Escriba una secuencia posible para un segmento de mRNA que codifique la apamina.

(b) ¿Cree que la apamina se ha sintetizado de la forma presentada en el Problema 9 o que es más probable que sea un producto de fragmentación proteolítica de un péptido mayor? Explíquelo.

11. Supongamos la siguiente porción de un mRNA. Halle una señal de iniciación y escriba la secuencia de aminoácidos que codifica

5′···GCCAUGUUUCCGAGUUAUCCCAAAGAUAAAAAAGAG···3′

12 Un investigador ha aislado un oligopéptido de secuencia y composición de aminoácidos desconocidas. Todos los intentos para secuenciarlo por la degradación de Edman han fracasado; la reacción no funciona.

(a) Sugerir dos explicaciones posibles bastante diferentes del problema.

(b) Sugerir un experimento que finalmente diferenciara entre estas dos.

*13. Suponga que ha separado las cadenas A y B de la insulina por reducción de disulfuros. ¿Qué método cromatográfico permitiría el aislamiento de las cadenas puras A y B? Describa el procedimiento con detalle.

14. Los ribosomas de *E. coli* son partículas grandes, cada una de las cuales está constituida por dos partículas más pequeñas, denominadas subunidad 30S y subunidad 50S debido a sus coeficientes de sedimentación. El ribosoma intacto no tiene un coeficiente de sedimentación de 80S, sino que el valor es 70S. Explique el motivo. (Véase Herramientas de la Bioquímica 5A.)

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 5A

Modos de aislar y purificar las proteínas y otras macromoléculas

El bioquímico, cuando intenta comprender los procesos químicos en las células y los organismos, se enfrenta a un enorme reto. Incluso la más simple de las células es una estructura compleja, formada por miles de compuestos distintos. Antes de que puedan entenderse sus interacciones y cambios, es preciso *aislar* estos constituyentes celulares diversos, identificarlos y estudiar sus estructuras y propiedades.

Para separar las moléculas, el bioquímico aprovecha las diferencias que existen entre ellas. Tales diferencias pueden ser de solubilidad, tamaño, masa, carga eléctrica o afinidad por otras moléculas. En Herramientas de la Bioquímica 2A se ha presentado la electroforesis, que utiliza las diferencias de carga eléctrica para la separación. Pero la electroforesis es principalmente una herramienta *analítica*, más que un medio de preparación de muestras. Aunque en ocasiones se utiliza para purificar pequeñas cantidades de proteínas y ácidos nucleicos, su capacidad es limitada; la preparación de las cantidades de sustancias necesarias para la caracterización y el estudio precisa otros métodos. Para pasar desde las células o los tejidos a un material purificado, solemos utilizar diversas técnicas distintas de modo secuencial. Aquí describiremos algunas de ellas.

Solubilidad

Una de las formas más antigua, más simple y aún bastante eficaz para llevar a cabo la separación de una mezcla de proteínas es utilizar la solubilidad diferente en disoluciones salinas concentradas. En el Capítulo 2, se mencionó que muchas proteínas se hacen insolubles en presencia de concentraciones elevadas de sales, especialmente las polivalentes, que contribuyen fuertemente a la fuerza iónica. Sin embargo, lo que no se mencionó es que la solubilidad varía mucho entre una proteína y otra y en disoluciones concentradas varía rápidamente con la fuerza iónica (véase la Figura 5A.1). A partir de estos datos queda claro que en una disolución de sulfato amónico 3 M, la hemoglobina y la albúmina sérica son casi totalmente insolubles, mientras que la mioglobina permanece bastante soluble. De esta forma, debería ser posible purificar la mioglobina de dichos contaminantes precipitándolos con sulfato amónico. El sulfato amónico se emplea con frecuencia para estas precipitaciones selectivas debido a que pueden conseguirse fuerzas iónicas bastante altas sin dañar a las proteínas.

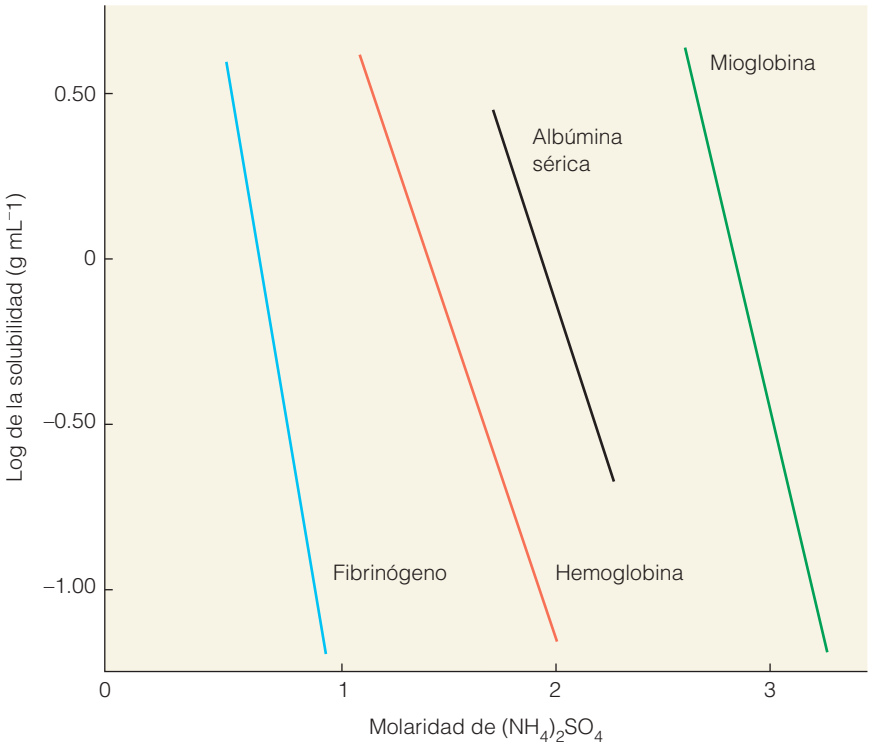


FIGURA **5A.1**
Solubilidad de algunas proteínas en sulfato amónico en función de la concentración de sal.

Centrifugación

Puede decirse que cualquier partícula sometida a un campo centrífugo al girar en un rotor de una centrífuga está sujeta a una fuerza centrífuga (Figura 5A.2). Para una partícula de masa m, esta fuerza viene dada por

$$f_c = m(1 - \bar{v}\rho)\omega^2 r \qquad (5A.1)$$

En esta expresión r es la distancia de la partícula desde el centro del rotor, que está girando a una velocidad angular de ω radianes/s ($\omega = (2\pi/60) \times$ RPM, donde RPM es el número de revoluciones por minuto). El factor $(1 - \bar{v}\rho)$ es el **factor de flotación**, que tiene en cuenta el hecho de que la solución que rodea a la partícula la hace flotar. Este factor contiene la densidad de la solución ρ (g/mL) y el volumen específico de la partícula $\bar{v}$ (mL/g). El volumen específico $\bar{v}$ puede considerarse igual a $1/\rho_p$, donde ρ_p es la densidad real de la partícula. Por consiguiente, el factor de flotación $1 - \bar{v}\rho = 1 - \rho/\rho_p$. Evidentemente, si $\rho_p = \rho$, no hay una fuerza neta sobre la partícula, ya que ésta desplaza su propia masa de disolución; esta partícula no sedimentará. Como en la electroforesis, al movimiento de la partícula se opone una fuerza $f_r = fv$, donde v es la velocidad y f es el **coeficiente de fricción**. Se establece una velocidad constante de sedimentación, donde $f_r = f_c$; por consiguiente

$$fv = m(1 - \bar{v}\rho)\omega^2 r \qquad (5A.2)$$

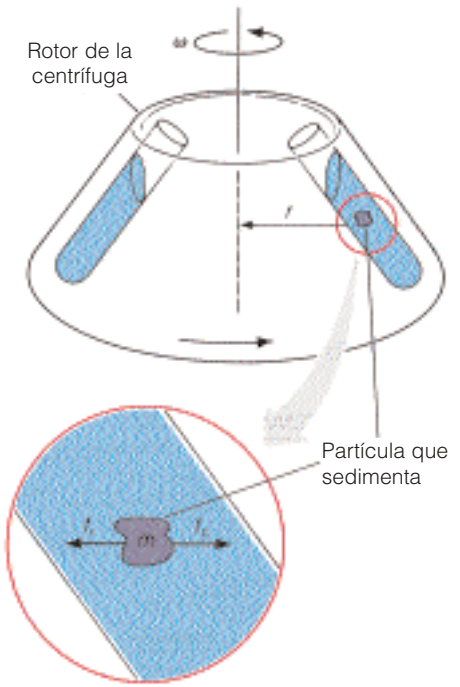


FIGURA **5A.2**

Fuerzas que actúan sobre una partícula en un campo centrífugo en un rotor de ángulo fijo.

Como en la electroforesis, dividimos la velocidad por la intensidad del campo, en este caso la intensidad del campo centrífugo $\omega^2 r$, y obtenemos

$$S = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m(1 - \bar{v}\rho)}{f} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{Nf} \qquad (5A.3)$$

donde M es el peso molecular y N es el número de Avogadro ($M = Nm$). El *peso molecular* (que es más correcto denominar *masa molar*) es la masa de 1 mol de sustancia, expresada en gramos. La cantidad S es el **coeficiente de sedimentación**.

Obsérvese que la ecuación (5A.3) es análoga a la ecuación (2A.2) de la página 60 para la movilidad electroforética. En ambos casos la magnitud (S o μ) está definida como velocidad/intensidad de campo, y se expresa en términos moleculares (a la derecha) como el cociente entre un factor que describe la fuerza impulsora y un factor que tiene en cuenta la resistencia de fricción.

El coeficiente de sedimentación tiene unidades de segundos. Los valores característicos para las moléculas se encuentran cerca de 10^{-13} s, por lo que esta cantidad se ha designado como 1 **unidad Svedberg** (**S**), que toma el nombre de Theodor Svedberg, iniciador de la investigación sobre la centrifugación. Por ejemplo, el coeficiente de sedimentación de la hemoglobina es de aproximadamente 4×10^{-13} s, o 4S. Las partículas celulares suelen identificarse por su valor de S, por ejemplo, ribosomas 70S.

Evidentemente, S aumenta con la masa de la partícula, pero la relación no es lineal ni sencilla, dado que el coeficiente de fricción, f, aumenta con el tamaño de la partícula y también depende de la forma de ésta. A pesar de que podemos utilizar la sedimentación como una medida del peso molecular, la relación es sólo aproximada.

Puesto que las partículas o moléculas de distinto tamaño difieren en cuanto a S, y en consecuencia también difieren en su velocidad de sedimentación, la sedimentación es una herramienta útil para la separación. Se utilizan diversas técnicas, dependiendo de lo que el investigador desee separar. Si la tarea consiste sencillamente en eliminar las partículas grandes o agregados de una disolución de moléculas, puede que sea suficiente una centrifugación a baja velocidad con un rotor provisto de tubos de ángulo fijo (véase la Figura 5A.2). Por ejemplo, un primer paso en el aislamiento de las proteínas suele comportar la fragmentación de las células y la separación de las proteínas solubles del citosol de los núcleos celulares, los fragmentos de pared celular, los orgánulos y otros restos densos. Para lograr esta separación suele ser suficiente la sedimentación en un rotor de ángulo fijo a unos pocos miles de RPM durante 10-20 minutos. En casos más difíciles, donde deben separarse unas de otras distintos tipos de moléculas grandes o partículas, puede utilizarse la técnica de **gradiente de sacarosa** que se presenta en la Figura 5A.3. El método de gradiente de sacarosa produce una mejor separación que la sedimentación de ángulo fijo, ya que los componentes se separan en bandas discretas. Puede utilizarse, por ejemplo, para obtener fracciones enriquecidas en proteínas individuales a

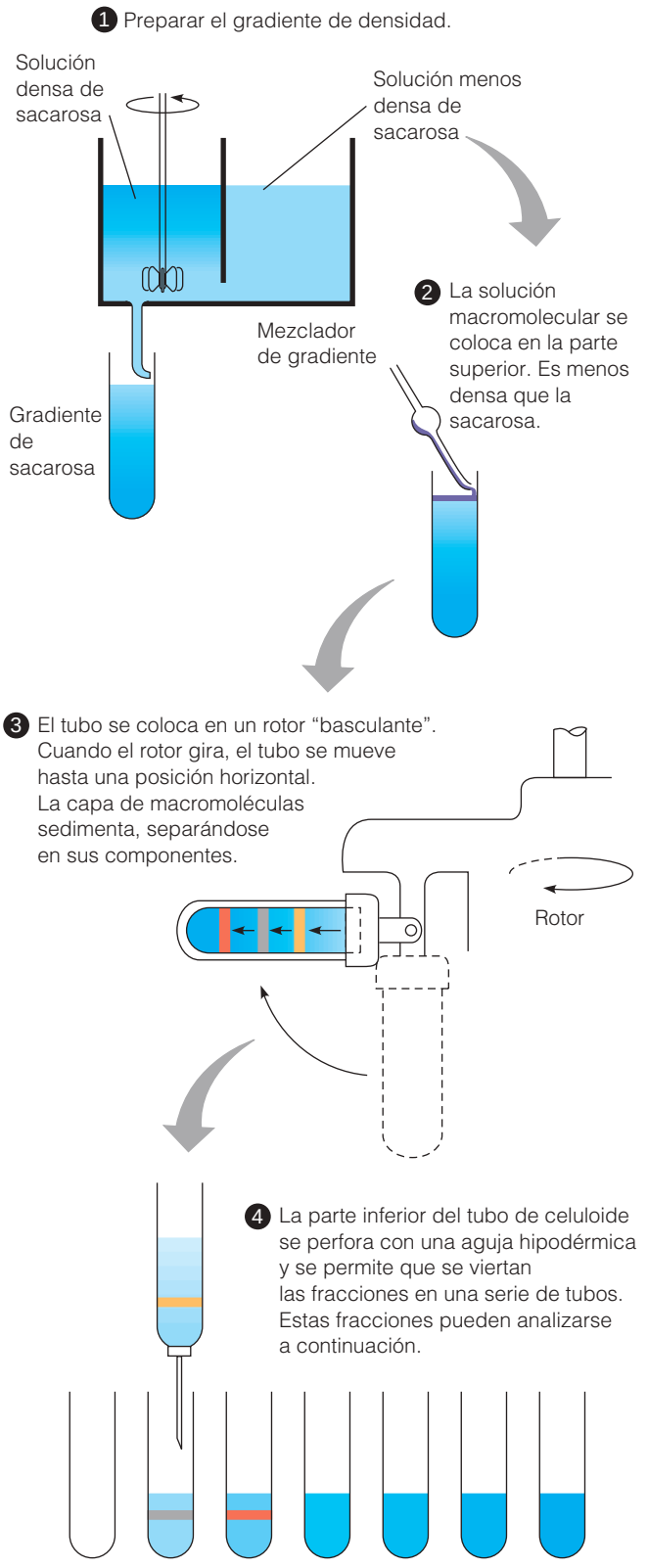


FIGURA **5A.3**

Centrifugación preparativa que utiliza el método de gradiente de sacarosa.

partir del sobrenadante obtenido mediante una centrifugación a baja velocidad de células rotas. Para separar moléculas proteicas, se precisa una velocidad del rotor elevada (a menudo hasta 70 000 RPM).

También puede utilizarse la sedimentación para analizar mezclas, en vez de separarlas preparativamente. En tales casos se utiliza una **ultracentrífuga analítica**, en la que puede seguirse el progreso de la sedimentación de los componentes individuales durante el experimento. Con estos experimentos, pueden determinarse con exactitud los coeficientes de sedimentación de las macromoléculas, utilizando la ecuación (5A.3). El uso de los experimentos de sedimentación para la determinación real de pesos moleculares se describirá en Herramientas de la Bioquímica 6B.

Cromatografía

Gran parte de la bioquímica moderna se basa en la utilización de los métodos de la cromatografía en columna para separar las moléculas. Los métodos cromatográficos comportan el paso de una solución (la *fase móvil*) a través de un medio (la *fase estacionaria*) que presenta una absorción selectiva para los distintos componentes solutos. La rapidez con la que pasa cada componente de la fase móvil depende de manera inversa de la fuerza con la que interactúe con la fase estacionaria. En la Figura 5A.4 se ilustran los principios generales comunes a todas las cromatografías. Se llena una columna con un material que pueda adsorber las moléculas de modo selectivo debido a alguna diferencia de su estructura química. Inicialmente se humedece la columna con la solución amortiguadora adecuada. A continuación, se coloca la mezcla de las moléculas que se van a separar en la parte superior de la columna y se hace pasar lentamente a lo largo de la columna una solución amortiguadora. Se toman fracciones, utilizando un colector automático de fracciones, mientras continúa este proceso de **elución** (paso a través de la columna). Algunas moléculas sólo se adsorben débilmente o no se adsorben en absoluto, y son las primeras que eluyen. Las que se adsorben con más intensidad son las últimas en eluir. En ocasiones debe modificarse la

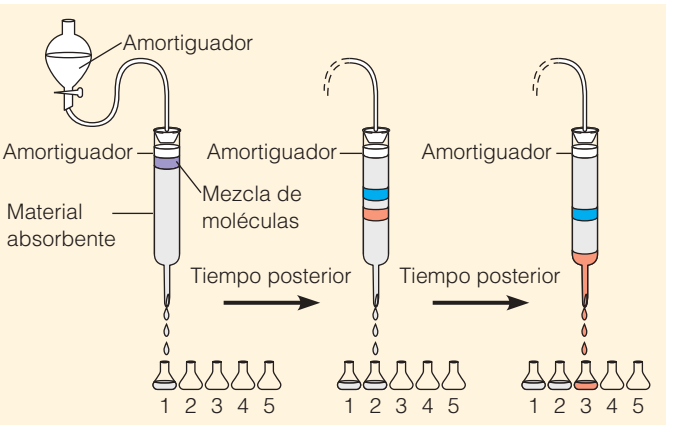


FIGURA **5A.4**

Principio de la cromatografía en columna.

composición de la solución amortiguadora durante la elución para eliminar las moléculas ligadas con más fuerza. El material de la columna utilizado y el método de elución dependen del fundamento que desee utilizarse para la separación. Las secciones que siguen describen algunos métodos importantes de cromatografía en columna.

Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se utiliza para separar las moléculas de acuerdo con su carga eléctrica. Se utilizan **resinas de intercambio iónico**, que son *polianiones* o *policationes*. Supongamos que deseamos separar tres clases de moléculas, una de las cuales está cargada negativamente, otra con una carga positiva débil y la tercera con una carga positiva fuerte. Puede utilizarse para el material de la columna una resina *aniónica*, que lleva grupos cargados negativamente. Las moléculas de la mezcla cargadas negativamente pasarán a través sin adsorberse y se encontrarán en las fracciones iniciales. Los dos tipos de moléculas con carga positiva serán ligados por la resina, aunque las de carga positiva débil quedarán fijadas con menor fuerza. Dado que los aumentos de concentración salina tienden a romper las interacciones electrostáticas de este tipo, puede utilizarse un *gradiente salino* una vez recogidas las primeras fracciones. Es decir, se incrementa gradualmente la concentración salina de la solución amortiguadora eluyente (por ejemplo, utilizando NaCl). A medida que aumenta la concentración salina, los iones Na^+ pueden competir cada vez mejor por los lugares negativos en la resina. A continuación, eluirán los cationes fijados débilmente y los fijados intensamente con fuerte carga positiva sólo eluirán con la concentración salina más elevada.

Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad es una clase de cromatografía más específica, ideal para aislar una o unas pocas proteínas de una mezcla compleja. Muchas proteínas presentan interacciones bastante fuertes con otras moléculas, por ejemplo las interacciones de las enzimas con análogos de sus sustratos o con cofactores (véase el Capítulo 11). Las moléculas adecuadas, acopladas de modo covalente a una matriz inerte, actuarán como "anzuelos" moleculares para captar la proteína deseada. Todas las proteínas restantes simplemente pasarán a través de la columna. Las moléculas proteicas capturadas pueden liberarse posteriormente eluyendo la columna con una solución amortiguadora que contenga copias libres de las moléculas "anzuelo", o algún otro reactivo que pueda romper la interacción. En una variante de este método, se acoplan a la resina *anticuerpos* (véase el Capítulo 7) para una sustancia concreta y proporcionan una retención muy específica del producto deseado.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: High-Performance Liquid Chromatography)

La cromatografía suele ser un proceso lento. Con los procedimientos habituales sólo se aplica una pequeña presión hidrostática para hacer que los fluidos pasen a través de la columna y la elución requiere varias horas. Este proceso no sólo precisa mucho tiempo sino que en ocasiones es perjudicial para los productos sensibles. Además, la muestra tiende a esparcirse, debido a la difusión, a medida que baja a lo largo de la columna. Cuanto más dure el experimento, más grave será la extensión y quedará afectada la resolución de los componentes. Por todos estos motivos, los investigadores bioquímicos han agradecido el desarrollo de los métodos de cromatografía líquida de alta resolución. Con estas técnicas se utilizan presiones de 2000 a 3000 psi para hacer que las soluciones pasen rápidamente a través de la resina. Este nivel de presión ha requerido el desarrollo de resinas no compresibles y columnas metálicas fuertes en las que llevar a cabo el proceso. De este modo, las separaciones que anteriormente precisaban horas, en la actualidad pueden realizarse en minutos y con una resolución más elevada.

Filtración en gel

La filtración en gel es un tipo de cromatografía en el que la base de la separación es el tamaño molecular en lugar de las propiedades químicas. En consecuencia, suele ser una alternativa a la sedimentación. A menudo, constituye un método adecuado para separar las macromoléculas de tamaño diferente o para eliminar los contaminantes de peso molecular bajo de las disoluciones de moléculas grandes.

El aparato utilizado para la filtración en gel (Figura 5A.5) es muy similar al descrito para la cromatografía en columna. Se llena una columna con esferas de un gel poroso, normalmente un polisacárido entrecruzado. Se elige la porosidad del gel de modo que las moléculas más pequeñas de la mezcla puedan penetrar en las esferas, mientras que las mayores no puedan hacerlo. La muestra se aplica en la parte superior de la columna, como en la cromatografía, y se eluye con un amortiguador. A medida que la muestra desciende por la columna, las moléculas más grandes se mueven más rápidamente, ya que no pueden entrar en las esferas de gel y sólo pueden fluir por los intersticios que hay entre ellas. Las moléculas pequeñas

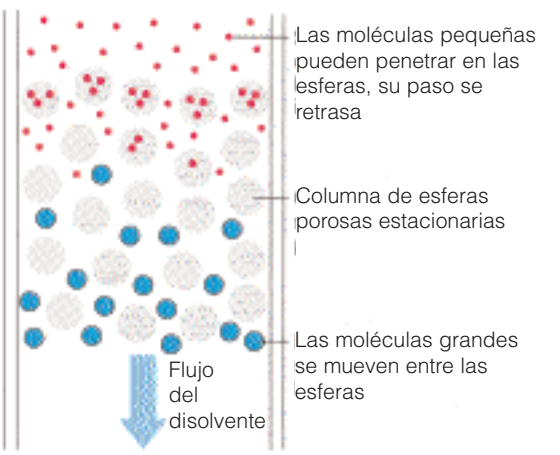


FIGURA **5A.5**
Principio de la filtración en gel.

pueden entrar en las esferas de gel y en consecuencia se rezagan. Si se recogen las fracciones cuando se pasa la disolución amortiguadora a través de la columna, las primeras fracciones contendrán las moléculas más grandes. Si se elige adecuadamente la porosidad de las esferas, pueden separarse mezclas de distintos tipos de tamaños; incluso puede calibrarse la columna con sustancias conocidas para obtener una medida aproximada del tamaño molecular basándonos en el punto en el que aparece un componente concreto.

Diálisis y ultrafiltración

Es posible obtener **membranas semipermeables** con poros lo suficientemente grandes para permitir que las moléculas pequeñas pasen libremente pero que sean una barrera para las proteínas y otras macromoléculas. Este tipo de membranas se utilizan para la purificación y concentración de biopolímeros.

La **diálisis** se utiliza habitualmente para eliminar las pequeñas moléculas contaminantes o para cambiar suavemente las condiciones de una disolución amortiguadora. Por ejemplo, se coloca una disolución de una proteína en una bolsa cerrada fabricada con una membrana de este tipo y sumergida en un volumen mucho mayor de disolución amortiguadora. Tras muchas horas los contaminantes de peso molecular bajo salen fuera y el entorno original de las moléculas proteicas se reemplaza por la disolución amortiguadora exterior. (La disolución exterior se cambia a menudo varias veces durante el proceso.) La **ultrafiltración** se utiliza algunas veces para concentrar disoluciones de macromoléculas. Se utiliza una membrana semipermeable similar, pero se aplica presión para hacer salir al disolvente y a las moléculas pequeñas a través de la membrana, con lo que se concentran las macromoléculas.

Un ejemplo: cómo preparar la mioglobina

Después de describir varios métodos de separación y purificación, parece adecuado presentar un ejemplo de cómo pueden utilizarse algunos de ellos en la purificación real de una proteína. En la Tabla 5A.1 se describe el esquema general de la preparación de mioglobina, junto con algunos de los fundamentos de cada paso. Se ha elegido la mioglobina porque el procedimiento es relativamente simple y porque utilizaremos la mioglobina con frecuencia como ejemplo de proteína característica.

La pureza del material obtenido al final del paso 5 puede verificarse por electroforesis en gel o enfoque isoeléctrico. Sobre el gel debe observarse una única banda.

Debe destacarse que este ejemplo es la preparación de una proteína especialmente sencilla. La mioglobina es abundante en el tejido utilizado y se precisan relativamente pocos pasos. La mayoría de las purificaciones son mucho más difíciles que ésta.

TABLA **5A.1**

CÓMO AISLAR Y PURIFICAR LA MIOGLOBINA[a]

Pasos	Explicación razonada
1. Empezar con tejido de músculo rojo congelado.	Debe utilizarse una fuente con gran cantidad de la proteína deseada. Se ha mantenido congelada para evitar la degradación del material.
2. Cortarlo, homogeneizar en un mezclador con una disolución de sulfato amónico saturado al 65%. Mantener a 4°C.	La homogeneización rompe las células musculares, liberando la mioglobina y otras proteínas citosólicas. El sulfato amónico precipita muchas de las proteínas solubles pero *no* la mioglobina.
3. Centrifugar a 8000 RPM en un rotor de ángulo fijo durante 30 minutos. Recoger el sobrenadante; descartar el sedimento del fondo del tubo.	Este paso elimina núcleos, partículas subcelulares, paredes celulares rotas, fibras musculares y elementos semejantes, junto con las proteínas precipitadas por el $(NH_4)_2SO_4$. El sobrenadante es un preparado de mioglobina crudo.
4. Dializar a 4°C durante 24 horas frente a un amortiguador pH 8.70, cambiándolo varias veces.	Esta etapa elimina las moléculas pequeñas que estaban presentes en el citosol y deja la proteína disuelta en el amortiguador deseado. Se elige un pH al que la mioglobina sea especialmente estable.
5. Cromatografiar la solución dializada sobre una resina de intercambio catiónico de DEAE celulosa[b]. El principal componente de la mioglobina es la primera fracción que contiene hemo (roja) que sale de la columna.	Este paso proporciona la separación final de otras proteínas, incluyendo variantes menores de la mioglobina presentes en la mezcla. El producto deberá ser una preparación bastante pura de la mioglobina.

[a] Adaptado de T. E. Hugli y F. R. N. Gurd, *J. Biol. Chem.* (1970) 245:1930-1938.

[b] DEAE = dietilaminoetil.

Bibliografía

Cantor, C. R. y P. R. Schimmel (1980) *Biophysical Chemistry*, Vol. 2. Freeman, Nueva York. Cubre de manera detallada diversas técnicas.

Freifelder, D. (1982) *Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology*. Freeman, Nueva York. Resalta más que la obra de Cantor y Schimmel las técnicas de separación prácticas.

Scopes, R. (1982) *Protein Purification: Principles and Practice*. Springer-Verlag, Nueva York.

van Holde, K. E., W. C. Johnson y P.-S. Ho (1998) *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J. Nivel intermedio (para las técnicas físicas como la sedimentación) entre el de Freifelder y el de Cantor y Schimmel.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 5B

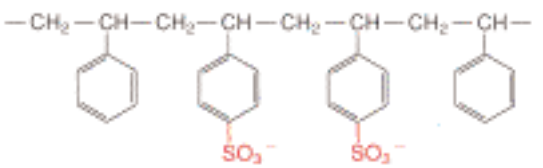
Análisis de los aminoácidos de las proteínas

Los métodos actuales para determinar la composición de aminoácidos de las proteínas comportan tres pasos básicos:

1. *Hidrólisis* de la proteína a sus aminoácidos constituyentes.
2. *Separación* de los aminoácidos de la mezcla.
3. *Cuantificación* de los aminoácidos individuales.

Aquí se describe una técnica utilizada con pequeñas variaciones en muchos laboratorios. Primero se purifica una pequeña muestra de la proteína, quizá mediante una combinación de los métodos descritos en Herramientas de la Bioquímica 5A. La proteína se disuelve en HCl 6 M y se sella la solución en una ampolla al vacío. A continuación, se calienta a 105-110°C durante aproximadamente 24 horas. En estas condiciones, los enlaces peptídicos metaestables entre los residuos se hidrolizan totalmente.

A continuación, la muestra hidrolizada se separa en los aminoácidos constituyentes en una columna de intercambio catiónico. Las resinas que se utilizan normalmente son las de poliestireno sulfonado:



Esta clase de resina separa los aminoácidos de dos modos. En primer lugar, al estar cargada negativamente, tiende a hacer pasar los aminoácidos ácidos primero y retener los básicos. El pH del amortiguador eluyente se aumenta durante la elución para facilitar esta separación. En segundo lugar, la naturaleza hidrófoba del propio poliestireno tiende a retener los aminoácidos más hidrófobos como la leucina y la fenilalanina. En la Figura 5B.1 se presenta un ejemplo de este tipo de análisis. Obsérvese el orden de aparición de los aminoácidos, que va del más ácido al más básico. Los analizadores de aminoácidos modernos están completamente programados y llevan a cabo la separación cromatográfica de los aminoácidos y su cuantificación. Cada vez más, los investigadores optan por la HPLC (véase Herramientas de la Bioquímica 5A) para la separación de los aminoácidos. Sus ventajas son la rapidez y una resolución incluso mejor.

Existen muchos métodos para detectar y cuantificar los aminoácidos que eluyen de la columna. Las técnicas más antiguas utilizaban la reacción con **ninhidrina** (Figura 5B.2).

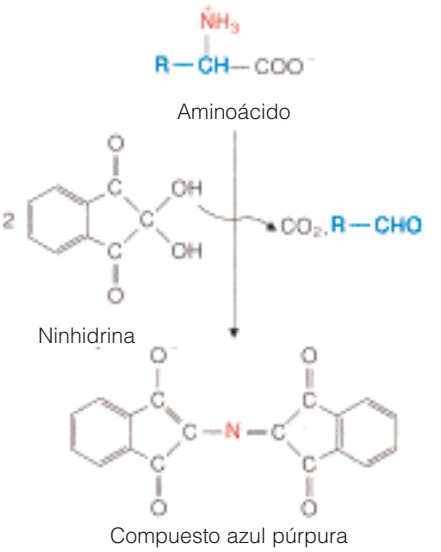


FIGURA **5B.2**
Reacción de la ninhidrina.

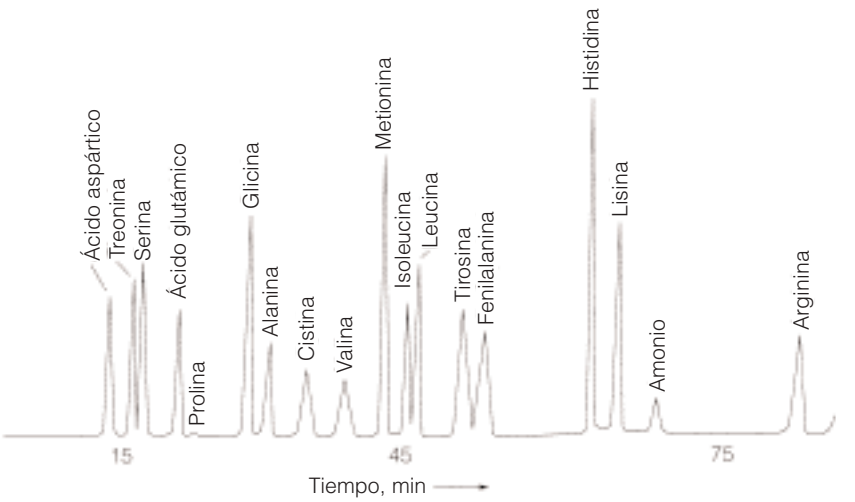
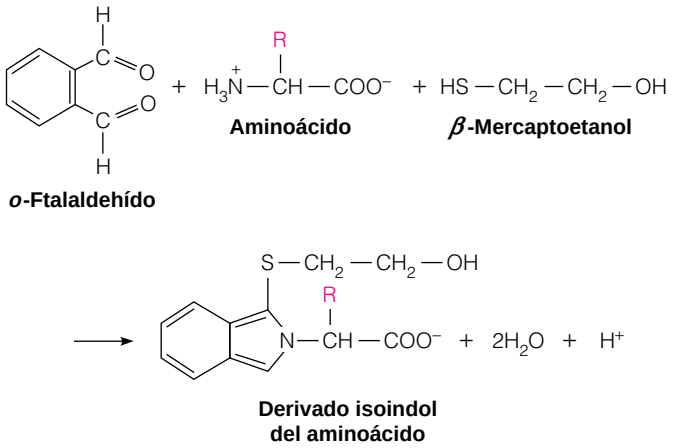


FIGURA **5B.1**
Análisis de un hidrolizado proteico en un analizador de aminoácidos de columna única.
Cortesía de Beckman Instruments, Inc.

La ninhidrina se mezclaba y reaccionaba a 100°C con los aminoácidos que eluyen del analizador; a continuación, se detectaba espectrofotométricamente la absorbancia de cada pico (que es proporcional a la concentración del aminoácido) en el mismo instrumento. Con esta técnica pueden detectarse unos pocos nanomoles (10^{-9} mol) de un aminoácido.

Más recientemente, la sensibilidad del análisis ha mejorado en gran medida con el uso de reactivos fluorescentes y detección fluorescente, que ha sustituido casi por completo a los métodos espectrofotométricos. Por ejemplo, los aminoácidos pueden hacerse reaccionar con *o*-ftalaldehído para producir un complejo fluorescente:



Tales técnicas proporcionan fácilmente una sensibilidad del orden de picomoles (pmol, o 10^{-12} mol). Los avances recientes que utilizan un nuevo sistema de microelectroforesis y detección de fluorescencia han ampliado esta sensibilidad al orden de *atomoles* (amol, o 10^{-18} mol). Esta cantidad corresponde sólo a unos pocos miles de moléculas. De hecho, las técnicas de análisis de aminoácidos han llegado hasta el punto de que puede analizarse con facilidad la cantidad de proteína que contiene una mancha en una electroforesis en gel bidimensional.

Por supuesto, estos procedimientos no son tan sencillos ni presentan tan pocos problemas como podría deducirse a partir del comentario anterior. Algunos aminoácidos presentan problemas en la reacción con los compuestos utilizados para la detección; en particular la prolina, dado que es un aminoácido cíclico, suele reaccionar de modo diferente o no reacciona en absoluto. Además, algunos aminoácidos tienden a quedar parcialmente destruidos durante la hidrólisis intensa. En este aspecto presenta problemas el triptófano y debe determinarse mediante un análisis por separado, normalmente basado en su fuerte absorbancia ultravioleta (véase la Figura 5.6). La serina, la treonina y la tirosina también tienden a degradarse durante una hidrólisis larga. Estas dificultades pueden evitarse en gran medida realizando reacciones protectoras previas o midiendo el contenido aparente del aminoácido en momentos distintos de la hidrólisis y extrapolándolo al momento cero de la hidrólisis. La asparagina y la glutamina se hidrolizan invariablemente para dar los ácidos aspártico y glutámico, de modo que el contenido total observado de estos ácidos incluye las amidas. Esta reacción, como las demás reacciones de degradación mencionadas antes, puede evitarse utilizando una hidrólisis enzimática, con una mezcla de enzimas proteolíticas, en lugar de la hidrólisis ácida. Sin embargo, este método también presenta inconvenientes, porque a veces es difícil lograr una hidrólisis completa y las mismas enzimas deben eliminarse antes del análisis.

A pesar de estas complicaciones, el análisis de aminoácidos mediante analizadores automatizados se ha convertido en una operación habitual en muchos laboratorios. Uno de los primeros análisis de cualquier proteína recién descubierta es invariablemente su composición de aminoácidos.

Bibliografía

Chang, J.-Y., R. Knecht y D. Braun (1981) Amino acid analysis at the picomole level. *Biochem. J.* 199:547-555.

Cheng, Y.-F. y N. Dovichi (1988) Subattomole amino acid analysis by capillary zone electrophoresis and laser-induced fluorescence. *Science* 242:562-564.

Liu, T.-Y. (1972) Determination of tryptophan. *Methods Enzymol.* 25:44-55.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 5C

Cómo secuenciar una proteína

La determinación de la estructura primaria de una proteína, como el análisis similar de los ácidos nucleicos, suele denominarse secuenciación. Existen varias maneras de determinar la secuencia de aminoácidos. Como se mencionó en la página 158, la determinación de la secuencia del gen se está convirtiendo rápidamente en uno de los métodos más fáciles. De hecho, a medida que se están determinando los genomas completos de muchos organismos, se está adquiriendo automáticamente la información de las secuencias de miles de proteínas, muchas de ellas de función aún desconocida. No obstante, como se ha señalado, esas secuencias no nos proporcionan información sobre las modificaciones de los aminoácidos o sobre la existencia de entrecruzamientos intramoleculares como los enlaces disulfuro y para encontrarlos debemos secuenciar la proteína. Hoy en día, prácticamente todas las secuenciaciones directas se realizan por el método desarrollado por Pehr Edman. La degradación de Edman emplea la secuencia de reacciones que aparece en la Figura 5C.1. El fenilisotiocianato reacciona en medio alcalino con el grupo amino terminal para dar un derivado de feniltiocarbamilo del péptido (Figura 5C.1, paso 1). Este derivado se trata posteriormente con un ácido anhidro fuerte que produce la rotura del enlace peptídico entre los residuos 1 y 2 (paso 2).

El derivado del residuo N-terminal se reagrupa a continuación para dar un derivado de feniltiohidantoína (PTH) del aminoácido (paso 3). Se han logrado dos cosas importantes. En primer lugar, el residuo N-terminal se ha marcado con una etiqueta identificable, mientras que el resto del polipéptido no se ha destruido; sencillamente se ha acortado en un residuo. A continuación, puede repetirse toda la secuencia de reacciones y determinarse el segundo residuo. Por repetición continuada, puede "leerse" un polipéptido largo empezando desde el extremo N-terminal. Este procedimiento es la base del método más importante para secuenciar directamente las cadenas polipeptídicas.

Actualmente se realiza casi por completo de forma automática en aparatos denominados secuenciadores. Este tipo de dispositivos es capaz de realizar todas las reacciones que se presentan en la Figura 5C.1 una y otra vez. El secuenciador acumulará en un tubo aparte el derivado de feniltiohidantoína (PTH) de cada residuo de aminoácido del polipéptido, comenzando con el residuo N-terminal y realizando tantos ciclos como desee el operador o lo permita la precisión. Los derivados de PTH normalmente se identifican por cromatografía de alta resolución.

La proteína que utilizaremos como ejemplo es la insulina bovina. Esta elección es adecuada, ya que fue la primera proteína secuenciada por Frederick Sanger y sus colaboradores a principios de los años 1950. (Evidentemente, los métodos que describimos son mucho más sofisticados que los que disponía Sanger en su trabajo pionero.) El ejemplo es también más complicado que la mayoría, ya que tenemos dos cadenas conectadas de forma covalente, y hay que localizar los enlace S—S. Los pasos del procedimiento se presentan en la Figura 5C.2.

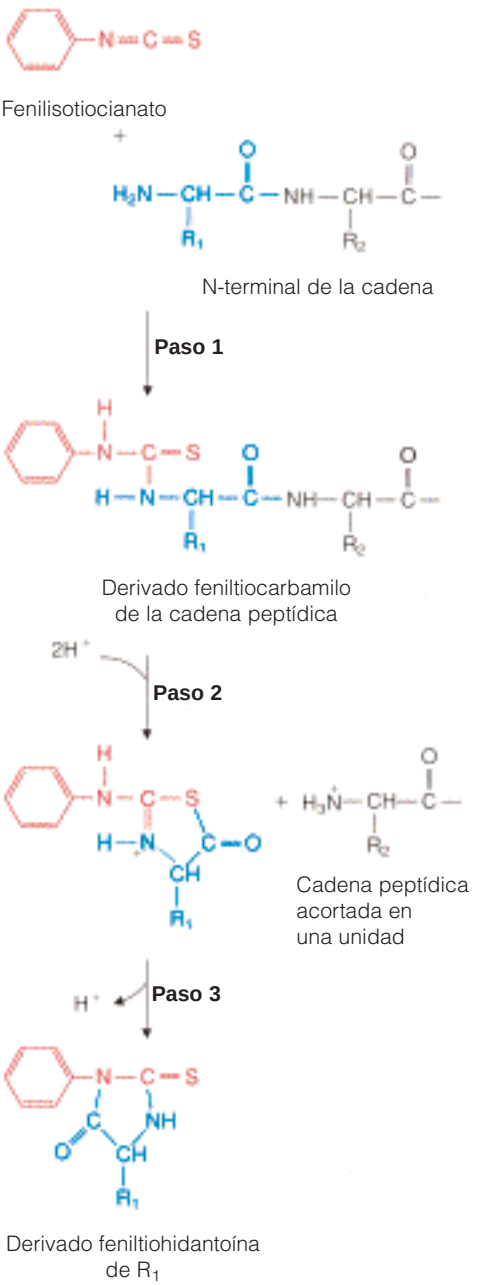
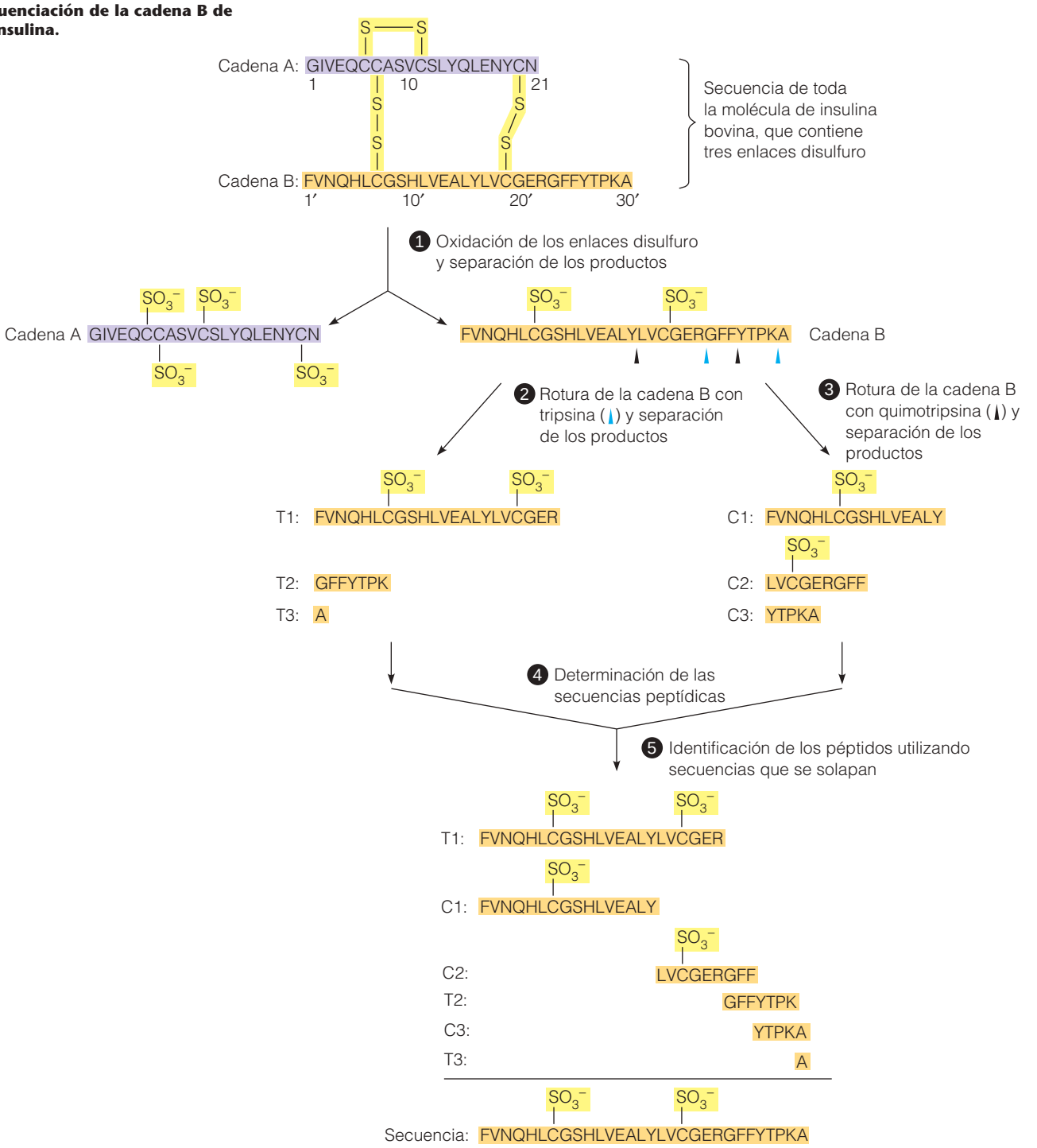


FIGURA **5C.1**
Degradación de Edman.

FIGURA **5C.2**

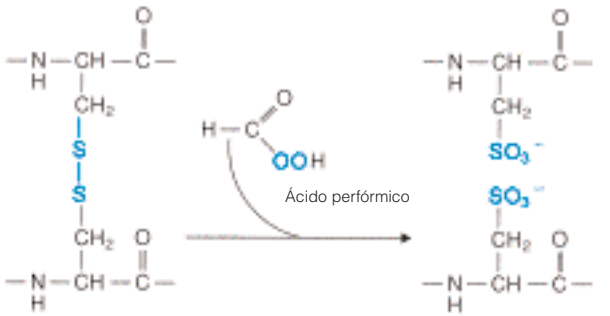
Secuenciación de la cadena B de la insulina.



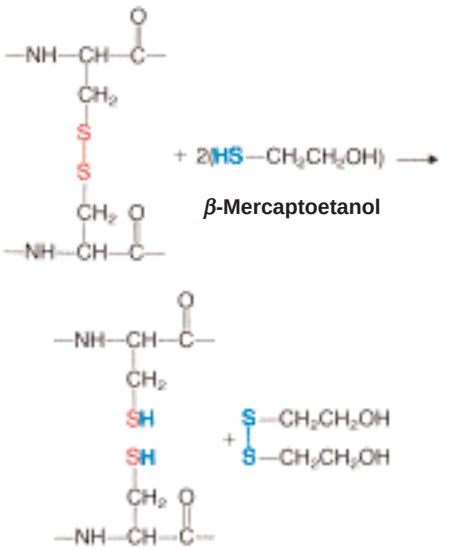
El investigador que desee secuenciar una proteína primero debe asegurarse de que el material es puro. La proteína puede separarse de otras proteínas por una combinación de los métodos descritos en Herramientas de la Bioquímica 5A y comprobarse su pureza mediante electroforesis, enfoque isoeléctrico o los dos métodos a la vez. A continuación, debe determinarse si el material contiene más de una cadena polipeptídica, ya que en algunos casos los puentes disulfuro enlazan cadenas de modo covalente. La electroforesis en gel con dodecilsulfato sódico (SDS) en presencia y ausencia de agentes reductores puede responder a esta pregunta. En el ejemplo de la insulina, el investigador encontraría que hay dos cadenas, A y B, como muestra la Figura 5C.2. Estas cadenas deben separarse y secuenciarse individualmente. Existen distintas reac-

ciones para romper los enlaces disulfuro y así separar las cadenas. A continuación, se describen las dos reacciones de este tipo más importantes.

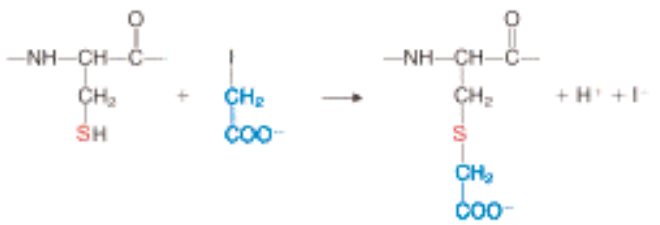
La *oxidación con ácido perfórmico* es la técnica que se utiliza en la Figura 5C.2, paso 1. El agente oxidante fuerte ácido perfórmico producirá ácido cisteico:



La *reducción con β-mercaptoetanol* es una técnica más suave.



La reducción deja grupos sulfhidrilo libres, que suelen estar colocados de modo que es probable la reoxidación para formar de nuevo el enlace disulfuro. En consecuencia, suelen bloquearse los sulfhidrilos para impedirlo. Un agente bloqueante común es el yodoacetato:



Si se lleva a cabo alguno de estos dos métodos con la insulina, la proteína completa se fragmenta en cadenas A y B. A continuación, pueden separarse estas cadenas por métodos cromatográficos.

Antes de secuenciar las cadenas individuales, suele determinarse su composición de aminoácidos (véase Herramientas de la Bioquímica 5B). Esta determinación puede señalar composiciones poco habituales y de este modo alertar al operador ante problemas potenciales. Además, los datos de la composición servirán para comprobar los resultados de la secuenciación, ya que la secuencia determinada debe concordar con la composición.

En este momento puede iniciarse la secuenciación. El investigador debe tener presente que ni siquiera las mejores técnicas de secuenciación de Edman pueden producir resultados fiables más allá de 40-60 residuos. A partir de este punto, las impurezas acumuladas y las reacciones incompletas producen resultados ambiguos. Si la electroforesis en gel SDS ha indicado que la cadena es de esta longitud o superior, primero es necesario fragmentarla en partes de tamaño manejable. En el caso de la insulina bovina, las cadenas A y B son tan cortas que las técnicas modernas podrían secuenciarlas en una sola operación del secuenciador. Pero para presentar los métodos necesarios para proteínas más grandes, supondremos que el investigador debe fragmentar las cadenas de insulina en polipéptidos pequeños. (En realidad, éste fue el caso en los estudios iniciales de secuenciación de Sanger sobre la insulina.) Supongamos que debe secuenciarse la cadena B de la insulina. El primer paso sería fragmentar partes alícuotas de la cadena con dos o más de los reactivos fragmentadores específicos descritos previamente. La tripsina y la quimotripsina, por ejemplo, producirían los péptidos que aparecen en los pasos 2 y 3, respectivamente, de la Figura 5C.2. A continuación, se aislarían los péptidos individuales de cada una de las dos mezclas utilizando, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, y podrían determinarse sus secuencias (Figura 5C.2, paso 4).

En la actualidad se utilizan varias técnicas instrumentales para secuenciar péptidos mediante la técnica de Edman. A continuación, se presentan las descripciones de dos de ellas.

En el *secuenciador de fase sólida de pulso líquido* (Figura 5C.3), el polipéptido se acopla de modo covalente mediante su C-terminal a una matriz sólida de soporte. Esta matriz es algunas veces una membrana polimérica delgada, que se mantiene en el recipiente de reacción o puede ser lechos de resina a los que se acopla la proteína. Se añaden los reactivos, se produce la reacción y los productos se extraen automáticamente. Se recogen y analizan los derivados de feniltiohidantoína.

En una técnica variante, la *secuenciación en fase gaseosa*, muchos de los reactivos se añaden en estado gaseoso, lo cual minimiza las pérdidas y proporciona unos análisis más rápidos. Estos métodos en fase sólida pueden secuenciar cantidades muy pequeñas de polipéptidos; en ocasiones es suficiente con sólo 1 μg (10^{-3} mg).

Volviendo a la secuenciación de la insulina bovina, supongamos que se han secuenciado todos y cada uno de los péptidos que aparecen en la Figura 5C.2 (paso 4). A pesar de que con sólo los péptidos trípticos se cubre toda la secuencia,

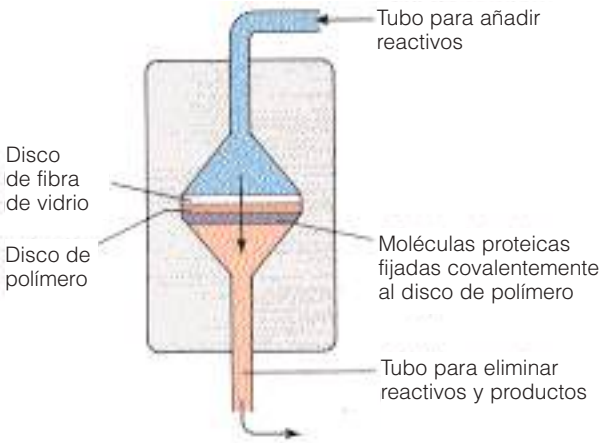


FIGURA **5C.3**

Recipiente de reacción en un secuenciador automático de fase sólida.

no son suficientes para permitirnos escribir la secuencia de la cadena B de la insulina, ya que no conocemos el orden en el que aparecen en la cadena. Sin embargo, también tenemos los péptidos quimiotrípticos, que solapan los trípticos; en consecuencia, se elimina toda ambigüedad. Sólo una disposición de la cadena completa concuerda con las secuencias de estos dos conjuntos de péptidos, como puede verse comparando las secuencias que se solapan (paso 5).

Finalmente, la caracterización completa de la estructura covalente de una proteína requiere localizar las posiciones de todos los enlaces disulfuro. En la preparación para la secuenciación, estos enlaces se habrán destruido, pero se habrán determinado las posiciones de todas las cisteínas, algunas de las cuales *pueden* participar en el enlace. La pregunta es: ¿qué cisteínas están unidas de este modo en la proteína nativa y cuál está conectada a cuál?

Para determinar la disposición de los enlaces disulfuro, el investigador empieza de nuevo con la proteína nativa, la insulina en el ejemplo que aparece en la Figura 5C.4. La reacción con yodoacetato marcado radiactivamente señala los residuos de cisteína libres, y la fragmentación de la proteína en los mismos péptidos de la secuenciación permite que se identifiquen las posiciones de estas cisteínas no enlazadas (paso 1). A continuación se fragmentan muestras de la proteína intacta con varios agentes fragmentadores, pero en esta ocasión sin romper primero los enlaces disulfuro (pasos 2 y 3). Algunos péptidos, que están conectados por estos enlaces, están unidos entre sí. A continuación, pueden aislarse y romper sus enlaces disulfuro para averiguar el péptido que contiene cada uno del conjunto original.

Hasta el momento hemos descrito cómo se puede determinar toda la secuencia de aminoácidos, o estructura primaria, de una proteína. Tales análisis se han llevado a cabo en varios millares de proteínas distintas en los años transcurridos desde que Sanger determinó por primera vez la secuencia de la insulina. El simple hecho de que tal secuenciación pueda llevarse a cabo es una prueba convincente de que cada proteína tiene una estructura primaria única.

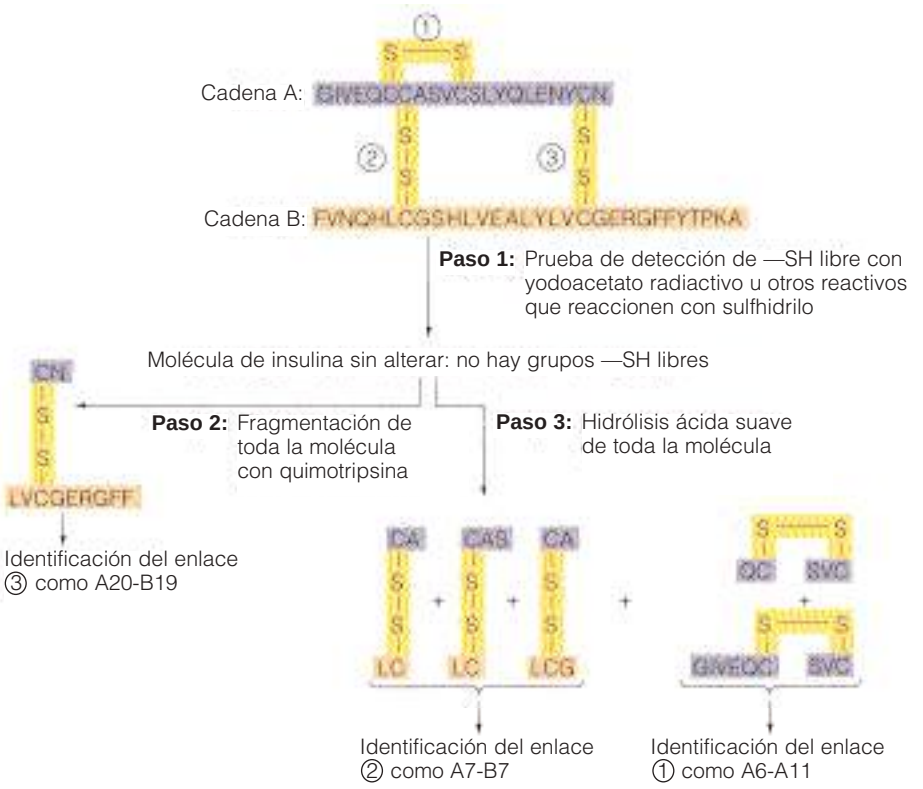


FIGURA **5C.4**

Localización de los enlaces disulfuro en la insulina.

Bibliografía

Edman, P. y G. Begg (1967) A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* 1:80-91. El primer método automatizado.

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

Stein, S. y S. Udenfreund (1984) A picomole protein and peptide chemistry: Some applications to the opioid peptides. *Anal. Biochem.* 136:7-23.

Walsh, K. A., L. H. Ericsson, D. C. Parmelee y K. Titani (1981) Advances in protein sequencing. *Annu. Rev. Biochem.* 50:261-284.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 5D

Cómo se sintetiza un polipéptido

La síntesis química de péptidos de secuencia definida ha pasado a ser de gran importancia en medicina y biología molecular. Pueden fabricarse algunas hormonas sintéticas con modificaciones no naturales que las hagan más estables. Pueden utilizarse péptidos sintéticos para producir eficazmente anticuerpos contra porciones de proteínas específicas; estos anticuerpos son útiles para estudiar la interacción de las proteínas con otras moléculas.

Para sintetizar un péptido de secuencia definida deben cumplirse varios criterios:

1. Debe ser posible añadir aminoácidos de uno en uno, preferiblemente en un reactor automatizado.
2. Debido a la metaestabilidad del enlace peptídico, los aminoácidos deben activarse de algún modo.
3. Para evitar las reacciones secundarias, deben bloquearse todos los grupos reactivos distintos de los grupos amino y carboxilo adyacentes al carbono α. Ésta es la función del agente bloqueante.

El esquema que se utiliza habitualmente en la actualidad se presenta en la Figura 5D.1. Fue diseñado por Bruce Merrifield.

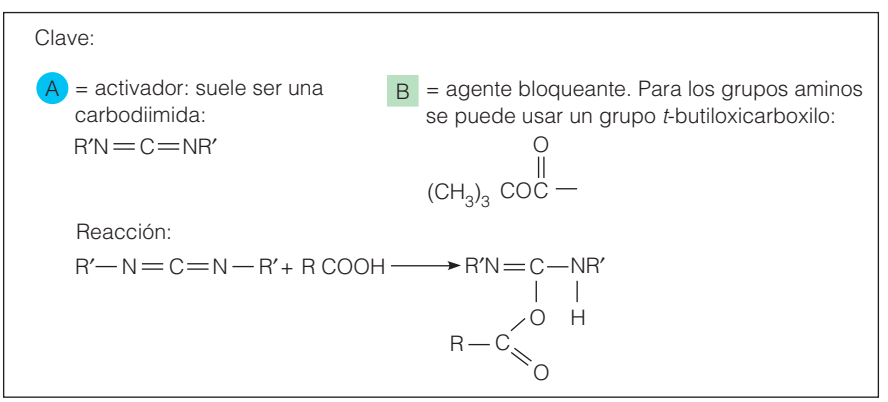


FIGURA **5D.1**
Reacciones de la síntesis peptídica en fase sólida.

El aminoácido C-terminal del péptido deseado se une de modo covalente a una resina, con su grupo $H_3\overset{+}{N}$— expuesto. El aminoácido que debe añadirse a continuación se activa por reacción de su carboxilo con un reactivo de carbodiimida, mientras que se bloquea su grupo amino con un *t*-butiloxicarbonilo (paso 1). Pueden utilizarse otros grupos bloqueantes para otros grupos reactivos en las cadenas laterales de los aminoácidos. La reacción de acoplamiento produce un dipéptido, que aún contiene un grupo amino bloqueado. Este grupo se desbloquea utilizando ácido trifluoroacético (paso 2) y, a continuación, se añade el siguiente residuo activado (paso 3). Todas las reacciones se llevan a cabo automáticamente, con las cadenas en crecimiento fijadas a la resina. En el último paso (que no se muestra), se añade HF para fragmentar la cadena, así como cualquier grupo bloqueante de las cadenas laterales de lisina y otros grupos reactivos.

Utilizando estos métodos, pueden sintetizarse de forma rutinaria péptidos con una longitud de alrededor de 100 residuos con un buen rendimiento; en algunos casos se han producido cadenas incluso más largas. Merrifield ha sintetizado, por ejemplo, una enzima activa (ribonucleasa) de 124 residuos.

Dispositivos combinatorios de péptidos organizados espacialmente y dirigidos por la luz

Frecuentemente es necesario analizar simultáneamente un gran número de péptidos diferentes para algún tipo de actividad biológica. Por ejemplo, puede quererse conocer qué miembro de una gran familia de oligopéptidos similares es el antígeno que reacciona con un anticuerpo específico. Inicialmente, éste era un proceso muy laborioso que requería hasta centenares de síntesis diferentes.

En la actualidad, es posible preparar dispositivos bidimensionales microscópicos que contienen muchas combinaciones de péptidos crecidos sobre una superficie sólida utilizando técnicas fotolitográficas. En la Figura 5D.2 se ilustra la técnica básica. Los aminoácidos que se van a emplear tienen bloqueado el N-terminal con un grupo protector fotolábil y llevan grupos carboxilo activados. En primer lugar, reacciona una clase de aminoácidos (en este caso Leu) con una superficie cubierta con grupos amino. A continuación, se ilumina toda la superficie, con lo que se eliminan los grupos protectores. Luego puede añadirse a cada cadena un segundo aminoácido activado. En este ejemplo, tras cuatro ciclos ha crecido en cada lugar el péptido GGFL. Comienza ahora la parte ingeniosa: en el ciclo siguiente, se coloca sobre la superficie una máscara rectangular, de forma que sólo se ilumina la mitad de cuadrados de un patrón de reconocimiento. Esto permite el acoplamiento de residuos de Tyr en la porción iluminada. A continuación, se ilumina la otra porción y se acopla con Pro. De esta forma, en este ejemplo, se obtiene un simple patrón de reconocimiento con PGGFL y YGGFL alternantes. La Figura 5D.3 presenta la reacción de un anticuerpo fluorescente que reacciona con YGGFL en una

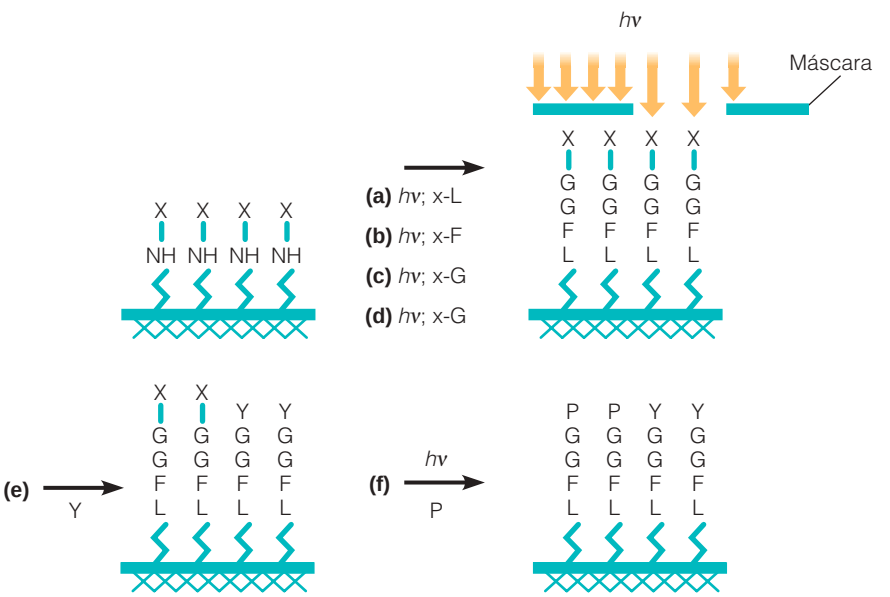


FIGURA **5D.2**

Un ejemplo de síntesis de oligopéptidos con un patrón espacial dirigida por la luz. X indica un grupo bloqueante fotolábil unido a cada residuo de aminoácido que se añade. En los pasos a-d, se construye sobre la superficie el tetrapéptido GGFL. Posteriormente se emplea una máscara para iluminar y romper los grupos bloqueantes en áreas definidas, para permitir la adición de tirosina (paso e). Se emplea un ciclo adicional de fotodesprotección y acoplamiento para añadir prolina en las áreas que quedan.

De S. P. A. Fodor et al., *Science* (1991) 251:767–773. © 1991 AAAS. Reproducido con permiso.

superficie así. El ejemplo que se presenta es simple: pueden generarse fácilmente patrones mucho más complejos utilizando máscaras solapantes, lo cual permite generar sobre una superficie miles de péptidos diferentes, con un patrón determinado.

Bibliografía

Fodor, S. P. A., J. L. Reed, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu y D. Solas (1991) Light-directed spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251:767-773.

Merrifield, B. (1986) Solid phase synthesis. *Science* 232:341-347.

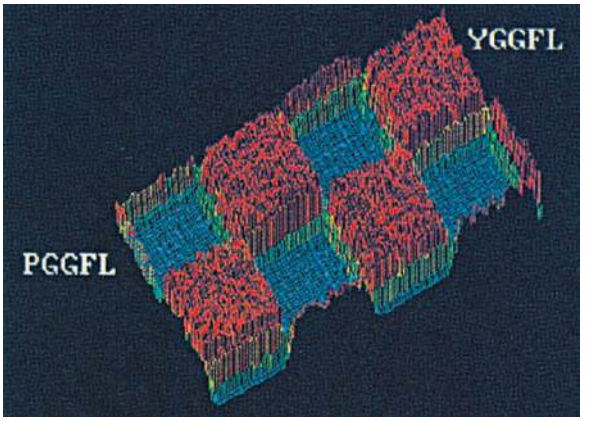


FIGURA **5D.3**

Representación tridimensional del dispositivo de reconocimiento de YGGFL y PGGFL. Los datos de intensidad de fluorescencia se transformaron en alturas de agujas que son proporcionales al número de cuentas detectadas de los píxeles de 2.5 μm cuadrados. Las agujas están también codificadas por un color.

Cortesía de S. Fodor, Affymetrix Research Institute, reproducido por S. Fodor et al., *Science* (1991) 251:767–773, con permiso de *Science*.

CAPÍTULO 6

Estructura tridimensional de las proteínas

En el Capítulo 5 presentamos el concepto de estructura primaria de las proteínas. Destacamos que este primer nivel de organización, la secuencia de aminoácidos, viene dado por la secuencia de DNA del gen para cada proteína. Sin embargo, la mayoría de las proteínas presentan también niveles superiores de organización estructural. Es la estructura tridimensional específica de cada proteína la que le permite desempeñar su función biológica concreta.

En la Figura 6.1 se presenta otra representación de la conformación tridimensional de la molécula de mioglobina que mostramos en la Figura 5.1. Una estructura tridimensional específica supone que cada uno de los miles de átomos de una molécula de proteína ocupa una situación espacial concreta y bien definida dentro de la molécula. Esta característica está destacada en la Figura 5.1. En cambio, la Figura 6.1 se ha dibujado para señalar que existen dos niveles distinguibles del plegado tridimensional de la cadena polipeptídica. En primer lugar, la cadena parece encontrarse parcialmente enrollada en regiones de estructura helicoidal (indicadas como A-H en la figura). Este plegado *regular* local se denomina **estructura secundaria** de la molécula. Las regiones enrolladas de modo helicoidal se pliegan a su vez formando una estructura compacta específica de toda la cadena polipeptídica. A este nivel superior de plegado lo denominamos **estructura terciaria** de la molécula. Más adelante, en este mismo capítulo, encontraremos que algunas proteínas constan de varias cadenas polipeptídicas, dispuestas de modo regular. Esta disposición se denomina nivel de organización **cuaternario**.

Este capítulo está dedicado a examinar los distintos niveles de estructura proteica: su geometría, cómo se estabilizan y su importancia en la función de la proteína.

Las moléculas proteicas poseen cuatro niveles de organización estructural: primaria (secuencia), secundaria (plegado local), terciaria (plegado global) y cuaternaria (asociación de varias cadenas).

Estructura secundaria: formas regulares de plegar la cadena polipeptídica

DESCUBRIMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS POLIPEPTÍDICAS REGULARES

Nuestro conocimiento sobre la estructura secundaria tiene su origen en la notable obra de Linus Pauling, quizás el químico más importante del siglo XX. Ya en

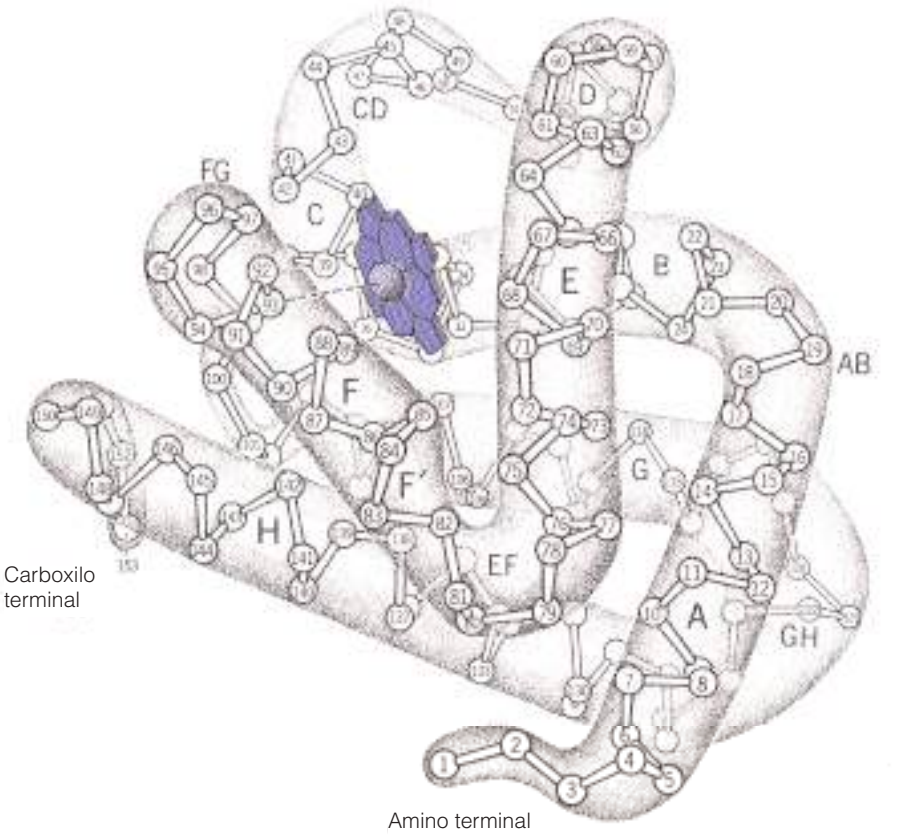


FIGURA **6.1**

Plagado tridimensional de la proteína mioglobina. Cada aminoácido está indicado por un círculo correspondiente a su átomo de carbono α. Se omiten las cadenas laterales con el fin de destacar el modo en que el armazón polipeptídico se envuelve formando hélices y se pliega. Las regiones helicoidales α individuales están marcadas de la A a la H, y las regiones de giro se designan con dos letras (p. ej., GH). Esta proteína se pliega alrededor de un grupo hemo (que se indica en color púrpura), una estructura heterocíclica en el plano que forma un quelato con el hierro y actúa como lugar de unión del oxígeno

© Irving Geis.

los años 1930 había empezado los estudios de difracción de rayos X de aminoácidos y péptidos pequeños, a fin de poder analizar finalmente la estructura proteica. A principios de los años 1950, Pauling y sus colaboradores se sirvieron de estos datos, junto con una intuición científica poco habitual, para empezar un análisis sistemático de las posibles conformaciones regulares de la cadena polipeptídica. Postularon varios principios que debía cumplir cualquier estructura de este tipo:

1. Las longitudes de enlace y los ángulos de enlace deberían desviarse lo menos posible de los hallados en los estudios de difracción de rayos X de los aminoácidos y los péptidos, tal como aparece en la Figura 5.12b (página 154).
2. Dos átomos no pueden acercarse el uno al otro a una distancia menor de la que les permiten sus radios de van der Waals.
3. El grupo amida debe permanecer en un plano y en la configuración *trans*, como se muestra en la Figura 5.12b. (Esta característica se había reconocido en los primeros estudios de difracción de rayos X de péptidos pequeños.) En consecuencia, sólo es posible la rotación alrededor de los dos enlaces adyacentes al carbono α de cada residuo de aminoácido, tal como se muestra en la Figura 6.2.

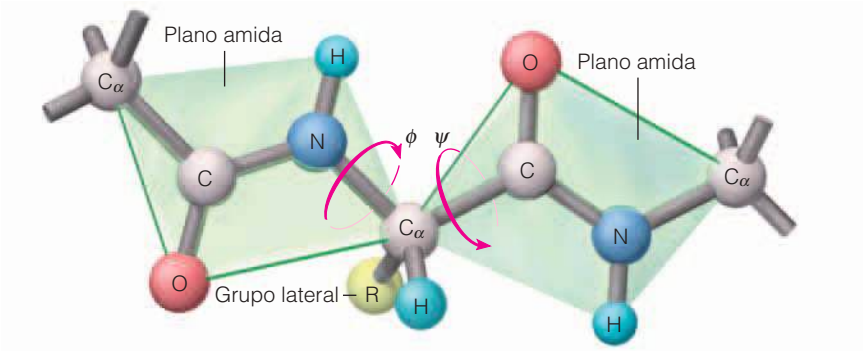


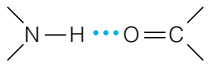
FIGURA **6.2**

Rotación alrededor de los enlaces en una cadena polipeptídica. Se muestran dos planos amida adyacentes en verde claro. Sólo está permitida la rotación alrededor de



los enlaces N—C_α y C_α—C—. Los ángulos de rotación alrededor de estos enlaces se definen respectivamente como ϕ y ψ, con direcciones definidas como rotación positiva, tal como señalan las flechas; la rotación positiva es en el sentido de las agujas del reloj como se ve en el carbono α. La conformación extendida de la cadena que se muestra aquí corresponde a ϕ = + 180º, ψ = +180º.

4. Es preciso algún tipo de enlace no covalente para estabilizar un plegado regular. La posibilidad más evidente es el enlace de hidrógeno entre los protones amida y los oxígenos carbonilo:



Este concepto resultaba natural para Pauling, que había tenido mucho que ver con el desarrollo de la idea de los enlaces de H. En resumen, las conformaciones preferidas deben ser aquellas que permitan una cantidad máxima de enlaces de hidrógeno pero que al mismo tiempo cumplan los criterios 1-3.

Trabajando principalmente con modelos moleculares, Pauling y sus colaboradores pudieron llegar a un pequeño número de conformaciones regulares que cumplían todos estos criterios. Algunas de ellas eran estructuras helicoidales formadas por una única cadena polipeptídica y otras eran estructuras en forma de lámina formadas por cadenas adyacentes. En la Figura 6.3a y b se presentan las dos estructuras que propusieron como las más probables: la *hélice* α y la *lámina* β. De hecho, estas dos estructuras resultaron ser las estructuras secundarias más comunes de las proteínas. En la Figura 6.4 se muestran otras dos hélices polipeptídicas que se han definido posteriormente. La hélice 3_{10} se observa en algunas proteínas, pero no es tan común como la hélice α. La hélice π, aunque es posible estéricamente, no se ha observado, lo que tal vez se deba a que presenta un agujero en la parte media que es demasiado grande para permitir las interacciones de van der Waals y demasiado pequeño para admitir moléculas de agua potencialmente estabilizadoras. Todas las estructuras que aparecen en las Figuras 6.3 y 6.4 cumplen los criterios antes mencionados. En concreto, en todas las estructuras el grupo peptídico está en un plano, y cada uno de los protones amida y cada uno de los oxígenos carbonilo (exceptuando algunos próximos a los extremos de las hélices) participan en los enlaces de hidrógeno. Cada una de estas formas constituye un posible tipo de estructura secundaria de las proteínas.

De entre las diversas estructuras secundarias posibles de los polipéptidos, las que se encuentran con mayor frecuencia son la hélice α, la lámina β y la hélice 3_{10}.

DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS: HÉLICES MOLECULARES Y LÁMINAS PEGADAS

En Herramientas de la Bioquímica 4A presentamos una relación de las distancias que definen una hélice molecular: la repetición cristalográfica (c), el paso (p) y la elevación (h). También señalamos que las hélices pueden ser a derechas o a izquierdas, y que pueden contener un número entero de residuos por vuelta o bien un número no entero. Al número de residuos por vuelta lo denominamos

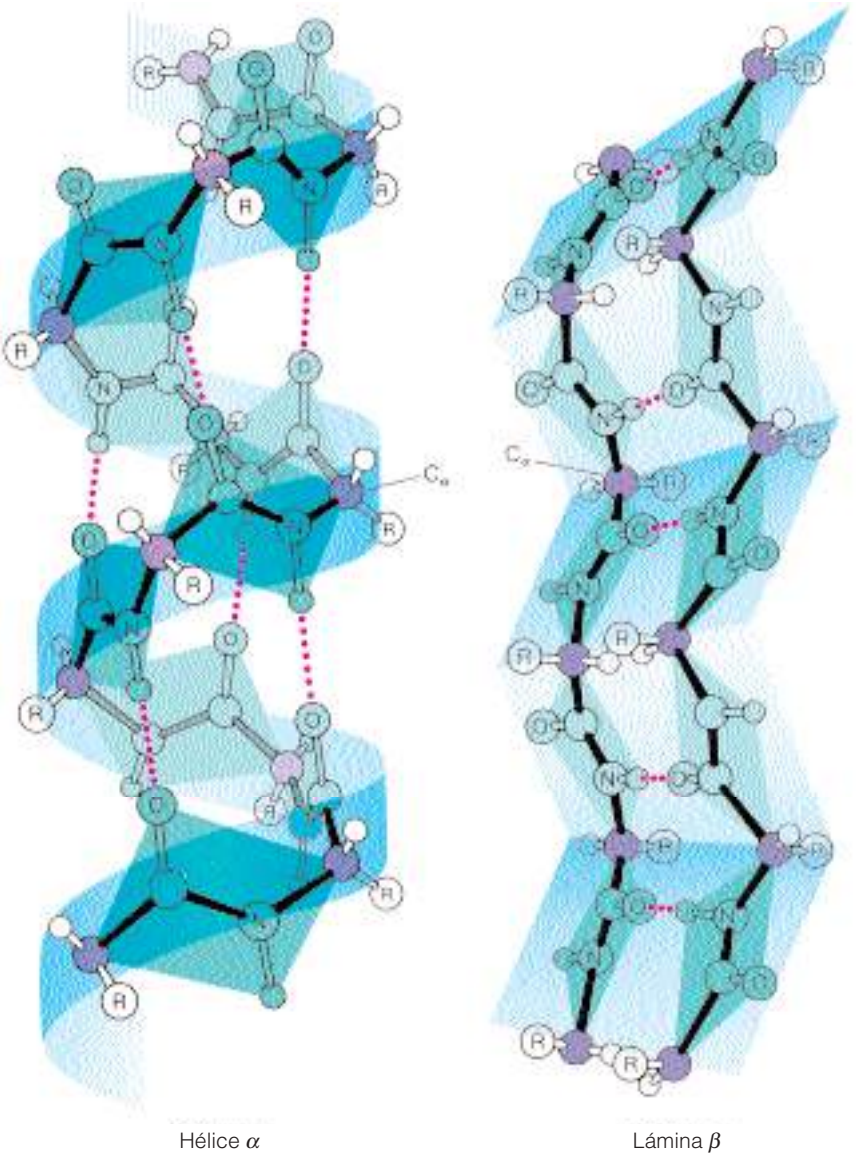


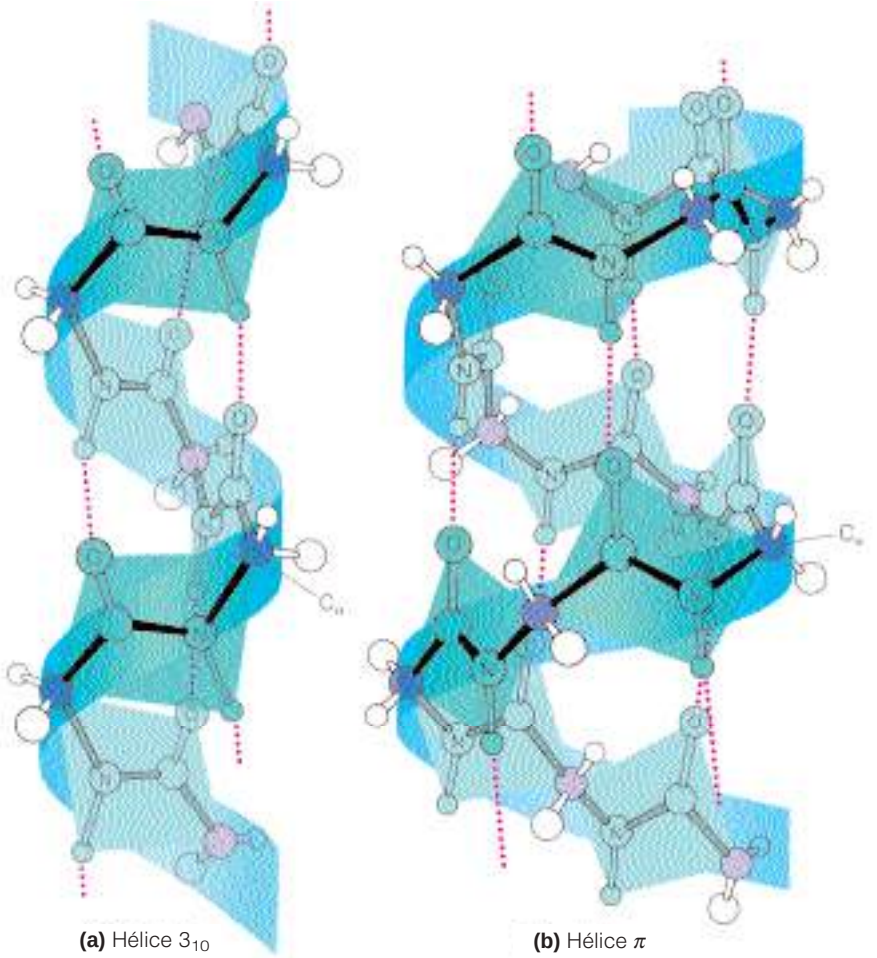
FIGURA **6.3**

Hélice α y lámina β. Éstas son las dos estructuras secundarias regulares más importantes de los polipéptidos. Linus Pauling predijo su existencia. **(a)** En la hélice α los enlaces de hidrógeno se forman dentro de una única cadena polipeptídica y son casi paralelos al eje de la hélice. **(b)** En la lámina β, los enlaces de hidrógeno se forman entre cadenas adyacentes, de las cuales aquí sólo aparecen dos. En esta estructura, los enlaces de hidrógeno son casi perpendiculares a las cadenas.

© Irving Geis.

n y al número de residuos por repetición m. Este último siempre ha de ser un número entero, puesto que define una repetición exacta de la estructura. Si existe un número entero de residuos por vuelta, la repetición y el paso serán iguales, y $n = m$. En la Figura 6.5 se presentan esquemáticamente algunas hélices de este tipo. Obsérvese que, a medida que aumenta el número de residuos por vuelta, la estructura cambia progresivamente desde una hélice ancha hasta una cinta plana. Además, el cambio progresivo en la misma dirección conduce a hélices de giro opuesto. Se produce la misma inversión de giro cuando intentamos construir hélices polipeptídicas con más de 5 residuos/vuelta. La hélice se amplía hasta un anillo cerrado. No todas estas estructuras se hallan en los polipéptidos. Por ejemplo, la estructura de cadena única con $n = 2$ que se muestra en la Figura 6.5 no se da en la naturaleza, como vamos a explicar en breve.

Una de las intuiciones más importantes de Pauling fue reconocer que las hélices polipeptídicas no tienen por qué tener un número entero de residuos por vuelta. Por ejemplo, la hélice α se repite tras exactamente 18 residuos, que representan 5 vueltas. En consecuencia, tiene 3.6 residuos por vuelta. Dado que el



(a) Hélice 3_{10} **(b)** Hélice π

FIGURA **6.4**

Otras estructuras secundarias posibles de los polipéptidos. **(a)** La hélice 3_{10} se encuentra en las proteínas, pero es menos común que la hélice α que aparece en la Figura 6.3a. **(b)** La hélice π (o 4.4_{16}) es posible estéricamente, pero hasta el momento no se ha observado en las proteínas.

© Irving Geis.

paso de una hélice viene dado por $p = nh$, tenemos para la hélice α, con una elevación de 0.15 nm/residuo, $p = 3.6$ (res/vuelta) $\times$ 0.15 (nm/res) = 0.54 nm/vuelta. Los parámetros para las otras hélices que aparecen en las Figuras 6.3 y 6.4 se indican en la Tabla 6.1.

Los parámetros que se han definido anteriormente describen a la mayoría de las hélices moleculares. Para las hélices polipeptídicas, con enlaces de hidrógeno, existe otra magnitud importante. Si se examina el modelo de hélice α (Figura 6.3a), se observará que cada oxígeno del carbonilo está unido por enlace de hidrógeno al protón de la amida del *cuarto* residuo más adelante de la hélice. Por consiguiente, si incluimos el enlace de hidrógeno, se forma un bucle de 13 átomos. La Figura 6.6 muestra esto de forma esquemática para cada una de las hélices de las Figuras 6.3 y 6.4. Cada tipo de hélice tiene un número distinto de átomos en este bucle de enlaces de hidrógeno. A este número le llamaremos *N*. Entonces, un modo rápido de describir una hélice polipeptídica es mediante la abreviatura n_N, donde n es el número de residuos por vuelta. La hélice 3_{10} encaja en esta descripción. Presenta exactamente 3 residuos por vuelta y un bucle de enlaces de hidrógeno de 10 elementos. La hélice α también podría llamarse hélice 3.6_{13}, y la hélice π, hélice 4.4_{16}.

Dado que los enlaces de hidrógeno tienden a ser lineales, los átomos N—H···O en las hélices polipeptídicas deben estar en una línea recta. Si se examinan las Figuras 6.3 y 6.4, se verá que este requisito se satisface como mínimo

TABLa 6.1 Parámetros de algunas estructuras secundarias polipeptídicas

Tipo de Estructura	Residuos/ Vuelta	Elevación (nm)	Número de átomos en un anillo con enlace de H	ϕ (°)	ψ (°)
Lámina β antiparalela	2.0	0.34	—[a]	−139	+135
Lámina β paralela	2.0	0.32	—[a]	−119	+113
Hélice 3_{10}	3.0	0.20	10	−49	−26
Hélice α (3.6_{13})	3.6	0.15	13	−57	−47
Hélice π (4.4_{16})[b]	4.4	0.12	16	−57	−70

[a]El enlace es entre cadenas polipeptídicas.
[b]Posible desde un punto de vista estérico, pero no se ha observado en las proteínas.

aproximadamente para las hélices 3_{10}, α y π. No obstante, es muy difícil formar hélices con sólo dos residuos por vuelta *y* enlaces de hidrógeno lineales entre los residuos de la misma cadena. Por consiguiente, la única estructura $n = 2$ que se halla en las proteínas *no* es la cinta plana que aparece en la Figura 6.5, sino la estructura de *lámina plegada* β de la Figura 6.3b. En la lámina plegada β todos los residuos presentan una rotación de 180° respecto al precedente, con lo que cada cadena se convierte en una hélice $n = 2$. Si las cadenas también están plegadas en la forma de acordeón de la Figura 6.3b, pueden producirse enlaces de hidrógenos lineales *entre* cadenas adyacentes. La formación de enlaces entre cadenas permite corregir los ángulos de enlace con una tensión mínima cuando $n = 2$. Las láminas β pueden formarse de dos maneras. Las cadenas pueden tener sus direcciones N ⟶ C en paralelo, para formar la *lámina* β *paralela*, o bien pueden ser *antiparalelas* como en la Figura 6.3b. Resulta instructivo intentar formar estas estructuras utilizando modelos moleculares. Se verá que hacer una hélice $n = 2$ con enlaces de H internos resulta problemático, pero las estructuras de lámina plegada se forman naturalmente.

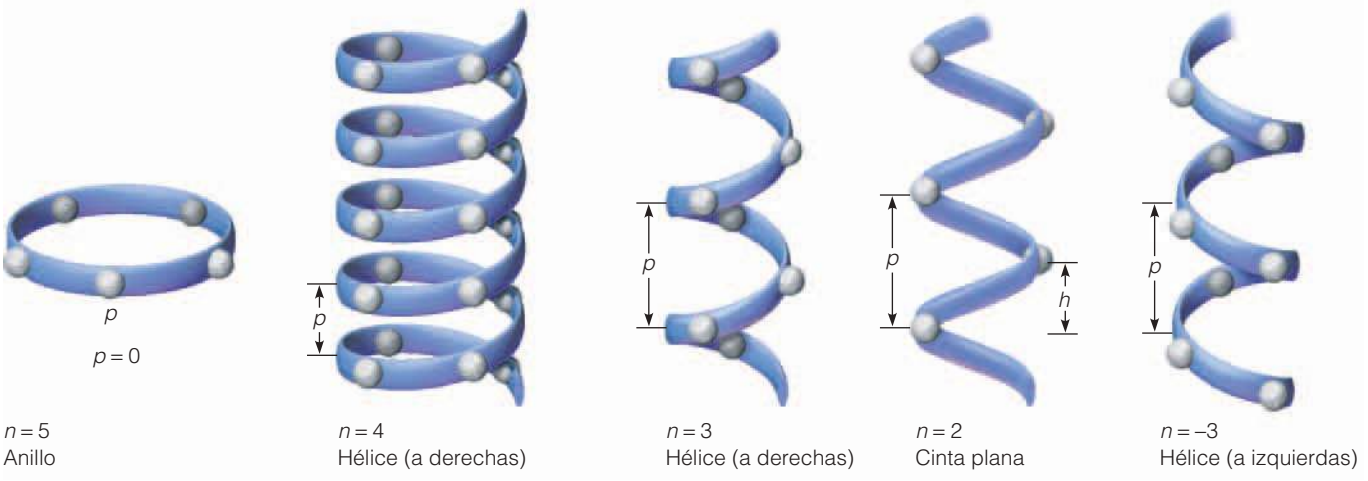


FIGURA **6.5**

Hélices idealizadas. Estas estructuras hipotéticas demuestran el efecto producido al variar el número (*n*) de residuos polipeptídicos por vuelta de una hélice. En cada caso, está indicado el paso (*p*), y en el caso de $n = 2$ también se presenta la elevación (*h*). Los polipéptidos pueden formar hélices que oscilan entre un anillo cerrado ($n = 5$, $p = 0$) y una hélice doble ($n = 2$), en la cual cada residuo tiene una rotación de 180º respecto al precedente. Aquí se presentan todos los valores enteros positivos de *n* y un ejemplo de un valor negativo. Las hélices $n = 4$ y $n = 3$ son a derechas, la hélice $n = –3$ es a izquierdas, y la $n = 5$ (un anillo) y la $n = 2$ (una cinta) no presentan lateralidad. La hélice α a derechas (que no se muestra aquí), con $n = 3.6$, es un intermedio entre las estructuras $n = 3$ y $n = 4$.

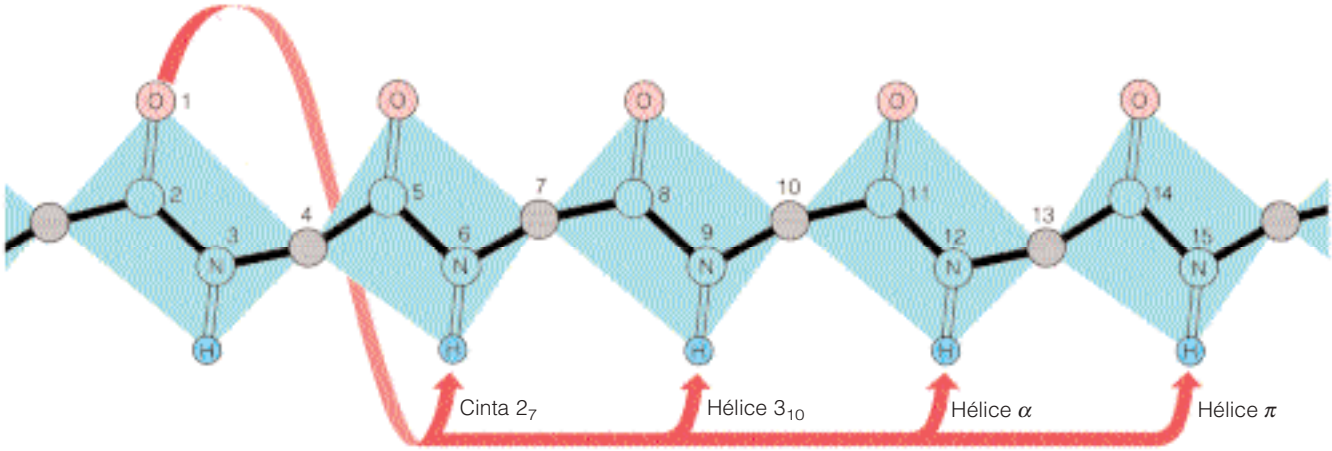


FIGURA **6.6**

Patrones de enlaces de hidrógeno para cuatro hélices. Las estructuras se representan de modo esquemático a fin de simplificar el recuento de átomos en cada bucle con enlace de H. Por ejemplo, hay 13 átomos en el bucle H correspondiente a la hélice α (3.6_{13}).

© Irving Geis.

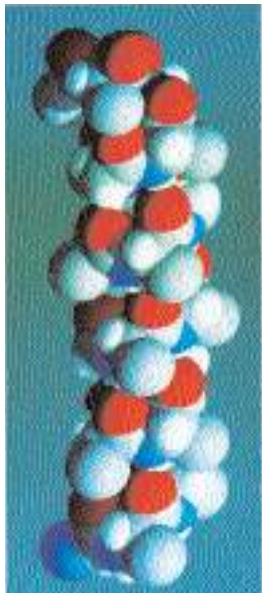


FIGURA **6.7**

Segmento de una hélice α presentada como modelo de relleno espacial. El segmento que se muestra es el de la hélice E de la mioglobina de cachalote (véase la Figura 6.1).

Cortesía de Richard J. Feldman, National Institutes of Health.

En consecuencia, las posibles estructuras secundarias de las proteínas se dividen en dos clases generales: diferentes hélices y como mínimo dos tipos de lámina plegada. Pero el sólo hecho de que pueda dibujarse una estructura y que ésta contenga buenos enlaces de H no significa que exista necesariamente. Muchos de los tipos de conformaciones de cadena que pueden imaginarse son imposibles estéricamente porque se solaparían los átomos del armazón, los de las cadenas laterales o de ambos a la vez. Estas restricciones estéricas sólo pueden apreciarse por completo examinando los modelos de relleno espacial. Por ejemplo, la hélice α de la Figura 6.7 está totalmente comprimida con los grupos R en el exterior. Para examinar el amontonamiento estérico de modo sistemático, precisamos un procedimiento general para describir las conformaciones polipeptídicas.

REPRESENTACIONES DE RAMACHANDRAN

Tal como se mostró en la Figura 6.2, cada uno de los residuos de una cadena polipeptídica tiene dos enlaces del armazón alrededor de los cuales pueden efectuarse rotaciones: el enlace entre el nitrógeno y el carbono α, y el enlace entre el carbono α y el oxígeno del carbonilo. Los ángulos de rotación alrededor de estos enlaces, definidos como ϕ (phi) y ψ (psi) respectivamente, pueden ajustarse para formar estructuras distintas. De este modo, se puede describir la conformación del armazón de cualquier residuo concreto de una proteína especificando estos dos ángulos. Para conseguir que la definición tenga significado, debemos especificar lo que queremos decir con una dirección positiva de la rotación y la conformación de ángulo cero de cada uno de ellos. Los convenios elegidos para las direcciones de rotación positiva alrededor de ϕ y ψ se dan mediante las flechas de la Figura 6.2, esto es, en el sentido de las agujas del reloj cuando se mira en cualquier dirección desde el carbono α. La conformación que aparece en esa figura corresponde a $\phi = +180°$ y $\psi = +180°$, la forma totalmente extendida de la cadena polipeptídica.

Con estos convenios, la conformación del armazón de cualquier residuo concreto de una proteína puede describirse por un punto en un mapa (Figura 6.8) con coordenadas ϕ y ψ. Para determinados tipos sencillos de estructura secun-

Pueden imaginarse muchas estructuras secundarias, pero sólo son posibles estéricamente unas pocas. La representación de Ramachandran señala las conformaciones permitidas.

daria (por ejemplo, las hélices α), todos los residuos están en conformaciones equivalentes, y tienen ángulos ϕ y ψ equivalentes; de este modo los puntos de todos los residuos se solaparían. En consecuencia, un único punto en un mapa como éste también puede describir una estructura secundaria determinada. Estos mapas se denominan **representaciones de Ramachandran**, por el bioquímico G. N. Ramachandran que los utilizó por primera vez de forma amplia.

La representación de Ramachandran de la Figura 6.8 ilustra las posiciones de las diversas estructuras secundarias regulares comentadas anteriormente, así como algunas más que también son concebibles. Obsérvese que todas las hélices con un número entero determinado de residuos por vuelta se encuentran en alguna del conjunto de líneas numeradas trazadas a lo largo del mapa. Es particularmente im-

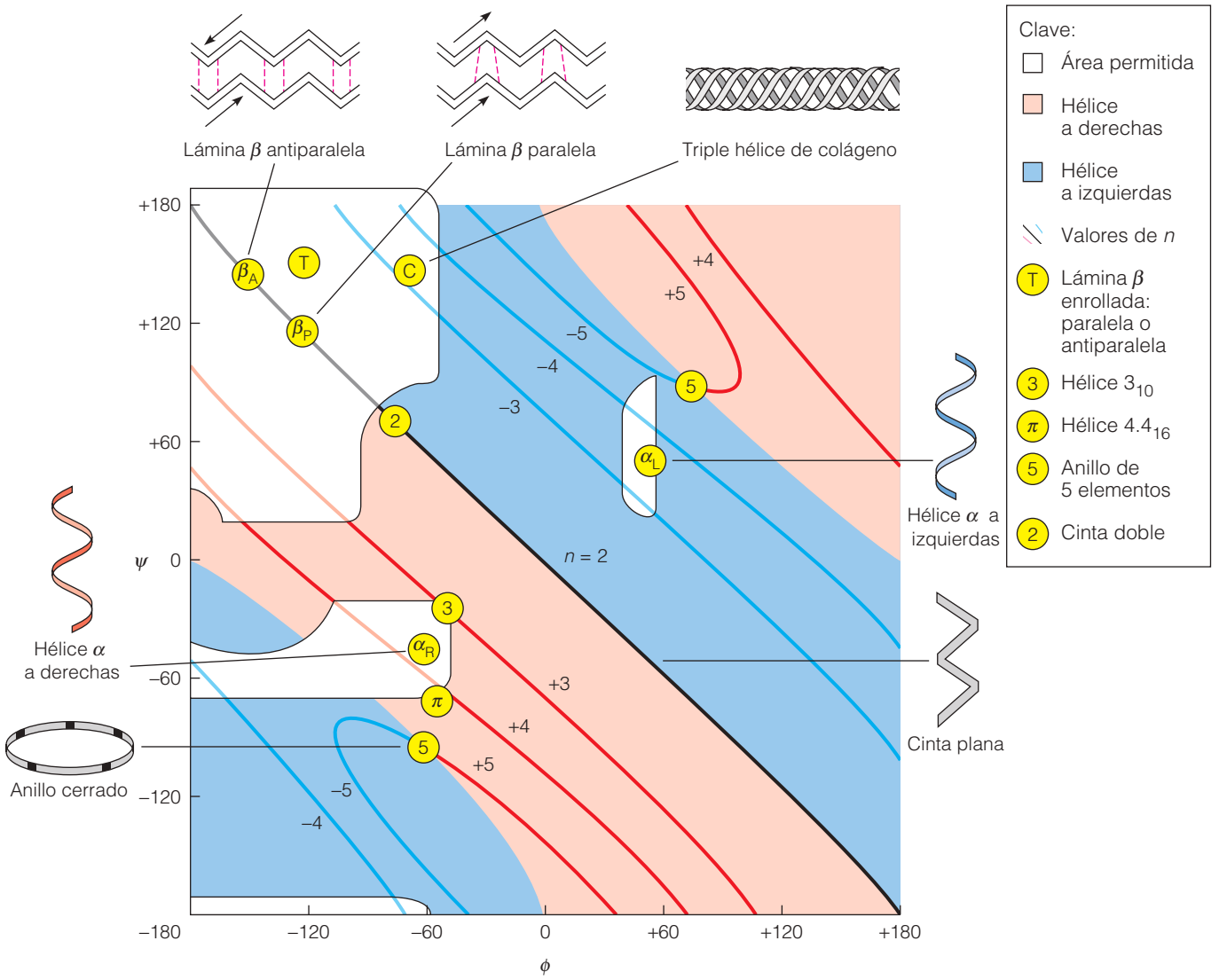


FIGURA **6.8**

Representación de Ramachandran. Este tipo de mapa puede utilizarse para describir la conformación del armazón de cualquier residuo polipeptídico así como de algunas estructuras secundarias sencillas de las proteínas. Las coordenadas son los ángulos de enlace ϕ y ψ, definidos como en la Figura 6.2. Las áreas blancas corresponden a las conformaciones permitidas, que varían según el volumen de las cadenas laterales; en esta representación se supone que todos los residuos son alaninas. Las líneas coloreadas que recorren el gráfico corresponden a diversos valores de n (residuos por vuelta); la bisectriz del gráfico corresponde a $n = 2$. La hélice es a derechas cuando n es positiva (regiones rosa) y a izquierdas cuando n es negativa (regiones azul). Los círculos con símbolos corresponden a estructuras secundarias importantes, como se indica en los márgenes.

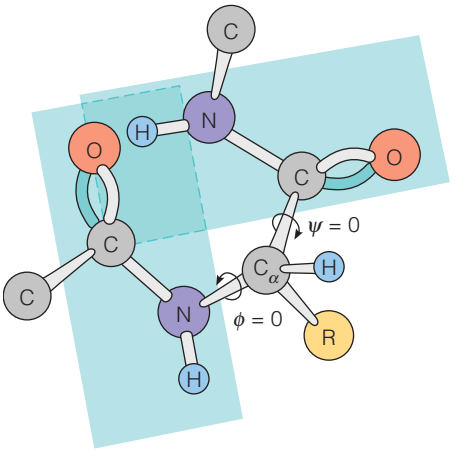


FIGURA **6.9**

Una conformación no permitida estéricamente. La conformación $\phi = 0$, $\psi = 0$ no está permitida en ninguna cadena polipeptídica debido al choque estérico entre el oxígeno carbonilo y el protón amino.

portante la línea correspondiente a la cinta plana ($n = 2$) y los puntos correspondientes a los anillos cerrados ($n = 5$). Cuando se pasan éstos, cambia la mano de la hélice, lo cual puede comprenderse fácilmente a partir del siguiente experimento imaginario. Supongamos que se desenrolla una hélice a derechas hasta que se aproxima a una cinta plana. El valor de n disminuirá hasta que, cuando $n = 2$, se alcance la estructura de cinta plana. Si se continúa enrollando en la misma dirección, empieza a formarse una hélice a izquierdas. De modo parecido, en una progresión hacia hélices más y más anchas, el paso disminuye continuamente. Una cadena polipeptídica puede formar un anillo de cinco elementos con un paso = 0, que se encuentra en el límite entre hélices a derechas y a izquierdas.

Una de las características más útiles de los mapas de Ramachandran es que nos permiten describir de forma muy simple las estructuras que son posibles estéricamente y las que no lo son. Cada punto sobre la superficie del mapa corresponde a un par de ángulos ϕ, ψ, y en consecuencia a una estructura secundaria *concebible*. Pero para muchos pares de valores ϕ, ψ, algunos átomos de la cadena se aproximarían más de lo que les permiten sus radios de van der Waals. En la Figura 6.9 se muestra un ejemplo. Tales conformaciones quedan descartadas estéricamente. Ramachandran y otros investigadores han examinado toda la superficie del mapa, utilizando modelos y ordenadores para determinar las conformaciones que son posibles realmente. Las parejas de ϕ, ψ permitidas se encuentran en las áreas blancas de la Figura 6.8. Queda claro que sólo una pequeña fracción de las conformaciones concebibles es realmente posible. Todas las estructuras regulares que hemos comentado se encuentran en estas áreas o están muy próximas a ellas.

A pesar de que la Figura 6.8 presenta la hélice α a izquierdas en el límite de una región permitida, en realidad no está tan favorecida como la forma a derechas. Esta diferencia se debe a que todos los aminoácidos de las proteínas son de la forma L. Con los aminoácidos L la interferencia estérica entre las cadenas laterales y el armazón de la hélice es menor con una hélice a derechas que con una a izquierdas. Este principio puede comprenderse a partir de una inspección cuidadosa de la Figura 6.3a. Obsérvese que cada grupo R es aproximadamente *trans* respecto al oxígeno del carbonilo adyacente. Si el aminoácido fuese D en lugar de L, la orientación sería *cis*, con mayor probabilidad de conflicto estérico. Recuérdese del Capítulo 5 que los químicos han sintetizado recientemente proteínas con todos los aminoácidos D. Tal como se esperaba, estas proteínas presentan hélices α a izquierdas. La importancia de tales efectos de la cadena lateral depende del volumen de la cadena lateral. El mapa que se presenta en la Figura 6.8 se dibujó su-

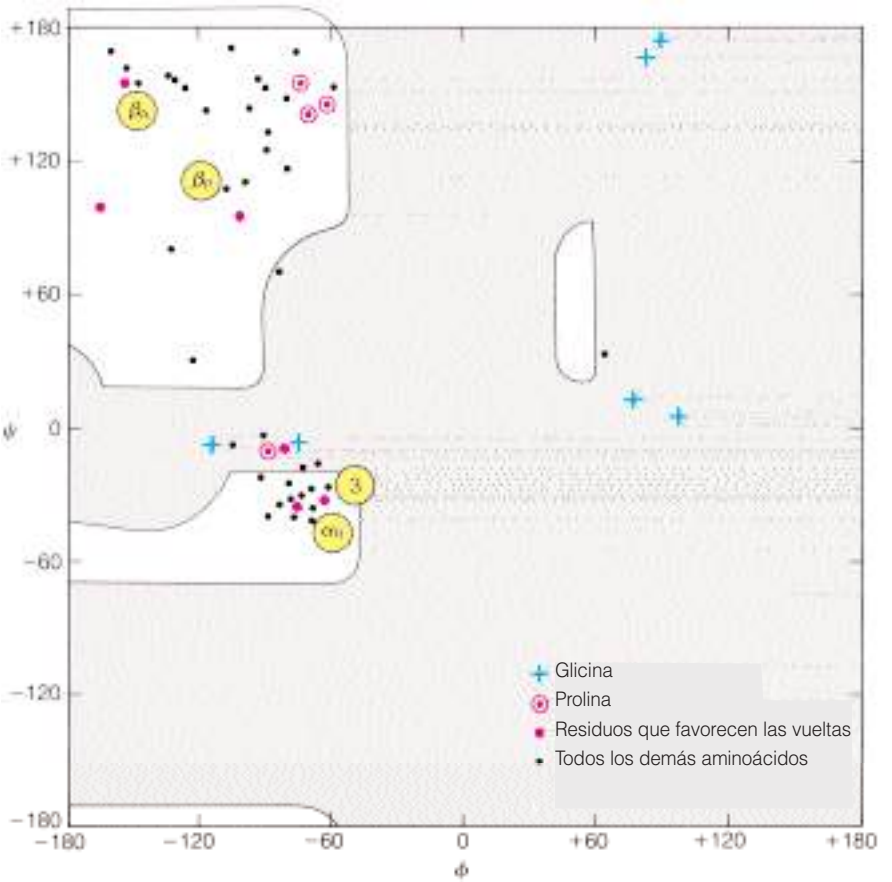


FIGURA **6.10**

Representación de Ramachandran de los residuos del inhibidor de la tripsina pancreática bovina (BPTI). Las posiciones de las principales estructuras están indicadas mediante círculos amarillos. Obsérvese que la mayoría de los pares ϕ, ψ se encuentran dentro o cerca de las regiones permitidas (blancas) y cerca de las estructuras más importantes. La mayoría de los puntos alejados de las regiones permitidas corresponden a glicinas.

poniendo que todos los residuos son L-alanina (es decir, todos tienen cadenas laterales con CH_3). Si se consideran cadenas laterales más voluminosas, la región "permitida" se contraería. Al contrario, la glicina, con su cadena lateral —H permite más conformaciones de las que aparecen en la Figura 6.8.

El análisis precedente de la estructura proteica es bastante abstracto. ¿Cómo se ajusta a la realidad? Bastante bien, como se ve en la Figura 6.10, que indica los ángulos ϕ, ψ individuales de los residuos de aminoácidos de una proteína pequeña. Estas magnitudes se han calculado a partir de un examen detallado de la estructura molecular real, determinada mediante difracción de rayos X. La mayoría de los puntos de este mapa se encuentran cerca de la posición α_R o de las posiciones de lámina β. Pero no corresponden exactamente a estos puntos, lo cual da fe de la existencia de distorsiones de estas estructuras en una proteína real y de la existencia de regiones de estructura diferente de la lámina β o la hélice α. A pesar de que la mayoría de los puntos se encuentran en áreas "permitidas", algunos se encuentran en áreas "no permitidas". Se trata principalmente de glicinas, para las que se permite una gama de ángulos ϕ, ψ mucho más amplia, dado que la cadena lateral es muy pequeña.

Hasta el momento, nuestra exposición proporciona una base para comprender los fundamentos de la estructura proteica. Ahora es el momento de considerar algunos casos específicos. Empezaremos observando que existen dos clases principales de proteínas. Se denominan *fibrosas* y *globulares*, y se distinguen por diferencias estructurales importantes. En primer lugar estudiaremos las proteínas fibrosas.

Proteínas fibrosas: materiales estructurales de las células y los tejidos

Las proteínas fibrosas son moléculas alargadas con estructuras secundarias bien definidas. Suelen desempeñar funciones estructurales en las células.

Las **proteínas fibrosas** se diferencian de las proteínas globulares por su forma filamentosa, o alargada. La mayoría de ellas desempeña funciones estructurales en las células y los tejidos animales: mantienen las cosas juntas. Las proteínas fibrosas comprenden las principales proteínas de la piel, del tejido conjuntivo y de las fibras animales como el pelo y la seda. La secuencia de aminoácidos de cada una de estas proteínas favorece un tipo concreto de estructura secundaria, que a su vez confiere un conjunto concreto de propiedades mecánicas adecuadas a la sustancia. La Tabla 6.2 indica la composición de aminoácidos de cuatro ejemplos específicos, que consideraremos a continuación.

QUERATINAS

Dos clases importantes de proteínas que tienen secuencias de aminoácidos y funciones biológicas similares son las α- y β-queratinas. Las **α-queratinas** son las proteínas más importantes del pelo y las uñas y forman una parte importante de la piel animal. Las α-queratinas son miembros de un gran grupo de **proteínas filamentosas intermedias**, que desempeñan funciones estructurales importantes en los núcleos, los citoplasmas y las superficies de muchas células. Todas las proteínas filamentosas intermedias tienen predominantemente una estructura de hélice α; en realidad, fue el patrón característico de difracción de rayos X de la α-queratina el que Pauling y sus colaboradores buscaron para explicar su modelo de hélice α.

TABLA 6.2 Composiciones de aminoácidos de algunas proteínas fibrosas

Aminoácido	α-Queratina (Lana)	Fibroína (Seda)	Colágeno (Tendón Bovino)	Elastina (Aorta Porcina)
Gly	8.1	44.6	32.7	32.3
Ala	5.0	29.4	12.0	23.0
Ser	10.2	12.2	3.4	1.3
Glu + Gln	12.1	1.0	7.7	2.1
Cys	11.2	0	0	— [e]
Pro	7.5	0.3	22.1 [a]	10.7 [c]
Arg	7.2	0.5	5.0	0.6
Leu	6.9	0.5	2.1	5.1
Thr	6.5	0.9	1.6	1.6
Asp + Asn	6.0	1.3	4.5	0.9
Val	5.1	2.2	1.8	12.1
Tyr	4.2	5.2	0.4	1.7
Ile	2.8	0.7	0.9	1.9
Phe	2.5	0.5	1.2	3.2
Lys	2.3	0.3	3.7 [b]	3.6 [d]
Trp	1.2	0.2	0	— [e]
His	0.7	0.2	0.3	— [e]
Met	0.5	0	0.7	— [e]

Nota: Los tres aminoácidos más abundantes en cada proteína se indican en rojo. Los valores que se presentan están en porcentaje molar.

[a] Aproximadamente el 39% es hidroxiprolina.

[b] Aproximadamente el 14% es hidroxilisina.

[c] Aproximadamente el 13% es hidroxiprolina.

[d] La mayor parte (aproximadamente el 80%) está implicada en enlaces cruzados.

[e] Prácticamente ausente.

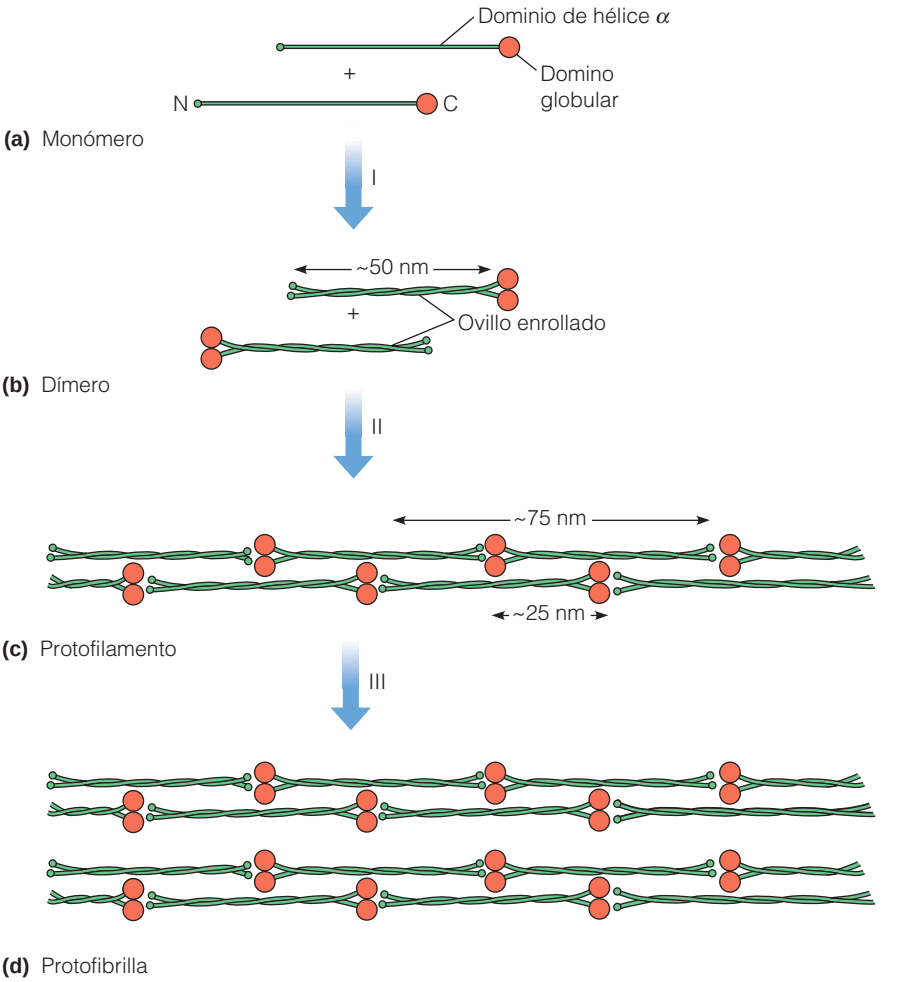


FIGURA **6.11**

Estructura propuesta para los filamentos intermedios del tipo de la queratina. Dos monómeros **(a)** se aparean a través de ovillos enrollados paralelos para formar el dímero de 50 nm de longitud **(b)**. Éstos, a continuación, se asocian para formar primero un protofilamento de 4 cadenas **(c)** y luego una protofibrilla de 8 cadenas **(d)**. El solapamiento es responsable del espaciado regular de 25 nm a lo largo de las fibras.

La α-queratina se construye sobre una estructura de hélice α de ovillo enrollado.

La estructura de una α-queratina característica, como la del pelo, se representa en la Figura 6.11. Las moléculas individuales contienen secuencias largas (de más de 300 residuos de longitud) que son totalmente α-helicoidales. Pares de estas hélices se enroscan en una estructura de **ovillo enrollado** a izquierdas. Este apareamiento de hélices α parece ser consecuencia de una peculiaridad de la secuencia de aminoácidos de la α-queratina. Cada cuatro aminoácidos aproximadamente hay uno con una cadena lateral hidrófoba no polar. Debido a que la hélice α tiene 3.6 residuos/vuelta, esto significa que hay una tira de residuos hidrófobos a lo largo de un lado de cada cadena (realmente, un enrollamiento muy lento alrededor de la hélice, ya que 4.0 no es exactamente igual a 3.6). Como hemos señalado en el Capítulo 2, los grupos hidrófobos tienden a buscar sus propias clases, de forma que se pegan juntas dos hélices de α-queratina, unidas por sus tiras hidrófobas.

En los filamentos intermedios, los pares de ovillos enrollados tienden a asociarse entre ellos en un protofilamento de cuatro cadenas (Figura 6.11c), y dos de éstas a su vez se juntan para formar una protofibrilla (Figura 6.11d). Todavía no están claros los detalles de estos niveles superiores de asociación. Estos cables enrollados son muy elásticos y flexibles, pero en los distintos tejidos la α-queratina se endurece, en mayor o menor medida, mediante la introducción de enlaces cruzados disulfuro dentro de los diferentes niveles de estructura de la fibra. (Obsérvese que la α-queratina presenta un contenido de cisteína excepcionalmente alto; véase la Tabla 6.2.) Se dan muchos enlaces cruzados en las α-que-

ratinas de las uñas, mientras que el pelo presenta relativamente pocos. El proceso de introducción de una "onda permanente" en el pelo del ser humano comporta la reducción de estos enlaces disulfuro, el reordenamiento de las fibras y la reoxidación para "colocar" las ondas introducidas de este modo.

Las β-queratinas, como indica su nombre, contienen mucha más estructura de lámina β. De hecho, constituyeron la segunda clase estructural más importante descrita por Pauling y sus colaboradores. Las β-queratinas se encuentran principalmente en las aves y los reptiles, en estructuras como las plumas y las escamas.

FIBROÍNA

La estructura de lámina β se utiliza de manera muy elegante en las fibras tejidas por los gusanos de seda y las arañas. La fibroína de los gusanos de seda (Figura 6.12)

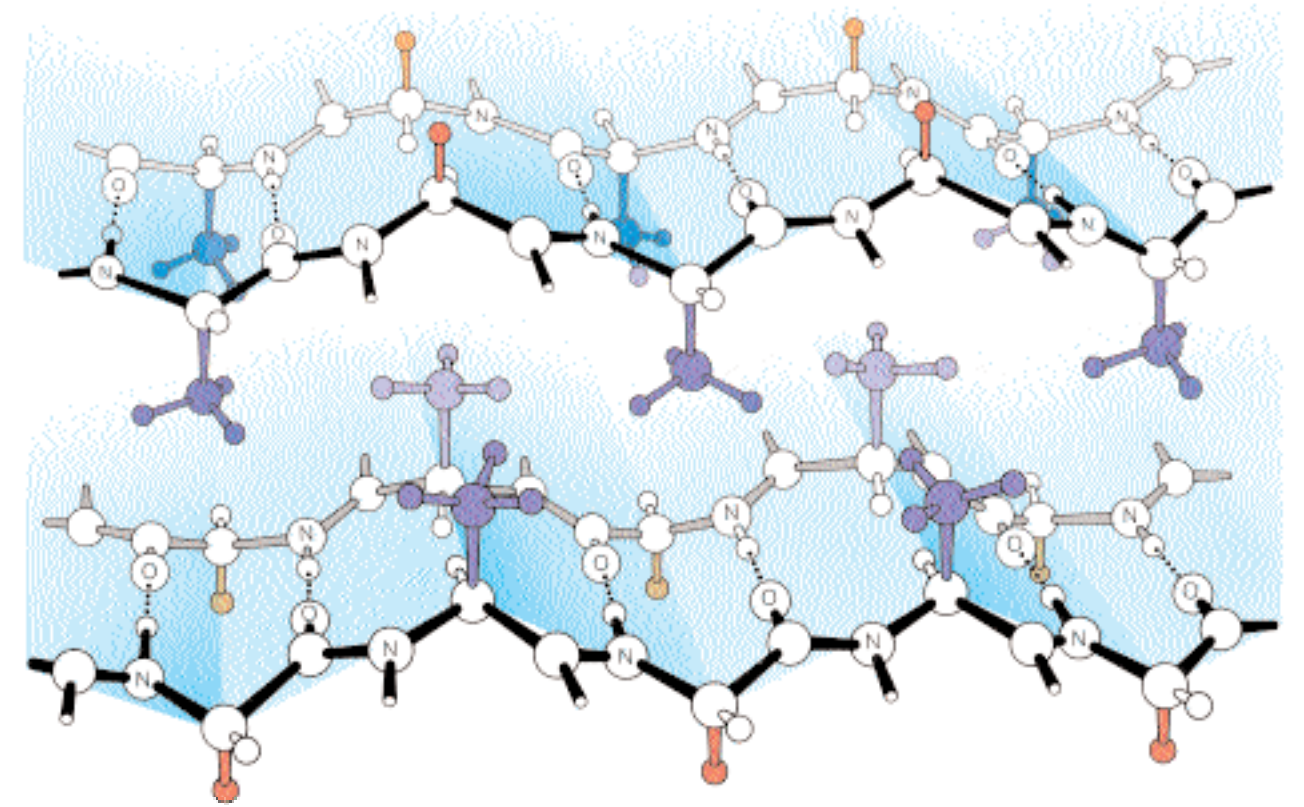


FIGURA **6.12**

Estructura de la fibroína de la seda. **(a)** Perspectiva tridimensional de las láminas β apiladas, con las cadenas laterales en color. La región que se presenta sólo contiene residuos de alanina y glicina. **(b)** Interdigitación de las cadenas laterales de alanina o serina y las cadenas laterales de glicina en la fibroína. El plano de corte es perpendicular a las láminas plegadas.

© Irving Geis.

La fibroína es una proteína de lámina β. Casi la mitad de sus residuos son glicina.

contiene regiones largas de lámina β antiparalela, con las cadenas polipeptídicas paralelas al eje de la fibra. Las regiones de lámina β contienen casi exclusivamente repeticiones múltiples de la secuencia

$$[Gly–Ala–Gly–Ala–Gly–Ser–Gly–Ala–Ala–Gly–(Ser–Gly–Ala–Gly–Ala–Gly)_8]$$

Al examinar esta secuencia, se observará que casi un residuo sí y otro no es Gly, y que entre ellos se encuentran residuos de Ala o Ser. Esta alternancia permite que las láminas encajen juntas y se empaqueten una sobre otra del modo que se ve en la Figura 6.12. Esta disposición produce una fibra que es fuerte y relativamente inextensible, debido a que las cadenas unidas de modo covalente están extendidas hasta casi su longitud máxima posible. Sin embargo, las fibras son muy flexibles porque los enlaces entre las láminas implican sólo las interacciones débiles de van der Waals entre las cadenas laterales, que proporcionan poca resistencia al doblado.

No toda la proteína de fibroína está en láminas β. Como muestra la composición de aminoácidos de la Tabla 6.2, la fibroína contiene pequeñas cantidades de otros aminoácidos voluminosos, como valina y tirosina, que no encajan en la estructura presentada. Éstos se encuentran en zonas plegadas compactas que interrumpen periódicamente los segmentos de lámina β y probablemente explican la capacidad de extenderse que poseen las fibras de seda. De hecho, distintas especies de gusanos de seda producen fibroínas con distintos grados de tales estructuras diferentes a la lámina β y a las que corresponden diferencias de elasticidad. La estructura completa de la fibroína es un ejemplo notable de molécula proteica que ha evolucionado para realizar una función determinada: para proporcionar una fibra resistente, aunque flexible, para el capullo del gusano de seda o para la tela de la araña.

COLÁGENO

Dado que realiza una variedad de funciones tan amplia, el **colágeno** es la proteína más abundante en la mayoría de los vertebrados. En los animales grandes, puede llegar a un tercio de la masa total de proteínas. Las fibras de colágeno forman la *matriz* de los huesos, sobre la que precipitan los constituyentes minerales; estas fibras constituyen la mayor parte de los tendones, y una red de fibras de colágeno es un constituyente importante de la piel. Básicamente, el colágeno mantiene unidos a la mayoría de los animales.

Estructura del colágeno

Las fibras de colágeno están formadas por hélices triples de polipéptidos con abundante glicina y prolina.

La unidad básica de la fibra de colágeno es la molécula de **tropocolágeno**, una *hélice triple* de tres cadenas polipeptídicas, cada una de ellas con aproximadamente 1000 residuos. Esta estructura helicoidal triple, que se presenta en la Figura 6.13a y b, es característica del colágeno. Las cadenas individuales son hélices a izquierdas, con aproximadamente 3.3 residuos/vuelta. Tres de estas cadenas se enrollan unas alrededor de las otras a derechas, con enlaces de hidrógeno que se extienden entre ellas. El examen del modelo revela que cada tercer residuo, que debe encontrarse cerca del centro de la hélice triple, *sólo* puede ser glicina (véase la Figura 6.13a). Cualquier cadena lateral distinta de H sería demasiado voluminosa. La formación de las hélices individuales del tipo colágeno también resultan favorecidas por la presencia de prolina o hidroxiprolina en la molécula de tropocolágeno. Un conjunto que se repite en la secuencia es la forma Gly–X–Y, donde X suele ser prolina e Y, prolina o hidroxiprolina. Sin embargo, en ocasiones se toleran otros residuos en estas posiciones. Como la fibroína de la seda, el colágeno es un buen ejemplo de cómo un tipo concreto de secuencia repetitiva determina una estructura específica. Para realizar adecuadamente sus muchas funciones, el colágeno se presenta en un gran número de variantes genéticas en los organismos superiores.

El colágeno también es excepcional en su extensa modificación de prolina a hidroxiprolina. La mayoría de los enlaces de hidrógeno entre las cadenas en la hélice triple se establecen entre protones amidas y oxígenos carbonilo, aunque los grupos —OH de la hidroxiprolina también parecen participar en la estabilización de la estructura. También se produce la hidroxilación de los residuos de lisina en el colágeno, pero es mucho menos frecuente. Desempeña una función distinta, ya que sirven para formar lugares de unión para los polisacáridos.

La enzima que cataliza la hidroxilación de la prolina necesita **vitamina C**, ácido ascórbico (véase el Capítulo 21). Un síntoma de carencia grave de vitamina C, que se denomina **escorbuto**, consiste en el debilitamiento de las fibras de colágeno producido por el fallo de la hidroxilación de la prolina y la lisina. Las consecuencias son las que podían esperarse: aparecen lesiones en la piel y las encías, y se debilitan los vasos sanguíneos. El trastorno mejora rápidamente al administrar vitamina C.

Las moléculas individuales de tropocolágeno se empaquetan juntas formando una fibra de colágeno de una manera específica (Figura 6.13c). Cada molécula tiene una longitud de aproximadamente 300 nm y se solapa con su vecina en aproximadamente 64 nm, produciendo el aspecto característico de bandas de las fibras que aparecen en la Figura 6.13d y e. Esta estructura proporciona una resistencia notable: las fibras de colágeno de los tendones tienen una resistencia comparable a la del cable de cobre de alta resistencia.

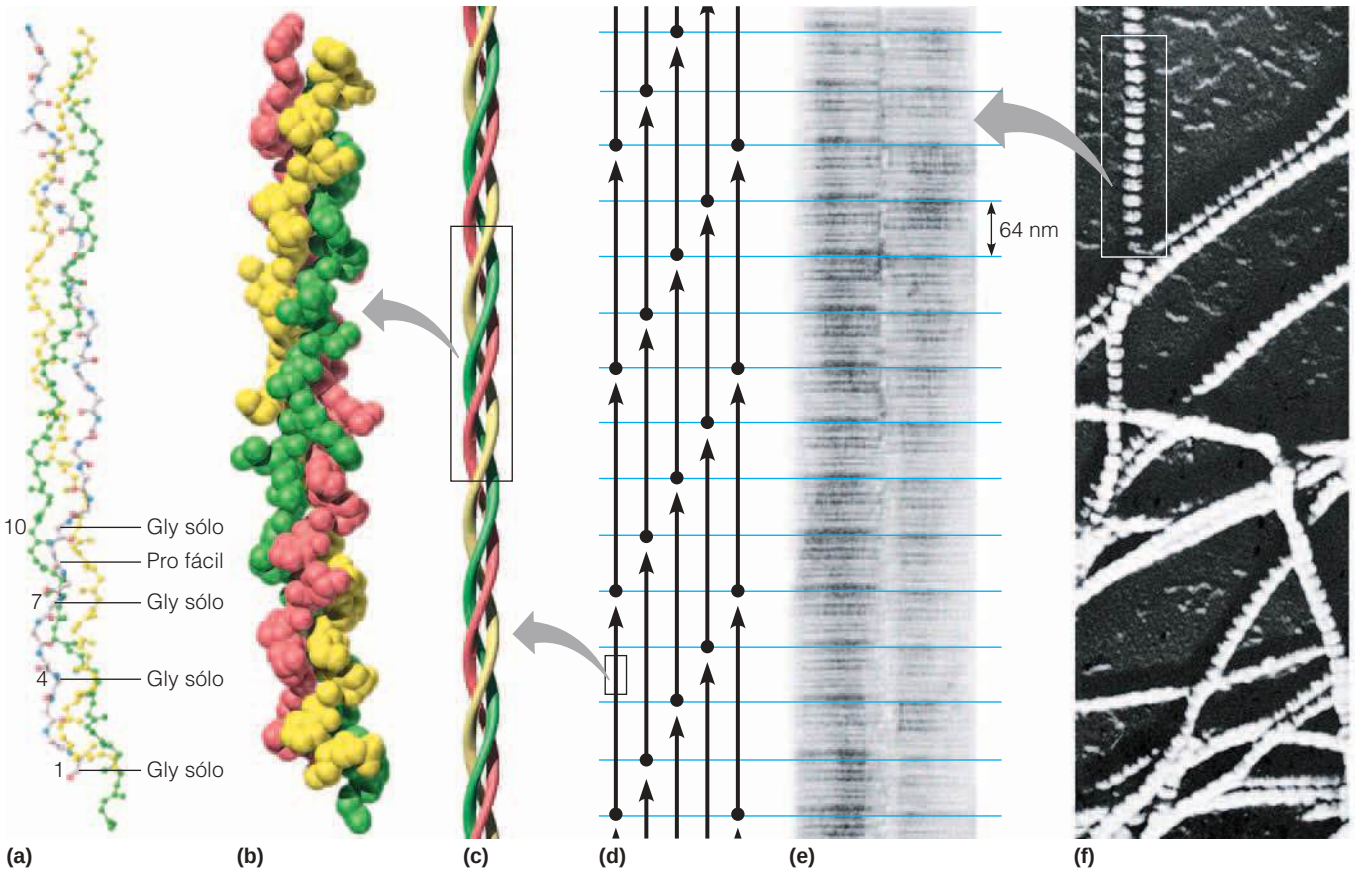
Parte de la dureza del colágeno se debe al entrecruzamiento de las moléculas de tropocolágeno mediante una reacción que utiliza las cadenas laterales de la lisina. Algunas de las cadenas laterales de la lisina se oxidan para dar lugar a

El escorbuto lo produce la ausencia de la hidroxilación de prolinas en el colágeno.

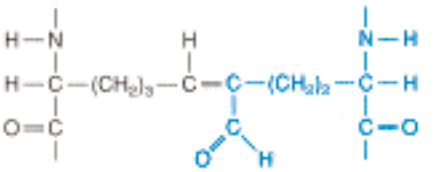
FIGURA **6.13**

Estructura de las fibras de colágeno. La proteína colágeno está formada por moléculas de tropocolágeno empaquetadas juntas para formar las fibras. La molécula de tropocolágeno es una hélice triple. **(a)** y **(b)** Estructura primaria y secundaria de una molécula de tropocolágeno. **(c)** Con pocos aumentos destaca la estructura secundaria de hélice triple. **(d)** Moléculas de tropocolágeno alineadas una al lado de otra de modo escalonado para formar la fibra de colágeno. **(e)** El patrón periódico que se presenta de forma esquemática en (c) puede observarse en una fotografía de microscopia electrónica de una fibra de colágeno. **(f)** Una fotografía de microscopia electrónica del colágeno con bajo aumento muestra el modo en el que se entrecruzan muchas fibras, siendo claramente visible el patrón periódico en cada una de ellas.

(e, f) Cortesía del Dr. Alan Hodges.



derivados aldehídos, que, a continuación, pueden reaccionar con un residuo de lisina o bien unos con otros mediante una condensación aldólica y deshidratación para dar lugar a un entrecruzamiento:



Este proceso sigue a lo largo de la vida, y los entrecruzamientos que se acumulan hacen que el colágeno sea cada vez menos elástico y más quebradizo. Como consecuencia, los huesos y los tendones de las personas mayores pueden romperse con mayor facilidad y la piel pierde gran parte de su elasticidad. Muchos signos que asociamos con el envejecimiento son consecuencias de este sencillo proceso de entrecruzamiento.

Síntesis de colágeno

El colágeno experimenta una amplia modificación posterior a la traducción.

Como ya habrá deducido en estos momentos, el colágeno es una proteína que experimenta una modificación importante. De hecho, puede considerarse un ejemplo casi completo de las rutas de modificación posteriores a la traducción que consideramos al final del Capítulo 5. La hélice triple de tropocolágeno que acaba entrecruzada en una fibra de colágeno extracelular es muy diferente de la que se sintetiza inicialmente en un ribosoma. En la Figura 6.14 se presentan los pasos de esta transformación, que empieza con la traducción (paso 1). El polipéptido recién traducido se hidroxila (paso 2) y, a continuación, se unen los azúcares (paso 3) para dar **procolágeno** (paso 4). El procolágeno contiene alrededor de 1500 residuos, de los cuales aproximadamente 500 están en las regiones N-terminal y C-terminal que no tienen la secuencia característica de la fibra de colágeno descrita previamente. Tres moléculas de procolágeno enrollan sus regiones centrales formando una hélice triple, mientras que las regiones N-terminal y C-terminal se pliegan formando estructuras proteicas globulares. Las hélices triples de procolágeno se exportan a continuación al espacio extracelular (paso 5); en este punto las regiones N-terminal y C-terminal se separan mediante proteasas específicas, dejando sólo la hélice triple de tropocolágeno, con aproximadamente 1000 residuos (paso 6). A continuación, estas moléculas se ensamblan dando lugar a las formaciones escalonadas que se muestran en la Figura 6.13c. Finalmente, los entrecruzamientos pegan juntas a las moléculas formando una fibra dura de colágeno.

ELASTINA

La proteína elastina forma fibras elásticas que se hallan en los ligamentos y en los vasos sanguíneos.

El colágeno se encuentra en los tejidos en los que se precisa resistencia o dureza, pero otros tejidos, como los ligamentos y los vasos sanguíneos arteriales, necesitan fibras muy elásticas. Estos tejidos contienen grandes cantidades de la proteína fibrosa **elastina**.

La cadena polipeptídica de la elastina contiene abundante glicina, alanina y valina, y es muy flexible y puede extenderse fácilmente. De hecho, su conformación probablemente se parece a la de un ovillo aleatorio, que carece casi totalmente de estructura secundaria. No obstante, la secuencia también contiene frecuentes cadenas laterales de lisina, que pueden participar en entrecruzamientos. Estos entrecruzamientos impiden que las fibras de elastina se extiendan indefinidamente, haciendo que las fibras vuelvan de golpe a su situación habitual cuando se elimina la tensión. El mismo principio explica exactamente la elasticidad de la goma

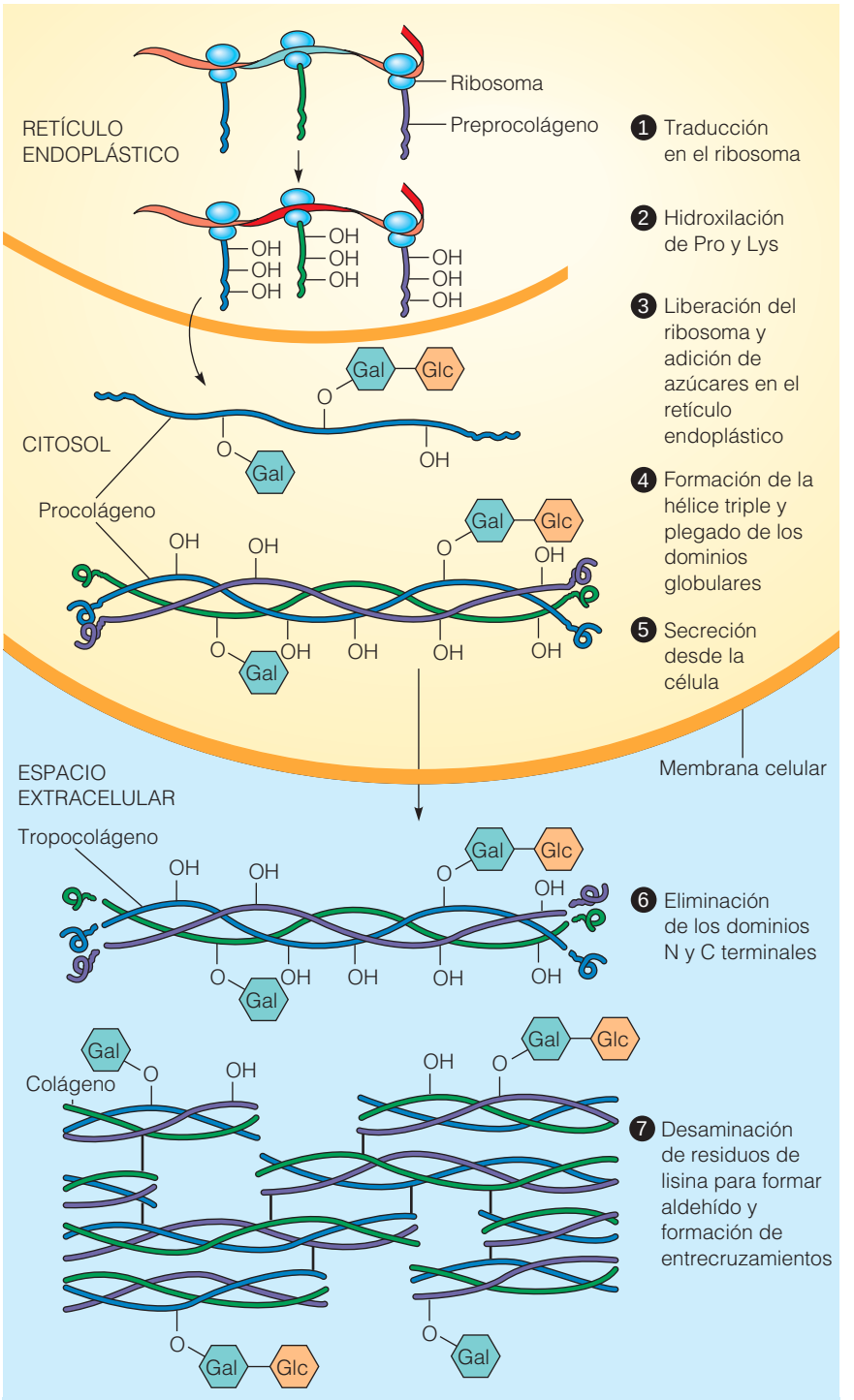
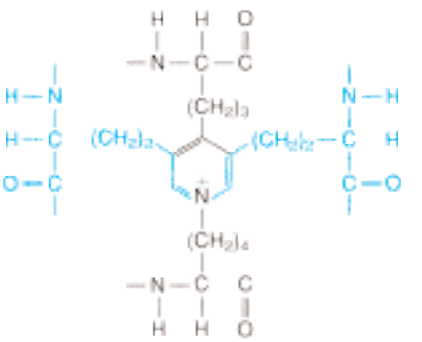


FIGURA **6.14**

Biosíntesis y ensamblaje del colágeno. El proceso puede dividirse en varios pasos. Los pasos 1-4 se producen en el retículo endoplásmico y el citosol de las células sintetizadoras de colágeno; los pasos 6 y 7 se producen en la región extracelular. Gal = galactosa, Glc = glucosa.

vulcanizada, cuyas cadenas flexibles están también sostenidas por entrecruzamientos. Los entrecruzamientos de la elastina son bastante distintos de los del colágeno, puesto que están diseñados para mantener juntas a varias cadenas. Pueden combinarse cuatro cadenas laterales de lisina para producir un entrecruzamiento de **desmosina**, como se muestra en el margen. Dado que están conectadas cuatro cadenas, sólo se precisa una pequeña cantidad de este entrecruzamiento para convertir las fibras de elastina en una red gomosa muy interconectada.



RESUMEN

Esta breve visión general de unas cuantas proteínas estructurales pone de manifiesto varios puntos. En primer lugar, las proteínas pueden evolucionar para realizar una diversidad de funciones casi infinita. En segundo lugar, las proteínas fibrosas estructurales hacen esto aprovechando la propensión de las secuencias repetitivas concretas de residuos de aminoácidos para favorecer un tipo u otro de estructura secundaria. Finalmente, la modificación posterior a la traducción de las proteínas, incluyendo los entrecruzamientos, es un elemento accesorio importante para ajustar una proteína a su función. En los Capítulos 27 y 28 diremos más acerca de los lugares celulares de estas modificaciones, cuando se considere detalladamente el proceso completo de la síntesis de proteínas.

Estos pocos ejemplos no agotan la lista de proteínas estructurales. Existen otras importantes, como la actina y la miosina del músculo y la tubulina de los microtúbulos. Pero estas proteínas se forman de un modo muy distinto y se describirán en el Capítulo 8.

Proteínas globulares: estructura terciaria y diversidad funcional

PLEGADOS DISTINTOS PARA FUNCIONES DIFERENTES

Las proteínas estructurales, aun siendo tan abundantes y esenciales en cualquier organismo, sólo constituyen una pequeña parte de las proteínas que poseen. La mayor parte del trabajo químico de la célula (sintetizador, transportador y metabólico) se lleva a cabo con la ayuda de una gran cantidad de **proteínas globulares**, que reciben este nombre debido a que sus cadenas polipeptídicas se pliegan en estructuras compactas muy distintas de las formas filamentosas y extendidas de las proteínas fibrosas. La mioglobina (véase la Figura 6.1) es una proteína globular característica. Con sólo una ojeada a su estructura tridimensional, comparándola con la de, por ejemplo, el colágeno, se ve inmediatamente esta diferencia cualitativa.

En la actualidad ya sabemos mucho sobre los detalles estructurales de muchas proteínas globulares, en gran medida gracias al uso de métodos de difracción de rayos X (véase Herramientas de la Bioquímica 4A). A menudo la resolución (la precisión de detalles que pueden distinguirse) llega hasta menos de 0.3 nm. Esta resolución es suficiente para identificar residuos individuales de aminoácidos, de modo que puede trazarse la cadena polipeptídica a lo largo de la molécula.

Las proteínas globulares no sólo poseen estructuras secundarias sino que, además, también se pliegan formando estructuras terciarias compactas.

A medida que se avanza a lo largo de la molécula, la cadena polipeptídica está plegada localmente, formando alguna de las estructuras secundarias (hélice α, lámina β, etc.) que ya hemos explicado. Pero para que la estructura sea globular y compacta, estas regiones también deben plegarse unas sobre otras. Este plegado se denomina estructura terciaria de la proteína; es este plegado el que da a la molécula su forma tridimensional total. La distinción entre las estructuras secundaria y terciaria puede apreciarse claramente, por ejemplo, en la estructura de la mioglobina, tal como aparece en la Figura 6.1. Aproximadamente el 70% de la mioglobina es una hélice α, y esa hélice se dobla y pliega para formar una molécula compacta. Un hueco dentro de esta estructura contiene un **grupo prostético**, el hemo. Muchas proteínas globulares llevan grupos prostéticos, moléculas pequeñas que pueden estar enlazadas de modo covalente o no covalente a la proteína y capacitarla para que cumpla funciones especiales. En este caso, el grupo hemo unido de modo

no covalente contiene el lugar de unión del oxígeno de la mioglobina (véase el Capítulo 7).

Para mostrar la gran variación estructural entre las diversas proteínas globulares, consideremos otro ejemplo. La Figura 6.15 representa una de las proteínas globulares más pequeñas y sencillas: el inhibidor de la tripsina pancreática bovina (BPTI). Esta proteína, que se sintetiza en el páncreas de la vaca, es una de las proteínas cuya única función consiste en unir e inhibir enzimas proteolíticas como la tripsina. Es importante para la salud, ya que impide la autodigestión del páncreas cuando se activa la tripsina. La hemos elegido como ejemplo inicial porque es tan simple que se ha estudiado con mucho detalle. La utilizaremos como ejemplo en muchos lugares.

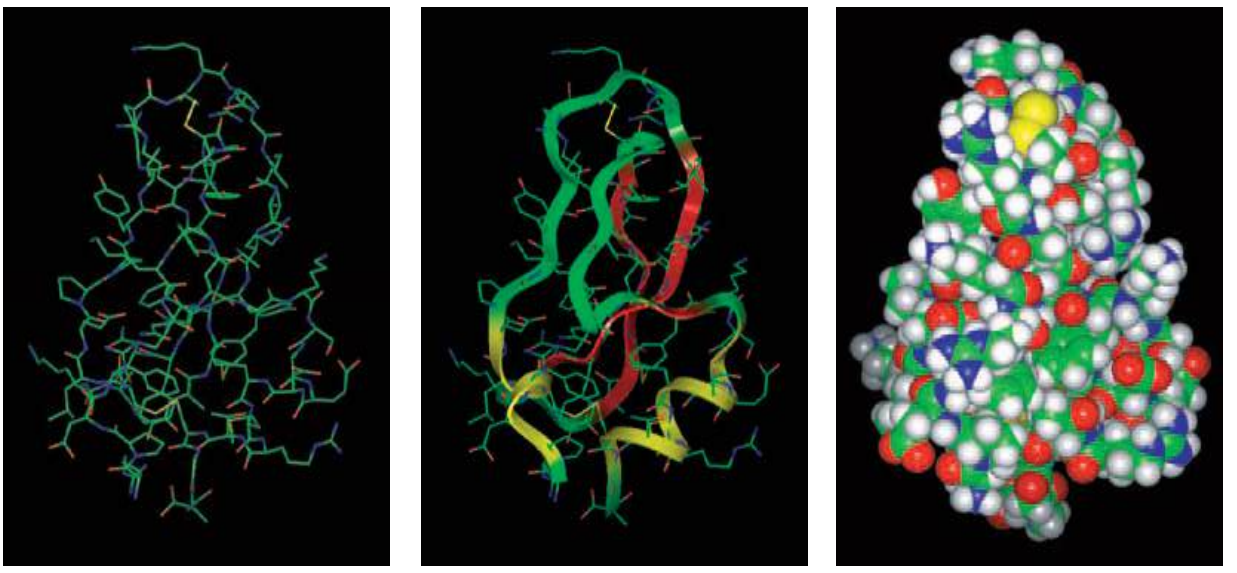
En la Figura 6.15 el BPTI se representa de tres modos. En la Figura 6.15a se muestra un modelo esquelético que representa las posiciones de todos los átomos, que se han medido con gran precisión mediante difracción de rayos X. En la Figura 6.15b se presenta un modelo de cinta del armazón de la cadena. En este modelo se puede trazar con facilidad el camino de la cadena polipeptídica, y pueden verse claramente las estructuras de hélice α y de lámina β presentes en esta molécula; también se muestran las posiciones de los tres enlaces disulfuro del BPTI. Finalmente, la Figura 6.15c representa un modelo de relleno espacial que ilustra el punto importante de que las proteínas globulares son estructuras empaquetadas densamente y de hecho suelen ser de forma globular.

Al comparar la Figura 6.15 con la Figura 6.1 puede observarse que la estructura del BPTI es completamente distinta de la de la mioglobina. Mientras que la mioglobina es básicamente una hélice α, el BPTI presenta regiones helicoidales y laminares, conectadas mediante dobleces de la cadena. El punto que deseamos destacar es el siguiente: cada proteína globular posee una estructura terciaria singular, formada por elementos de estructura secundaria (hélices, láminas β, regiones irregulares) plegados de una manera específica. A medida que se estudian proteínas, se descubre que cada conformación de este tipo está adecuada para el cometido funcional concreto que desempeña la proteína.

FIGURA **6.15**

Estructura terciaria del BPTI. El inhibidor de la tripsina pancreática bovina, o BPTI, se une a la tripsina y le impide catalizar la hidrólisis peptídica. El BPTI sólo contiene 58 residuos de aminoácidos y es una de las proteínas más estudiadas. **(a)** Modelo esquelético que muestra las posiciones de los átomos obtenido por difracción de rayos X. **(b)** Modelo de cinta del armazón. Hay dos hélices α cortas cerca de la parte inferior de la molécula; gran parte del resto está formado por una lámina β antiparalela. **(c)** Modelo de relleno espacial, en el que se dan los radios de van der Waals de todos los átomos. En (a) y (b) los enlaces disulfuro aparecen en amarillo.

Cortesía de P.-S. Ho.



(a) (b) (c)

FIGURA **6.16**

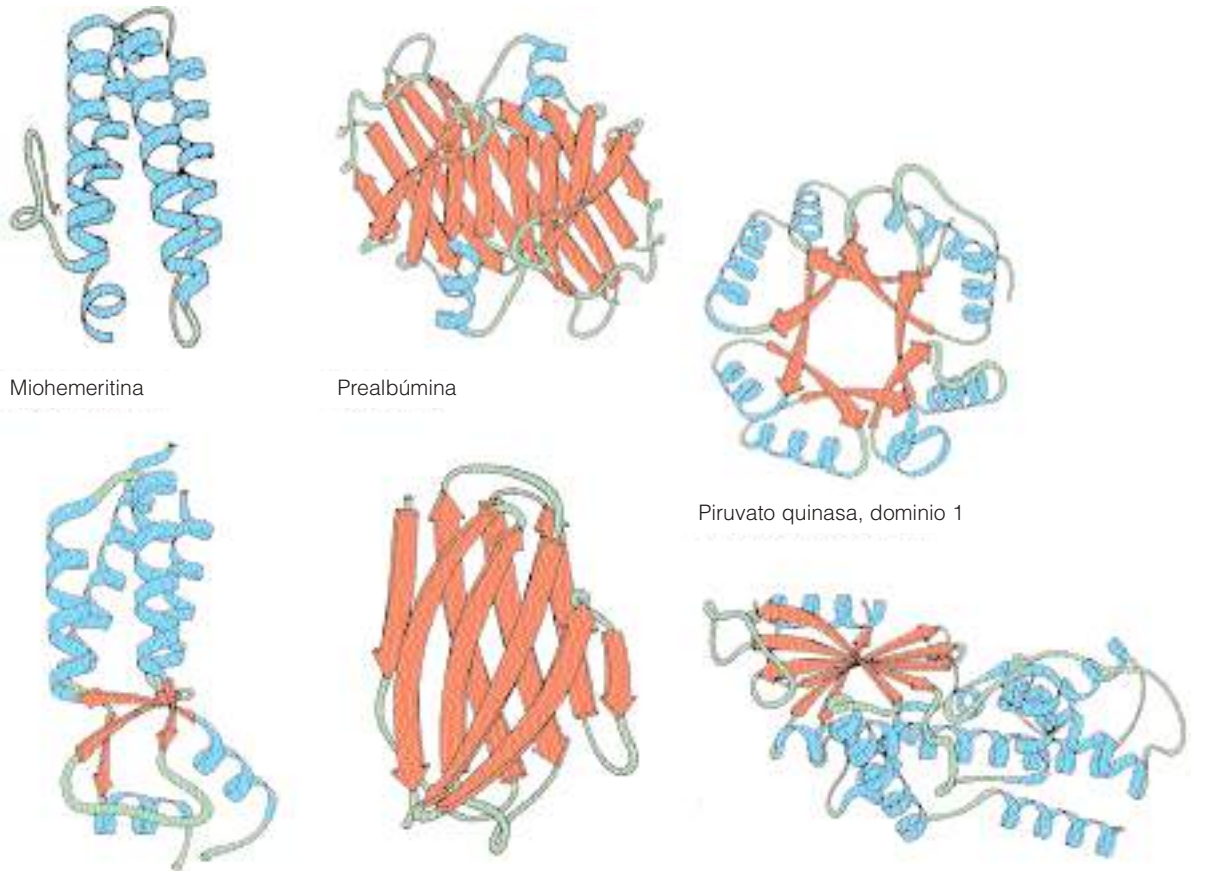
Estructuras características de las proteínas globulares. El azul indica las hélices α; el naranja, las láminas β, y el verde, las regiones de estructura irregular. Las puntas de flecha en los extremos de las cadenas β apuntan en la dirección N ⟶ C. **(a)** Hélice α predominante (haces de hélices). Parte superior: miohemeritrina. Parte inferior: proteína de la cubierta del virus del mosaico del tabaco. **(b)** Lámina β predominante. Parte superior: prealbúmina (un dímero). Parte inferior: inmunoglobulina, dominio V_2. La prealbúmina (también denominada transtiretina) puede describirse como un sándwich β, mientras que el dominio V_2 de la inmunoglobulina es un cilindro β antiparalelo. **(c)** Hélice α y lámina β mezcladas. Parte superior: piruvato quinasa, dominio 1. Contiene un ejemplo excelente de un cilindro β paralelo, que se observa aquí desde la parte superior. También es un tipo de secuencia común denominada α/β, en la cual se alternan las regiones α y β. Parte inferior: hexoquinasa, dominio 2. Contiene un ejemplo claro de lámina β enrollada vista desde el lateral.

Cortesía de la Dra. Jane Richardson.

VARIEDADES DE LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS GLOBULARES: PATRONES DE PLEGADO

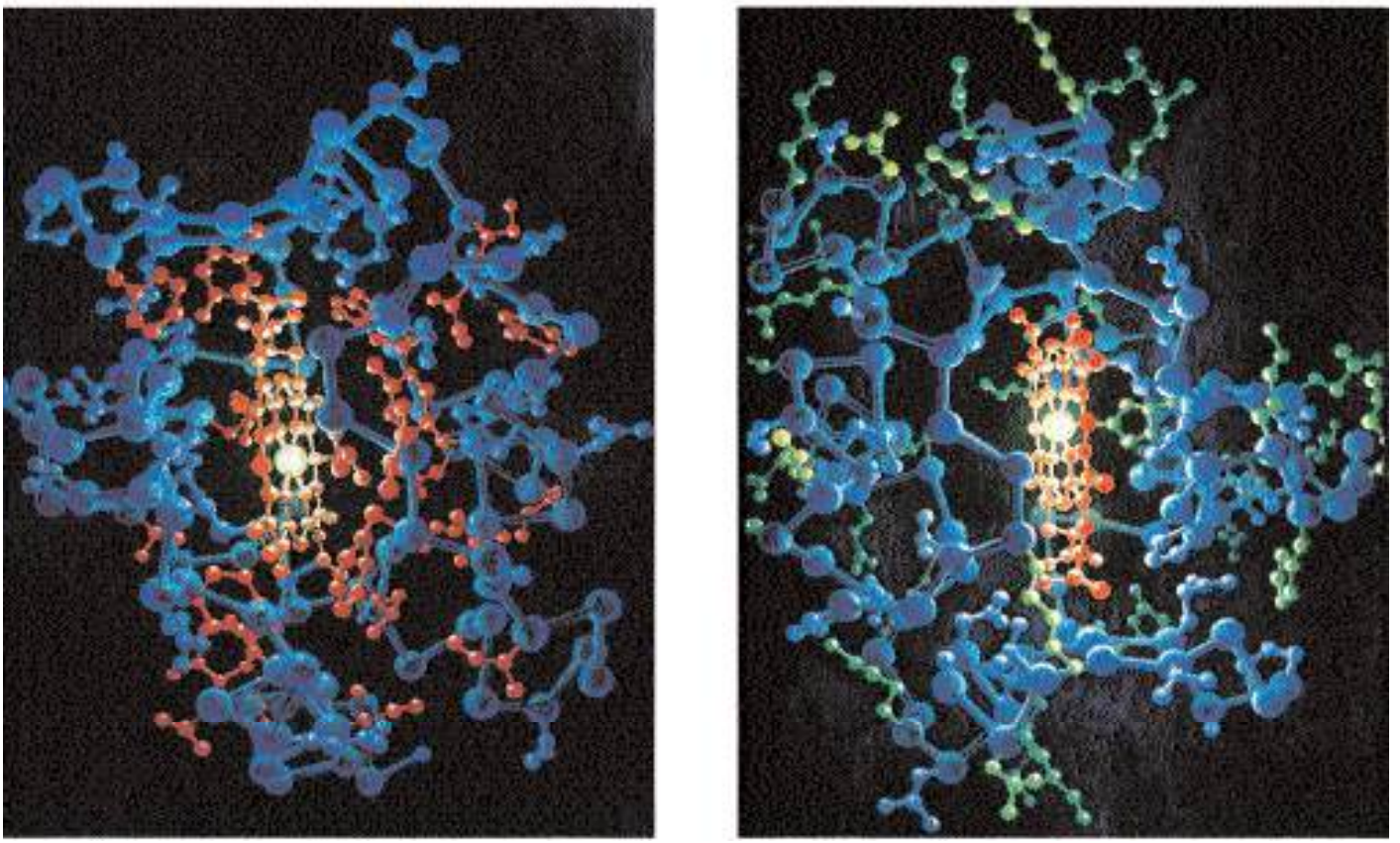
A primera vista, puede parecer que existe un número casi infinito de maneras en las que pueden doblarse las proteínas globulares. Si examinamos todos los detalles posibles de plegado, esto es cierto. Sin embargo, cuando se analiza un gran número de las estructuras conocidas, se encuentran determinados motivos y principios comunes. El primer principio es que la mayoría de las proteínas están formadas por más de un dominio. Un **dominio** es una región compacta, plegada localmente, de la estructura terciaria. Los dominios están conectados entre sí mediante la cadena polipeptídica que transcurre a lo largo de toda la molécula. Los dominios múltiples son especialmente comunes en las proteínas globulares más grandes, mientras que las proteínas muy pequeñas, como el BPTI, tienden a ser dominios plegados únicos. Como veremos en apartados posteriores, los distintos dominios suelen realizar funciones diferentes y en ocasiones un tipo determinado de dominio puede reconocerse en varias proteínas diferentes.

Entre las variedades de dominio, Jane Richardson ha reconocido varias clases distintas (véase la Bibliografía). Los principales patrones de plegado son de dos tipos: los que se producen alrededor de un empaquetamiento de hélices α y los que se construyen sobre un entramado de estructuras de lámina β. En la Figura 6.16 se presenta una serie de ejemplos. Branden y Tooze proporcionan una exposición detallada de las diferencias entre las distintas clases de estructuras (véase la





(a)



(b)

FIGURA **6.17**

Distribución de los residuos hidrófilos e hidrófobos en las proteínas globulares. **(a)** Secuencia de aminoácidos del citocromo *c* de corazón de caballo. Los residuos hidrófobos (rojo), hidrófilos (verde) y ambivalentes (blanco) parecen estar dispersos a lo largo de la secuencia. **(b)** Estructura tridimensional de la misma proteína. Izquierda: obsérvese el modo en que los aminoácidos hidrófobos (que se indican en rojo) se agrupan alrededor del grupo hemo y en el interior de la molécula. Derecha: en una perspectiva diferente de la misma molécula, se muestran en verde los residuos hidrófilos. Obsérvese que tienden a ubicarse en la superficie molecular.

(b) © Irving Geis.

Bibliografía). El análisis de las estructuras de centenares de proteínas globulares ha conducido a formular algunas reglas generales que rigen el plegado terciario:

- *Todas las proteínas globulares poseen un interior y un exterior definidos.* Si se analizan las secuencias de aminoácidos de las proteínas globulares, no se observa un patrón de distribución concreto de los residuos hidrófobos o hidrófilos (Figura 6.17a). Pero cuando observamos las posiciones de los aminoácidos en la estructura tridimensional, invariablemente se encuentra que la estructura terciaria hace que los residuos hidrófobos se sitúen principalmente en el interior, mientras que los residuos hidrófilos están en la superficie, en contacto con el agua (Figura 6.17b).
- *Las láminas β están generalmente enrolladas, o envueltas en estructuras cilíndricas.* Pueden observarse ejemplos evidentes en la Figura 6.16. En la mayoría de los casos, las láminas β enrolladas presentan un enrollamiento a izquierdas, cuando se observan desde una dirección perpendicular a los ejes de la cadena (por ejemplo, véase la hexoquinasa, dominio 2). Se ha argumentado que esta tendencia de las láminas β hacia un enrollamiento a izquierdas es consecuencia de la configuración L de

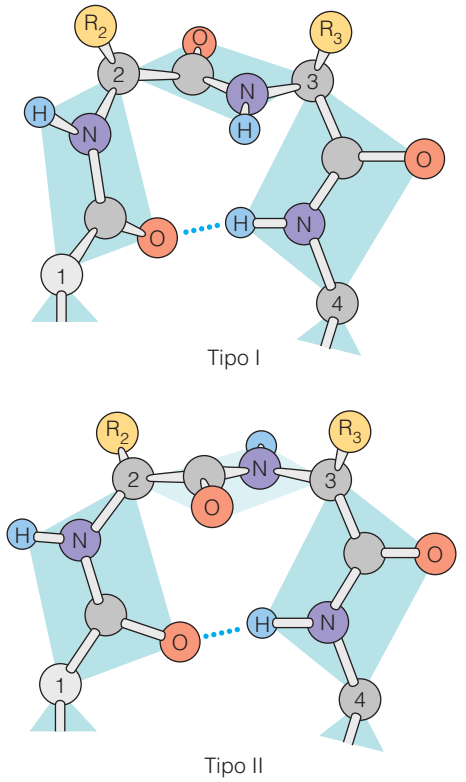


FIGURA **6.18**

Ejemplos de giros β. Cada uno de estos tipos de giro permite un cambio brusco de la dirección de la cadena polipeptídica. En el giro tipo II, el residuo 3 suele ser la glicina, presumiblemente porque un grupo R voluminoso presentaría conflictos con el oxígeno carbonilo del residuo 2.

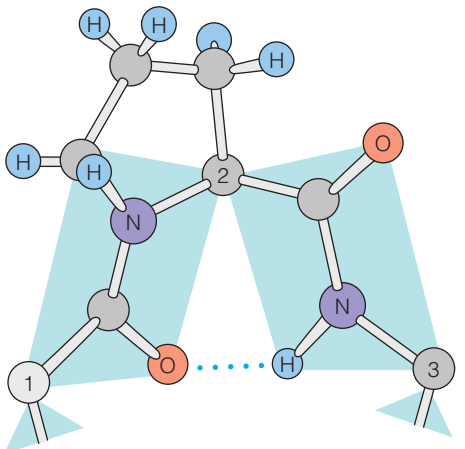


FIGURA **6.19**

Giro γ. Sólo un residuo se encuentra fuera de la secuencia del enlace de hidrógeno. En este caso es una prolina, que en ningún caso puede formar un enlace de este tipo.

los residuos de aminoácidos. Es probable que la estructura de la fibroína de la seda no sea exactamente plana, como se representa en la Figura 6.12, sino ligeramente enrollada.

- *La cadena polipeptídica puede doblar las esquinas de diversas maneras*, para ir desde un segmento β o una hélice α al siguiente. Una clase de giro compacto se denomina giro β (Figura 6.18). Existen distintas variedades de giro β, y cada una de ellas puede lograr una inversión completa de la dirección de la cadena polipeptídica en sólo cuatro residuos; en cada caso, el carbonilo del residuo i está unido por enlace de hidrógeno al hidrógeno amida del residuo $i + 3$. En el giro γ, que es incluso más estrecho, el enlace es con el residuo $i + 2$ (Figura 6.19). La prolina suele participar en los giros, como en la Figura 6.19, y también como fragmentador de hélices α, dado que este residuo no puede acomodarse en la hélice. Las vueltas y los giros se producen con mayor frecuencia en la superficie de las proteínas.
- *No todas las partes de las proteínas globulares pueden clasificarse convenientemente como hélice, lámina β o giros.* Por ejemplo, el examen de la Figura 6.16 revela en las cadenas muchos pliegues y bucles de contorno extraño (las regiones que aparecen de color verde). En ocasiones se las ha denominado regiones de "ovillo aleatorio", aunque este término es inadecuado, puesto que tales secciones de la cadena no son flexibles del mismo modo que lo es un verdadero ovillo aleatorio (véase la página 115 en el Capítulo 4). Más bien cada región concreta presenta su propio plegado particular, exactamente el mismo en cada ejemplo de la molécula de proteína concreta. Conocemos esta regularidad porque los estudios de difracción de rayos X muestran la misma disposición en todas las moléculas del cristal. Podríamos denominarlas *regiones estructuradas irregularmente*. Algunas proteínas también presentan regiones de ovillo aleatorio verdadero, que suelen hallarse en el N- o C-terminales. Cuando sucede esto, la porción de ovillo aleatorio no puede resolverse mediante difracción de rayos X.

En algunas proteínas el plegado está dominado por la necesidad de unir un grupo prostético. La mioglobina es un ejemplo de ello. A pesar de que la mioglobina puede describirse aproximadamente como un manojo de hélice α, la estructura terciaria de esta proteína se ha distorsionado para formar una jaula hidrófoba alrededor del grupo hemo.

Factores que determinan las estructuras secundaria y terciaria

INFORMACIÓN PARA EL PLEGADO PROTEICO

¿Qué es lo que en último término determina la compleja mezcla de plegado secundario y terciario que caracteriza a cada proteína globular? Muchos indicios señalan que la *mayoría de la información que determina la estructura tridimensional de una proteína la lleva la secuencia de aminoácidos de esa proteína.* Esto puede demostrarse mediante experimentos en los que la estructura tridimensional *nativa*, o natural, se rompe al cambiar las condiciones ambientales. Si elevamos lo suficiente la temperatura, o hacemos que el pH sea fuertemente ácido o alcalino, o bien añadimos al disolvente algunos tipos de moléculas orgánicas, como alcoholes o urea, se despliega la estructura de la proteína (Figura 6.20a). Como con los ácidos nucleicos, este proceso se llama **desnaturalización**, porque se ha perdido la estructura natural de la proteína, junto con la mayoría de sus propiedades específicas. La cadena desplegada es un *ovillo aleatorio*, con libertad de rotación alre-

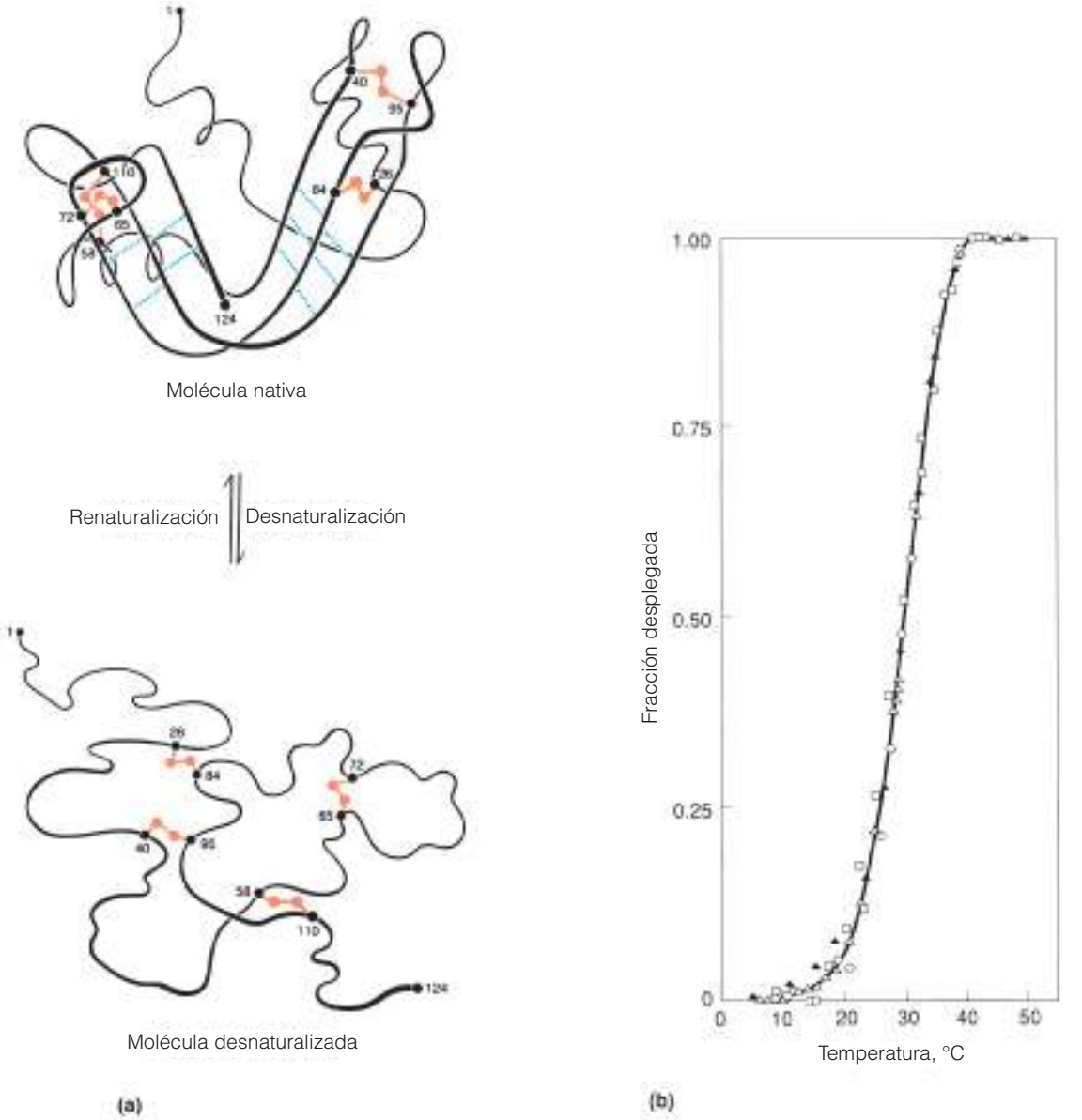


FIGURA **6.20**

Desnaturalización térmica de la ribonucleasa. **(a)** Este dibujo esquemático representa el cambio de conformación hacia una estructura desordenada cuando la ribonucleasa se calienta por encima de su temperatura de desnaturalización térmica. Obsérvese que los enlaces disulfuro aún están intactos, lo cual proporciona una cierta limitación a la flexibilidad conformacional. **(b)** Desnaturalización de la ribonucleasa seguida por varios métodos físicos. Esta gráfica muestra la fracción desnaturalizada, medida por el aumento de la viscosidad de la solución (□), el cambio de la rotación óptica a 365 nm (○) y el cambio de la absorbancia UV a 287 nm (△). Las tres técnicas indican la misma fracción desplegada. Las mediciones de una segunda desnaturalización después del enfriamiento (▲) producen la misma curva, lo que demuestra que el proceso es reversible. Los experimentos se llevaron a cabo a un pH de 2.1, y una fuerza iónica de 0.019 M. En condiciones fisiológicas, la ribonucleasa es mucho más estable, y no se desnaturaliza hasta aproximadamente 70-80°C.

(b) Datos tomados de A. Ginsburg y W. R. Carroll, *Biochemistry* (1965) 4:2159-2174.

dedor de los enlaces, tanto en el armazón polipeptídico como en las cadenas laterales. Ya no tiene una conformación compacta única, sino que fluctúa continuamente entre un gran número de conformaciones extendidas. Las diferencias entre las conformaciones nativa y de ovillo aleatorio pueden detectarse con varios de los métodos que se presentan en Herramientas de la Bioquímica 5A.

La secuencia de aminoácidos (estructura primaria) determina las estructuras secundaria y terciaria.

En el experimento clásico de C. Anfinsen que se representa en la Figura 6.20, la enzima ribonucleasa se ha desnaturalizado elevando la temperatura. La ribonucleasa es una enzima digestiva que cataliza la hidrólisis de los ácidos ribonucleicos. Cuando la ribonucleasa se desnaturaliza, se pierden sus estructuras terciaria y secundaria, y ya no puede actuar como catalizador para la fragmentación del RNA. El proceso puede seguirse mediante varias medidas físicas, tal como aparece en la Figura 6.20b. Es de destacar que esta desorganización total de la estructura de la ribonucleasa es completamente reversible. Si la ribonucleasa vuelve a las condiciones fisiológicas normales de temperatura y disolvente, se plegará espontáneamente a su estructura original. Además, será de nuevo una enzima funcional. En consecuencia, la proteína "conoce" su propia conformación favorecida y no precisa otra información para guiarse que la que contiene su secuencia. Experimentalmente se ha observado el mismo fenómeno en muchas otras proteínas, a pesar de que existen excepciones claras. Por consiguiente, puede esperarse que un polipéptido recién sintetizado en una célula se pliegue espontáneamente a su conformación adecuada, preparado para desempeñar su función. Como veremos más adelante en este capítulo, los procesos reales in vivo pueden ser a veces más complicados, y las proteínas pueden necesitar "ayuda" para evitar errores de mal plegamiento o agregación. Sin embargo, el principio básico de autoensamblaje de las estructuras secundaria y terciaria parece ser la norma general.

TERMODINÁMICA DEL PLEGADO

El plegado de una proteína globular es un proceso claramente favorecido termodinámicamente en condiciones fisiológicas. En otras palabras, el cambio de energía libre global que se produce con el plegado debe ser negativo. Este cambio de energía libre negativo se consigue mediante el equilibrio de varios factores termodinámicos, que se describirán a continuación.

Entropía conformacional

El proceso de plegado, que comporta el paso desde una multitud de conformaciones de ovillo aleatorio a una *única* estructura plegada, implica una disminución de la aleatoriedad y en consecuencia una disminución de la entropía. Este cambio se denomina **entropía conformacional** del plegado. La ecuación de la energía libre, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, demuestra que este ΔS negativo realiza una contribución *positiva* a ΔG. En otras palabras, el cambio de entropía conformacional trabaja *contra* el plegado. Para buscar la explicación de un ΔG global negativo, debemos buscar las características del plegado proteico que producen o bien un ΔH negativo grande o bien algún otro *aumento* de la entropía con el plegado. Pueden hallarse ambas cosas.

La disminución de la entropía conformacional cuando se pliega una proteína desfavorece el plegado, que se compensa en parte por la estabilización energética a través de los enlaces internos no covalentes.

La fuente principal de un ΔH negativo son las interacciones energéticamente favorables entre grupos en el interior de la molécula plegada, entre las que se encuentran muchas de las interacciones no covalentes descritas en el Capítulo 2.

Interacciones carga-carga

Las interacciones carga-carga pueden producirse entre grupos de las cadenas laterales cargados positivamente y negativamente. Por ejemplo, un grupo amino de la cadena lateral de la lisina puede situarse cerca del grupo γ-carboxilo de algún residuo de ácido glutámico. A pH neutro, un grupo se cargará positivamente y el otro negativamente, de modo que existe una fuerza electrostática de atracción entre ellos. Podemos decir que un par de estas características forma un tipo de sal en el interior de la molécula proteica; consecuentemente, estas interacciones se denominan algunas veces **puentes salinos**. Estos enlaces iónicos se rompen cuando la proteína se lleva a valores de pH lo suficientemente bajos o elevados para que

una u otra de las cadenas laterales pierdan su carga. Esta pérdida de puentes salinos explica en parte la desnaturalización ácida o básica de las proteínas. La repulsión mutua entre pares de los numerosos grupos de carga similar que se encuentran en las proteínas en disoluciones muy ácidas o básicas también contribuye a la inestabilidad de la estructura plegada en estas condiciones.

Enlaces de hidrógeno internos

Muchas de las cadenas laterales de los aminoácidos llevan grupos que son buenos donadores de enlaces de hidrógeno o buenos aceptores, como por ejemplo los hidroxilos de la serina o de la treonina, los grupos amino y los oxígenos carbonilo de la asparagina o la glutamina, y los nitrógenos del anillo de la histidina. Además, si los protones amida o los carbonilos del armazón polipeptídico no toman parte en la formación de la estructura secundaria, son posibles candidatos para interactuar con los grupos de las cadenas laterales. En la porción de la molécula de la enzima lisozima que aparece en la Figura 6.21 se ve una red de varios tipos de enlaces de hidrógeno internos. Como hemos visto antes, los enlaces de hidrógeno son relativamente débiles en disolución acuosa, pero su gran número puede añadir una contribución considerable a la estabilidad.

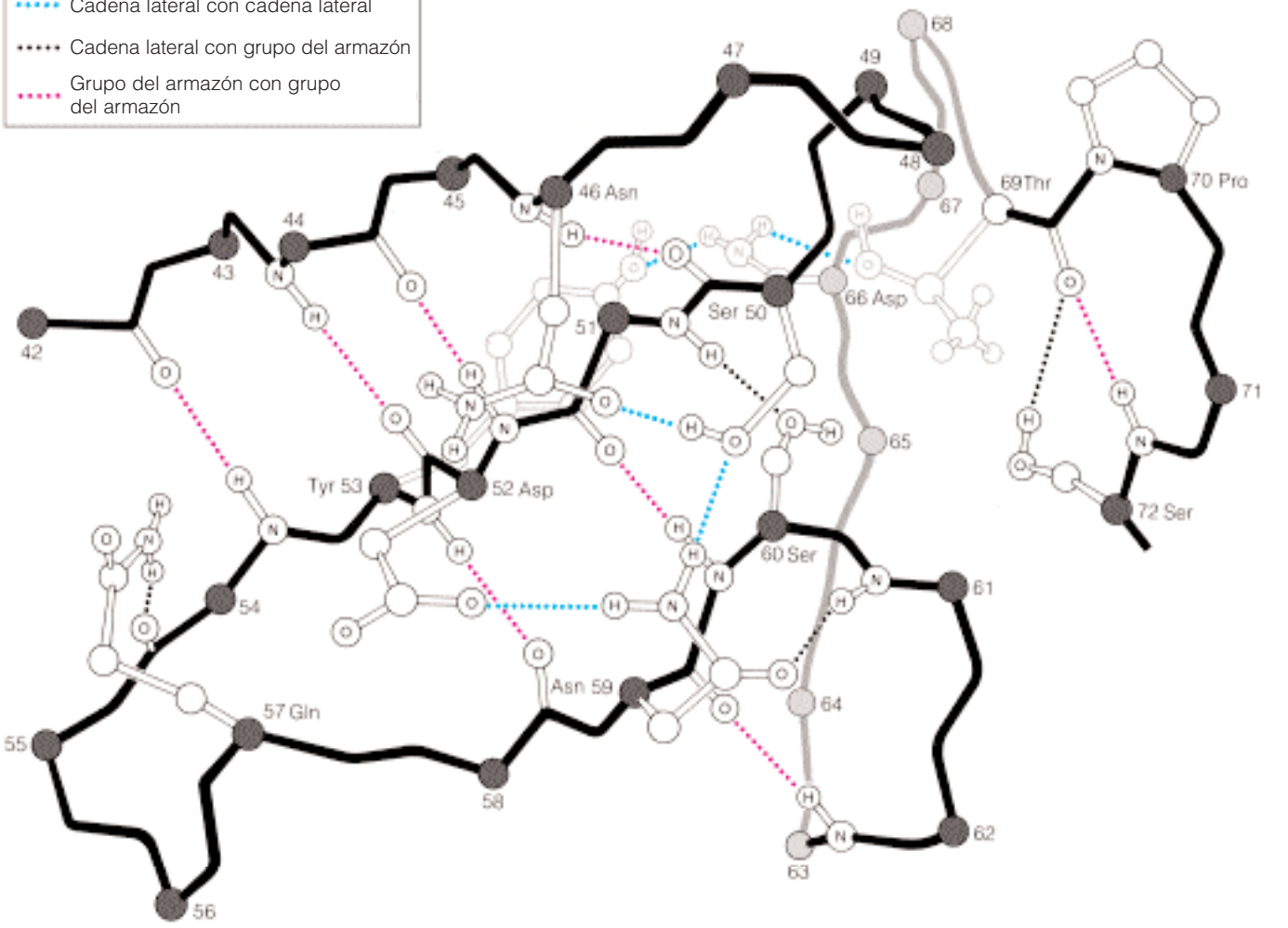


FIGURA **6.21**

Detalles de los enlaces de hidrógeno en una proteína característica. Se ilustra una red de enlaces de hidrógeno dentro de la enzima lisozima. Se distinguen tres tipos de enlaces de H: enlaces entre grupos de las cadenas laterales; enlaces entre grupos del armazón; y enlaces entre un grupo de la cadena lateral y un hidrógeno amida o un oxígeno carbonilo del armazón.

© Irving Geis.

TABLA 6.3 Parámetros termodinámicos del plegado de algunas proteínas globulares a 25°C en disoluciones acuosas

Proteína	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/K·mol)
Ribonucleasa	−46	−280	−790
Quimotripsina	−55	−270	−720
Lisozima	−62	−220	−530
Citocromo *c*	−44	−52	−27
Mioglobina	−50	0	+170

Nota: Datos adaptados de P. L. Privalov y N. N. Khechinashvili, *J. Mol. Biol.* (1974) 86:665–684. Cada conjunto de datos se ha tomado en el valor de pH en el que la proteína presenta una estabilidad máxima; todos están cerca del pH fisiológico. Los datos son para la reacción de plegado: desnaturalizada $\rightleftharpoons$ natural.

Interacciones de van der Waals

Las interacciones débiles entre grupos moleculares sin carga también pueden aportar contribuciones importantes a la estabilidad de la proteína. Como demuestran los modelos de relleno espacial de las proteínas, como el de la Figura 6.15c, el interior se encuentra densamente empaquetado, permitiendo el contacto máximo entre los átomos de las cadenas laterales.

La contribución de cualquiera de estas interacciones a la entalpía negativa del plegado disminuye por el hecho de que cuando una molécula proteica se pliega a partir de un ovillo aleatorio extendido, abandona algunas interacciones favorables con el agua. Como señalamos en el Capítulo 2, una hélice α desplegada forma enlaces de hidrógeno con el agua en lugar de formar enlaces internos. No está claro en qué medida este cambio modifica el cambio de energía global. Sin embargo, sabemos que si *no* se forman los enlaces de H internos cuando quedan enterrados por el plegado los donadores o aceptores de enlaces de H, se produce una diferencia de energía sustancial en favor del estado desplegado.

Cada interacción individual sólo puede contribuir en una pequeña cantidad (como máximo sólo unos pocos kilojulios) a la entalpía de interacción negativa global. Pero la suma de las contribuciones de muchas interacciones puede dar una poderosa estabilización a la estructura plegada. En la Tabla 6.3 se presentan ejemplos de los cambios de entalpía total del plegado de algunas proteínas representativas. En muchos casos, una contribución energética favorable a partir de la suma de las interacciones intramoleculares compensa de modo más que suficiente la entropía desfavorable del plegado.

El enterramiento de los grupos hidrófobos dentro de una molécula proteica plegada produce un aumento de la entropía de estabilización conocido como efecto hidrófobo.

Efecto hidrófobo

Hay otro factor que realiza una contribución importante a la estabilidad termodinámica de muchas proteínas globulares. Recuérdese del Capítulo 2 que las sustancias hidrófobas en contacto con el agua hacen que las moléculas de agua formen estructuras parecidas a jaulas o clatratos alrededor de ellas. Esta ordenación corresponde a una pérdida de aleatoriedad en el sistema; disminuye la entropía. Supongamos que una proteína contiene, en su secuencia de aminoácidos, un número sustancial de residuos con cadenas laterales hidrófobas (por ejemplo, leucina, isoleucina y fenilalanina). Cuando la cadena polipeptídica se encuentra desplegada, estos residuos están en contacto con el agua y producen la ordenación de la estructura del agua circundante. Pero cuando se pliega la cadena formando una estructura globular, los residuos hidrófobos quedan enterrados dentro de la molécula (véase la Figura 6.17b). Las moléculas de agua que se ordenaron por la proteína cuando ésta estaba en estado desnaturalizado se liberan en este momento, consiguiendo libertad de movimiento. En consecuen-

cia, la internalización de los grupos hidrófobos a través del plegado aumenta la aleatoriedad de todo el sistema (proteína más agua) y, por consiguiente, produce un *aumento* de entropía al doblarse. Este aumento de entropía produce una contribución negativa a la energía libre del plegado y aumenta la estabilidad de la estructura proteica.

El término *enlace hidrófobo* se ha utilizado a veces para describir la estabilización resultante del enterramiento de los grupos hidrófobos, pero este término no en realidad es inadecuado. La estabilización no es principalmente el resultado de los enlaces que se forman entre grupos hidrófobos, a pesar de que se producen con seguridad interacciones de van der Waals. Más bien, el sistema global se estabiliza por un efecto entrópico. El término más adecuado para describir esta fuente de estabilización proteica es **efecto hidrófobo**. En la Tabla 6.3 pueden verse ejemplos de la importancia del efecto hidrófobo. La ΔS negativa muy pequeña del citocromo *c* y el valor positivo de la mioglobina son consecuencia del efecto hidrófobo en estas proteínas. De hecho, la estabilidad de la mioglobina se debe principalmente al efecto hidrófobo.

Los diferentes residuos de aminoácidos contribuyen de forma muy diferente al efecto hidrófobo. Los estudios sobre la transferencia de aminoácidos desde el agua a los disolventes orgánicos, así como algunas consideraciones teóricas, han conducido al diseño de distintas escalas de hidrofobicidad. En la Tabla 6.4 se presentan dos ejemplos. Las dos escalas, basadas en premisas distintas, no son exactamente iguales. Sin embargo, este tipo de escalas puede utilizarse para predecir la importancia del efecto hidrófobo en la estabilización de cualquier proteína concreta. En el Capítulo 10 veremos cómo también pueden utilizarse para predecir las porciones de una proteína que se insertarán en una membrana lipídica.

En resumen, la estabilidad de la estructura plegada de una proteína globular depende de la interacción de tres factores:

1. El cambio de entropía conformacional desfavorable, que favorece en su lugar las cadenas aleatorias.
2. La entalpía favorable de las interacciones de los grupos laterales intramoleculares.
3. El cambio de entropía favorable del enterramiento de los grupos hidrófobos en el interior de la molécula.

Así, el factor 1 va en contra del plegado, mientras que el 2 y el 3 colaboran a estabilizar el plegado. En la Figura 6.22 se presenta un dibujo esquemático del modo en que estos componentes contribuyen a la energía libre del plegado. En distintas proteínas, difiere el aporte a la estabilización de las interacciones de las cadenas laterales y el efecto hidrófobo (véase la Tabla 6.3) pero la consecuencia general es la misma: alguna estructura plegada concreta corresponde a un mínimo de energía libre del polipéptido en condiciones fisiológicas. Éste es el motivo por el que las cadenas se pliegan espontáneamente.

El examen de los datos de la Tabla 6.3 revela otro aspecto importante de la estabilización proteica. El ΔG relativamente pequeño correspondiente a la reacción de plegado suele ser la diferencia entre términos ΔH y $T\Delta S$ grandes. Estos valores grandes surgen porque una proteína tiende a plegarse de modo *cooperativo*. Una mezcla parcialmente plegada contiene principalmente moléculas totalmente desplegadas y totalmente plegadas, con pocas estructuras intermedias. En consecuencia, muchas interacciones del plegado dentro de una molécula se forman o rompen de manera concertada. Una consecuencia de esta cooperatividad es que la desnaturalización térmica de una proteína habitualmente se produce en un estrecho margen de temperaturas, como se mues-

TABLA 6.4 Dos ejemplos de escalas de hidrofobicidad

Aminoácido	Escala de Engelman, Steitz, y Goldman[a]	Escala de Kyte y Doolittle[b]
Phe	3.7	2.8
Met	3.4	1.9
Ile	3.1	4.5
Leu	2.8	3.8
Val	2.6	4.2
Cys	2.0	2.5
Trp	1.9	−0.9
Ala	1.6	1.8
Thr	1.2	−0.7
Gly	1.0	−0.4
Ser	0.6	−0.8
Pro	−0.2	−1.6
Tyr	−0.7	−1.3
His	−3.0	−3.2
Gln	−4.1	−3.5
Asn	−4.8	−3.5
Glu	−8.2	−3.5
Lys	−8.8	−3.9
Asp	−9.2	−3.5
Arg	−12.3	−4.5

[a] Datos tomados de Engelman, D. M., T. A. Steitz, y A. Goldman, *Annu. Rev. Biophys. & Biophys. Chem.* (1986) 15:321-353.

[b] Datos tomados de Kyte, J., y R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* (1982) 157:105-132.

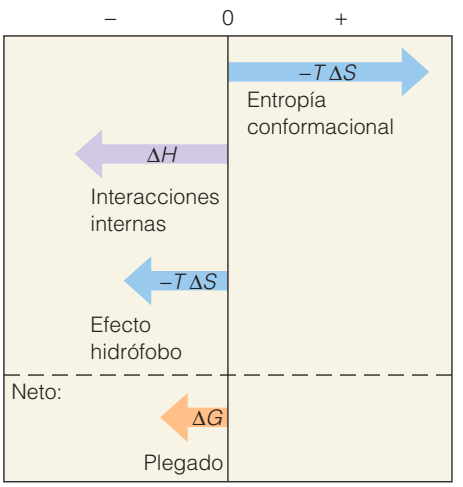


FIGURA **6.22**

Contribuciones a la energía libre del plegado de las proteínas globulares. El cambio de entropía conformacional actúa contra el plegado, pero la entalpía de las interacciones internas y el cambio de entropía hidrófoba favorecen el plegado. La suma de estas cantidades puede hacer que la energía libre total del plegado sea negativa, de modo que la estructura plegada sea estable.

tra en la Figura 6.20b. Los datos ilustran más el principio de **compensación entropía-entalpía**. A pesar de que los valores de ΔH y ΔS varían mucho, parecen estar ajustados de modo que ΔG permanece bastante constante. Aunque se precisa estabilidad para la función proteica, puede lograrse mediante muchas combinaciones distintas de contribuciones a ΔH y ΔS; la evolución selecciona, no en función de los valores de estos parámetros individuales, sino por alguna *combinación* de valores que produzcan estabilidad a la temperatura del organismo. Los organismos termófilos como los que viven en las fuentes termales tienen proteínas que son más estables a temperaturas elevadas que las de los organismos que viven en ambientes más templados.

FUNCIÓN DE LOS ENLACES DISULFURO

Algunas proteínas plegadas se estabilizan mediante enlaces disulfuro internos, además de las fuerzas no covalentes.

Una vez que se ha producido el plegado, la estructura tridimensional se estabiliza más en algunos casos por la formación de enlaces disulfuro entre residuos de cisteína. Un ejemplo extremo de este enlace se encuentra en la proteína inhibidora de la tripsina pancreática bovina (BPTI), representada en la Figura 6.15. Con tres puentes —S—S— en 58 residuos, esta molécula es una de las proteínas más estables que se conocen. Es bastante inerte frente a los reactivos desplegantes, como la urea, y presenta una desnaturalización térmica por debajo de los 100°C sólo en disoluciones muy ácidas; el punto medio de la desnaturalización reversible es de aproximadamente 80°C a pH 2.1 (Figura 6.23). Pero si sólo *uno* de los enlaces disulfuro (el que está entre los residuos de cisteína 14 y 38, Figura 6.15b) se reduce y carboximetila, el punto medio disminuye hasta 59°C.

Cuando todos los enlaces disulfuro del BPTI se reducen, la proteína se despliega a temperatura ambiente. Pero con la reoxidación de los sulfhidrilos, se forma eficazmente la proteína nativa con los tres apareamientos disulfuro correctos. Esta nueva formación no es la que se esperaría por azar. Supongamos que se ha reducido una molécula de BPTI, produciendo 6 residuos de cisteína y, a continuación, reoxidamos aleatoriamente los grupos —SH. El primer grupo —SH que capte un compañero tendrá 5 posibilidades, el segundo grupo 3 y el último sólo 1, de modo que existen 5×3, es decir, 15 combinaciones igualmente probables. En consecuencia, sólo esperaríamos que aproximadamente el 7% del BPTI reducido se volviera a plegar con éxito *por azar*. Pero muchos estudios de ésta y otras proteínas que contienen enlaces disulfuro indican que se consiguen apareamientos correctos en casi el 100% de las moléculas si se da el tiempo suficiente. Este hallazgo debe significar que es el plegado preferido de la proteína el que coloca los grupos —SH en posición adecuada para el apareamiento correcto. El corolario de esta afirmación es que los puentes —S—S— no son esenciales en sí mismos para que la proteína se vuelva a plegar correctamente. Sin embargo, contribuyen a la estabilidad de la estructura una vez está plegada. Una molécula que contenga puentes —S—S— tiene un menor número de conformaciones disponibles en la forma desplegada que los que tiene una proteína comparable sin los puentes. Por consiguiente, presenta una ganancia de entropía más pequeña al desplegarse y por lo tanto está estabilizada.

Esta ventaja plantea una pregunta: ¿por qué la *mayoría* de las proteínas no tienen enlaces disulfuro? En realidad, estos enlaces son relativamente infrecuentes y se encuentran principalmente en las proteínas que se exportan desde las células, como la ribonucleasa, el BPTI y la insulina. Una explicación es que el ambiente en el interior de la mayoría de las células es reductor y tiende a mantener a los grupos sulfhidrilo en estado reducido. Los ambientes externos, la mayor parte de las veces, son oxidantes y estabilizan los puentes —S—S—.

Un método nuevo potente para estudiar las fuentes de estabilización estructural de las proteínas ha surgido a partir de las técnicas de DNA recombinante.

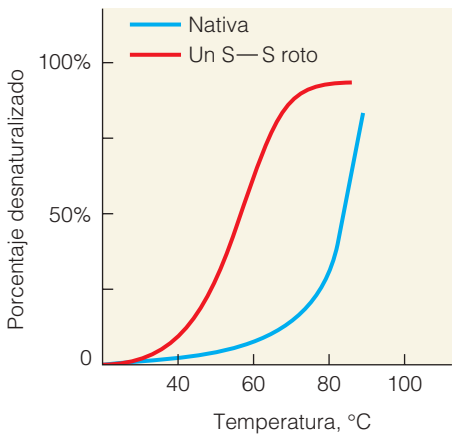


FIGURA **6.23**

Desnaturalización térmica del BPTI. Se indica el porcentaje de desnaturalización en función de la temperatura a pH 2.1 para la proteína nativa y para la proteína en la que el enlace disulfuro Cys 14-Cys 38 se ha reducido y carboximetilado.

Datos tomados de J. P. Vincent, R. Chicheportiche y M. Lazdunski, *Eur. J. Biochem.* (1971) 23:401-411.

Actualmente, al poderse clonar los genes correspondientes a las proteínas y expresarlos en portadores bacterianos, es posible efectuar cambios específicos en las posiciones deseadas. Este método de **mutagénesis de lugar dirigida** (véase Herramientas de la Bioquímica 25E) nos permite probar el efecto producido por el cambio de uno o más residuos de aminoácido, o la adición o eliminación de enlaces disulfuro. El método ya se ha utilizado, por ejemplo, para eliminar enlaces disulfuro específicos en el BPTI reemplazando cisteínas con serinas o alaninas.

Dinámica de la estructura de las proteínas globulares

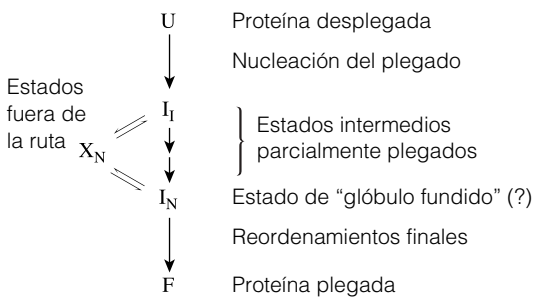
Las descripciones estructurales y termodinámicas que hemos realizado hasta el momento tienden a presentar un cuadro demasiado estático de las proteínas globulares. Las imágenes precisas producidas por difracción de rayos X dan la impresión de una estructura rígida e inflexible. Del mismo modo, el análisis termodinámico del plegado se centra en los estados inicial (desplegado) y final (plegado). Pero actualmente se acepta que las proteínas globulares se pliegan mediante rutas *cinéticas* complejas y que incluso la estructura plegada, una vez conseguida, es una estructura dinámica. Este apartado explora alguno de estos aspectos dinámicos de las proteínas globulares.

CINÉTICA DEL PLEGADO DE LAS PROTEÍNAS

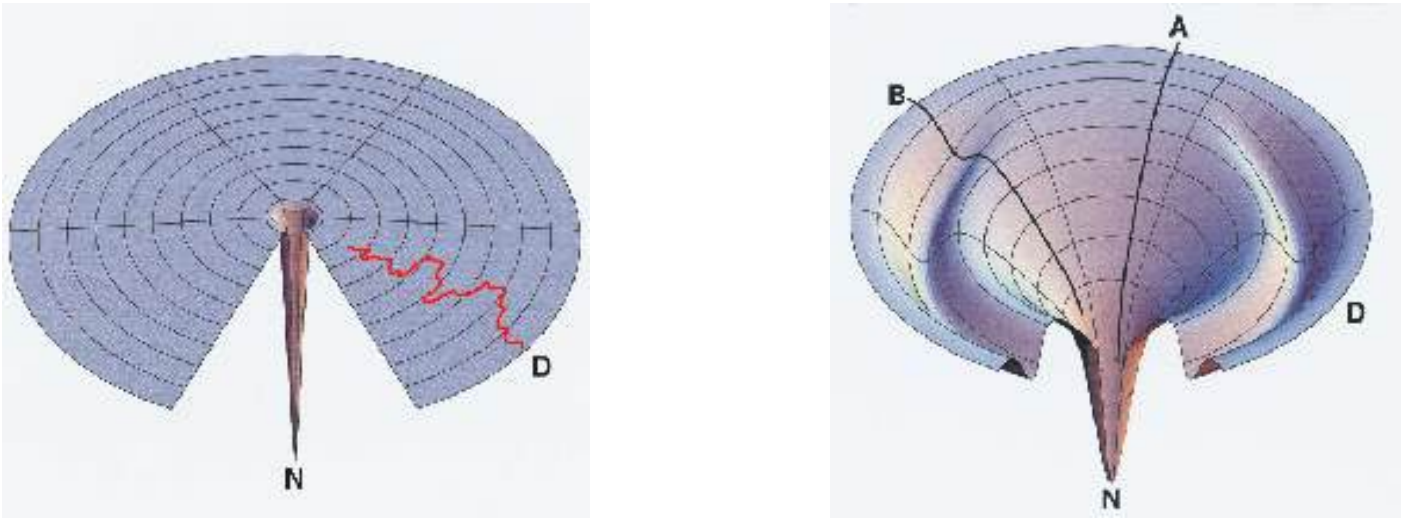
El plegado de las proteínas globulares a partir de sus conformaciones desnaturalizadas es un proceso notablemente rápido, que se completa en menos de un segundo. Esta observación ha sido una fuente continua de sorpresas y de interés para los bioquímicos, ya que a primera vista, parece que es muy difícil la consecución de la estructura muy precisa característica de las proteínas globulares. Este punto de vista quedó expresado de forma sorprendente en la "paradoja de Levinthal" enunciada por vez primera por Cyrus Levinthal en 1968: un cálculo aproximado indica que para una cadena polipeptídica como la ribonucleasa (124 residuos) son posibles unas 10^{50} conformaciones. Aunque la molécula pudiera intentar una nueva conformación cada 10^{-13} segundos, ¡se necesitarían unos 10^{30} años para intentar un número significativo de ellas! Sin embargo, se ha comprobado experimentalmente que la ribonucleasa se pliega in vitro aproximadamente en un minuto. Parece claro que hay algún error en estos cálculos.

El plegado proteico puede ser rápido pero parece comportar unos estados intermedios bien definidos.

Esta paradoja parece haber comenzado a resolverse tras años de estudios experimentales y de especulaciones teóricas. En primer lugar, ha quedado claro, mediante el uso de métodos cinéticos rápidos, utilizado diversas técnicas físicas para el seguimiento de los diferentes aspectos de la estructura proteica, que el plegado se produce a través de diversos estados intermedios; estas observaciones condujeron al modelo de plegado "de la ruta", que se indica como sigue:



Es crítico el paso de nucleación, ya que, por ejemplo, es mucho más difícil comenzar una hélice α que extenderla (obsérvese que deben doblarse adecua-



(a) (b)

FIGURA **6.24**

Superficies energéticas para visualizar las conformaciones proteicas.
(a) Panorama energético del "campo de golf" de Levinthal. **N** es la conformación nativa y **D** el estado desnaturalizado. La cadena busca **N** aleatoriamente, esto es, en un nivel de juego de campos de energía y tiene pocas oportunidades de encontrar el diminuto agujero que conduce al estado nativo.
(b) Un panorama energético más realista, que tiende a "encauzar" a la proteína hacia el estado nativo. Son posibles muchos caminos, alguno de los cuales conduce directamente "hacia abajo" como **A**, y proporciona un rápido plegado. Otros, como **B**, pueden conducir a mínimos de energía secundarios, que pueden retrasar el plegado. Los panoramas energéticos verdaderos son probablemente cauces mucho más complicados.

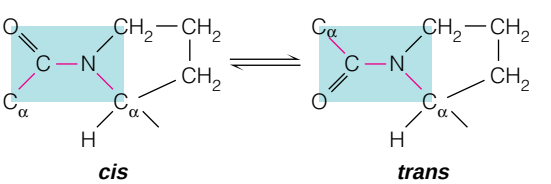
Cortesía de K. Dill y H. S. Chan, *Nature Struct. Biol.* (1997) 4:10-19.

damente al menos cuatro residuos para formar el primer enlace de H estabilizador). Por otro lado, se acepta en la actualidad que la nucleación puede comenzar en diversos puntos y que todas estas estructuras plegadas parcialmente serán "encauzadas" mediante mínimos energéticos hacia el estado final. El modelo de encauzamiento propone que no hay una única ruta sino *muchas* rutas posibles desde el estado desnaturalizado hasta el estado plegado, y cada ruta conduce a un descenso de energía. De esta forma, cualquier molécula sólo necesita intentar una fracción infinitesimal de todas las configuraciones posibles, y se evita la paradoja de Levinthal (véase la Figura 6.24).

Durante el descenso hacia el mínimo de energía libre, puede haber pausas que corresponden a las estructuras intermedias metaestables, que se incorporan al modelo de la ruta. Una estructura intermedia importante en el plegado de muchas proteínas parece ser la que se ha denominado de estado de "glóbulo fundido", una estructura compacta en la que se ha producido ya gran parte del plegado secundario y terciario, pero donde todavía no se han asentado en su lugar final los residuos hidrófobos que se sitúan en el interior.

Existen también pruebas de estados "fuera de la ruta" que son aquellos en los que algunos de los elementos clave están plegados de forma incorrecta. Estos estados pueden corresponder a mínimos locales de energía libre del cauce y pueden atrapar temporalmente a la proteína (véase la Figura 6.24b). Como veremos posteriormente en este capítulo, la célula dispone de mecanismos para ayudar a las proteínas plegadas de forma incorrecta a encontrar sus conformaciones adecuadas. Las proteínas complejas más grandes pueden no conseguir nunca el 100% de éxito del plegado in vivo, pero la célula puede identificar las que son incorrectas y eliminarlas. Uno de los errores de plegado más corrientes se produce en la isomerización *cis-trans* incorrecta del enlace amida adyacente a un residuo de prolina:

El plegado puede retrasarse si se atrapan moléculas en los estados "fuera de la ruta".



A diferencia de otros enlaces peptídicos de las proteínas, para los que el isómero *trans* está muy favorecido (por un factor de aproximadamente 1000), los residuos

de prolina favorecen la forma *trans* del enlace peptídico precedente por un factor de sólo aproximadamente 4. En consecuencia, hay una oportunidad significativa de que se forme primero el isómero "equivocado" (en términos de conformación funcional de la proteína). La conversión a la configuración correcta puede comportar un reordenamiento significativo de la cadena y, por lo tanto, puede ser lenta in vitro. Actualmente existen indicios de que las células tienen enzimas que catalizan esta isomerización *cis-trans* y de esta forma aceleran el plegado in vivo.

CINÉTICA DE LA FORMACIÓN DE LOS ENLACES DISULFURO

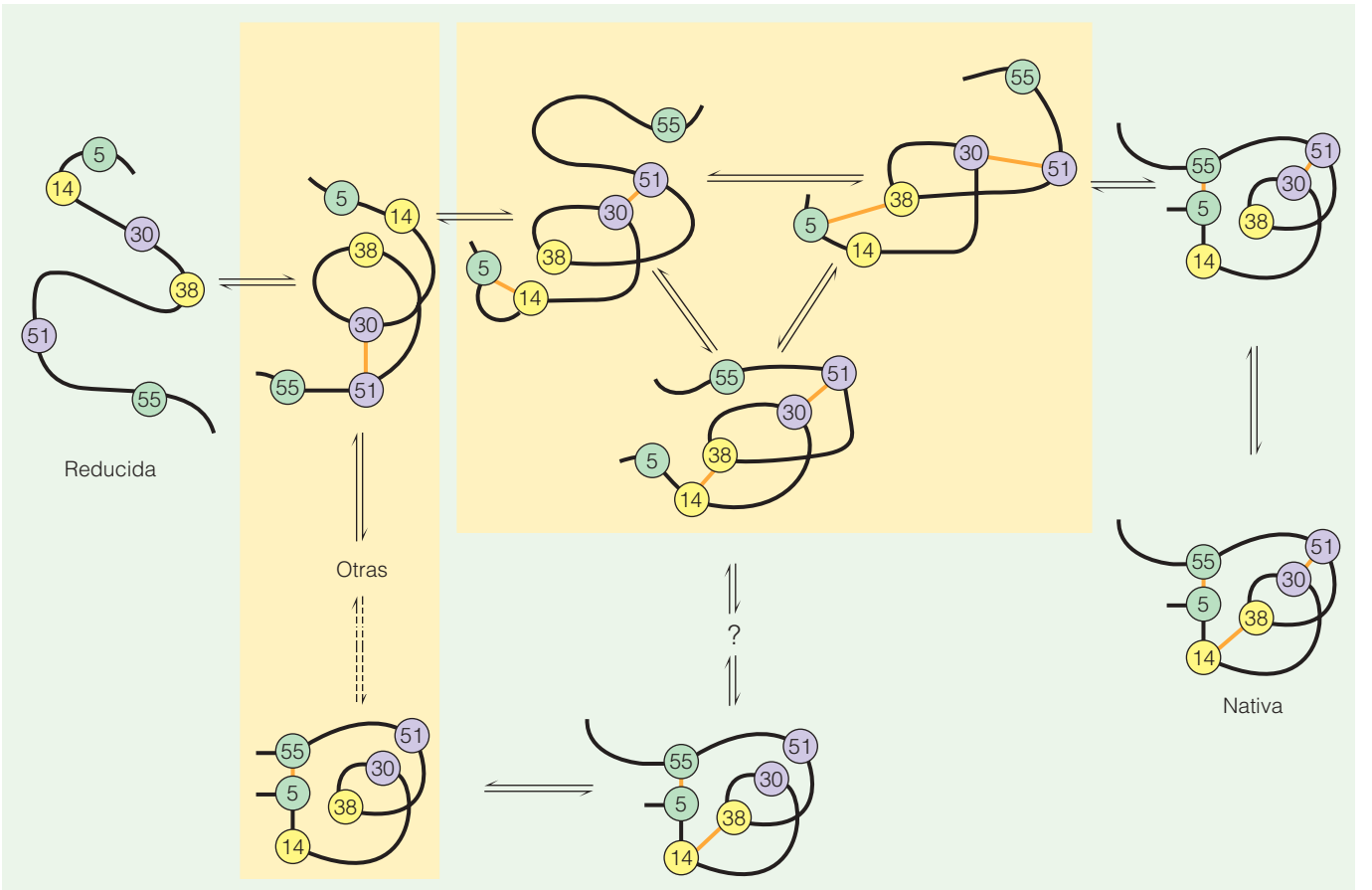
Si una proteína se pliega desde un estado en el que los enlaces disulfuro se han roto y por lo tanto deben volver a formarse, el proceso es más complicado y lento: suele precisar muchos minutos. En estos casos, es posible un análisis más detallado, porque los métodos químicos pueden captar productos intermedios en los que sólo se han formado algunos de los enlaces disulfuro. Estos productos intermedios pueden separarse a continuación mediante métodos como la electroforesis en gel o la cromatografía de alta resolución. Estas reacciones de atrapamiento son sencillas y rápidas; un ejemplo de ello es el bloqueo con yodoacetato de sulfhidrilos que no han reaccionado (véase Herramientas de la Bioquímica 5C).

El proceso de replegado se ha estudiado con gran detalle utilizando el BPTI, que es adecuado porque es pequeño y contiene tres puentes —S—S—. Además, cuando se reducen los puentes, el BPTI se despliega totalmente a temperatura ambiente. Los experimentos que se iniciaron en los laboratorios de T. E. Creighton han proporcionado un cuadro fascinante y sorprendente de este proceso, que aparece como un diagrama en la Figura 6.25. A pesar de que algunos detalles del

FIGURA **6.25**

Replegado y formación de los enlaces disulfuro. Este dibujo esquemático presenta la ruta postulada para el replegado y la formación de los enlaces disulfuro en el BPTI. Se indican con el mismo color los pares de residuos que forman enlaces disulfuro unos con otros en la estructura nativa. Obsérvese que las estructuras intermedias pueden contener tanto enlaces disulfuro nativos como no nativos. Los estados intermedios agrupados juntos en los recuadros coloreados se interconvierten rápidamente; el estado intermedio 5-55 se interconvierte más lentamente que los otros estados intermedios de un disulfuro.

Adaptado de D. P. Goldenberg, *Trends Biochem. Sci.* (1992) 17:257-261. © 1992 con permiso de Elsevier Science.



La formación de los enlaces disulfuro correctos en una proteína algunas veces se produce mediante estados intermedios incorrectos.

modelo han cambiado con la investigación continuada, el punto principal es que se forman algunos enlaces disulfuro que no se encuentran en la estructura nativa en las etapas intermedias del plegado. Aparentemente, la proteína puede utilizar varias rutas alternativas para plegarse, pero al final encuentra tanto su estructura terciaria adecuada como el conjunto correcto de enlaces disulfuro. Este proceso recibe la ayuda in vivo de catalizadores enzimáticos del reordenamiento de los enlaces —S—S—. Los experimentos con otras proteínas (entre ellas la ribonucleasa) han confirmado este cuadro general.

CHAPERONINAS

El plegado y ensamblaje de las proteínas in vivo en ocasiones recibe la ayuda de proteínas chaperonas.

El hecho de que una proteína pueda, por sí misma, encontrar su estado de plegado natural in vitro no significa necesariamente que se produzcan los mismos acontecimientos in vivo. Ya hemos señalado dos de las ayudas catalíticas al plegado que se producen en las células, las enzimas que aceleran la conversión *cis-trans* en los residuos de prolina, y aquellas que catalizan el reagrupamiento de los enlaces disulfuro.

Sin embargo, se ha descubierto que algunas proteínas requieren una colaboración especial para conseguir un plegado adecuado y deben obtener la ayuda de unas proteínas especiales denominadas *chaperoninas* o *chaperonas moleculares*. Como su nombre implica, la función de estas chaperonas es mantener sin problemas a la proteína recién formada. Los problemas significan, en este caso, un plegado o una agregación inadecuados. El plegado inadecuado puede corresponder a un atrapamiento en un mínimo local profundo en el panorama energético. Con frecuencia, la agregación es un peligro ya que la proteína, liberada del ribosoma en un estado desplegado, tendrá grupos hidrófobos expuestos que serán arropados en el interior en el plegado normal, pero que cuando se encuentran expuestos tienen posibilidad de producir interacciones hidrófobas con *otras* cadenas polipeptídicas y, como consecuencia, agregarse.

Se han descubierto varios sistemas de chaperoninas cuya variedad se considerará en el Capítulo 27, donde se describe con detalle el procesamiento que reciben las proteínas en los diferentes tipos celulares. Por ahora, consideramos, como ejemplo, la chaperonina mejor estudiada de todas, que es el complejo GroEL-ES de *E. coli*. Se ha elucidado recientemente, mediante difracción de rayos X (véase la Figura 6.26a), la estructura de este complejo enorme y singular. Consta de dos porciones básicas de las que GroEL está formado por dos anillos, cada uno de los cuales tiene siete proteínas. El centro de cada anillo es una cavidad abierta, accesible al disolvente en los extremos. Cada cavidad puede "taparse" con GroES, de nuevo un anillo de siete miembros de subunidades más pequeñas.

Básicamente, las cavidades proporcionan "refugios" en los que pueden "incubarse" las nuevas cadenas proteicas hasta plegarse adecuadamente. El complejo GroEL-ES no estipula el patrón de plegado, que es algo que hace la misma proteína, como hemos visto, pero el aislamiento del medio evita las probabilidades de agregación o un plegado inadecuado. En la Figura 6.26b se presenta, de forma esquemática, el ciclo que sufre una molécula proteica. La proteína desplegada penetra en una forma de la cavidad alineada con los residuos hidrófobos, tras lo cual la cavidad se modifica y presenta un alineamiento hidrófilo que separa a la proteína de las paredes, la pliega, y posteriormente, la libera. Obsérvese que se requiere ATP, presumiblemente para conducir el proceso en una dirección.

Sólo una fracción de las proteínas que se forman en *E. coli* (o cualquier célula) se procesa mediante las chaperoninas. Algunas son demasiado grandes para acomodarse dentro de la cavidad, mientras que otras pueden plegarse sin problemas por sus medios. Sin embargo, el descubrimiento de las chaperoninas, de nuevo, nos ha señalado lo maravillosamente complejos y sutiles que pueden ser los procesos de la vida.

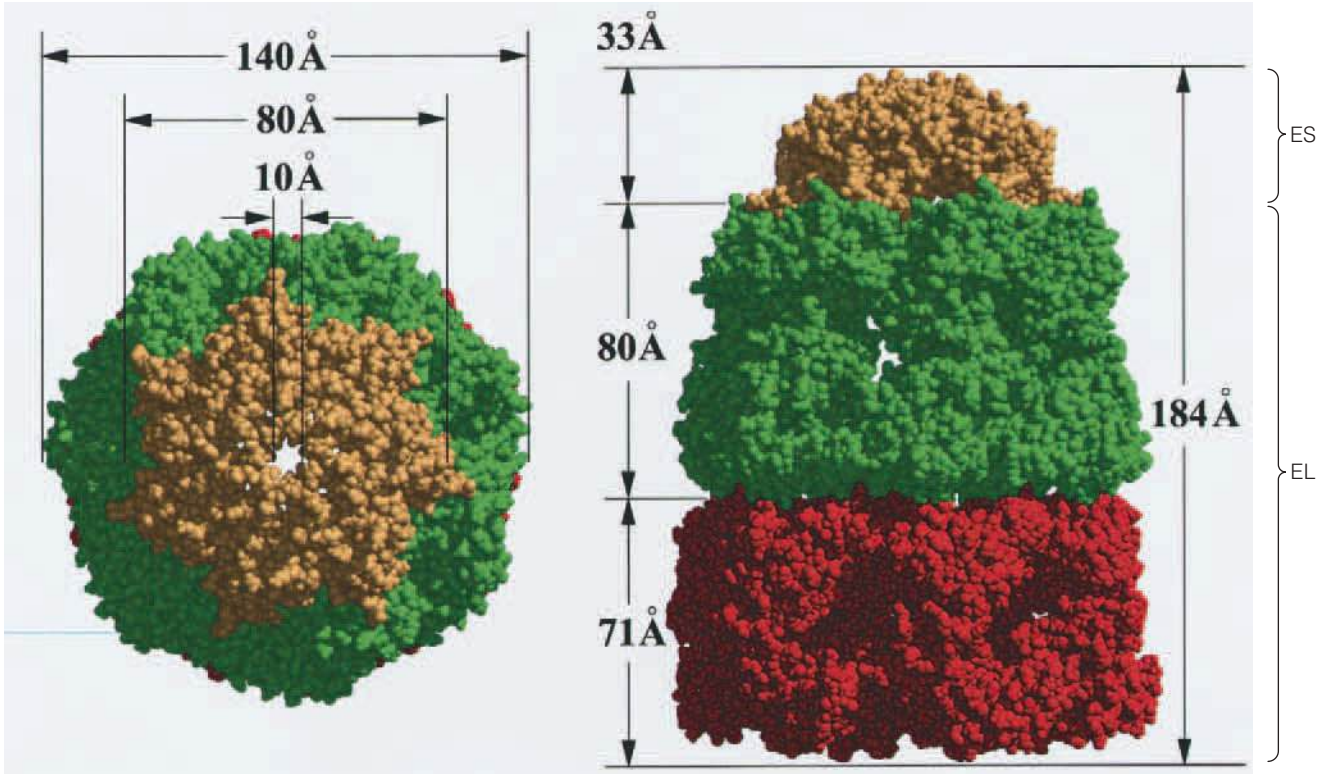


FIGURA **6.26**

La chaperonina GroEL-GroES. **(a)** Estructura de difracción de rayos X del complejo EL-ES $(ADP)_7$. **(b)** Esquema de la función: U = proteína desplegada, N = proteína nativa.

(a) Cortesía de P. B. Sigler de Z. Xu, A. L. Horwich y P. B. Sigler, *Nature* (1997) 388:741-750. © 1997 Macmillan Magazines, Ltd.; **(b)** adaptado de W. S. Netzer y F. U. Hartl, *Trends Biochem. Sci.* (1998) 23:68-73. © 1998 con permiso de Elsevier Science.

MOVIMIENTOS DENTRO DE LAS MOLÉCULAS PROTEICAS GLOBULARES

Las proteínas globulares no son estáticas sino que experimentan continuamente una gran variedad de movimientos internos.

Muchos indicios apuntan a que se producen continuamente diversos tipos de movimientos en el interior de las moléculas proteicas plegadas. Una molécula proteica sufre fluctuaciones rápidas y continuadas de su energía, como consecuencia de las interacciones con su entorno. Los movimientos resultantes pueden agruparse de forma general en varias clases, como aparece en la Tabla 6.5. Los movimientos de clase 1 se producen incluso en el interior de las moléculas proteicas cristalizadas, y explican, en parte, los límites de resolución que se ob-

TABLA 6.5 Movimiento en la moléculas proteicas

Clase	Tipo de movimiento	Margen aproximado Amplitud (nm)	Tiempo (s)
1	Vibraciones y oscilaciones de átomos y grupos individuales	0.2	10^{-15}–10^{-12}
2	Movimientos concertados de elementos, estructurales como hélices α y grupos de residuos	0.2–1	10^{-12}–10^{-8}
3	Movimientos de dominios completos, apertura y cierre de hendiduras	1–10	$\geq 10^{-8}$

tienen en los estudios de difracción de rayos X. Los movimientos mayores y más lentos de las clases 2 y 3 se producen principalmente en disolución. Algunos de ellos, como la apertura y el cierre de hendiduras en las moléculas, se cree que participan en las funciones catalíticas de las enzimas. Como veremos en capítulos posteriores, el tiempo que precisa una proteína para captar o liberar una molécula pequeña puede depender del tiempo que precisa la proteína para abrir o cerrar una hendidura. De modo similar, las "puertas" proteicas por las que las moléculas e iones pasan a través de las membranas cambian rápidamente de estados abiertos a cerrados. Parece probable que el comportamiento dinámico de las proteínas, es como mínimo, tan importante en su función como son los detalles estáticos de su estructura. Este comportamiento será un campo productivo para la investigación futura.

PRIONES: PLEGADO PROTEICO Y ENFERMEDAD DE LAS VACAS LOCAS

Hasta hace muy poco tiempo, la mayor parte de los investigadores creían que las únicas vías por las que podían transmitirse las enfermedades de un organismo a otro eran a través de los virus o los microorganismos. Después de todo, el DNA y el RNA son los portadores de la información. Sin embargo, en la actualidad hay pruebas de la existencia de una clase de enfermedades que se transmiten por una proteína y nada más. Entre estas enfermedades, la más conocida es la *encefalopatía espongiforme bovina* o "enfermedad de las vacas locas", aunque también están incluidas la *tembladera* de las ovejas y determinadas neuropatologías en el ser humano. El agente infeccioso se ha denominado *prión*, y la proteína que se cree responsable se denomina *proteína relacionada con el prión*, o *PrP*. La PrP se encuentra presente normalmente en muchos animales (incluidos los seres humanos) en una forma no patológica denominada PrP^{c} (*proteína celular relacionada con el prión*). En la Figura 6.27 se muestra la conformación de esta proteína en esta forma; pero, en determinadas circunstancias, aún no conocidas al completo, PrP^{c} puede cambiar de conformación a una estructura diferente, denominada PrP^{sc}, o *proteína de la tembladera relacionada con el prión*. En esta forma en la que aparece plegada, al menos parcialmente, en una lámina β la porción N-terminal desordenada, destruye el sistema nervioso. Aún más extraordinario es el hecho de que la ingestión de PrP^{sc} puede inducir la conversión de PrP^{c} en PrP^{sc} en el receptor, transmitiendo, de esta forma, la enfermedad. Se desconoce cómo se cataliza esta conversión, pero parece ser que PrP^{c} representa una forma de plegado "fuera de la ruta" especialmente estable del tipo señalado en el apartado anterior. Stanley Prusiner ganó en 1997 el Premio Nobel de Fisiología o Medicina como reconocimiento a la relación de la PrP con estas enfermedades.

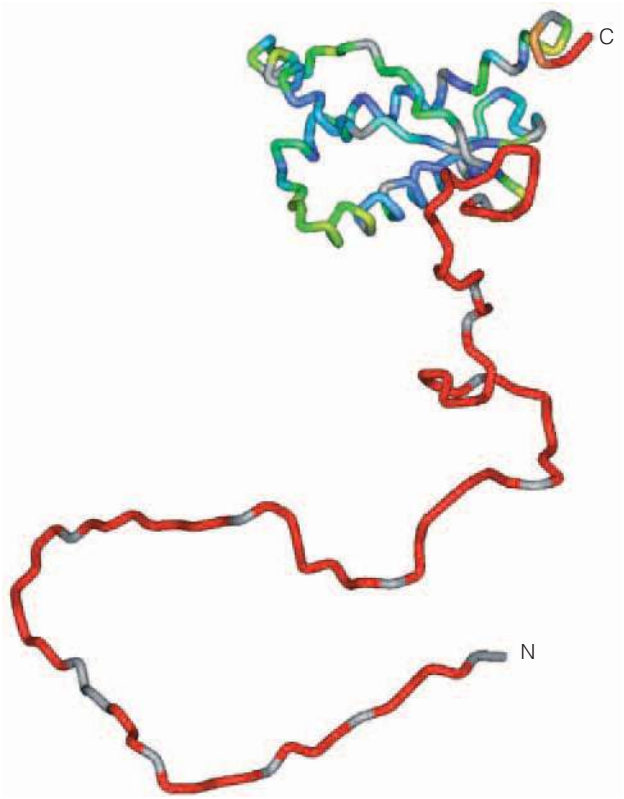


FIGURA **6.27**

la proteína prión. Este modelo dibuja los resultados de la RMN de la estructura de la mayoría de las PrP^{c}. La región globular de hélice α se encuentra en el C-terminal. La mayor parte de la región N-terminal parece ser un ovillo aleatorio desordenado. Se cree que es esta porción de la molécula la que se pliega para dar la lámina β aumentada que se observa en la PrP^{sc}.

Cortesía de D. G. Donne, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1997) 94:13452-13457. Con permiso de PNAS.

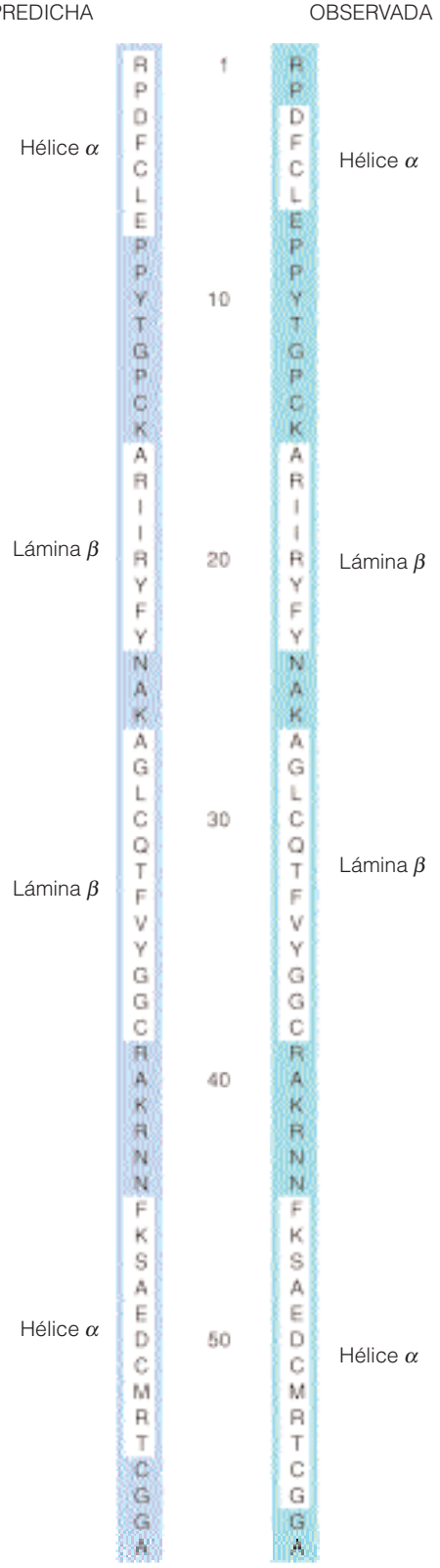
Predicción de las estructuras proteicas secundaria y terciaria

Actualmente la estructura secundaria de una proteína puede predecirse con una moderada exactitud. La estructura terciaria, más compleja, aún no puede predecirse.

¿Puede predecirse la estructura proteica? En cierto sentido, la respuesta a esta pregunta debe ser ciertamente afirmativa. Sabemos que la información molecular necesaria para determinar las estructuras secundaria y terciaria está incluida en la propia secuencia de aminoácidos; en consecuencia, el gen "predice" la estructura. Lo que implica este hecho es que si comprendiéramos totalmente las reglas del plegado, podríamos describir la conformación tridimensional completa de cualquier proteína, partiendo únicamente del conocimiento de su secuencia. Este tipo de predicción aún no puede hacerse totalmente. Podemos predecir bastante bien la estructura secundaria, pero la predicción del plegado terciario es un problema mucho más complicado y sólo se ha progresado algo recientemente.

PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA

Aunque son varios los enfoques utilizados para abordar el problema de predecir la estructura secundaria, el método más satisfactorio es totalmente empírico. A partir del análisis de las estructuras *conocidas* de algunas proteínas, se han compilado tablas que indican la frecuencia relativa (P_α, P_β, P_t) con la que un tipo concreto de residuo de aminoácido se encuentra en hélices α, láminas β o giros. En la Tabla 6.6 se da un ejemplo. A partir de estos datos, pueden realizarse algunas distinciones claras. Por ejemplo, Leu, Met y Glu son todos potentes formadores de hélices; Gly y Pro no favorecen las hélices. De modo similar, Ile, Val y Phe son potentes formadores de láminas β, mientras que Pro no encaja bien en ellas. Gly se halla con frecuencia en los giros β, mientras que no sucede así con Val. Ya hemos mencionado que Pro tiende a encontrarse en los gi-



ros. No está tan claro el motivo de que los otros residuos se encuentren generalmente en una u otra estructura.

Se han propuesto distintas reglas que usan los valores de *P* para predecir estructuras; en la Tabla 6.6 se indican las desarrolladas por P. Y. Chou y G. D. Fasman. Las estructuras predichas aplicando estas reglas suelen concordar bastante bien, aunque nunca exactamente, con las estructuras secundarias determinadas experimentalmente mediante difracción de rayos X (Figura 6.28). Las diferencias más frecuentes se hallan en la definición de la localización precisa de los extremos de las regiones α y β.

TABLA 6.6 Correspondencia de residuos de aminoácidos con estructuras secundarias proteicas

A. Probabilidades relativas de aparición de residuos de aminoácidos en distintas estructuras secundarias de proteínas globulares[a]

Aminoácido	Hélice α (P_α)	Lámina β (P_β)	Giro (P_t)	
Ala	1.29	0.90	0.78	Favorecen hélices α
Cys	1.11	0.74	0.80	
Leu	1.30	1.02	0.59	
Met	1.47	0.97	0.39	
Glu	1.44	0.75	1.00	
Gln	1.27	0.80	0.97	
His	1.22	1.08	0.69	
Lys	1.23	0.77	0.96	
Val	0.91	1.49	0.47	Favorecen láminas β
Ile	0.97	1.45	0.51	
Phe	1.07	1.32	0.58	
Tyr	0.72	1.25	1.05	
Trp	0.99	1.14	0.75	
Thr	0.82	1.21	1.03	
Gly	0.56	0.92	1.64	Favorecen giros
Ser	0.82	0.95	1.33	
Asp	1.04	0.72	1.41	
Asn	0.90	0.76	1.23	
Pro	0.52	0.64	1.91	
Arg	0.96	0.99	0.88	

B. Reglas de Chou-Fasman para la predicción[b]

1. Cualquier segmento de seis residuos o más, con $\langle P_\alpha \rangle \geq 1.03$, así como $\langle P_\alpha \rangle > \langle P_\beta \rangle$, y que no incluya Pro, se predice que será una hélice α.
2. Cualquier segmento de cinco residuos o más, con $\langle P_\beta \rangle \geq 1.05$, y $\langle P_\beta \rangle > \langle P_\alpha \rangle$, se predice que será una lámina β.
3. Examinar la secuencia para identificar tetrapéptidos con $\langle P_\alpha \rangle < 0.9$, $\langle P_t \rangle > \langle P_\beta \rangle$. Tienen una buena oportunidad de ser vueltas. Las reglas reales para predecir giros β son más complejas, pero este método funciona en la mayoría de los casos.

[a]Datos adaptados de M. Levitt, *Biochemistry* (1978) 17:4277-4285.

[b]Adaptado con permiso de P. Y. Chou y G. D. Fasman, *Biochemistry* (1974) 13:222-245. © 1974 American Chemical Society. Los símbolos $\langle P_\alpha \rangle$, $\langle P_\beta \rangle$ y $\langle P_t \rangle$ denotan valores *medios* de estas cantidades en una región de la secuencia.

FIGURA **6.28**

Predicción de la estructura secundaria del BPTI. La secuencia de la izquierda muestra los elementos estructurales secundarios predichos por P. Y. Chou y G. D. Fasman para el inhibidor de la tripsina pancreática bovina. La secuencia de la derecha muestra los resultados de los estudios de difracción de rayos X de la misma proteína. La coincidencia excepcionalmente buena entre la estructura predicha y la observada es ligeramente mejor para el BPTI que para la mayoría de las proteínas.

ESTRUCTURA TERCIARIA: SIMULACIÓN POR ORDENADOR DEL PLEGADO

Los intentos de predecir la estructura terciaria se han revelado mucho más difíciles, debido probablemente a que el plegado de orden superior depende de manera crucial de las interacciones de las cadenas laterales específicas, a menudo entre residuos muy apartados unos de otros en la secuencia. Sin embargo, el reconocimiento reciente de patrones globales del plegado terciario ha permitido obtener algunos éxitos. Así, por ejemplo, se han utilizado predicciones de la estructura secundaria para predecir una estructura de cilindro α/β para la enzima triptófano sintasa que concuerda de modo excelente con el resultado obtenido con rayos X.

En unos pocos casos, se han realizado intentos de predecir las estructuras tridimensionales globales de pequeñas proteínas globulares de un modo más directo. El método se basa en el hecho de que, en su plegado espontáneo, las proteínas buscan un mínimo de energía libre. Se permite que una cadena de ovillo aleatorio, en simulación por ordenador, experimente un número muy elevado de pequeñas permutaciones de su conformación, mediante la rotación alrededor de los enlaces individuales. El programa de ordenador rastrea la energía total, en cuanto a posibles interacciones, y busca un mínimo de energía. Si se intenta buscar simplemente al azar entre las conformaciones posibles, la tarea es imposible, ya que en esencia nos enfrentamos con el problema de Levinthal (véase la página 209). De alguna forma, la búsqueda del mínimo debe ser más directa. Recientemente, varios investigadores han desarrollado algoritmos mucho más eficaces, que fraccionan el proceso de plegado en pasos razonables. Un ejemplo es el programa LINUS (Local Independently Nucleated Units of Structure; Unidades de la estructura nucleadas independientemente de forma local) (véase Srinivasan y Rose en la Bibliografía). LINUS encuentra, en primer lugar, las regiones donde hay mayor probabilidad de presentar una estructura secundaria determinada y luego interroga cómo pueden plegarse juntas para hacer mínima la energía. Ésta es la forma como se cree se pliegan las proteínas reales, por lo que no es sorprendente que LINUS haya hecho varias predicciones acertadas. Este planteamiento está aún en una fase inicial, pero permite albergar esperanzas de que finalmente podamos predecir no sólo los patrones de plegado de las proteínas, sino también las rutas que conducen a las estructuras finales. Un planteamiento bastante distinto procede del reconocimiento creciente de que se ha conservado a lo largo de la evolución el plegado de determinados tipos de dominios. Si se pueden detectar mediante la secuencia, se pueden tener unos buenos indicios iniciales de cómo deberían plegarse.

Estructura cuaternaria de las proteínas

En el Capítulo 5 y en este capítulo, hemos explorado niveles cada vez más complejos de la estructura proteica, desde la primaria hasta la terciaria, pasando por la secundaria (Figura 6.29a-c). La organización proteica funcional puede alcanzar como mínimo un nivel más: la **estructura cuaternaria** (Figura 6.29d). Existen muchas proteínas dentro de la célula (y en disolución, en condiciones fisiológicas), que forman agregados específicos de dos o más cadenas polipeptídicas plegadas, o *subunidades*. Los métodos para determinar si una proteína está compuesta o no de múltiples subunidades se describen en Herramientas de la Bioquímica 6B. Esta organización cuaternaria puede ser de dos tipos: asociación entre cadenas polipeptídicas idénticas o casi idénticas (**homotípicas**), o interacciones entre subunidades con estructuras muy distintas (**heterotípicas**). En ambos casos se forman *proteínas con múltiples subunidades*.

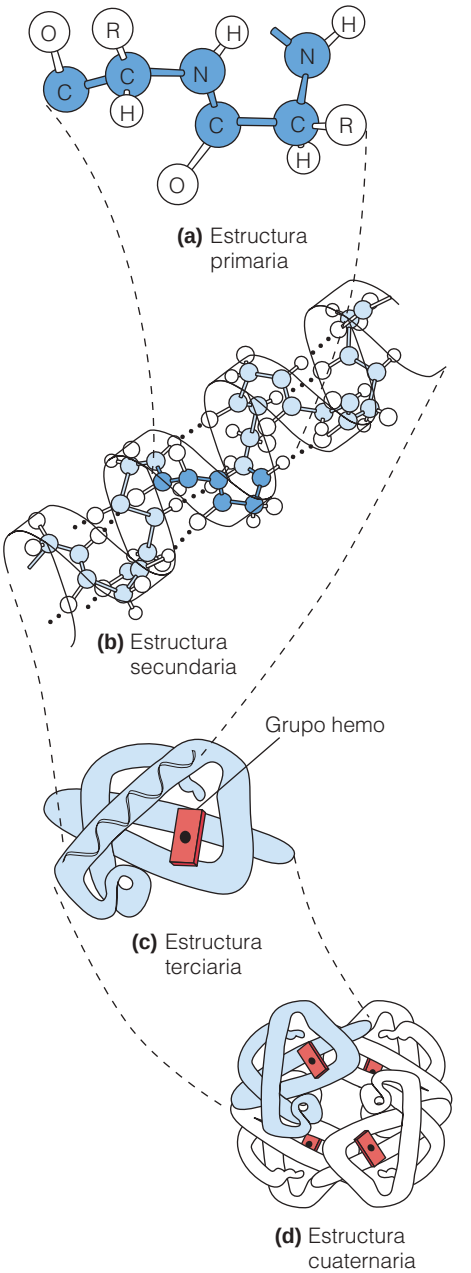


FIGURA **6.29**

Los cuatro niveles de estructura proteica. Este resumen de los niveles estructurales de las proteínas utiliza como ejemplo la molécula de hemoglobina, un tetrámero de cadenas parecidas a la mioglobina.

(a, b) Tomado de W. M. Becker, L. J. Kleinsmith y J. Hardin, *The World of the Cell*, 4ª ed. (San Francisco, CA: Addison Wesley Longman, 2000). © Addison Wesley Longman, Inc.; **(c, d)** © Irving Geis.

PROTEÍNAS CON MÚLTIPLES SUBUNIDADES: INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA HOMOTÍPICAS

Las interacciones entre las cadenas polipeptídicas plegadas en las proteínas con múltiples subunidades son de los mismos tipos que las que estabilizan la estructura terciaria: puentes salinos, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrófobas y, en ocasiones, enlaces disulfuro. Estas interacciones proporcionan la energía necesaria para estabilizar la estructura de múltiples subunidades.

Cada cadena polipeptídica es una unidad asimétrica en el agregado, pero la estructura cuaternaria global puede exhibir una amplia variedad de simetrías, en función de la geometría de las interacciones. Con fines ilustrativos, utilizaremos un objeto asimétrico familiar para todo el mundo: un zapato del pie derecho. Pensemos en este zapato como una cadena polipeptídica plegada en una forma tridimensional compacta. Podemos juntar zapatos de muchas maneras. Si las superficies que interactúan (A y B) fuesen las del talón y los dedos, podría formarse un agregado lineal:



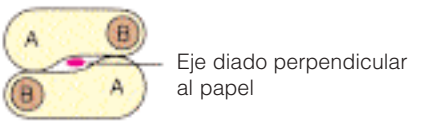
Dado que los dos grupos que interactúan se encuentran en zonas totalmente distintas de la subunidad, a esta interacción la denominaremos **heteróloga**. Las interacciones heterólogas deben estar especialmente orientadas para dar un agregado realmente lineal. Con mayor frecuencia, la interacción es tal que cada unidad está torcida con algún ángulo respecto a la precedente. Esta torcedura da lugar a una estructura helicoidal. La Figura 6.30a presenta una disposición de zapatos que forman una hélice a derechas con n unidades por vuelta. La parte superior de los dedos de cada zapato está fijada a la suela de los dedos del siguiente, con una rotación de $360/n$ grados. En la Figura 6.31 se presentan dos ejemplos biológicos, ambos de **simetría helicoidal**: la hélice de la proteína muscular actina y la cubierta helicoidal del virus del mosaico del tabaco. Obsérvese que tanto las disposiciones lineales como las helicoidales pueden tener un crecimiento indefinido mediante la adición de más subunidades. Los filamentos de actina pueden tener millares de unidades de longitud.

La asociación de cadenas polipeptídicas para formar estructuras específicas de múltiples subunidades es el nivel cuaternario de organización proteica.

La mayoría de los ensamblajes de las subunidades proteicas no se basan en la simetría helicoidal sino en una de las clases de **simetría punto-grupo** (Figura 6.30b-g), con un número definido de subunidades dispuestas alrededor de uno o varios **ejes de simetría**. Un eje de simetría n-ario corresponde a la rotación de cada subunidad $360/n$ grados respecto a su vecina; en consecuencia, un eje binario corresponde a una rotación de 180°. Los tipos más simples de simetría punto-grupo son las simetrías cíclicas C_n, que aparecen en la Figura 6.30b-d. Estos anillos de subunidades comportan interacciones heterólogas donde $n = 3$ o superior.

Dos clases generales de simetría caracterizan la mayoría de las estructuras cuaternarias: la helicoidal y la punto-grupo.

Una situación especial de gran importancia surge cuando dos subunidades se relacionan una con la otra mediante un eje binario (también llamado eje **diado**) para dar una simetría C_2. Es decir, cada subunidad está rotada 180° alrededor de este eje con respecto a la otra:



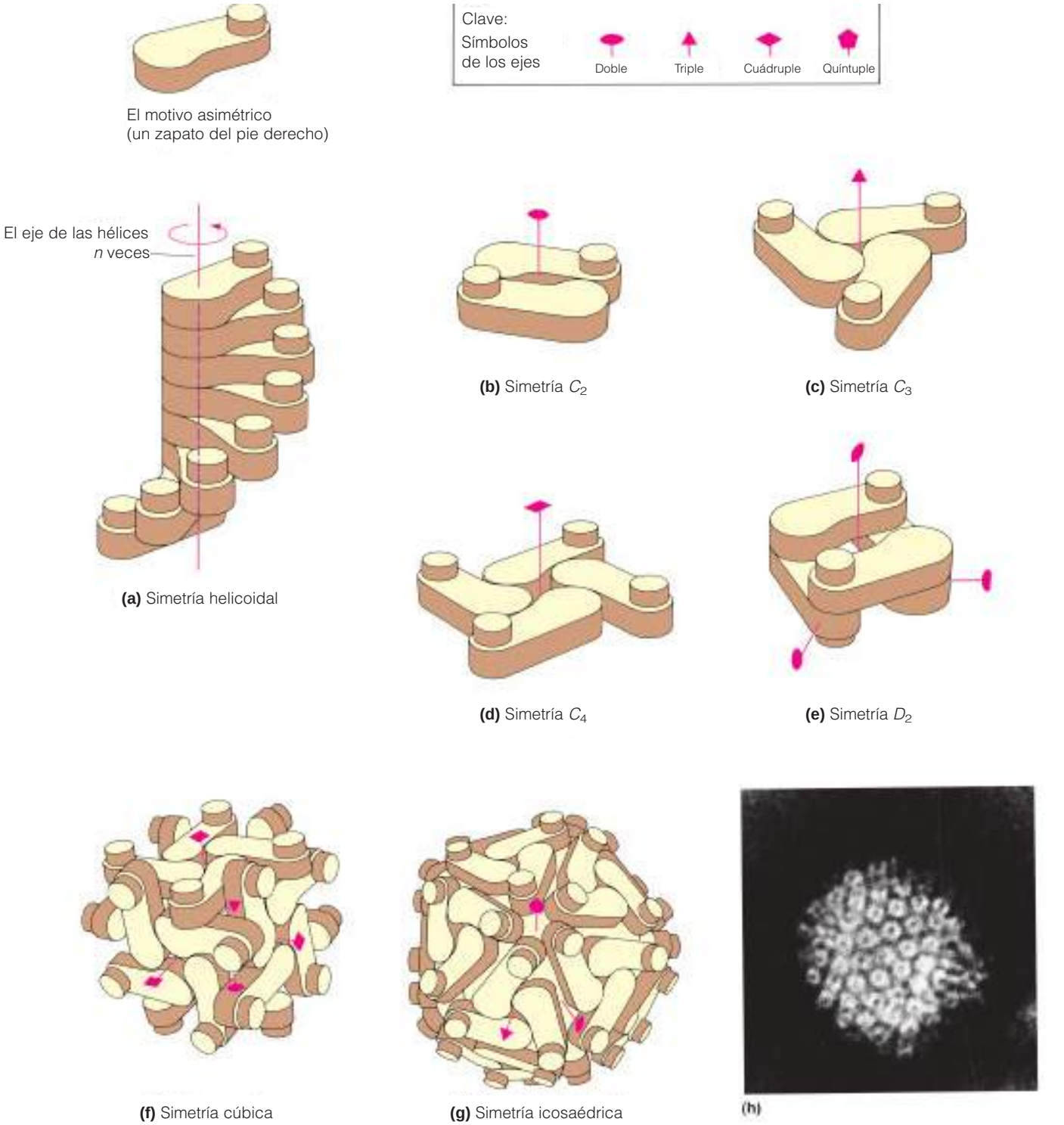


FIGURA **6.30**

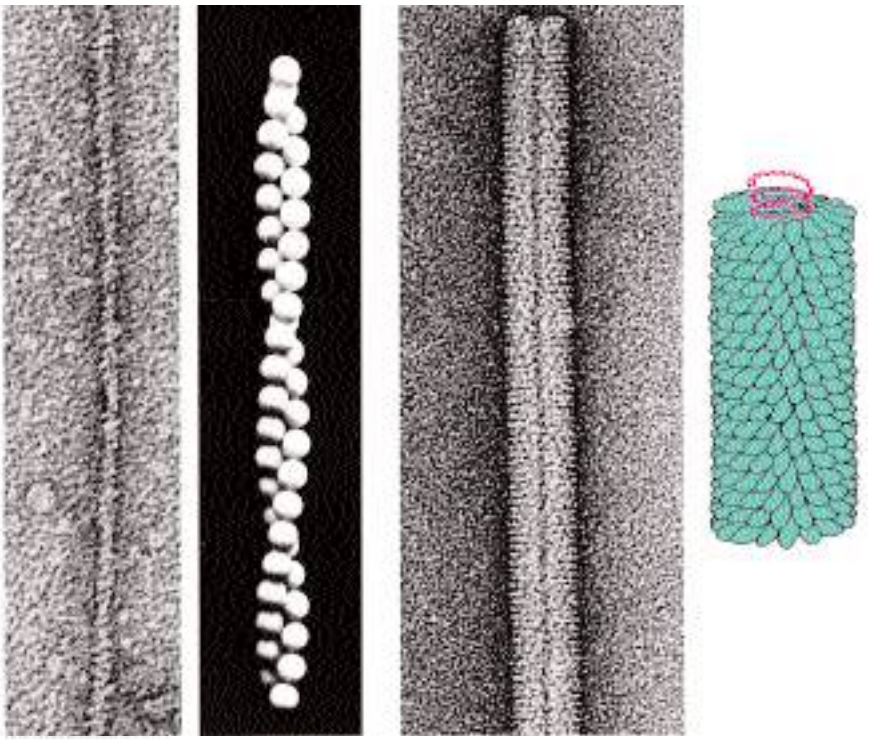
Simetrías de las estructuras cuaternarias de las proteínas. Aunque se componen de polipéptidos asimétricos, las proteínas adoptan muchos patrones simétricos al formar las estructuras cuaternarias. En esta figura, un zapato del pie derecho representa la unidad estructural asimétrica. **(a)** Hélice formada por la rotación de cada unidad 360/*n* grados respecto a la precedente. Esta rotación produce una hélice de *n* unidades por vuelta de longitud indefinida. **(b)** Dímero con simetría C_2: un eje binario. **(c)** Trímero con simetría C_3: un eje ternario. **(d)** Tetrámero con simetría C_4: un eje cuaternario. **(e)** Tetrámero con simetría D_2: tres ejes binarios. **(f)** 24-mero con simetría cubica. Esta estructura tiene ejes binarios, ternarios y cuaternarios. **(g)** 60-mero icosaédrico, tipo de estructura que se halla en la cubierta proteica de algunos virus. Esta estructura tiene ejes quíntuples, ternarios y binarios. **(h)** Fotografía de microscopia electrónica de un virus del herpes con simetría icosaédrica.

(h) Cortesía de B. Roizman, Universidad de Chicago/BPS.

FIGURA **6.31**

Dos proteínas helicoidales. Al lado de cada fotografía de microscopia electrónica se muestra una representación esquemática de la estructura agregada helicoidal. **(a)** Actina. **(b)** Virus del mosaico del tabaco. En el virus, las subunidades proteicas forman una disposición helicoidal alrededor de un RNA enrollado helicoidalmente (rojo).

(a) Cortesía de T. Pollard, reproducido de *J. Cell Biol.* (1981) 91:156, con permiso de © Rockefeller University Press; **(b)** cortesía de R. C. Williams, Universidad de California, Berkeley.



(a) Actina **(b)** Virus del mosaico del tabaco

(En la Figura 6.30b se presenta esta disposición en tres dimensiones.) Imaginemos que existen grupos que interactúan en A y B. Por ejemplo, A podría ser un donador de enlaces de hidrógeno y B un aceptor. Obsérvese que, en este caso, la simetría binaria significa que se producen *dos* interacciones idénticas, colocadas simétricamente alrededor del eje diado. Esta interacción simétrica se denomina **isóloga**, a diferencia de la interacción heteróloga asimétrica. Las interacciones isólogas se hallarán siempre que estén presentes ejes binarios. Los dímeros son las estructuras cuaternarias más comunes, y casi siempre están enlazadas de este modo. En la Figura 6.32 se presenta un ejemplo. Más interacciones isólogas pueden dar lugar fácilmente a estructuras cuaternarias más complejas de simetría más elevada. Un ejemplo es la simetría **diédrica** (Figura 6.30e), la estructura más común de las proteínas tetraméricas. Presenta tres ejes binarios perpendiculares y, por consiguiente, implica tres pares de interacciones isólogas. De hecho, cualquier simetría D_n puede generarse únicamente mediante interacciones isólogas.

Existen otras simetrías punto-grupo más complejas en algunas estructuras cuaternarias proteicas, de las que se presentan ejemplos en la Figura 6.30f y g. Obsérvese que las estructuras más complejas incluyen ejes binarios y ejes con $n > 2$. Estas moléculas presentan interacciones isólogas y heterólogas. Lo más importante es que las moléculas que presentan cualquiera de estas simetrías punto-grupo siempre están limitadas a un número definido de subunidades. La mayoría de las proteínas con múltiples subunidades presentan este tipo de geometría de asociación, en vez de la agregación lineal o helicoidal que puede conducir a un crecimiento indefinido. Éste es el motivo por el que la mayoría de las moléculas proteicas, aunque contengan múltiples subunidades, presentan una forma, tamaño y masa bien definidos.

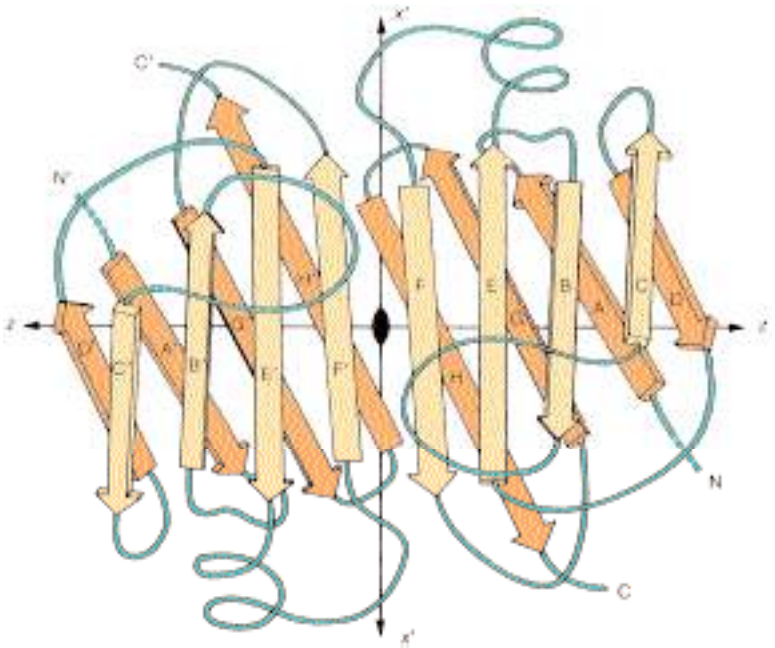


FIGURA **6.32**

Dímero de prealbúmina. En el dímero de prealbúmina, que también se presenta en la Figura 6.16b, los dos monómeros se combinan para formar un sándwich β completo o un cilindro β aplastado. El dímero presenta una simetría binaria alrededor de un eje perpendicular al papel. Las interacciones isólogas son principalmente enlaces de hidrógeno entre cadenas de láminas β específicas: de F a F′ y de H a H′. La prealbúmina también puede formar un tetrámero a partir de dos de estos dímeros mediante un segundo conjunto de interacciones isólogas.

C. C. F. Blake et al., *J. Mol. Biol.* (1974) 88:1-12. © 1974 Academic Press.

Deben señalarse dos excepciones a esta sencilla caracterización de las posibles estructuras. La primera, que a pesar de que la mayoría de los dímeros tienen una simetría binaria y una unión isóloga, es posible construir dímeros en los que la unión sea heteróloga mientras que la asociación indefinida está aún bloqueada estéricamente. Estos dímeros no presentan simetría binaria (Figura 6.33). Aparece una segunda complicación siempre que se incorpora a una estructura específica de múltiples subunidades más de un tipo de cadena polipeptídica. En estos casos, la simetría se reduce del nivel que cabría esperar del número total de cadenas polipeptídicas, porque dos o más cadenas distintas formarán ahora una unidad asimétrica. En el Capítulo 7 analizaremos un ejemplo de este tipo, la *hemoglobina*.

Obsérvese que cada nivel de estructura proteica se construye sobre los niveles inferiores, tal como se resume en la Figura 6.29. La estructura terciaria puede considerarse como un plegado de elementos de estructura secundaria, y la estructura cuaternaria se establece combinando subunidades plegadas. *Toda* esta estructuración de alto nivel está dictada por la estructura primaria y en último término por el gen. El conocimiento de la estructura proteica es una de las ideas más importantes de la biología molecular.

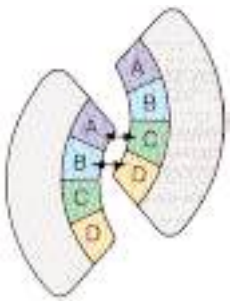


FIGURA **6.33**

Dímero sin simetría. Este dibujo esquemático presenta cómo pueden asociarse dos subunidades mediante interacciones heterólogas y, sin embargo, no producir una cadena indefinida. Los lugares de interacción (A, B, C, D) están bloqueados para reaccionar con más monómeros por el encaje ajustado de las superficies.

INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA HETEROTÍPICAS

La sección anterior se ha centrado en la asociación de subunidades proteicas idénticas o casi idénticas. Sin embargo, la gama de interacciones proteína-proteína es mucho más amplia, pues son comunes las asociaciones específicas entre moléculas proteicas totalmente distintas. En ocasiones, estas asociaciones conducen a estructuras organizadas que contienen una docena o más de subunidades distintas.

Las interacciones que forman estos ensamblajes son del mismo tipo que las que describimos previamente, es decir, fuerzas no covalentes en las superficies

Todos los niveles superiores de estructura de una proteína están dictados por sus genes.

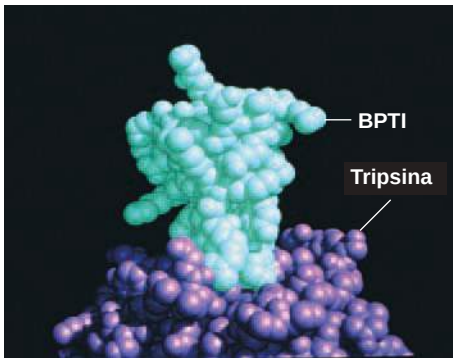


FIGURA **6.34**

Interacción del BPTI con la tripsina. La molécula de BPTI (parte superior) se ajusta perfectamente a la superficie de la molécula de tripsina (parte inferior), bloqueando el lugar activo de la misma. Esta figura es de una simulación de "acoplamiento" por ordenador, que se parece mucho (difiere en menos de 0.05 nm) a la estructura del complejo por rayos X.

Cortesía de B. K. Soichet e I. D. Kuntz, *J. Mol. Biol.* (1991) 221:327-346. © 1991 Academic Press.

proteicas complementarias. Un ejemplo sencillo es el de una proteína que hemos descrito detalladamente en este capítulo, el BPTI. El inhibidor de la tripsina pancreática bovina recibe este nombre porque forma un complejo fuerte y específico con la enzima tripsina, inhibiendo de este modo la actividad proteolítica de la tripsina en el páncreas. La Figura 6.34, una simulación por ordenador de esta interacción, muestra que las dos superficies proteicas encajan perfectamente una con otra. El "acoplamiento" de una proteína con otra que predice el modelo de ordenador se parece mucho a la estructura real del complejo determinada mediante difracción de rayos X. La exactitud de la predicción sugiere que puede ser más fácil predecir algunos aspectos de la estructura cuaternaria que la estructura terciaria.

RESUMEN

Las moléculas proteicas se organizan de manera característica en distintos niveles. El primer nivel, o nivel primario, es la secuencia de aminoácidos, dictada por el gen. Esta secuencia, a su vez, determina el plegado local (estructura secundaria), el plegado global (estructura terciaria) y la organización en estructuras de múltiples subunidades (estructura cuaternaria).

De las muchas estructuras secundarias concebibles, sólo son posibles estéricamente y pueden estabilizarse mediante enlaces de hidrógeno un pequeño número. Entre ellas se encuentran la hélice α, la lámina β y la hélice 3_{10}. También existen estructuras específicas que permiten que una cadena polipeptídica realice giros bruscos. Los diagramas de Ramachandran proporcionan un medio para visualizar las posibilidades.

Las proteínas pueden agruparse en dos grandes categorías: fibrosas y globulares. Las proteínas fibrosas son alargadas, habitualmente de estructura secundaria regular, y desempeñan funciones estructurales en la célula y el organismo. Son ejemplos importantes las queratinas (hélice α), las fibroínas (lámina β), el colágeno (triple hélice) y la elastina (ovillos aleatorios con enlaces cruzados). Las proteínas globulares presentan estructuras terciarias más complejas y se pliegan en formas compactas que suelen contener dominios definidos. Se han identificado diversas clases de plegados terciarios, como los haces de hélices α, las láminas β enrolladas y los cilindros β.

Diversos factores determinan la estabilidad de las proteínas globulares: la entropía conformacional, la entalpía debida a los enlaces no covalentes internos, el efecto hidrófobo y los enlaces disulfuro. El plegado de muchas proteínas globulares se produce espontánea y rápidamente en condiciones "nativas". En la célula, las proteínas denominadas chaperoninas ayudan a impedir la formación de estructuras incorrectas o interacciones no deseadas. Incluso cuando están plegadas, las proteínas globulares son estructuras dinámicas que experimentan diversos tipos de movimientos internos. Actualmente se puede predecir la estructura secundaria proteica con un cierto grado de exactitud, pero la predicción de la estructura terciaria es mucho más difícil.

Muchas proteínas globulares (tal vez la mayoría) existen y funcionan como ensamblajes de múltiples subunidades que forman un nivel de estructura cuaternario. Algunas de estas proteínas son estructuras alargadas con simetría helicoidal; la mayoría tienen un pequeño número de subunidades (frecuentemente 2, 4 ó 6) y presentan simetría punto-grupo. Todos estos niveles de estructura proteica están determinados por la secuencia del gen.

BIBLIOGRAFÍA

General

Branden, C. y J. Tooze (1991) *Introduction to Protein Structure.* Garland, Nueva York. Una introducción sobre los principios estructurales muy bien ilustrada.

Creighton, T. E. (1993) *Proteins: Structures and Molecular Properties,* 2ª ed. Freeman, San Francisco. Un tratamiento fiable y detallado de la estructura y la función proteica.

Kyte, J. (1995) *Structure in Protein Chemistry.* Garland, Nueva York. Se complementa muy bien con la 2ª edición de Creighton; resalta principalmente la estructura y los métodos.

Oxender, D. L. y C. F. Fox (1987) *Protein Engineering.* Alan R. Liss, Nueva York. Una excelente recopilación de artículos actuales sobre el diseño y la modificación de las proteínas.

Histórica

Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181:223-230. Describe algunos de los experimentos iniciales importantes que pusieron de manifiesto la espontaneidad del plegado.

Pauling, L., R. B. Corey y H. R. Branson (1951) The structure of proteins: Two hydrogen bonded helical conformations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37:205-211. La primera descripción de la hélice α.

Ramachandran, G. N. y V. Sassiekharan (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* 28:283-437. Introducción a las representaciones de Ramachandran.

Proteínas fibrosas

Fuchs, E. y P. A. Coulombe (1992) Of mice and men: Genetic skin diseases of keratin. *Cell* 69:899-902.

Kaplan, D., W. W. Adams, B. Farmer y C. Viney (1994) *Silk Polypeptides.* American Chemical Society Press, Nueva York.

Piez, K. A. y A. H. Reddi (1984) *Extracellular Matrix Biochemistry.* Elsevier Science Publishing, Nueva York.

vanderRest, M. y P. Bruckner (1993) Collagens: Diversity at the molecular and supramolecular levels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:430-436.

Proteínas globulares: estructura secundaria y terciaria

Matthews, B. W. (1987) Structural basis of protein stability and DNA-protein interactions. En: *The Harvey Lectures,* ser. 81, pp. 33-51. Alan R. Liss, Nueva York. Describe el empleo de la mutagénesis para analizar la estabilidad de las proteínas.

Richardson, J. S. (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* 34:167-339. Un análisis de importancia crucial, en el que se introduce el concepto de los motivos estructurales.

Rose, G. (1979) Hierarchic organization of domains in globular proteins. *J. Mol. Biol.* 134:447-470. Un artículo importante sobre nuestro conocimiento de la organización de las proteínas.

Wetzel, R. (1988) Harnessing disulfide bonds using protein engineering. *Trends Biochem. Sci.* 12:478-482. Un breve comentario sobre la importancia de los enlaces —S—S— en la función y la estabilidad de las proteínas.

Plegado de las proteínas

Baldwin, R. L. y G. Rose (1999) Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. *Trends Biochem. Sci.* 24:26-33. Este artículo y el siguiente proporcionan una visión crítica actual del estado del problema del plegado.

Baldwin, R. L. y G. Rose (1999) Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states. *Trends Biochem. Sci.* 24:77-83.

Dill, K. A. y H. S. Chan (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nature Struct. Biol.* 4:10-19. Un tratamiento muy claro e interesante de la "paradoja de Levinthal" y su resolución.

Gierasch, L. M. y J. King (1990) *Protein Folding.* American Association for Advancement of Science, Washington, D.C. Una excelente recopilación de artículos sobre muchos aspectos del problema del plegado de las proteínas.

Goldenberg, D. P. (1992) Native and non-native intermediates in the BPTI folding pathway. *Trends Biochem. Sci.* 17:257-261.

Kim, P. S. y Baldwin, R. L. (1980) Structural intermediates trapped during the folding of ribonuclease A by amide exchange. *Biochemistry* 19:6124-6129.

Chaperoninas

Braig, K., Z. Otwinowski, R. Hedge, D. C. Boisvert, A. Joachimiak, A. L. Horwich y P. B. Sigler (1994) The crystal structure of the bacterial chaperonin GnoEL at 2.8 Å. *Nature* 371:578-586.

Georgopoulos, C. (1992) The emergence of the chaperone machine. *Trends Biochem. Sci.* 17:295-299.

Xu, Z., A. L. Horwich y P. B. Sigler (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-$(ADP)_7$ chaperonin complex. *Nature* 388:741-750.

Predicción de la estructura proteica

Chou, P. Y. y G. D. Fasman (1978) Empirical predictions of protein structure. *Annu. Rev. Biochem.* 47:251-276.

Kabsch, W. y C. Sander (1983) How good are predictions of protein secondary structure? *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 155:179-182.

Srinivasan, R. y G. Rose (1995) *Proteins Struct. Funct. Genet.* 22:81-99.

Dinámica de las proteínas

Karplus, M. y J. A. McCannon (1986) The dynamics of proteins. *Sci. Am.* 254(4):42-51. Una introducción excelente y de fácil lectura.

Ringe, D. y G. R. Petsko (1985) Mapping protein dynamics by x-ray diffraction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 45:197-235.

Priones

Pan, K.-M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, F. E. Cohen y S. B. Prusiner (1993) Conversion of α-helices into β-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10962-10966.

Prusiner, S. B. (1997) Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 278:245-251. Una visión excelente de los priones y sus efectos patológicos.

Estructura cuaternaria

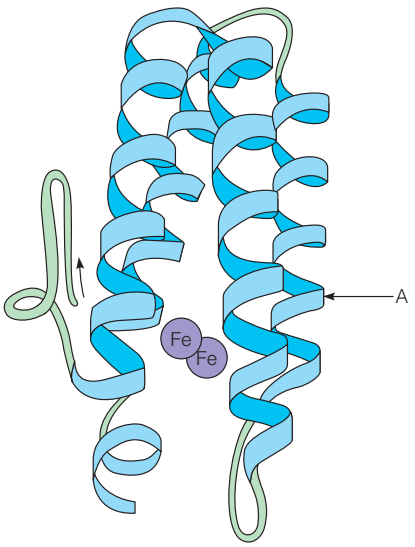
Caspar, D. L. P. y A. Klug (1962) Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27:1-24. Un artículo clásico sobre la simetría.

Klotz, I. M., N. R. Langerman y D. W. Darnall (1970) Quaternary structure of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 39:25-62. Una buena visión global de las estructuras y los enlaces.

Matthews, B. W. y S. A. Bernhard (1973) Structure and symmetry of oligomeric enzymes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 2:257-317.

PROBLEMAS

1. La poliglicina, un polipéptido simple, puede formar una hélice con ϕ = -80°, ψ = +150°. A partir de la representación de Ramachandran (véase la Figura 6.8), describa esta hélice en cuanto a (a) su lateralidad y (b) su número de residuos por vuelta.
2. Algunas secuencias polipeptídicas que muestran una tendencia pronunciada a dimerizar en una estructura de ovillo enrollado antiparalela presentan una repetición exacta de leucina cada 7 residuos. Si también se sabe que la hélice α está ligeramente distorsionada respecto a sus habituales 3.6 residuos/vuelta en los ovillos enrollados, proponga un mecanismo para la dimerización. ¿Qué valor sugiere que podría tener la cifra de residuos/vuelta en un ovillo enrollado?
3. Se presenta a continuación una estructura esquemática de la subunidad de la hemeritrina (una proteína que une oxígeno presente en los animales invertebrados).
   (a) Se ha observado que en algunas de las áreas de hélice α de la hemeritrina, aproximadamente cada tres o cuatro residuos de aminoácido hay uno hidrófobo. Sugiera un motivo estructural para esta observación.
   (b) ¿Cuál sería el efecto de una mutación que colocase un residuo de prolina en el punto A de la estructura?
   *(c) Esbozar un mecanismo razonable (esto es, una serie de pasos) para el plegado de la hemeritrina desde un ovillo aleatorio hasta la estructura que se presenta.



4. En la proteína *adenilato quinasa*, la región C-terminal es una hélice α con la secuencia

   Val–Asp–Asp–**Val**–**Phe**–Ser–Gln–**Val**–Cys–
   Thr–His–**Leu**–Asp–Thr–**Leu**–Lys–

   Los residuos hidrófobos de esta secuencia se presentan en negrita. Sugerir un posible motivo para la periodicidad de su espaciamiento.
5. A pesar de que la energía de enlace para el enlace de hidrógeno en el vacío es de aproximadamente 20 kJ/mol, observamos que cada uno de los enlaces de hidrógeno de una proteína plegada contribuye mucho menos, probablemente menos de 5 kJ/mol, a la entalpía de estabilización de la proteína. Sugiera una explicación de esta diferencia.
6. Considere una pequeña proteína que contiene 101 residuos de aminoácidos. La proteína tendrá unos 200 enlaces alrededor de los cuales puede producirse rotación. Suponga que son posibles tres orientaciones alrededor de cada uno de estos enlaces.
   (a) Sobre la base de estos supuestos, ¿aproximadamente cuántas conformaciones de *ovillo aleatorio* serán posibles para esta proteína?
   (b) El cálculo obtenido en (a) seguramente es demasiado grande. Dé una razón que lo explique.
*7. (a) Basándose en una respuesta más conservadora al Problema 6 (2.7×10^{92} conformaciones), calcule el cambio de entropía conformacional del plegado de un mol de esta proteína para dar una estructura con una sola conformación.
   (b) Si la proteína se pliega *por completo* formando una hélice α con enlaces de H como único origen de entalpía de estabilización, y cada mol de enlaces de H contribuye con -5 kJ/mol a la entalpía, calcule el $\Delta H_{\text{plegado}}$. Obsérvese que no se pueden formar 4 enlaces de H en un extremo.
   (c) A partir de sus respuestas a las preguntas (a) y (b), calcule el $\Delta G_{\text{plegado}}$ para esta proteína a 25°C. ¿Es estable la forma plegada de la proteína a 25°C?
*8. La secuencia siguiente es parte de una proteína globular. Utilizando la Tabla 6.6 y las reglas de Chou-Fasman, predecir la estructura secundaria de esta región.

   ···RRPVVLMAACLRPVVFITYGDGGTYYHWYH···

9. (a) Se comprueba que una proteína es un tetrámero de subunidades idénticas. Indique dos simetrías posibles para una molécula de este tipo. ¿Qué clases de interacciones (isólogas o heterólogas) estabilizarían a cada una de ellas?
   (b) Suponga que un tetrámero, como la hemoglobina, está formado por dos pares de dos tipos de cadenas, α y β. ¿Cuál es en este caso la simetría más elevada posible?
*10. En condiciones fisiológicas, la proteína hemeritrina existe como un octámero de ocho cadenas del tipo que aparece en el Problema 3.
   (a) Indique dos simetrías posibles para esta molécula.
   (b) ¿Cuál cree que es la más probable? Explíquelo.
   (c) Para la simetría más probable, ¿qué tipo de interacciones (isólogas, heterólogas o ambas) esperaría? ¿Por qué?
*11. Un investigador estudia la desnaturalización térmica de la hemeritrina mediante dos métodos: (1) utilizando dicroísmo circular, que mide el contenido de hélice α, (véase Herramientas de la Bioquímica 6A) y (2) utilizando calorimetría de barrido diferencial (véase Herramientas de la Bioquímica 10A). Observa un ΔH considerablemente mayor por calorimetría del que registra con dicroísmo circular. Sugiera un motivo para esta diferencia.
12. La hormona peptídica *vasopresina* se utiliza en la regulación del equilibrio hidrosalino en muchos vertebrados. La vasopresina porcina (de cerdo) tiene la siguiente secuencia:

   Asp–Tyr–Phe–Glu–Asn–Cys–Pro–Lys–Gly

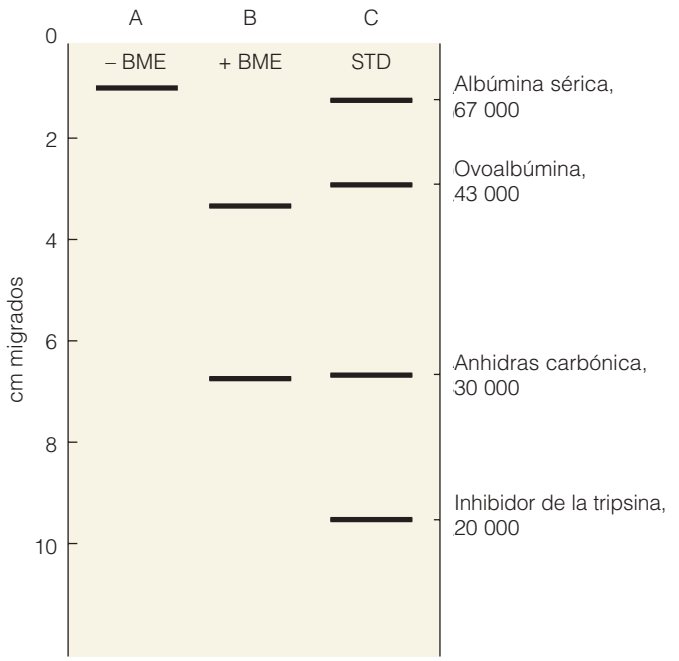
   (a) Utilizando los datos de la Figura 5.6 y la Tabla 5.1, calcule el coeficiente de extinción ε (en unidades de cm^2/mg) para la vasopresina, utilizando radiación con λ = 280 nm.

(b) Una disolución de vasopresina se coloca en una cubeta de 0.5 cm de grosor. Se observa que su absorbancia a 280 nm es de 1.3. ¿Cuál es la concentración de vasopresina, en mg/cm^3?

(c) ¿Qué fracción de luz incidente pasa a través de la cubeta en (b)?

(Véase Herramientas de la Bioquímica 6A.)

*13. Una proteína, en condiciones de composición de amortiguador, pH y temperatura próximas a las condiciones fisiológicas, presenta un peso molecular, mediante medidas de equilibrio de sedimentación, de 140 000 g/mol. Cuando la misma proteína se estudia por electroforesis en gel con SDS en ausencia o presencia del agente reductor β mercaptoetanol (BME), se observan los patrones de las calles A y B respectivamente. La calle C contiene estándares del peso molecular indicado. A partir de estos datos, describa la proteína nativa, en lo relativo a tipos de subunidades presentes, estequiometría de las subunidades y tipos de enlace (covalente, no covalente) que existen entre las subunidades. (Véase Herramientas de la Bioquímica 6B.)



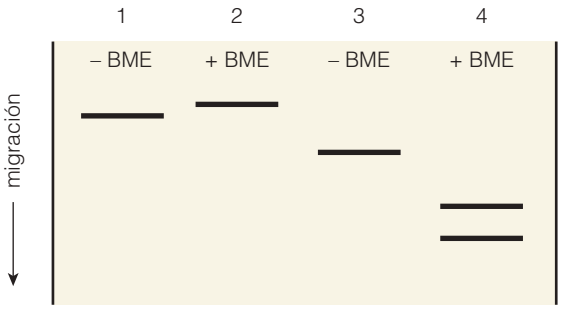
14. En una ultracentrífuga analítica se han obtenido los siguientes datos para la γ-globulina humana a 20°C:

$S = 7.12 \times 10^{-13}$ s $\qquad \bar{\upsilon} = 0.718$ mL/g

$D = 4.00 \times 10^{-7}$ cm^2 s^{-1} $\qquad \rho = 1.00$ g/cm^3

¿Cuál es el peso molecular de la γ-globulina? Obsérvese que la constante de los gases R, en unidades cgs, es 8.314×10^7 erg/K·moll. (Véase Herramientas de la Bioquímica 6B.)

*15. Una proteína da una única banda en la electroforesis con SDS, como se observa en las calles 1 y 2 más abajo. Existe poco efecto, si es que lo hay, con la adición de β–mercaptoetanol (BME) en el gel; si hay algo, la proteína corre un poquito más lenta. Cuando se trata con la enzima proteolítica trombina (véase el Capítulo 5) y se somete a electroforesis en ausencia de BME, la proteína migra un poco más rápidamente (calle 3), mientras que cuando está presente el BME, se encuentran dos bandas que migran mucho más rápidamente (calle 4). Explicar estos resultados en términos de un modelo para la proteína.



16. Se ha postulado que la forma normal (no infecciosa) del prión se diferencia de la forma infecciosa únicamente en la estructura secundaria/terciaria (véase la página 215).

(a) ¿Cómo podría demostrar que se producen cambios de la estructura secundaria?

(b) ¿Cómo podría comprobar los cambios de la estructura cuaternaria?

(c) Si este modelo es correcto, ¿qué implicaciones tiene sobre los esquemas predictivos como los de Chou y Fasman (página 217)?

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 6A

Métodos espectroscópicos para el estudio de la conformación macromolecular en disolución

La difracción de rayos X (véase Herramientas de la Bioquímica 4A) es un método muy potente para determinar los detalles de la estructura tridimensional de las proteínas globulares y otros biopolímeros. Sin embargo, esta técnica presenta la limitación fundamental de que sólo puede utilizarse cuando las moléculas han cristalizado, y la cristalización no siempre es fácil o siquiera posible. Además, este método no puede utilizarse con facilidad para estudiar los cambios de conformación que se producen en respuesta a los cambios del entorno de las moléculas. Sin embargo, existen otros métodos que nos permiten estudiar las moléculas en disolución. Varios de estos métodos pueden agruparse en la categoría de **técnicas espectroscópicas**.

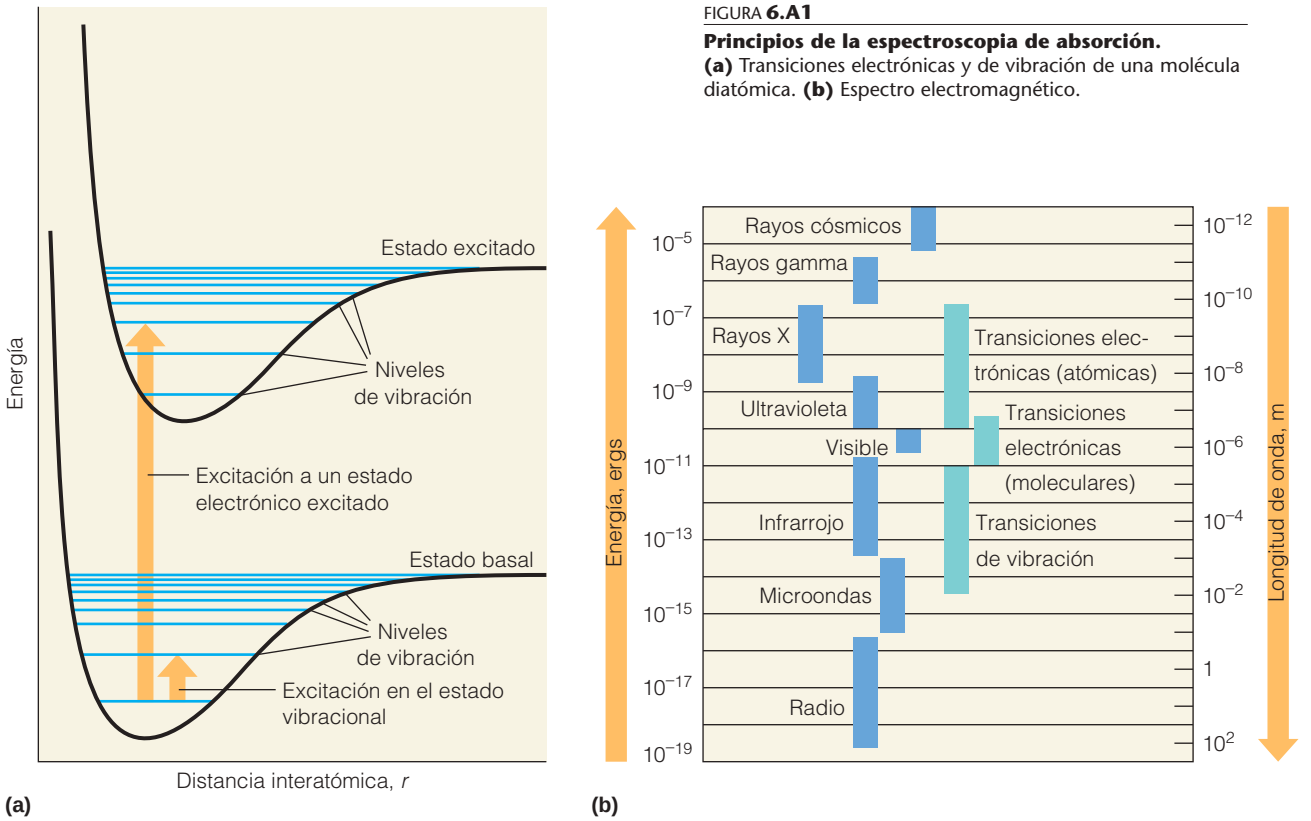


FIGURA **6.A1**
Principios de la espectroscopia de absorción. **(a)** Transiciones electrónicas y de vibración de una molécula diatómica. **(b)** Espectro electromagnético.

Espectroscopia de absorción

Las proteínas, los hidratos de carbono y los ácidos nucleicos son moléculas complejas que pueden absorber radiación a lo largo de un amplio margen del espectro. No obstante, los principios básicos de su absorción pueden explicarse en términos del tipo más sencillo de molécula, una molécula diatómica.

Cuando interactúan dos átomos para formar una molécula, la curva de energía potencial para el estado electrónico de energía más baja (**estado basal**) se parecerá a la curva inferior de la Figura 6A.1a. Los **estados electrónicos excitados** presentarán curvas similares para la energía frente a la distancia interatómica, pero a energías más elevadas. Para cada estado electrónico de la molécula habrá una serie de **estados de vibración** permitidos, con niveles de energía indicados por las líneas horizontales en la figura. La base de la espectroscopia molecular puede comprenderse con dos reglas sencillas: (1) sólo son posibles las transiciones entre estados de energía permitidos de la molécula (los niveles de energía están **cuantizados**), y (2) la energía (ΔE) que debe absorberse en cualquier transición determina la longitud de onda (λ) de la radiación que se absorbe para lograr esa transición. La energía de un **cuanto de radiación** es inversamente proporcional a λ:

$$\Delta E = hc/\lambda \qquad \Delta E = E_{\text{estado final}} - E_{\text{estado inicial}} \qquad (6A.1)$$

en donde h es la constante de Planck (6.626×10^{-34} J s) y c es la velocidad de la luz (3×10^8 m/s). Según la ecuación (6A.1), las pequeñas diferencias de energía corresponden a longitudes de onda largas y las diferencias grandes a longitudes de onda cortas. Esta relación concuerda con la Figura 6A.1b, que indica que las transiciones de energía elevada entre estados electrónicos de una molécula conducen a la absorción en la región visible o ultravioleta del espectro, mientras que las transiciones de energía baja entre distintos niveles de energía de vibración corresponden a la absorción de energía infrarroja.

Los biopolímeros complejos como las proteínas y los ácidos nucleicos pueden experimentar multitud de tipos de vibraciones y oscilaciones moleculares. En consecuencia, la **espectroscopia infrarroja** puede proporcionar información directa relativa a la estructura macromolecular. Por ejemplo, las posiciones exactas de las bandas infrarrojas correspondientes a las vibraciones del armazón polipeptídico son sensibles al estado de conformación (hélice α, lámina β, etc.) de la cadena. Por lo tanto, los estudios en esta región del espectro suelen utilizarse para investigar las conformaciones de las moléculas proteicas.

La mayoría de los biopolímeros no absorben luz visible en cantidades significativas. Algunas proteínas son coloreadas, pero invariablemente contienen grupos prostéticos (como el hemo en la mioglobina) o iones metálicos (como el cobre) que les confieren la absorción. La sangre y la carne roja deben su color a los grupos hemo transportados por la hemoglobina, la mioglobina y otras hemoproteínas. Esta absorción a menudo

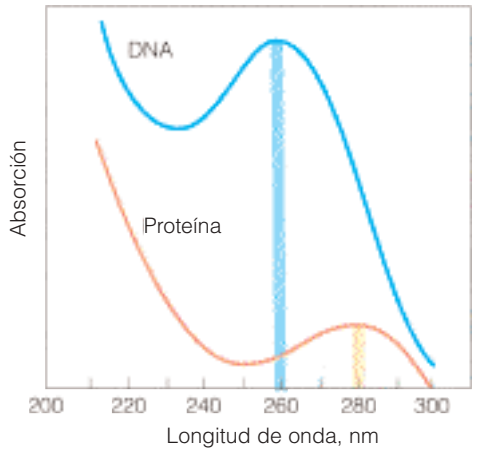


FIGURA **6.A2**

Espectros de absorción en el ultravioleta cercano de una proteína característica y del DNA. La absorción a 280 nm se utiliza habitualmente para medir concentraciones de proteínas, mientras que la absorción a 260 nm es más sensible para los ácidos nucleicos.

puede aprovecharse para investigar cambios del entorno molecular del grupo prostético. Un ejemplo de ello es el uso de la espectroscopia de absorción en el espectro visible para seguir la oxigenación de la mioglobina o la hemoglobina (véase la página 242 en el Capítulo 7). No obstante, los usos más comunes en bioquímica de las técnicas espectroscópicas son, con diferencia, los de la *espectroscopia ultravioleta*. En la región ultravioleta, tanto las proteínas como los ácidos nucleicos absorben intensamente (Figura 6A.2). La absorción proteica más fuerte se encuentra en dos márgenes de longitud de onda dentro de las regiones ultravioleta, en la proximidad de 280 y 200 nm. En el margen de 270-290 nm, vemos la absorción por las cadenas laterales aromáticas de fenilalanina, tirosina y triptófano (véase también la Figura 5.6). Dado que esta región del espectro es fácil de estudiar, la absorción a 280 nm se utiliza de modo sistemático para medir las concentraciones proteicas.

Las medidas espectroscópicas de concentración proteica utilizan un **espectrofotómetro**, en el que una cubeta de grosor l que contiene una solución de la proteína se coloca en un haz de radiación monocromática de intensidad I_0 (Figura 6A.3). La intensidad del haz emergente disminuirá hasta un valor de I porque la disolución absorbe parte de la radiación. La **absorbancia** a la longitud de onda λ se define como $A_\lambda = \log(I_0/I)$ y está relacionada con l y la concentración c por la **ley de Beer**:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda lc \qquad (6A.2)$$

donde ε_λ es el **coeficiente de extinción** a una longitud de onda λ para la sustancia concreta que se estudia (véase el Problema 12). Sus dimensiones dependen de las unidades de concentración empleadas. Si la concentración de proteína se mide en mg/cm^3 y l en cm, entonces ε_λ debe tener las dimensiones cm^2/mg, dado que A es una magnitud sin unidades. En cambio, cuando las concentraciones se expresan en molaridad (M), las unidades de ε pasan a ser M^{-1}cm^{-1}. Una vez determinado el coeficiente de extinción de una proteína concreta (por ejemplo, midiendo la absorbancia de una solución que contenga un peso conocido de la proteína), la concentración de cualquier otra solución de esa proteína puede calcularse a partir de una simple medida de absorbancia, utilizando la ecuación (6A.2). Se emplea habitualmente el mismo método para los ácidos nucleicos, pero en este caso suele utilizarse una longitud de onda de 260 nm, dado que los ácidos nucleicos absorben más intensamente en esa región del espectro.

La segunda región de fuerte absorción en el espectro de las proteínas se encuentra entre 180 y 220 nm. La absorción a estas longitudes de onda surge de las transiciones electrónicas en el propio armazón polipeptídico, y como consecuencia es sensible a la conformación del armazón. De hecho, *ambas* regiones del espectro de absorción de las proteínas resultan algo afectadas por el estado conformacional. Los coeficientes de extinción cambian ligeramente cuando una molécula pasa de una forma globular a otra de ovillo aleatorio, porque se modifica el entorno local de todos los grupos, incluyendo las cadenas laterales aromáticas. Dado que la espectroscopia puede realizarse con gran exactitud, pueden medirse incluso cambios pequeños y puede utilizarse para seguir la desnaturalización proteica. En la Figura 6.20 se presenta un ejemplo.

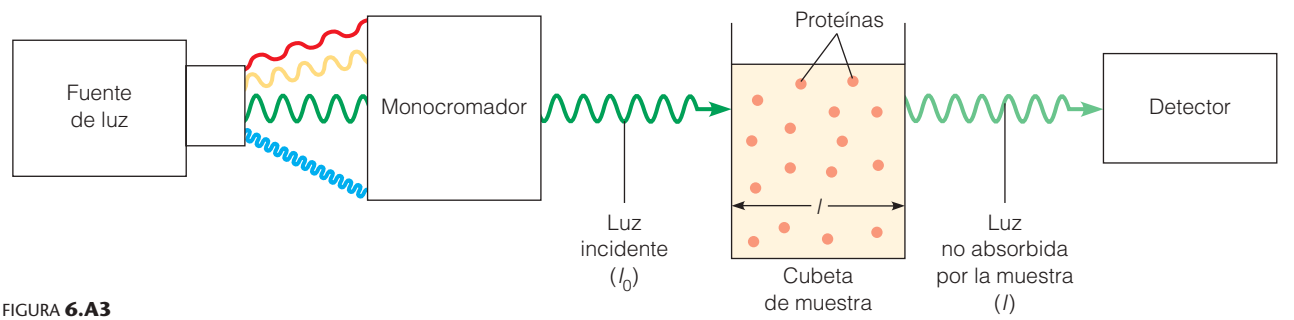


FIGURA **6.A3**

Medida de la absorción de luz con un espectrofotómetro.

Fluorescencia

En la mayoría de los casos, las moléculas que pasan a un estado electrónico excitado por la absorción de energía radiante vuelven al estado basal por una **transferencia sin radiación** de la energía de excitación a las moléculas circundantes. En pocas palabras, la energía vuelve a aparecer como calor. Pero en ocasiones, como se ve en la Figura 6A.4a, una molécula perderá sólo parte de su energía de excitación por transferencia (flecha amarilla) y volverá a radiar la parte más grande (flecha verde). Con ello surge el fenómeno denominado **fluorescencia**. Dado que, como se aprecia en la Figura 6A.4a, el cuanto de energía reemitida como fluorescencia siempre es de menor energía que el cuanto que se absorbió inicialmente (flecha naranja), la longitud de onda de la luz fluorescente será más larga que la longitud de onda de la luz de excitación. En la Figura 6A.4b se contrasta el **espectro de emisión de fluorescencia** de la tirosina con su espectro de absorción. En las proteínas, la tirosina y el triptófano son los grupos fluorescentes más importantes. El entorno de estos residuos puede modificar en gran medida la intensidad de su fluorescencia, y esta técnica puede utilizarse para el seguimiento de los cambios de conformación proteica. Además, la excitación de la fluorescencia por luz polarizada en el plano (véase el apartado siguiente) proporciona un modo de estudiar la dinámica de la estructura proteica. Si los residuos excitados pueden moverse o rotar de modo apreciable antes de que se reemita la luz fluorescente, la fluorescencia se despolarizará en alguna cantidad. La medida de la cuantía de esta despolarización proporciona una medida de la movilidad rotacional del grupo o la molécula.

Recientemente, se ha empezado a utilizar mucho la fluorescencia como herramienta para localizar con precisión las proteínas en las células o los orgánulos subcelulares. La microscopia confocal (véase Herramientas de la Bioquímica 1A) permite esta localización, si la proteína se puede marcar de forma específica. Algunas veces, esto puede conseguirse uniendo de forma covalente colorantes fluorescentes, pero es difícil de hacer in vivo. Una técnica nueva poderosa emplea una proteína muy fluorescente que se encuentra en algunas medusas, denominada proteína fluorescente verde (PFV). La fluorescencia intensa se debe a un cromóforo poco corriente, que se genera por oxidación de la secuencia de aminoácidos Ser-Tyr-Gly. La PFV se emplea con mayor efectividad como una proteína de fusión, de forma que el gen de la PFV se fusiona con el de la proteína que quiere estudiarse, y el producto fusionado se expresa en el organismo que interesa. La proteína fusionada actúa y se sitúa igual que la proteína natural y proporciona un marcador brillante en la microscopia.

Dicroísmo circular

A pesar de que la espectroscopia de absorción y la fluorescencia pueden ser útiles para el seguimiento de los cambios moleculares, estas medidas son difíciles de interpretar directamente en términos de cambios de la estructura secundaria. Para este objetivo, han adquirido importancia las técnicas que utilizan luz polarizada.

La luz puede polarizarse de varias maneras. La más conocida es la **polarización plana** (Figura 6A.5a, parte superior), en la que el campo eléctrico variable de la radiación tiene una orientación fija. Mientras que la luz *no polarizada* consta de ondas que vibran en *todos* los planos perpendiculares a la dirección del desplazamiento, la luz polarizada plana tiene ondas que vibran en un único plano. Menos conocida, pero igualmente importante, es la **polarización circular**, en la que la dirección de polarización *rota* con la frecuencia de la radiación (Figura 6A.5a, parte inferior). Si observa un haz polarizado circularmente que se le acerca, el campo eléctrico puede estar rotando tanto en sentido de las

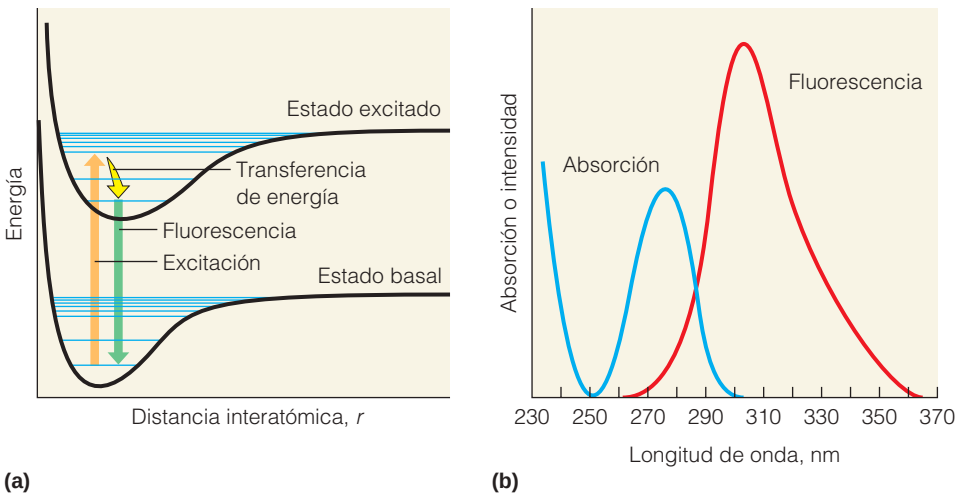


FIGURA **6.A4**

Fluorescencia. **(a)** Principio de la fluorescencia. **(b)** Espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de la tirosina.

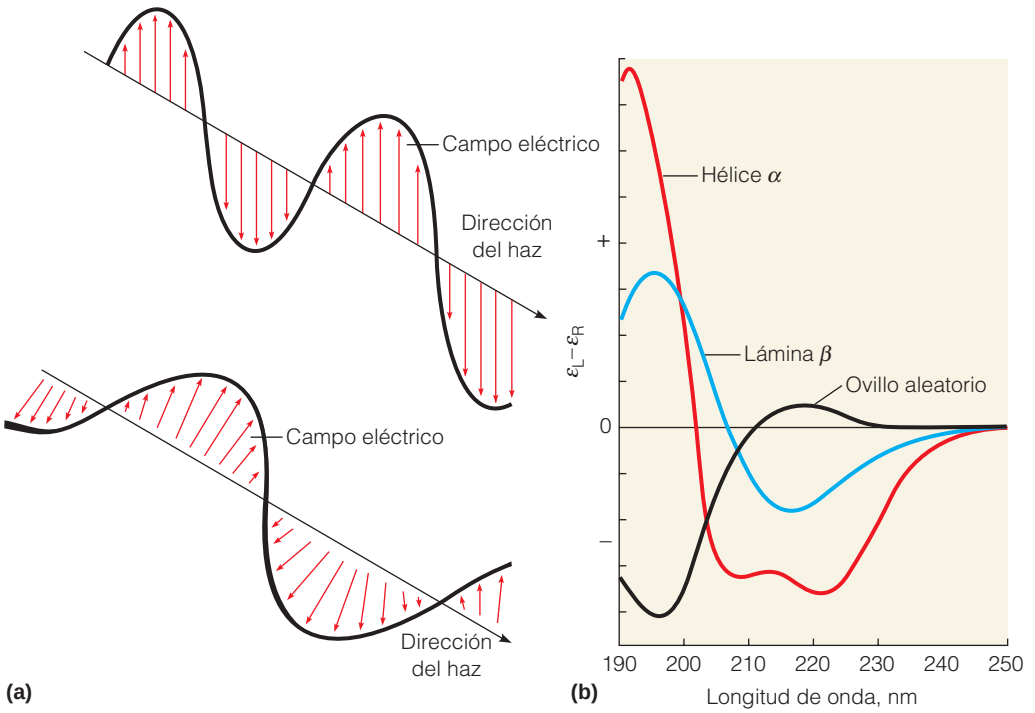


FIGURA **6.A5**
Dicroísmo circular. (a) Polarización de la luz. Arriba: luz polarizada plana. Abajo: luz polarizada circularmente. **(b)** Espectros de dicroísmo circular de polipéptidos con diversas conformaciones.

agujas del reloj como en sentido contrario. La primera se denomina *luz polarizada circularmente hacia la derecha*, y la segunda *luz polarizada circularmente hacia la izquierda.*

La mayoría de las moléculas que estudian los bioquímicos son asimétricas (por ejemplo, los aminoácidos L y D, las hélices proteicas a derechas y a izquierdas, y las hélices de ácidos nucleicos a derechas y a izquierdas). Estas moléculas presentan una preferencia por la absorción de luz polarizada circularmente hacia la izquierda o hacia la derecha. Así, por ejemplo, un haz polarizado circularmente hacia la derecha interactúa de modo distinto frente a una hélice α a derechas que un haz polarizado circularmente hacia la izquierda. Esta diferencia de absorción, denominada **dicroísmo circular**, se define como

$$\Delta A = \frac{A_L - A_R}{A} \qquad (6A.3)$$

donde A_L es la absorbancia de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda, A_R es la cantidad correspondiente para la polarización circular hacia la derecha y A es la absorbancia de la luz no polarizada. Dado que ΔA puede ser positivo o negativo, un **espectro de dicroísmo circular** (o **espectro DC**) es distinto de un espectro de absorción normal en que se permiten valores + y −.

La Figura 6A.5b presenta espectros DC de polipéptidos con conformaciones de hélice α, lámina β y ovillo aleatorio. Los tres espectros de la figura son muy diferentes, de forma que el dicroísmo circular puede ser una potente herramienta para el seguimiento de los cambios conformacionales de las proteínas. Así, por ejemplo, si se desnaturaliza una proteína de modo que su estructura nativa, que contiene regiones de hélice α y de lámina β, se transforma en una estructura desplegada de ovillo aleatorio, esta transformación se reflejará en un cambio muy notable de su espectro DC.

El dicroísmo circular puede utilizarse también para calcular el contenido de hélices α y de láminas β en proteínas nativas. Se conocen las contribuciones de estas estructuras secundarias distintas al dicroísmo circular a diferentes longitudes de onda, de modo que podemos intentar hacer corresponder un espectro observado de una proteína con una combinación de estas contribuciones. Este tipo de análisis coincide frecuentemente con la composición de estructura secundaria determinada por los estudios de rayos X, y ha apoyado la idea de que las estructuras de las proteínas globulares observadas en cristales se conservan cuando los cristales se disuelven en disoluciones amortiguadoras a pH fisiológico.

A pesar de que el dicroísmo circular es una técnica extraordinariamente útil, no resulta muy discriminadora. Esto es, en la actualidad no puede decirnos lo que sucede en un *punto* concreto de una molécula proteica. Un método que tiene la posibilidad de hacerlo es la resonancia magnética nuclear.

Resonancia magnética nuclear

Principios generales: RMN unidimensional

Los núcleos de determinados isótopos de algunos elementos tienen una propiedad denominada **espín**, que hace que

TABLA **6A.1**

NÚCLEOS UTILIZADOS CON MAYOR FRECUENCIA EN LOS EXPERIMENTOS BIOQUÍMICOS DE RMN

Isótopo	Espín	Abundancia Natural[a] (%)	Sensibilidad Relativa[b]	Aplicaciones
^{1}H	½	99.98	(1.000)	Casi cualquier tipo de estudio bioquímico
^{2}H	1	0.02	0.0096	Estudios de compuestos deuterados selectivamente
^{13}C	½	1.11	0.0159	Estudios de grupos específicos que contienen carbono
^{19}F	½	100.00	0.834	Sustituido por H como "sonda" de estructura local
^{31}P	½	100.00	0.0664	Estudios de ácidos nucleicos y compuestos fosforilados

[a]El número representa el porcentaje de este isótopo en la mezcla de isótopos de cada elemento que se produce naturalmente. Los isótopos con cifras próximas al 100% pueden estudiarse directamente en los biopolímeros que se producen naturalmente. Los isótopos raros, como ^{2}H (deuterio) y ^{13}C, suele ser preciso que se enriquezcan artificialmente en las sustancias a estudiar.

[b]Indica la sensibilidad (en comparación con ^{1}H) de los instrumentos de RMN convencionales para cada isótopo. Los valores bajos significan que el experimento será más difícil o que requerirá más tiempo.

los núcleos se comporten como imanes diminutos. Sólo un número limitado de isótopos tiene esta propiedad; algunos que son útiles para los bioquímicos se indican en la Tabla 6A.1. Si se aplica un campo magnético externo a una muestra que contenga estos núcleos, las distintas orientaciones del espín nuclear tendrán energías diferentes. La radiación de microondas puede hacer pasar estos núcleos de un estado energético a otro, un fenómeno denominado **resonancia magnética nuclear** (**RMN**). La RMN es en realidad un tipo de espectroscopia. Como se ve en la Figura 6A.6a, con un campo magnético determinado, una energía concreta correspondiente a una longitud de onda particular en la región de microondas del espectro corresponderá exactamente a la diferencia de energía entre los estados de espín. De este modo, el investigador puede utilizar un campo magnético fijo y cambiar la longitud de onda de las microondas hasta que se haya obtenido la "resonancia". También el experimento puede realizarse a la inversa: se mantiene fija la longitud de onda de la radiación y se varía el campo magnético hasta conseguir la resonancia.

Los niveles de energía de un núcleo girando en un campo magnético son muy sensibles al entorno que rodea al átomo en cuestión. Los hidrógenos distintos de un compuesto, por ejemplo, alcanzarán la resonancia a distintas intensidades del campo magnético. Estas diferencias suelen expresarse en términos de *desviaciones químicas* (δ) definidas respecto al material de referencia añadido a la muestra:

$$\delta = \frac{H_{ref} - H}{H_{ref}} \times 10^{6} \qquad (6A.4)$$

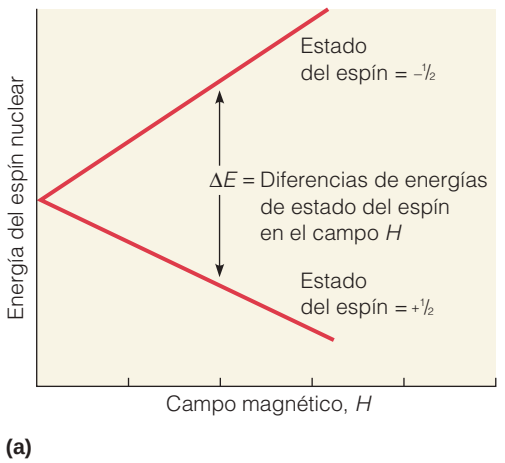
donde H es la intensidad del campo para la resonancia del núcleo en cuestión, y H_{ref} es la de un núcleo de referencia.

Con los instrumentos modernos de RMN, es posible diferenciar resonancias de la mayoría o todos los protones, incluso en una molécula grande. Así, por ejemplo, en la Figura 6A.6b se presenta un espectro de RMN de la proteína inhibidora de la tripsina pancreática bovina. Si pueden identificarse estas resonancias, una tarea que presenta alguna dificultad, es posible preguntarse qué le sucede a un grupo o átomo particular en una molécula grande como

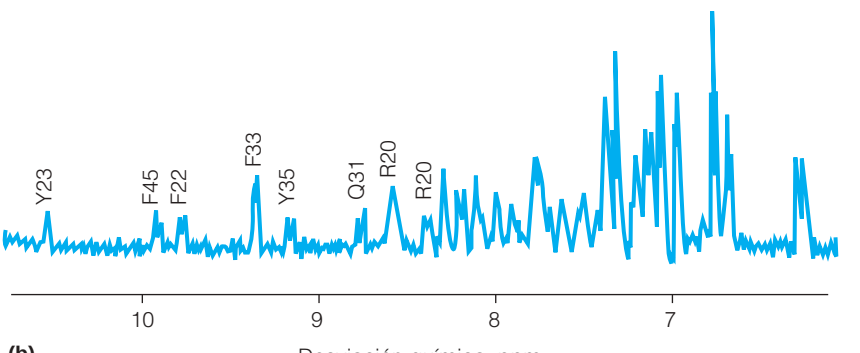
FIGURA **6.A6**

Resonancia magnética nuclear (RMN). **(a)** Principio de la RMN. **(b)** Parte del espectro de RMN de ^{1}H del inhibidor de la tripsina pancreática bovina. El eje es la desviación química, δ, en partes por millón (ppm). Las letras indican resonancias asignadas a grupos específicos de átomos.

K. Wüthricht y G. Wagner, *J. Mol. Biol.* (1979) 130:1-18. © 1979 Academic Press.



(a)



(b)

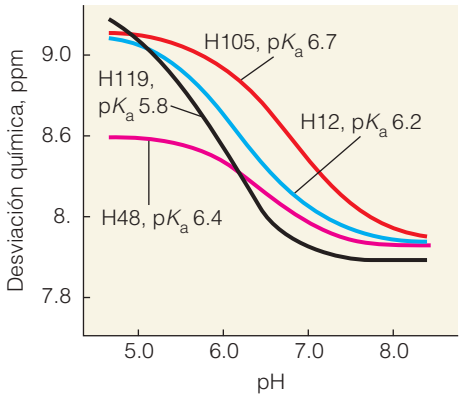


FIGURA **6.A7**

Titulación de los cuatro residuos de histidina de la ribonucleasa mediante RMN. Cada curva sigue la titulación de un grupo individual de histidina. Las marcas como H12 y H48 indican las posiciones de los grupos en la cadena. Las dos histidinas con los pK_a más bajos (H12 y H119) participan en el proceso catalítico.

una proteína. Un ejemplo de esta discriminación se presenta en la Figura 6A.7, que utiliza la RMN para trazar las curvas de titulación de los residuos de histidina individuales de la proteína ribonucleasa. La figura también demuestra gráficamente un principio al que se ha aludido en el Capítulo 5: los grupos individuales de un tipo determinado pueden presentar valores de pK_a muy distintos debido a sus entornos diferentes dentro de la molécula proteica compleja.

Los ejemplos del poder discriminador de la RMN son legión. Como otro ejemplo, podemos utilizar la RMN ^{31}P para mostrar lo que hacen los grupos fosfato en una molécula de ácido nucleico. Los espectros de RMN ^{13}C de la Figura 6A.8 diferencian los tipos individuales de átomos de carbono en el polipéptido sintético poli(γ-bencil)-L-glutamato. La Figura 6A.8 demuestra otra aplicación importante de la RMN. Cuando los átomos sólo pueden moverse lentamente en disolución, las líneas de RMN se ensanchan. Obsérvese el contraste de definición de los picos entre las formas de hélice y de ovillo aleatorio de este polipéptido. En el ovillo aleatorio, el armazón y las cadenas laterales son libres para dar una vuelta con movimiento aleatorio, pero en la hélice, cada uno está fijado a su sitio y sólo pueden moverse con el movimiento lento de toda la molécula grande de forma alargada. En consecuencia, en este caso la RMN nos permite estudiar de modo más directo la transición hélice $\longrightarrow$ ovillo aleatorio.

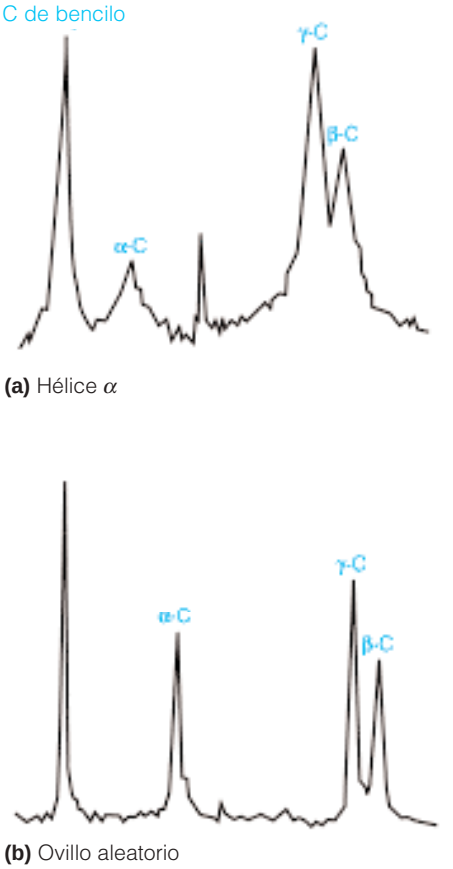


FIGURA **6.A8**

Espectros de RMN de ^{13}C de dos conformaciones de un polipéptido. Los picos individuales para los carbonos α, β, γ y bencilo de las cadenas laterales se resuelven claramente. **(a)** Espectro del poli(γ-bencil)-L-glutamato en la conformación de hélice α. **(b)** Espectro del mismo polipéptido en la conformación de ovillo aleatorio. Obsérvese cómo se estrechan los picos al pasar de la hélice al ovillo aleatorio.

Reproducido con permiso de A. Allerhand y E. Oldfield, *Biochem.* (1973) 12:3428-3433. © 1973 American Chemical Society.

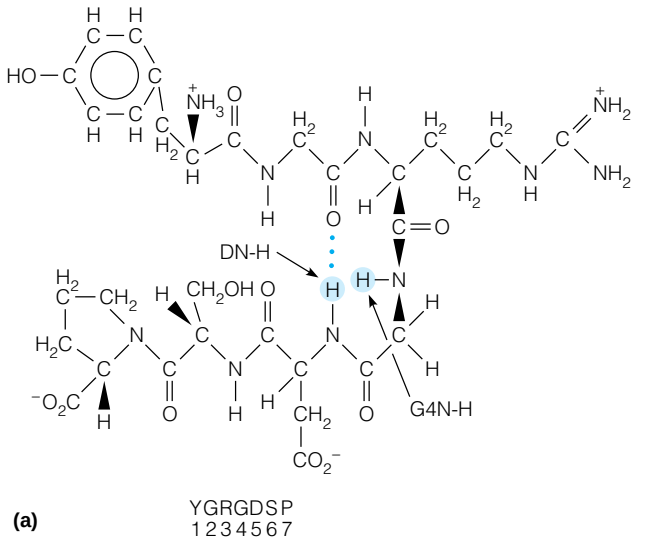
RMN Multidimensional

El tipo de espectro unidimensional que aparece en la Figura 6A.6b nos puede decir mucho sobre el comportamiento de los átomos individuales de una proteína, pero no proporciona toda la información potencialmente disponible con la RMN. El impulso de la "RMN bidimensional" de las proteínas, durante los últimos años, ha abierto toda una nueva gama de aplicaciones.

Básicamente, las técnicas de RMN bidimensional de *espectroscopia de correlación* (COSY) y de *espectroscopia de efecto Overhauser nuclear* (NOESY) se basan en el hecho de que los espines de distintos protones interactúan o se "acoplan" unos con otros. Con el uso de técnicas especiales con múltiples pulsos de energía para alinear los espines nucleares, es posible perturbar el espín de un núcleo y detectar su efecto sobre el estado de espín de otro. Los protones que están unidos a átomos adyacentes, y que en consecuencia pueden acoplar el espín directamente, pueden estudiarse con el método COSY. Este método permite al investigador asignar frecuencias de RMN a protones concretos "rastreando" un átomo tras otro. El espectro NOESY es incluso más importante, y se basa en el hecho de que dos protones que estén a menos de

0.5 nm de distancia el uno del otro perturban mutuamente sus espines *incluso si no están estrechamente acoplados en la estructura primaria*. En consecuencia, la NOESY permite averiguar los protones que están cerca *en el espacio* y proporciona una ruta para la determinación de la estructura tridimensional. En la Figura 6A.9 se presenta un espectro NOESY bidimensional característico. Las manchas en la diagonal corresponden al espectro convencional unidimensional, mientras que las manchas fuera de la diagonal muestran interacciones cercanas entre pares de protones correspondientes a las manchas de la diagonal. Por ejemplo, los protones que están a menos de 0.5 nm se muestran con la mancha marcada así, y con su contrapartida al otro lado de la diagonal. Cuando se combinan con las asignaciones de protones y las restricciones de enlaces, estos datos pueden proporcionar modelos bastante exactos de proteínas pequeñas en disolución. Se presenta un ejemplo en la Figura 6A.10, donde la estructura de armazón del BPTI obtenida por rayos X se compara con cinco modelos posibles generados a partir de los espectros de RMN bidimensionales.

Recientemente, se ha ampliado la potencia de estos métodos mediante la expansión a otras "dimensiones", observando las interacciones entre, por ejemplo, los espines de los protones y los espines de ^{13}C. La potencia de la RMN para el estudio de estructuras proteicas está aumentando rápidamente.



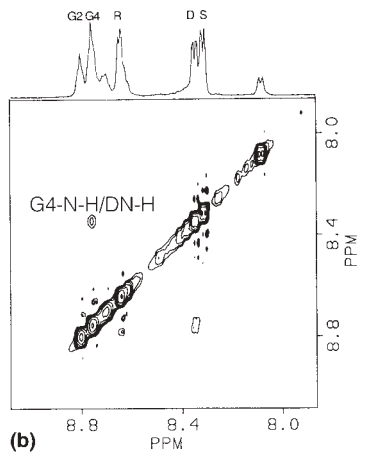


FIGURA **6.A9**

Uso de los espectros de RMN NOESY para determinar la proximidad de los átomos. **(a)** Péptido YGRGDSP. **(b)** Espectro NOESY del péptido (región de H de amida). La presencia de un pico cruzado correspondiente a la interacción del protón de la glicina 4 (G4N—H) con el protón N—H del aspartato (DN—H) demuestra que están cerca en el espacio.

Tomado de W. Curtis Johnson, Jr. et al., *Biochem.* (1993) 32:268, fig. 4. © 1993 American Chemical Society.

Bibliografía

Campbell, I. D. y R. A. Dwek (1984) *Biological Spectroscopy*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif. Una excelente descripción práctica de muchas técnicas; contiene numerosos ejemplos claros y problemas.

Clore, G. M. y A. M. Gronenborn (1989) Determination of three-dimensional structures of proteins and nucleic acids in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 24:479-564.

Johnson, W. C., Jr. (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 7:205-214.

van Holde, K. E., W. C. Johnson y P.-S. Ho (1998) *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J. Un tratamiento de estos temas con mayor detalle del que se da aquí.

Wagner, G., W. Braun, T. F. Havel, T. Schaumann, G. Nobuhiro y K. Wüthrich (1987) Protein structures in solution by nuclear magnetic resonance and distance geometry. The polypeptide fold of the bovine pancreatic trypsin inhibitor determined using two different algorithms, DISGEO and DISMAN. *J. Mol. Biol.* 196:611-639.

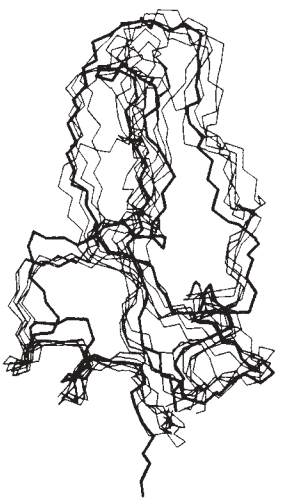


FIGURA **6.A10**

Comparación de las estructuras del BPTI obtenidas por RMN y por rayos X. La línea gruesa representa la conformación del armazón de la estructura de rayos X. Las líneas finas representan cinco posibles estructuras calculadas a partir de los datos de RMN.

Cortesía de K. Wüthrich de *J. Mol. Biol.* (1987) 196:611. © 1987 Academic Press.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 6B

Determinación de pesos moleculares y del número de subunidades de una molécula de proteína

Cuando se ha identificado y purificado una nueva proteína, surgen inmediatamente dos preguntas:

1. ¿Existe la proteína en condiciones fisiológicas como una cadena polipeptídica única o está formada por múltiples subunidades?
2. Si la proteína funcional tiene más de una subunidad, ¿son las subunidades idénticas o las hay de varios tipos?

Las respuestas a estas preguntas habitualmente pueden obtenerse primero determinando el peso molecular de la proteína nativa y, a continuación, sometiéndola a unas condiciones en las que se produzca la disociación en subunidades. Si las subunidades se mantienen juntas por interacciones no covalentes, el cambio del entorno disolvente afectara frecuentemente la disociación. Por ejemplo, podría elevarse o rebajarse el pH hasta situarlo fuera del margen fisiológico. Como alternativa, podrían utilizarse disolventes desnaturalizantes como las disoluciones concentradas de urea o clorhidrato de guanidina. Estos compuestos, que son excelentes enlazadores de hidrógeno, destruyen la estructura regular del agua, y por este motivo a veces se denominan agentes **caotrópicos** ("creadores de caos"). La destrucción de la estructura del agua disminuye el efecto hidrófobo y en consecuencia fomenta el desplegado y la disociación de las moléculas proteicas. Otros detergentes, como el dodecilsulfato sódico (SDS; véase la parte inferior de la página) son incluso más eficaces. El SDS forma micelas alrededor de las cadenas polipeptídicas individuales. Si se determinan los pesos moleculares de los productos disociados en un disolvente como éste y se comparan con el peso molecular nativo, se puede averiguar el número de subunidades implicadas.

Determinación del peso molecular de la estructura nativa

Se dispone de varias técnicas para determinar los pesos moleculares de las proteínas en sus estados fisiológicos. Recordemos de Herramientas de la Bioquímica 5A que el *coeficiente de sedimentación*, S, está relacionado con el peso molecular, M, del modo siguiente:

$$S = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{Nf} \qquad (6B.1)$$

Recordará de Herramientas de la Bioquímica 5A que $\bar{v}$ es el volumen específico de la proteína y ρ es la densidad de la solución. Esta ecuación contiene el coeficiente de fricción, f, que también depende del tamaño de la molécula. Para eliminar f, puede realizarse una determinación aparte del **coeficiente de difusión**, D, de la proteína. Esta magnitud mide la rapidez con la que las moléculas difunden en disolución debido al movimiento térmico Browniano. El coeficiente de difusión depende de la temperatura, T, y del coeficiente de fricción:

$$D = \frac{RT}{Nf} \qquad (6B.2)$$

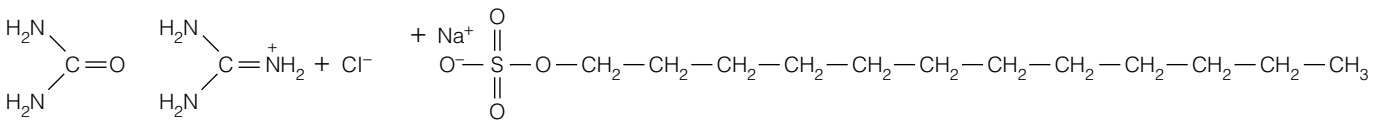
donde R es la constante de los gases, 8.31×10^7 erg/K·mol. El coeficiente de difusión puede medirse determinando la rapidez con la que se difumina la separación entre una solución de la molécula y el disolvente puro, o por técnicas de dispersión de luz láser (véase van Holde *et al.*, Capítulo 4). Combinando la ecuación (6B.1) con (6B.2), obtenemos la *ecuación de Svedberg* para M:

$$M = \frac{RTS}{D(1 - \bar{v}\rho)} \qquad (6B.3)$$

Un modo más directo de medir M utiliza la técnica del **equilibrio de sedimentación**. Si una disolución proteica sedimenta durante muchas horas a una velocidad de rotor baja, se establecerá un equilibrio entre la tendencia de las moléculas a sedimentar y su tendencia a difundir de nuevo a la disolución. Se establecerá un gradiente de concentración estacionario (Figura 6B.1a). Puede demostrarse que una proteína homogénea producirá un gradiente descrito por la ecuación

$$\frac{c(r)}{c(r_0)} = e^{M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2(r^2 - r_0^2)/2RT} \qquad (6B.4)$$

donde $c(r)$ es la concentración a una distancia r del centro de rotación, $c(r_0)$ es la concentración en la posición del menisco (r_0) y las demás magnitudes corresponden a las definidas en Herramientas de la Bioquímica 5A. Según la ecuación (6B.4),



Urea — **Clorhidrato de guanidina (cloruro de guanidinio)** — **Dudecilsulfato sódico (SDS)**

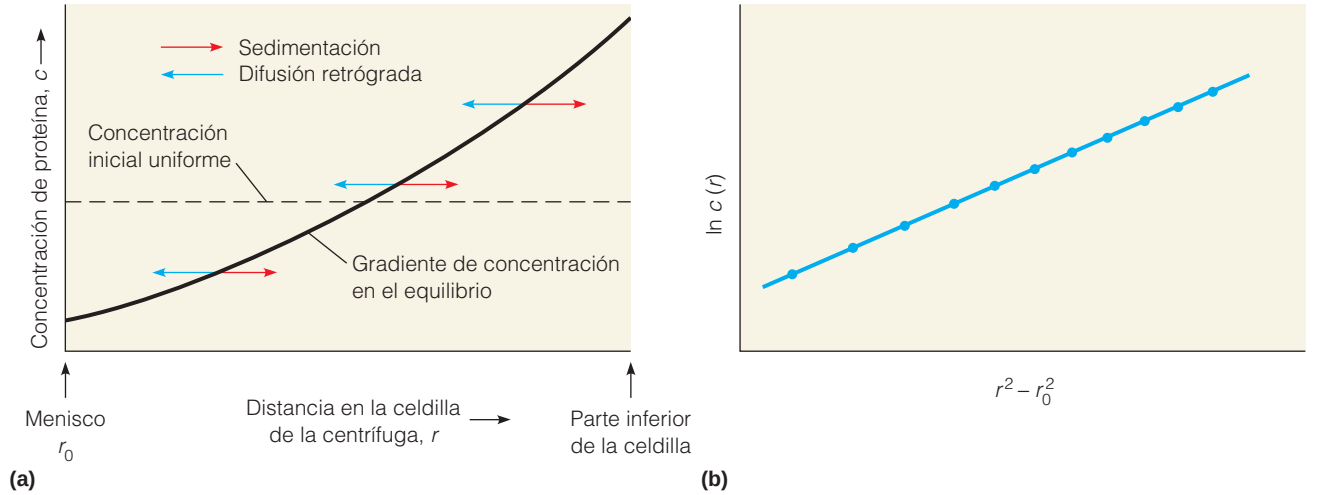


FIGURA **6.B1**

Utilización del equilibrio de sedimentación para medir el peso molecular. **(a)** El equilibrio de sedimentación se alcanza cuando el flujo de soluto hacia fuera causado por su sedimentación se equilibra con el flujo retrógrado debido a la difusión. **(b)** En el estado de equilibrio, el gradiente de concentración es tal que un gráfico de ln c frente a r^2 es una línea recta, con una pendiente dada por $M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2/2RT$.

si se representa gráficamente ln $c(r)$ frente a $r^2 - r_0^2$, debe obtenerse una línea recta (Figura 6B.1b):

$$\ln c(r) = \ln c(r_0) + \frac{M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2(r^2 - r_0^2)}{2RT} \qquad (6B.5)$$

La pendiente de la línea es $M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2/2RT$, lo cual hace posible la determinación de M. Una ultracentrífuga analítica permite la medida bastante exacta de M mediante esta técnica. Los detalles del equilibrio de sedimentación y otras técnicas físicas que pueden utilizarse para determinar los pesos moleculares de las proteínas nativas se presentan en el libro de van Holde *et al.* (véase la Bibliografía).

Determinación del número y peso aproximado de las subunidades: electroforesis en gel con SDS

Una vez determinado el peso molecular nativo, la manera más fácil de averiguar el peso o pesos moleculares de las subunidades consiste en utilizar la electroforesis en gel en presencia de SDS. En estas condiciones, las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas se descomponen todas. La cadena se despliega y se rodea de moléculas de SDS. Las numerosas cargas negativas transportadas por las muchas moléculas de SDS unidas a la proteína hacen que la carga que ésta transporta sea insignificante. La cadena polipeptídica plegada se transforma en un objeto alargado, cuya carga y longitud son proporcionales a la longitud (y, por lo tanto, al peso molecular) de la cadena. Tal como se señala en Herramientas de la Bioquímica 2A, estas partículas migrarán en la electroforesis en gel con movilidades relativas, que dependen únicamente de sus longitudes. Este fenómeno se demuestra en el gráfico que aparece en la Figura 6B.2.

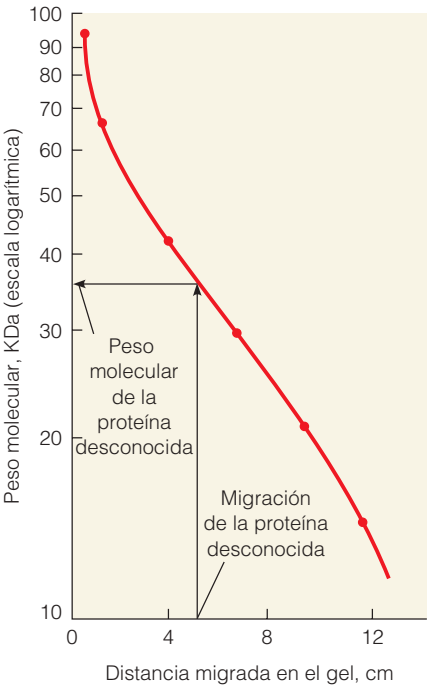


FIGURA **6.B2**

Electroforesis en gel con SDS. El gráfico representa el log M frente a la movilidad electroforética relativa para una serie de proteínas disueltas en una solución que contiene el detergente SDS. La curva resultante se utiliza para interpolar los datos de una proteína desconocida.

Si la electroforesis de una cadena proteica desconocida se lleva a cabo en el mismo gel que un conjunto de estándares de referencia, el peso molecular de la desconocida puede medirse por interpolación en un gráfico como el de la Figura 6B.2.

Cuando se investigan las subunidades de una proteína mediante esta técnica, es aconsejable realizar dos experimentos: uno en presencia de un agente reductor de enlaces disulfuro como el β-mercaptoetanol ($HSCH_2CH_2OH$) y otro en su ausencia. De este modo, se distinguirá entre las subunidades que se mantienen juntas mediante puentes —S—S— y las que se

mantienen juntas sólo mediante fuerzas no covalentes. Si se encuentra una sola banda en cada uno de estos geles con SDS, correspondiente en peso molecular a la de la proteína nativa, podemos concluir que la proteína existe en condiciones fisiológicas como una única cadena polipeptídica. Si la banda o bandas observadas son de un peso molecular muy inferior, está indicada una estructura de múltiples subunidades. Aunque los valores de peso molecular obtenidos a partir de la electroforesis en gel pueden ser aproximados, deberán ser lo suficientemente exactos para una buena estimación del número de subunidades (véase el Problema 13).

Suponiendo que el examen indique que hay múltiples subunidades, ¿hay sólo un tipo o hay varios? La presencia de más de una banda en el gel con SDS es una indicación clara de que se trata de múltiples tipos de subunidades. Pero hallar sólo una banda no demuestra que las subunidades sean idénticas. De hecho, puede haber varios tipos de subunidades con distintas secuencias de aminoácidos pero pesos moleculares casi idénticos; estas subunidades distintas no pueden diferenciarse en geles con SDS. Para dejar claro que sólo está presente un tipo de cadena, el investigador debe recurrir a otros métodos. Si puede hallarse un modo de disociar la proteína sin utilizar detergentes o agentes caotrópicos, el enfoque isoeléctrico puede ser una técnica muy sensible (véase Herramientas de la Bioquímica 2A).

Determinación de los pesos moleculares exactos de las subunidades de las proteínas: espectrometría de masas

En los últimos años se ha aplicado una técnica física antigua (espectrometría de masas) al estudio de las proteínas, con resultados notables. En los espectrómetros de masas, las moléculas se ionizan y posteriormente se aceleran a través del vacío mediante un campo eléctrico. Las partículas con distinta relación masa/carga se separan mediante su deflexión en un campo magnético o bien simplemente midiendo su "tiempo de vuelo" hasta un detector. (Véase la Figura 6B.3.)

Cada molécula recibe una carga determinada (con frecuencia sólo unas pocas unidades electrónicas, + o −) durante su ionización. El campo eléctrico entre el ánodo (la fuente) y un cátodo que contiene una pequeña apertura proporciona a cada molécula una energía cinética proporcional a su carga. Consideremos dos macromoléculas de masa diferente, cada una de las cuales recibe una unidad de carga positiva. La energía cinética para cada una será la misma, pero sus velocidades serán diferentes ya que $E = \frac{1}{2}\, mv^2$. Cuanto mayor sea la molécula se moverá más lentamente. De esta forma, midiendo el tiempo de llegada al detector a través de la región "de deriva" en el espectrómetro de masas, se puede medir la masa molecular.

Los resultados pueden ser muy exactos, del orden de una parte por 10 000 para moléculas del tamaño de la hemoglobina, lo cual es suficientemente exacto para detectar pequeños cambios de la secuencia de aminoácidos. La técnica se ha ampliado para poder estudiar moléculas del tamaño de las inmunoglobulinas (alrededor de 150 000 Da).

Bibliografía

Chait, B. T. y S. B. H. Kent (1992) Weighing naked proteins: Practical, high-accuracy mass measurement of peptides and proteins. *Science* 257:1885-1893.

Hames, B. D. y D. Rickwood, eds. (1990) *Gel Electrophoresis of Proteins*, 2ª ed. IRL Press, Oxford, Washington, D.C.

Senko, M. W. y F. W. McLafferty (1994) Mass spectrometry of macromolecules. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:763-785.

van Holde, K. E., W. C. Johnson y P.-S. Ho (1998) *Principles of Physical Biochemistry*, Capítulos 4-6. Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J.

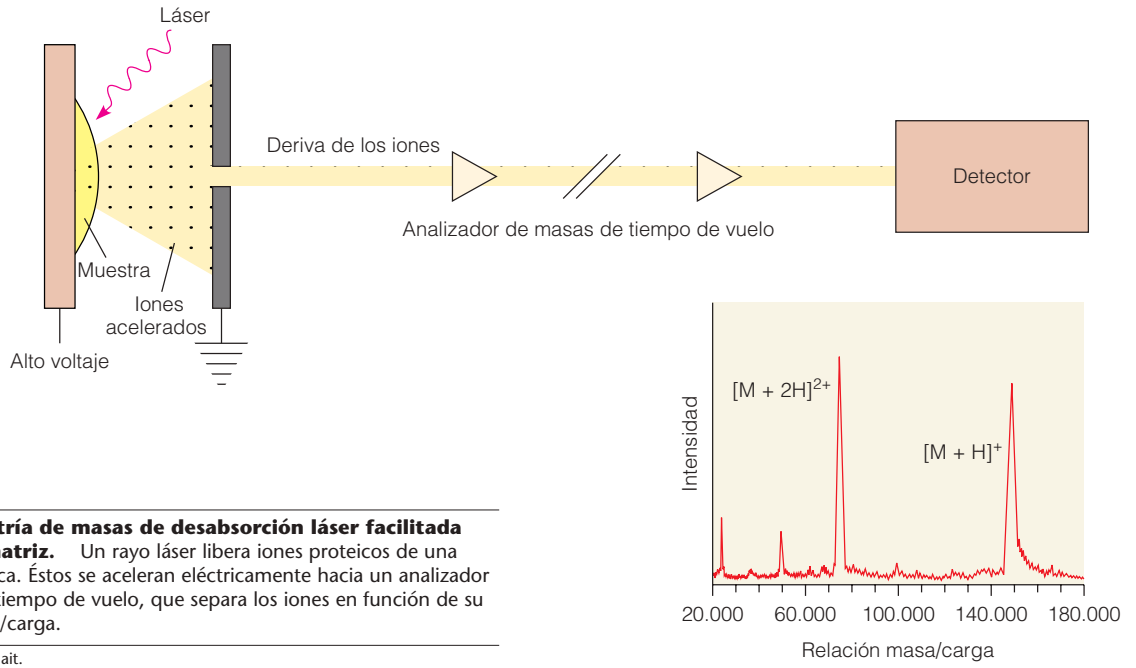


FIGURA **6.B3**

Espectrometría de masas de desabsorción láser facilitada mediante matriz. Un rayo láser libera iones proteicos de una matriz orgánica. Éstos se aceleran eléctricamente hacia un analizador de masas de tiempo de vuelo, que separa los iones en función de su relación masa/carga.

Cortesía de B. Chait.

CAPÍTULO 7

Función y evolución de las proteínas

UNA VEZ ALCANZADO EL CONOCIMIENTO DE LAS COMPLEJAS ESTRUCTURAS plegadas de las proteínas globulares, estamos en disposición de examinar con mayor detalle la manera en la que están relacionadas estas estructuras con las funciones de las moléculas. Utilizaremos como ejemplos en este capítulo dos grupos de proteínas, las globinas y las inmunoglobulinas, cuya función principal es la unión de otras moléculas.

Para empezar, examinaremos la **mioglobina** (abreviada como **Mb**) y su análogo molecular, la **hemoglobina** (**Hb**), miembros de una familia de proteínas denominadas colectivamente **globinas**. Hemos elegido estos ejemplos por diversas razones. En primer lugar, las hemoglobinas y las mioglobinas desempeñan funciones esenciales en uno de los aspectos más importantes del metabolismo animal: la adquisición y utilización del oxígeno. El mecanismo de generación de energía más eficaz de las células animales requiere oxígeno molecular para la oxidación de los alimentos. Por lo tanto, las proteínas que pueden llevar oxígeno a las células y almacenarlo hasta que sea necesario son esenciales para cualquier organismo superior. La mioglobina es la proteína de almacenamiento de oxígeno que utilizan prácticamente todas las especies animales, mientras que la hemoglobina se utiliza para el transporte de oxígeno en todos los vertebrados y en algunos invertebrados. Además, la hemoglobina desempeña una segunda función, consistente en la eliminación de CO_2 de los tejidos. El CO_2 es el producto principal de la oxidación de metabolitos, y debe eliminarse y exhalarse de forma continua. Estas funciones se ilustran esquemáticamente en la Figura 7.1.

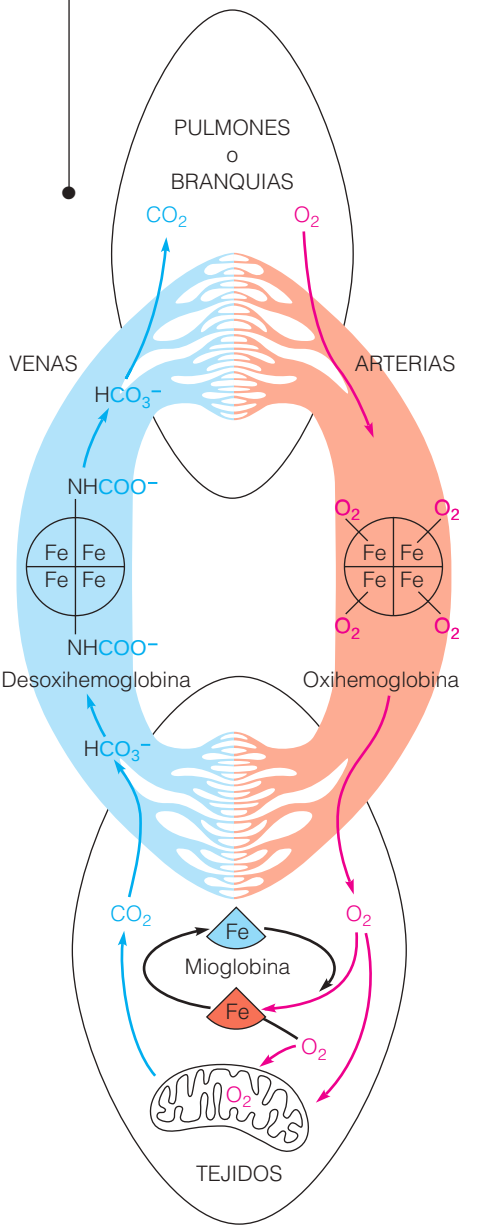


FIGURA **7.1**

Papel de las globinas en el transporte y almacenamiento del oxígeno. Los animales vertebrados utilizan la hemoglobina y la mioglobina para proporcionar a sus tejidos un suministro continuo de oxígeno. La hemoglobina transporta el oxígeno desde los pulmones o las branquias a los tejidos, en donde parte del mismo puede utilizarse directamente para el metabolismo en las mitocondrias. El resto del oxígeno puede almacenarse mediante su unión a la mioglobina y utilizarse posteriormente cuando la demanda de oxígeno sea intensa. El CO_2 liberado por los procesos oxidativos en los tejidos se transporta hacia los pulmones o las branquias por la hemoglobina, para su expulsión mediante la espiración.

Dado que el aporte de oxígeno y la captación de CO_2 deben regularse de forma cuidadosa para satisfacer las necesidades de los tejidos, estos ejemplos pueden enseñarnos mucho acerca de la regulación de la función proteica. Por último, la relación entre la hemoglobina y la mioglobina aporta algunas perspectivas importantes respecto a la forma en que evoluciona la función de las proteínas. Probablemente sabemos más sobre la estructura, la función y la evolución de la familia de la globina que sobre cualquier otro grupo de proteínas.

Mientras que las hemoglobinas y las mioglobinas están dedicadas fundamentalmente a la unión de un único tipo de molécula (el oxígeno), las **inmunoglobulinas** (o moléculas de anticuerpo) son estructuras proteicas que pueden producirse en multitud de formas para unir muchos tipos diferentes de moléculas en la respuesta inmunitaria. Nuestras defensas primarias frente a la enfermedad y a la infección dependen de la versatilidad de estas proteínas. En el Capítulo 11 se presentarán las relaciones estructura-función de otro grupo de proteínas muy grande e importante que son las enzimas.

Transporte y almacenamiento de oxígeno: funciones de la hemoglobina y la mioglobina

La hemoglobina y la mioglobina son proteínas que han evolucionado para realizar las funciones especializadas del transporte y almacenamiento de oxígeno en los animales. Cualquier animal que tenga más de unos milímetros de diámetro se enfrenta a un grave problema al realizar el metabolismo **aerobio** (que requiere oxígeno). Debe asegurar un aporte constante de oxígeno a sus células de todo el cuerpo y una eliminación de los productos de desecho metabólico como el dióxido de carbono. Estos gases difundirán a través de los tejidos, pero el transporte mediante difusión se hace muy lento si ha de recorrer distancias apreciables. Los insectos resuelven el problema mediante **tráqueas**, redes tubulares que van desde la superficie del cuerpo hacia dentro de los tejidos. Tienen, de hecho, aumentada su área superficial corporal hasta el punto en el que la difusión resulta practicable. Este mecanismo funciona porque los insectos son pequeños. (Por otra parte, podríamos decir que los insectos son pequeños porque se basan en este mecanismo para la obtención de oxígeno*.)

Todos los animales, excepto los más pequeños, necesitan una proteína, la hemoglobina en los vertebrados, para transportar el O_2 desde las branquias o los pulmones a los tejidos. La mioglobina es la proteína de almacenamiento de oxígeno que utiliza la mayor parte de los animales.

Casi todos los demás animales captan el oxígeno en los pulmones o las branquias, y lo bombean en la sangre a través de las arterias hasta los tejidos (véase la Figura 7.1). El dióxido de carbono vuelve a la sangre venosa y se libera en los pulmones o las branquias. En algunos organismos primitivos, los gases se disuelven simplemente en la sangre, pero este mecanismo es muy poco eficaz, ya que el oxígeno tiene una solubilidad baja. Es preciso bombear una cantidad elevada de sangre, con un gran gasto metabólico, para aportar siquiera una pequeña cantidad de oxígeno de esta forma. La evolución de todos los organismos superiores se ha acompañado del desarrollo de **proteínas transportadoras de oxígeno**, que permiten a la sangre transportar una cantidad de oxígeno mucho mayor de la que sería posible únicamente por solubilidad. Las proteínas transportadoras de oxígeno pueden estar disueltas en la sangre (como ocurre en algunos invertebrados) o concentradas en células especializadas, como los eritrocitos humanos que se muestran en la Figura 7.2. En todos los

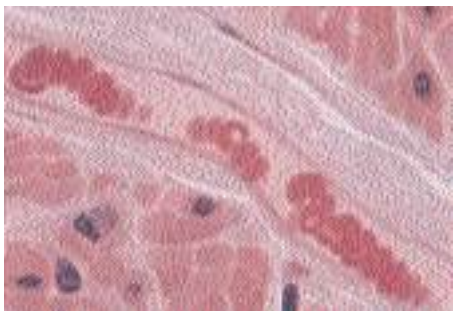


FIGURA **7.2**

Eritrocitos humanos. Estos glóbulos rojos o eritrocitos, se muestran moviéndose en un capilar. Cada eritrocito contiene unos 300 millones de moléculas de hemoglobina.

© E. Reschke.

* Esta hipótesis plantea un problema atractivo: ¿cómo se explica la existencia de las moscas dragón gigantes del período Carbonífero que tenían una envergadura de 60 cm? ¿Era entonces (hace alrededor de 300 millones de años) el contenido de oxígeno de la atmósfera más alto o utilizaban algún otro mecanismo para la captación de oxígeno? Las pruebas actuales sugieren que puede ser correcta la primera explicación.

vertebrados, la proteína transportadora de oxígeno es la hemoglobina, una proteína que puede recoger oxígeno en los pulmones o las branquias y repartirlo a los tejidos.

Una vez transportado el oxígeno a los tejidos, es preciso liberarlo para que sea utilizado. Algunos tejidos, como el músculo, necesitan reservas de oxígeno elevadas durante los períodos en los que las demandas energéticas son altas. Para garantizar una gran reserva de oxígeno, la mayoría de los animales utiliza la mioglobina para almacenar oxígeno. Incluso algunos organismos unicelulares (por ejemplo *Paramecium*) disponen de estas proteínas, probablemente para almacenar oxígeno para los períodos de déficit de éste.

La mioglobina y la hemoglobina están formadas sobre un motivo estructural común, como se muestra en la Figura 7.3. En la mioglobina, una sola cadena polipeptídica se pliega sobre un grupo prostético, el **hemo**, que contiene el lugar de unión del oxígeno. La hemoglobina es una proteína tetramérica, constituida por cuatro cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales se parece mucho a la mioglobina. Consideremos ahora la siguiente cuestión: ¿cómo desempeñan estas estructuras las funciones similares, aunque distintas, de almacenamiento y transporte de oxígeno? Empezaremos con la proteína más sencilla, la mioglobina, planteando primero cómo se une el oxígeno.

Mecanismo de unión del oxígeno por las hemoproteínas

Una molécula de almacenamiento o de transporte de oxígeno debe satisfacer requerimientos estrictos. Cualquier molécula de este tipo debe ser capaz de unir O_2, no permitirle que oxide ninguna otra sustancia (lo que reduciría el O_2), y liberar luego el O_2 en función de la demanda. ¿Cómo puede realizar esta función una molécula proteica? La estructura orgánica de una proteína es totalmente inadecuada en sí misma para la unión de oxígeno; sin embargo, determinados metales de transición, en sus estados de oxidación más bajos (en especial, el Fe(II) y el Cu(I)) tienen una fuerte tendencia a unir oxígeno. La evolución de la familia de proteínas mioglobina-hemoglobina ha producido una forma en la que el Fe(II) puede unirse a las proteínas de tal forma que se cree un lugar de unión para el O_2.

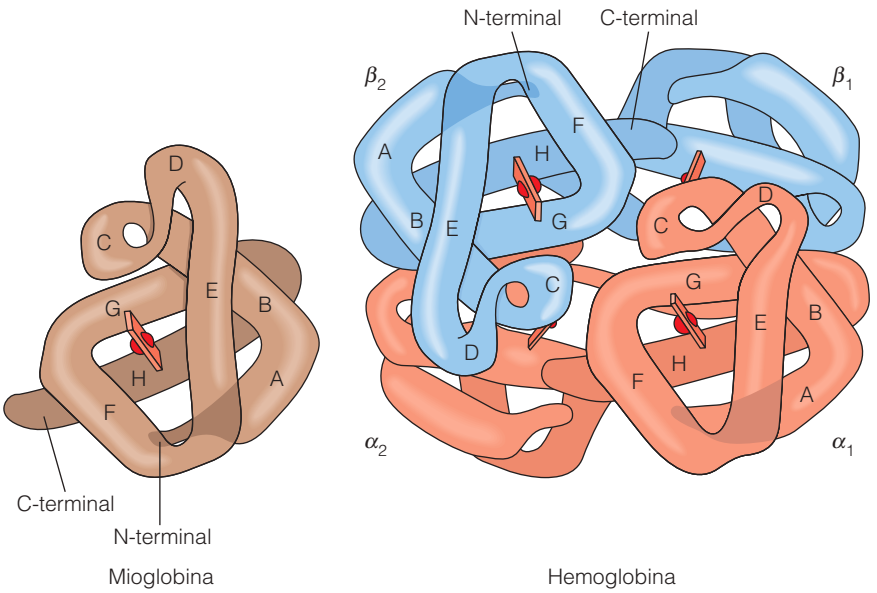


FIGURA **7.3**

Comparación de la mioglobina y la hemoglobina. Estos dibujos muestran las estructuras de las dos moléculas de unión de oxígeno tal como señala la cristalografía de rayos X. Cada una de las cuatro cadenas de la hemoglobina tiene una estructura plegada similar a la de la mioglobina, y cada una incluye un hemo (en rojo). La hemoglobina contiene dos cadenas α idénticas y dos cadenas β idénticas. Las cadenas α y β son muy similares pero pueden diferenciarse en su estructura primaria y en su forma de plegado. Las letras A-H señalan regiones de hélice α.

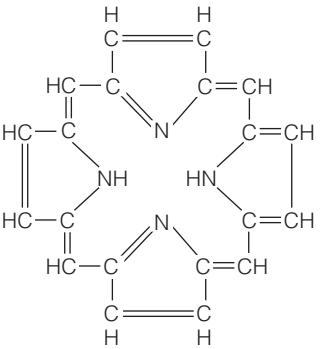
© Irving Geis.

LUGAR DE UNIÓN DEL OXÍGENO

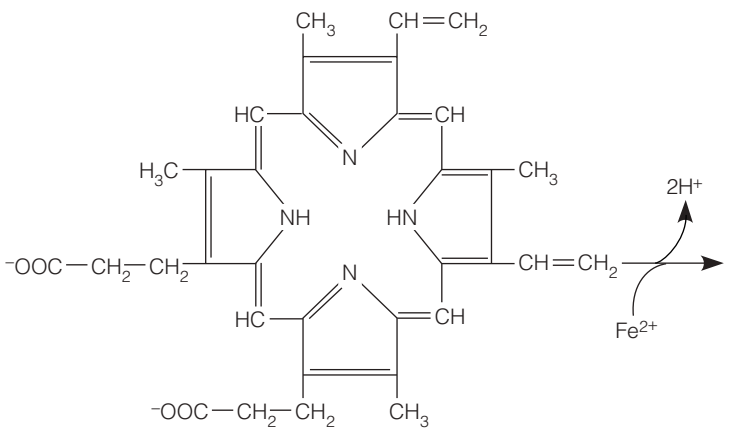
Diversas proteínas que contienen hierro pueden albergar el Fe(II) de varias formas posibles. En toda la familia mioglobina-hemoglobina, el hierro está quelado por un sistema de anillo tetrapirrólico denominado **protoporfirina IX**, que forma parte de una amplia clase de compuestos **porfirínicos**. La estructura de anillo básica de una porfirina se muestra en la Figura 7.4a y la de la protoporfirina IX se presenta en la Figura 7.4b. Encontraremos otras porfirinas en la clorofila (Capítulo 17), las proteínas citocrómicas (Capítulo 15) y algunos pigmentos naturales. Igual que la mayor parte de los compuestos con sistemas de anillos conjugados grandes, las porfirinas son intensamente coloreadas. El hierro porfirínico de la hemoglobina es el que explica el color rojo de la sangre, y el magnesio porfirínico de la clorofila es el responsable del color verde de las plantas.

La coordinación del Fe(II) en una porfirina (hemo) dentro de un bolsillo de globina hidrófobo, permite la unión del O_2 sin que se produzca la oxidación del hierro.

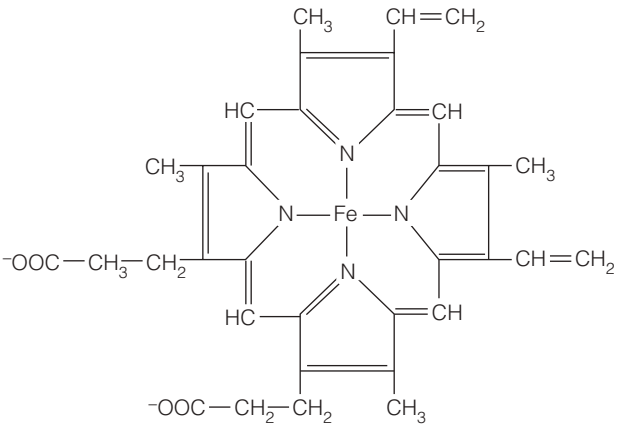
El complejo formado por la protoporfirina IX con el Fe(II) se denomina hemo (Figura 7.4c). Este grupo prostético está unido de forma no covalente en una hendidura hidrófoba en la molécula de mioglobina o de hemoglobina (véase la Figura 7.3). La unión del oxígeno al hemo se ilustra en la Figura 7.5, que muestra la forma oxigenada de la mioglobina. El hierro ferroso (Fe^{2+}) normalmente tiene una coordinación octaédrica, lo cual significa que debe tener seis **ligandos**, o grupos de unión, fijados a él. Como se observa en la Figura 7.5a, los átomos de nitrógeno del anillo de porfirina sólo incluyen cuatro de estos ligandos. Quedan dos lugares de coordinación, que se encuentran a lo largo de un eje perpendicular al plano del anillo. Tanto en la forma desoxigenada de la mioglobina como en la oxigenada, uno de estos lugares de coordinación que



(a) Porfina ($C_{20}H_{14}N_4$)



(b) Protoporfirina IX



(c) Ferroprotoporfirina (hemo)

FIGURA **7.4**

Estructura de las porfirinas. (a) La estructura del anillo de porfirina se observa claramente en la porfina, que es la más sencilla de las moléculas de porfirina. **(b)** La protoporfirina IX, más compleja, es la parte orgánica de la molécula de hemo. **(c)** El hemo, que es la protoporfirina IX formando complejo con Fe(II), es el grupo prostético de la hemoglobina y la mioglobina. Debido a la deslocalización de resonancia de los electrones del anillo de porfirina, todos los enlaces a los protones en la protoporfirina IX o al átomo de hierro en el hemo son equivalentes.

Adaptado de A. White et al., *Principles of Biochemistry, 6.ª* ed. (Nueva York: McGraw-Hill, 1978). © 1978 McGraw-Hill.

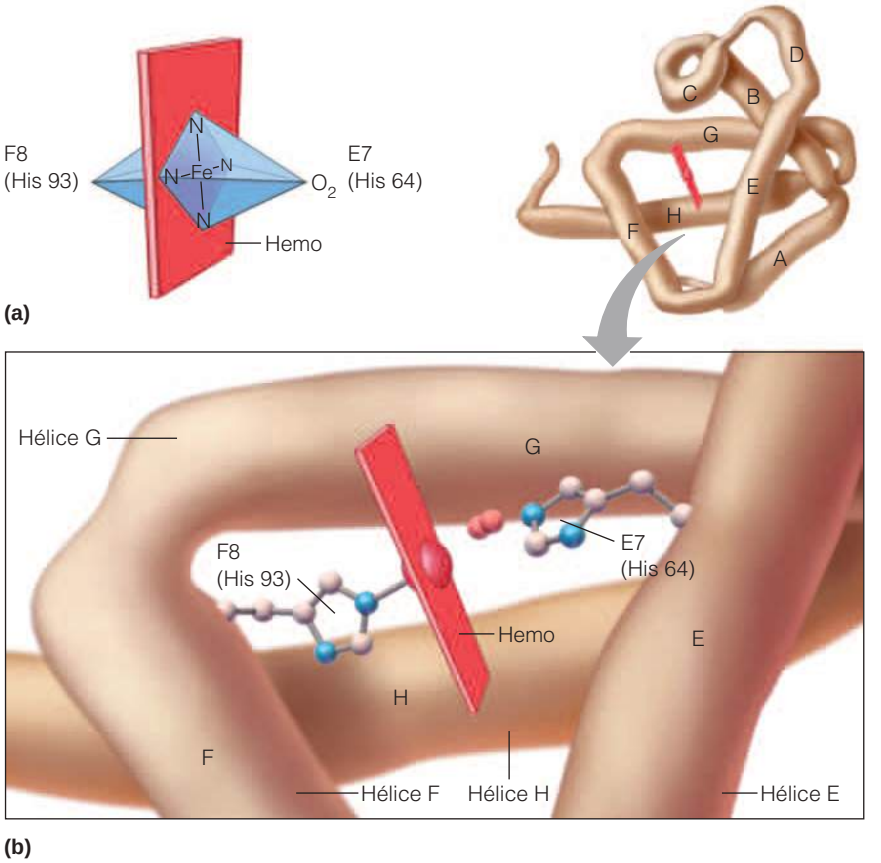


FIGURA **7.5**

Geometría de la coordinación del hierro en la oxihemoglobina. (a) Coordinación octaédrica del átomo de hierro. El hierro y los cuatro nitrógenos de la protoporfirina IX se encuentran próximos en un plano. Una histidina (F8 o His 93) ocupa una de las posiciones axiales, y el O_2 se mantiene en el otro lado por otra histidina (E7 o His 64). **(b)** Imagen ampliada del bolsillo del hemo, en la que se muestran las cadenas laterales de la histidina proximal (F8) y distal (E7).

quedan, está ocupado por el nitrógeno del residuo de histidina número 93. Los ocho segmentos helicoidales de las globinas se denominan con las letras A a H (como se indica en la Figura 6.1 y en la Figura 7.3) y el residuo 93 está situado en la hélice F (Figura 7.5b). En la nomenclatura habitualmente utilizada, este residuo se denomina histidina F8. Dado que está en contacto directo con el Fe, también se le denomina histidina **proximal**. En la **desoximioglobina**, el lugar de coordinación restante, en el otro lado del hierro, está ocupado por una molécula de agua. Cuando se une al oxígeno, formando **oximioglobina**, la molécula de O_2 ocupa este lugar. En el otro lado del O_2 unido se encuentra la histidina **distal**, número 64, o E7. Así pues, la molécula de O_2 está emparedada entre el nitrógeno del anillo de la histidina distal y el átomo de hierro del hemo. En cada subunidad de la hemoglobina se encuentra un modo de unión del oxígeno casi idéntico.

Normalmente, una molécula de oxígeno con un contacto tan estrecho con un ion ferroso lo oxidaría al estado férrico [Fe(III)]. El grupo hemo solo no protege al hierro, ya que el hemo disuelto libre en una solución es fácilmente oxidado por el O_2; pero en el entorno hidrófobo protegido que proporciona el interior de la molécula de mioglobina o de hemoglobina, el hierro no se oxida con facilidad. El oxígeno está unido y se produce un reordenamiento electrónico temporal. Cuando se libera el oxígeno, el hierro permanece en estado ferroso, capaz de unir otro O_2. Cuando la mioglobina o la hemoglobina se almacenan en contacto con el aire, fuera del ambiente celular, el hierro se oxida lentamente, formando lo que se denomina **metamioglobina** o **metahemoglobina**. Cuando se produce esta oxidación, el lugar de unión se inactiva. Las metaproteínas no unen O_2 y el lugar de éste lo ocupa una molécula de agua.

La protección de un metal que une oxígeno frente a la oxidación irreversible es la razón fundamental de la existencia de la mioglobina y la hemoglobina. Estas dos moléculas proporcionan unos entornos en los que se permite el primer paso de una reacción de oxidación (la unión del oxígeno) pero se bloquea el paso final (oxidación).

Aunque el bolsillo del hemo está perfectamente adaptado para contener una molécula de O_2, también aceptará algunas otras moléculas pequeñas. La más importante de ellas desde el punto de vista fisiológico, es el monóxido de carbono, que tiene aproximadamente el mismo tamaño y configuración electrónica que el O_2. Sin embargo, el CO se fija a la mioglobina y a la hemoglobina con mucha mayor afinidad que el O_2, y esta unión no es fácilmente reversible. Esta propiedad explica por qué el CO es un gas tan tóxico; ocupa los lugares de unión del oxígeno y bloquea, por tanto, la respiración.

ANÁLISIS DE LA UNIÓN DEL OXÍGENO POR LA MIOGLOBINA

La unión del oxígeno por la mioglobina debe cumplir determinados requisitos fisiológicos. Como muestra la Figura 7.1, la mioglobina en los tejidos, especialmente en el músculo, acepta oxígeno de la hemoglobina de la sangre arterial circulante, y posteriormente lo cede a los orgánulos de las células que consumen oxígeno (las mitocondrias) cuando sus necesidades son suficientemente grandes. Para comprender estas funciones desde un punto de vista cuantitativo, debemos observar la forma en la que la unión de un ligando como el oxígeno depende de su concentración en los alrededores.

En primer lugar, debemos disponer de una forma de medir la concentración de oxígeno disuelto. De acuerdo con la ley de Henry, la concentración de cualquier gas disuelto en un líquido es proporcional a la *presión parcial* de ese gas sobre el líquido. Por tanto, podemos regular (y medir) cómodamente la concentración de O_2 disuelto regulando la presión parcial de O_2 sobre la disolución de mioglobina que se estudia. De hecho, expresaremos la concentración de oxígeno en forma de su presión parcial: P_{O_2}.

Para describir o estudiar la unión, debemos disponer de una forma de medir la fracción de las moléculas de mioglobina que transportan oxígeno. Cuando se oxigena la mioglobina, el espectro de absorción se modifica debido a los desplazamientos electrónicos en el anillo de porfirina. Este cambio permite la determinación espectrofotométrica de la fracción de las moléculas de mioglobina que están oxigenadas. Los resultados de estos análisis, utilizando mioglobina en disolución a pH neutro, se exponen en la Figura 7.6. Una gráfica de este tipo se denomina *curva de unión*, pues describe la dependencia de la fracción de los lugares de la mioglobina que tienen oxígeno unido a ellos (θ) respecto a la concentración (presión parcial) de oxígeno libre.

La curva de unión del oxígeno para la mioglobina tiene forma hiperbólica que puede explicarse como sigue. Dado que el equilibrio de unión se describe mediante la reacción

$$Mb + O_2 \rightleftharpoons MbO_2$$

tenemos que

$$K = \frac{[MbO_2]}{[Mb][O_2]} \qquad (7.1)$$

donde, la constante de equilibrio K se denomina **constante de asociación** o **constante de afinidad**. Las magnitudes indicadas entre corchetes indican concentraciones molares de mioglobina oxigenada $[MbO_2]$, mioglobina sin oxige-

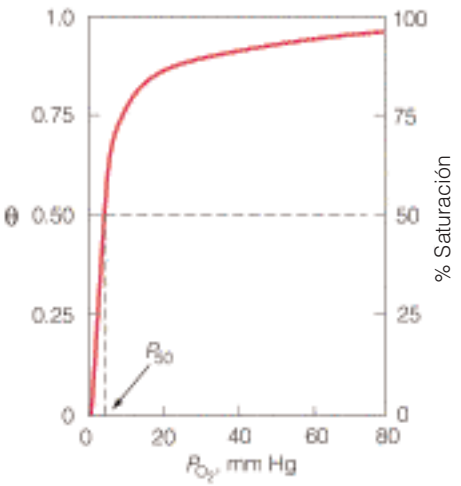


FIGURA **7.6**

Curva de unión del oxígeno de la mioglobina. La concentración de oxígeno libre se expresa como P_{O_2}, la presión parcial de oxígeno. La proporción de lugares de unión de la mioglobina que están ocupados se expresa mediante una fracción (θ, a la izquierda) o como porcentaje de saturación (a la derecha). Cuando la P_{O_2} se hace grande, la saturación se aproxima de manera asintótica, como describe la ecuación (7.6). El valor de P_{50}, la presión parcial de oxígeno a una saturación del 50%, se indica en el gráfico.

La unión de un ligando (como el O_2) a un único lugar en una proteína (como la Mb) se describe mediante una curva de unión hiperbólica.

nar [Mb], y oxígeno libre [O_2]. La fracción de lugares de la mioglobina ocupados se define de la forma siguiente:

$$\theta = \frac{\text{lugares ocupados}}{\text{lugares disponibles totales}} \tag{7.2}$$

Cada molécula de mioglobina tiene sólo un lugar, por lo que el número total de lugares potencialmente disponibles es proporcional a la concentración molar total de mioglobina, [MbO_2] + [Mb]. En consecuencia

$$\theta = \frac{[MbO_2]}{[Mb] + [MbO_2]} = \frac{K[Mb][O_2]}{[Mb] + K[Mb][O_2]} \tag{7.3}$$

donde hemos utilizado [MbO_2] = K[Mb][O_2] de la ecuación (7.1) para obtener la expresión de la derecha. La concentración de mioglobina sin oxígeno unido, [Mb], puede tomarse como factor común en el numerador y el denominador, y eliminarse, con lo que se obtiene

$$\theta = \frac{K[O_2]}{1 + K[O_2]} = \frac{[O_2]}{1/K + [O_2]} \tag{7.4}$$

La ecuación (7.4) puede volver a escribirse de la forma

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2]_{1/2} + [O_2]} \tag{7.5}$$

ya que $1/K = [O_2]_{1/2}$, la concentración de oxígeno cuando la mitad de las moléculas de hemoglobina tienen oxígeno unido a ellas. Se puede comprobar esta relación estableciendo $\theta = \frac{1}{2}$ en la ecuación (7.4). Dado que la concentración de oxígeno es proporcional a la presión parcial de oxígeno, la ecuación (7.5) puede formularse también de la forma siguiente

$$\theta = \frac{P_{O_2}}{P_{50} + P_{O_2}} \tag{7.6}$$

donde P_{50} es la presión parcial de oxígeno a la mitad de saturación.

Podemos comprobar que la ecuación (7.6) describe la curva de unión *hiperbólica* que se presenta en la Figura 7.6; θ comienza en cero a $P_{O_2} = 0$ y se aproxima a uno cuando P_{O_2} se hace muy grande. La P_{50} de la mioglobina es muy baja (unos 4 mm Hg), lo cual implica que la mioglobina tiene una afinidad elevada por el oxígeno. Esta característica es adecuada para una proteína que debe extraer oxígeno de la sangre. A la concentración de oxígeno que existe en los capilares (aproximadamente 30 mm Hg), la mioglobina de los tejidos adyacentes está casi saturada. Cuando las células están metabólicamente activas, su P_{O_2} interna disminuye hasta valores mucho más bajos. En estas condiciones, la mioglobina descargará su oxígeno.

Así pues, la molécula de mioglobina no sólo debe proporcionar un entorno para la unión reversible del oxígeno, sino que debe garantizar también que la constante de afinidad K (o P_{50}) tenga exactamente la magnitud adecuada. Podemos obtener una cierta perspectiva de la forma en que se realiza esta función si recordamos que la constante de afinidad es una constante de equilibrio y que, por tanto, debe ser el cociente de dos constantes, k_1 para la *reacción de unión* y k_{-1} para la *reacción de liberación.* Es decir,

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} \tag{7.7}$$

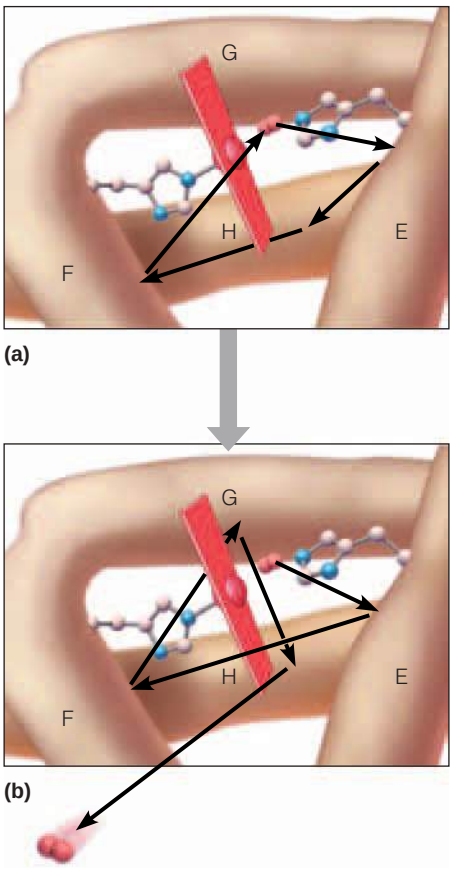


FIGURA **7.7**

Dinámica de la liberación de oxígeno por la mioglobina. **(a)** La molécula de O_2 se ha liberado del lugar de unión, pero rebota alrededor del bolsillo del hemo y puede volver a unirse. **(b)** El O_2 liberado escapa si las fluctuaciones de la estructura de la mioglobina abren un camino hacia el exterior.

Se consigue la eficacia del transporte de O_2 mediante la unión cooperativa en las proteínas con múltiples lugares, descrita por una curva de unión sigmoidea.

Así pues, la afinidad del oxígeno podría modularse a nivel molecular mediante la regulación de la unión o de la liberación. Todavía no es mucho lo que sabemos acerca de la reacción de unión, pero los estudios de cinética rápida han indicado que gran parte de la regulación se basa en la liberación del oxígeno. Las simulaciones por ordenador del comportamiento de la oximioglobina sugieren que el proceso limitante de la velocidad de liberación del oxígeno es la apertura de un camino para que la molécula de O_2 escape del bolsillo del hemo. De hecho, el oxígeno puede pasar algún tiempo dando vueltas por su jaula (y tal vez ser capturado de nuevo) antes de que se modifique lo suficiente la estructura terciaria de la mioglobina para permitirle escapar (Figura 7.7). Este proceso es un ejemplo explícito de un principio establecido en el capítulo precedente: los movimientos dinámicos internos de las moléculas proteicas globulares desempeñan un papel importante en la regulación de los procesos en los que intervienen las proteínas. La clave para determinar la *intensidad* de la unión del oxígeno a la mioglobina puede estar en la flexibilidad de la molécula de mioglobina.

Resumiendo, lo que observamos en la mioglobina es una estructura molecular complicada que se ha seleccionado a lo largo de la evolución hasta conseguir exactamente el entorno adecuado para permitir la unión y la liberación de oxígeno en las condiciones adecuadas.

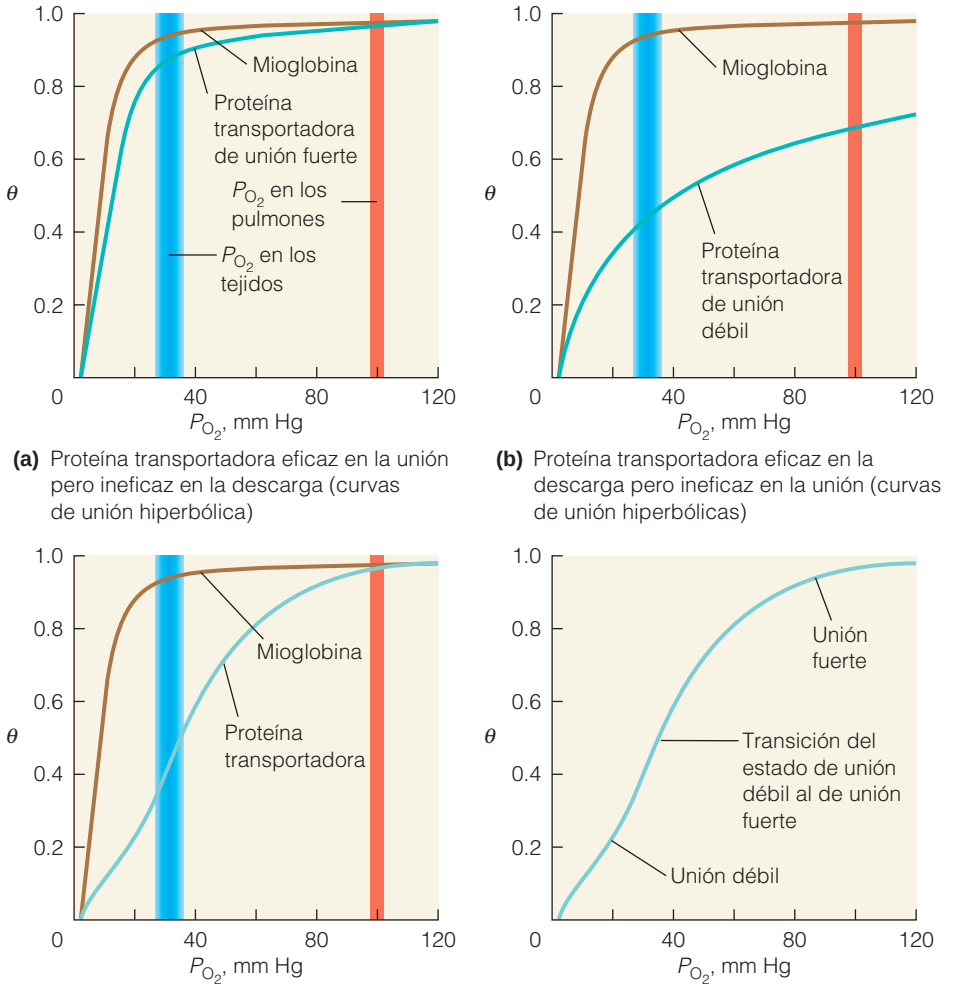
Transporte de oxígeno: hemoglobina

Todos los animales superiores contienen algún tipo de proteína transportadora de oxígeno. En los vertebrados y en algunos invertebrados, esta proteína es la hemoglobina. Todas las hemoglobinas son proteínas formadas por múltiples subunidades, a diferencia de las mioglobinas que contienen una única subunidad. ¿Cuál es el motivo? El estudio de esta cuestión descubre aspectos nuevos de la función proteica.

UNIÓN COOPERATIVA Y ALOSTERISMO

Consideremos las exigencias singulares que se plantean a una proteína transportadora de oxígeno. Para que resulte útil, debe aceptar oxígeno de manera eficaz a la presión parcial que existe en los pulmones o las branquias (aproximadamente 100 mm Hg) y luego ceder una fracción apreciable del O_2 a los tejidos, a una presión de unos 30 mm Hg. En otras palabras, una proteína transportadora de oxígeno ideal debería estar casi saturada a 100 mm Hg, e insaturada a aproximadamente 20-40 mm Hg. De esa forma, cada molécula de proteína transportadora podría ceder una parte importante de su carga de oxígeno. Si la proteína transportadora tuviera una curva de unión hiperbólica como la de la mioglobina, este comportamiento sería imposible de alcanzar. Con una curva de unión de este tipo, la proteína sería poco eficaz, tanto para la captación como para la cesión de oxígeno, como se indica en la Figura 7.8a y b.

El problema se ha resuelto mediante la evolución de las proteínas transportadoras de oxígeno que tienen la curva de unión *sigmoidea* que se muestra en la Figura 7.8c. Una curva sigmoidea es muy eficaz, ya que permite una saturación casi completa de la proteína en los pulmones o las branquias, así como una liberación máxima en los capilares. Podrá entender cómo es posible una curva de este tipo examinando la Figura 7.8d. A presiones de oxígeno bajas, la proteína actúa como si estuviera uniendo el oxígeno muy débilmente, pero a medida que se une más oxígeno, la afinidad por el oxígeno se hace mayor. Este comportamiento implica la existencia de una *interacción cooperativa* entre los lu-



(a) Proteína transportadora eficaz en la unión pero ineficaz en la descarga (curvas de unión hiperbólica)

(b) Proteína transportadora eficaz en la descarga pero ineficaz en la unión (curvas de unión hiperbólicas)

(c) Proteína transportadora eficaz en la unión y la descarga ya que tiene una curva de unión sigmoidea

(d) El paso de un estado de unión débil a uno de unión fuerte explica la curva sigmoidea

FIGURA **7.8**

Curva de unión requerida para una proteína transportadora. Estos gráficos muestran por qué una proteína transportadora de oxígeno, como la hemoglobina, debe tener una curva de unión sigmoidea. Los gráficos (a) y (b) indican lo que ocurriría si la proteína transportadora tuviera una curva hiperbólica como la de la mioglobina, con eficacia en la unión (a) o en la descarga (b). Los gráficos (c) y (d) muestran la curva de unión real de la hemoglobina. **(a)** Si la proteína transportadora tuviera una afinidad elevada por el O_2, que asegurara una saturación en los pulmones, la descarga de O_2 a la mioglobina en los tejidos sería poco eficaz. **(b)** Si la proteína transportadora tuviera una afinidad por el oxígeno menor, podría descargarlo a la mioglobina, pero entonces no se saturaría en los pulmones. **(c)** Una proteína transportadora que una de manera eficaz en los pulmones y descargue de manera eficaz en los tejidos requiere una curva de unión sigmoidea. **(d)** La curva de unión sigmoidea representa el cambio de la proteína transportadora de un estado de unión débil a presiones de oxígeno bajas, a un estado de unión fuerte a presiones de oxígeno elevadas.

gares de unión del oxígeno de la molécula proteica. La ocupación de los primeros lugares aumenta de algún modo la afinidad de los demás lugares por el oxígeno. También podemos expresar esta idea de otra forma equivalente, diciendo que la pérdida de algunos oxígenos de la proteína facilita el que ésta pierda más. Esta idea sólo puede ser cierta si se produce algún tipo de comunicación

La cooperatividad de la unión necesita de la comunicación entre los lugares de unión.

entre los lugares de unión. Una proteína con un solo lugar, como la mioglobina, no puede realizar este tipo de comunicación, puesto que una determinada molécula de mioglobina ignora por completo el estado de las demás. Se trata de entidades independientes.

En cambio, esta comunicación sí es posible entre las subunidades de unas proteínas con múltiples subunidades. Ésta es exactamente la estratagema que ha adoptado la evolución. Prácticamente todas las proteínas transportadoras de oxígeno son estructuras de múltiples subunidades, que presentan una interacción cooperativa entre sus lugares de unión.

En la línea de la evolución que ha conducido a los vertebrados, la proteína utilizada para el transporte de oxígeno es la hemoglobina*. La hemoglobina ha evolucionado a partir de la mioglobina más primitiva para formar la *estructura tetramérica* que se muestra en la Figura 7.3. Cada una de las subunidades tiene sus estructuras primaria, secundaria y terciaria, bastante similares a las de la mioglobina, pero las cadenas laterales de los aminoácidos en la hemoglobina proporcionan, además, otras interacciones necesarias (puentes salinos, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas) para estabilizar una determinada estructura cuaternaria.

Dado que la hemoglobina es un tetrámero, cada molécula de hemoglobina puede unir cuatro oxígenos, uno en cada uno de los cuatro lugares semejantes a los de la mioglobina. La diferencia funcional entre la hemoglobina y la mioglobina radica en la cooperatividad de unión que presentan los lugares de unión de la hemoglobina. Esta cooperatividad es posible porque el estado de oxigenación (lleno o vacío) de un lugar puede comunicarse a otro.

Hemos resaltado que esta cooperatividad es consecuencia de un "cambio" conformacional desde un estado de unión débil a un estado de unión fuerte. Este cambio no se ve fácilmente cuando se representan las curvas de unión como se hace en la Figura 7.8c o d, y estas curvas no proporcionan tampoco una forma fácil de medir el grado de cooperatividad. Un reordenamiento de la ecuación (7.6) permite ver mejor la cooperatividad. Si calculamos la cantidad $\theta/(1-\theta)$, obtenemos

$$\frac{\theta}{1-\theta} = \frac{P_{O_2}}{P_{50}} \tag{7.8}$$

O bien, tomando logaritmos a ambos lados de la ecuación,

$$\log \frac{\theta}{1-\theta} = \log P_{O_2} - \log P_{50} \tag{7.9}$$

El coeficiente de Hill es una medida de la cooperatividad de la unión.

La representación gráfica de $\log [\theta/(1-\theta)]$ frente a $\log P_{O_2}$ produce la denominada **representación de Hill** (Figura 7.9). La representación de Hill para una unión no cooperativa, según la ecuación (7.9), será una línea recta, con una pendiente = 1. En una representación de este tipo, el valor de la abscisa (esto es, el valor de $\log P_{O_2}$) que corresponde a $\log [\theta/(1-\theta)] = 0$, será igual a $\log P_{50}$. Consideremos ahora la representación de Hill para una proteína de unión cooperativa como la hemoglobina. Cuando la hemoglobina inicia la unión (a una P_{O_2} baja), su representación de Hill tiene una pendiente $\cong 1$, y corresponde al estado de unión débil (P_{50} grande). A medida que avanza la unión, la curva

* Sin embargo, la hemoglobina no es la única proteína de unión de oxígeno que utilizan los animales. La mayor parte de los moluscos y algunos artrópodos poseen una proteína bastante diferente, la hemocianina, que contiene cobre. Otros invertebrados utilizan una proteína que contiene hierro y que no tiene relación alguna con la hemoglobina, la hemeritrina. Esta variedad indica que a menudo puede llegarse a la misma función a través de varias vías evolutivas diferentes.

se desplaza para aproximarse a otra línea recta paralela que describe el estado de unión fuerte (P_{50} pequeña).

En una representación de Hill, es evidente la transición entre los estados de unión, y el comportamiento es inequívocamente diferente en los sistemas cooperativos y sin cooperatividad. Además, la representación de Hill proporciona una medida numérica directa del grado de cooperatividad, a partir de su pendiente máxima, n_H, que se denomina **coeficiente de Hill**. Pueden considerarse tres casos para una molécula con n lugares de unión:

1. $n_H = 1$: la molécula se une de forma no cooperativa. Esta situación puede producirse incluso con una proteína que disponga de múltiples lugares de unión, si éstos no se comunican entre sí.
2. $1 < n_H < n$: esta situación es la habitual en una proteína con una unión cooperativa, como se representa en la Figura 7.9. El coeficiente de Hill debe ser superior a la unidad para que la curva se desplace de la línea de unión débil a la línea de unión fuerte.
3. $n_H = n$: en esta situación hipotética, la molécula es *totalmente* cooperativa. En un caso así, una molécula ocuparía todos sus lugares antes de que ninguna otra hubiera captado oxígeno, con lo que en un momento dado del proceso de unión tan sólo habría moléculas completamente sin ligar y moléculas totalmente ligadas. Si se diera esa situación, la curva de unión tendría la siguiente forma

$$\theta = \frac{{P_{O_2}}^n}{{P_{50}}^n + {P_{O_2}}^n} \tag{7.10}$$

y la ecuación de Hill pasaría a ser

$$\log \frac{\theta}{1-\theta} = n \log P_{O_2} - n \log P_{50} \tag{7.11}$$

que corresponde a una línea recta con una pendiente = n. Este caso no se observa nunca en la realidad. Así, por ejemplo, el coeficiente de Hill de la hemoglobina ($n = 4$) es alrededor de 3 en condiciones fisiológicas.

La unión cooperativa del oxígeno por la hemoglobina es un ejemplo de lo que se denominan efectos **alostéricos**. En la unión alostérica, la captación de un ligando por una proteína influye sobre las afinidades de los lugares de unión restantes sin ocupar. Los ligandos pueden ser de la misma clase, como en este caso, o pueden ser diferentes. Como se presentará en el Capítulo 11, el alosterismo es también un mecanismo importante de regulación de la actividad de las enzimas. En ese caso, el alosterismo permite que un tipo de molécula pequeña regule la acción de una proteína sobre otro tipo de molécula. La capacidad de las proteínas con múltiples subunidades de permitir una regulación alostérica es una de las razones por las que estas proteínas participan tan frecuentemente en cadenas de reacciones que deben controlarse minuciosamente.

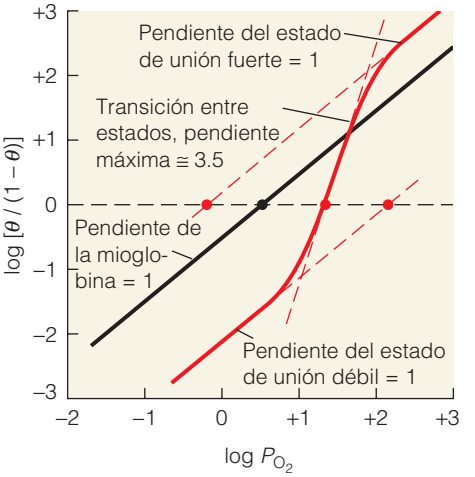


FIGURA **7.9**

Representaciones de Hill de la unión del oxígeno a la mioglobina y la hemoglobina. Los círculos indican la P_{50} de cada proteína y el estado de unión. La representación de la mioglobina, que une el oxígeno de manera no cooperativa, se indica mediante una línea negra continua con una pendiente de 1. La representación de la hemoglobina (en rojo), que une el oxígeno de manera cooperativa, muestra el cambio de un estado de unión débil (P_{50} grande) a un estado de unión fuerte (P_{50} pequeña) y tiene una pendiente máxima (coeficiente de Hill) de aproximadamente 3.5. Estos datos corresponden a proteínas en condiciones cercanas a las fisiológicas.

MODELOS DEL CAMBIO ALOSTÉRICO DE LA HEMOGLOBINA

¿Cómo se producen las transiciones alostéricas desde los estados de unión débil a los estados de unión fuerte? Se han elaborado varias teorías para describir las transiciones alostéricas, que pueden agruparse en tres clases. Aunque presentaremos estos modelos para la hemoglobina, pueden aplicarse, en general, para cualquier proteína alostérica con múltiples subunidades.

1. *Modelos secuenciales*: el prototipo de estos modelos es el de Koshland, Nemethy y Filmer (Figura 7.10a). El modelo KNF supone que las sub-

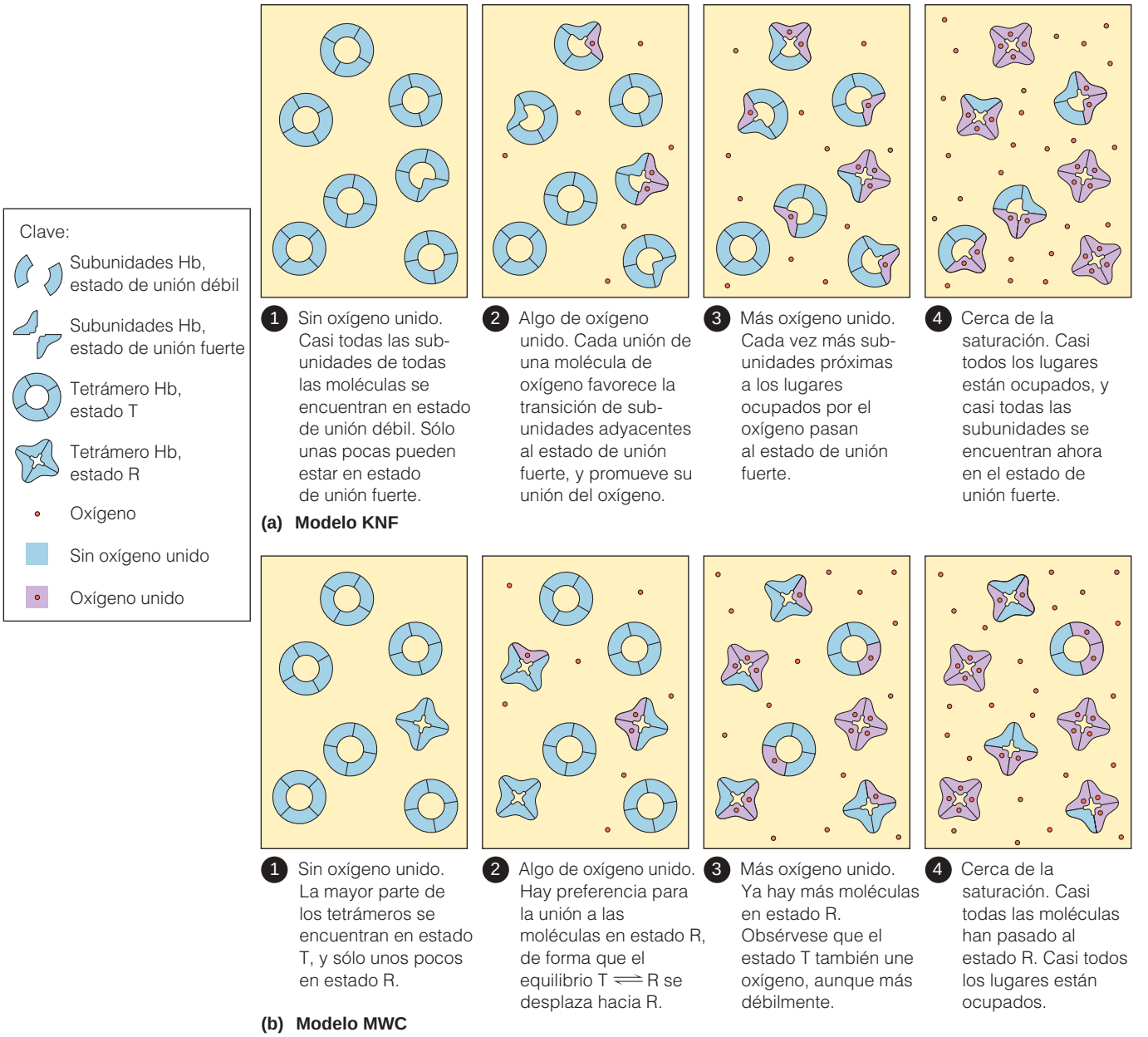


FIGURA **7.10**

Dos modelos de la transición cooperativa de la hemoglobina. Ambos modelos pueden explicar la unión cooperativa por algunas, aunque ciertamente no todas, las proteínas reales. **(a)** Modelo de Koshland, Nemethy y Filmer (KNF). A medida que cada subunidad une un ligando, se fomenta un cambio de conformación en la subunidad adyacente, que pasa a ser entonces de unión fuerte. **(b)** Modelo de Monod, Wyman y Changeux (MWC). Toda la molécula tiene dos estados diferentes (tenso (T) y relajado (R)) que están en equilibrio. La unión de ligandos desplaza el equilibrio hacia el estado de unión fuerte (R).

unidades pueden cambiar su conformación terciaria, una cada vez, en respuesta a la unión del oxígeno. La cooperatividad se produce porque la presencia de algunas subunidades portadoras de oxígeno favorece el estado de unión fuerte de las subunidades adyacentes, cuyos lugares no están ocupados aún. Así, a medida que avanza la oxigenación, casi todos los lugares pasan a ser de unión fuerte. Estos modelos se caracterizan por la existencia de moléculas con parte de las subunidades en estado débil y la otra parte en estado fuerte.

2. *Modelos concertados*: en el extremo opuesto se encuentra la teoría de Monod, Wyman y Changeux (Figura 7.10b). Según el modelo MWC, todo el tetrámero de hemoglobina se encuentra en un equilibrio entre dos formas. En el estado desoxi (T), todas las subunidades de cada molécula se encuentran en la conformación de unión débil, y en el estado oxi (R), todas se encuentran en la forma de unión fuerte. (Los símbolos T y R corresponden a "tenso" y "relajado", cuyo significado se verá en el apartado siguiente.) Se supone que existe un equilibrio entre estos estados, y la oxigenación parcial desplaza ese equilibrio hacia el estado R. El cambio es de tipo *concertado*, con lo que se excluyen específicamente las moléculas mixtas con algunas subunidades en un estado de unión débil y otras en un estado de unión fuerte.

3. *Modelos de estados múltiples*: en los últimos años se ha puesto claramente de manifiesto que ni el modelo KNF ni el modelo MWC pueden explicar *exactamente* el comportamiento alostérico de las proteínas, incluyendo la hemoglobina. Por consiguiente, se han diseñado modelos más complejos. La mayor parte de estos modelos conservan el concepto de MWC de un cambio concertado de conformación, pero consideran más de dos estados para la molécula completa. Veremos que se necesita un modelo más complejo para la hemoglobina.

CAMBIOS DE LA ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA QUE ACOMPAÑAN A LA UNIÓN DEL OXÍGENO

Para comprender el comportamiento alostérico de la hemoglobina, es necesario examinar la proteína con mayor detalle. La hemoglobina de los vertebrados superiores está formada por dos tipos de cadenas, denominadas α y β. En la Figura 7.11 se comparan sus correspondientes estructuras primarias con las de la mioglobina. Como puede observarse, las secuencias α y β tienen una semejanza considerable entre sí y una cierta semejanza con la secuencia de la mioglobina. Los residuos esenciales, como las histidinas proximal y distal (F8 y E7, respectivamente), están conservados, y parece que los que son cruciales para la estructura terciaria están también conservados, puesto que las cadenas de hemoglobina y mioglobina tienen una estructura terciaria muy similar. La molécula de hemoglobina contiene dos cadenas de cada tipo, con lo que la molécula completa puede denominarse un tetrámero $\alpha_2\beta_2$. Las cadenas están colocadas en una disposición aproximadamente tetraédrica, como se muestra esquemáticamente en la Figura 7.3. Cuando la hemoglobina se disuelve en disoluciones de urea concentradas, se disocia en dímeros $\alpha\beta$, lo cual sugiere que los contactos más próximos y fuertes son los que existen entre las cadenas α y β, y no los α-α o β-β. En otras palabras, la molécula podría considerarse un dímero de dímeros $\alpha\beta$. En la Figura 7.3 se muestra también que los grupos hemo, con sus lugares de unión de O_2, están todos próximos a la superficie pero *no* próximos entre sí. Por tanto, no podemos buscar el origen de la unión cooperativa en algo tan poco sutil como una interacción directa hemo-hemo.

En la Figura 7.12a y b se presenta una clave para explicar lo que ocurre realmente durante la oxigenación. En esta figura se presentan dos puntos de vista del cambio estructural al pasar del estado desoxigenado a la molécula totalmente oxigenada que lleva cuatro oxígenos. Los estudios de difracción de rayos X descubren que lo que ocurre es básicamente un cambio de la estructura cuaternaria, que se acompaña de unos cambios mucho menores de la estructura terciaria. Un par dímero $\alpha\beta$ rota y se desliza respecto al otro, como se aprecia en la Figura 7.12a. Este movimiento hace que las cadenas β se aproximen y estre-

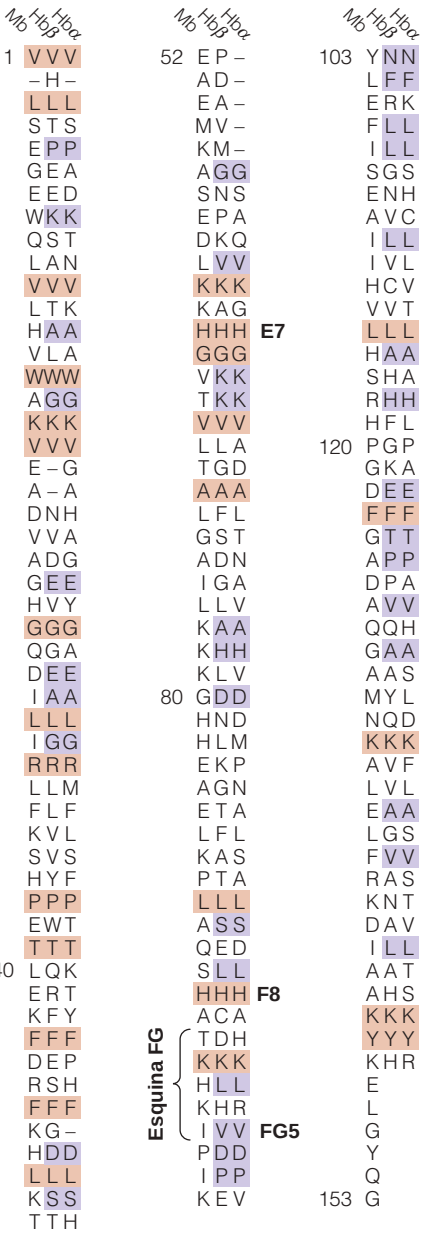


FIGURA **7.11**

Comparación de las secuencias de la mioglobina y de las cadenas α y β de la hemoglobina. Las secuencias alineadas corresponden a la mioglobina de la ballena y a las dos cadenas de la hemoglobina humana. Se han insertado huecos (indicados mediante guiones) donde era necesario, para establecer la alineación máxima de las secuencias; los números de los residuos que se indican a la izquierda de las cadenas corresponden a la secuencia de la mioglobina. Cuando un residuo es crucial para la función de estas proteínas se indica a la derecha de las cadenas; F8 y E7 son las histidinas proximal y distal, respectivamente (véase la Figura 7.5). El color marrón indica los residuos que son comunes a las tres cadenas, y el color púrpura los residuos que son comunes a ambas cadenas de hemoglobina.

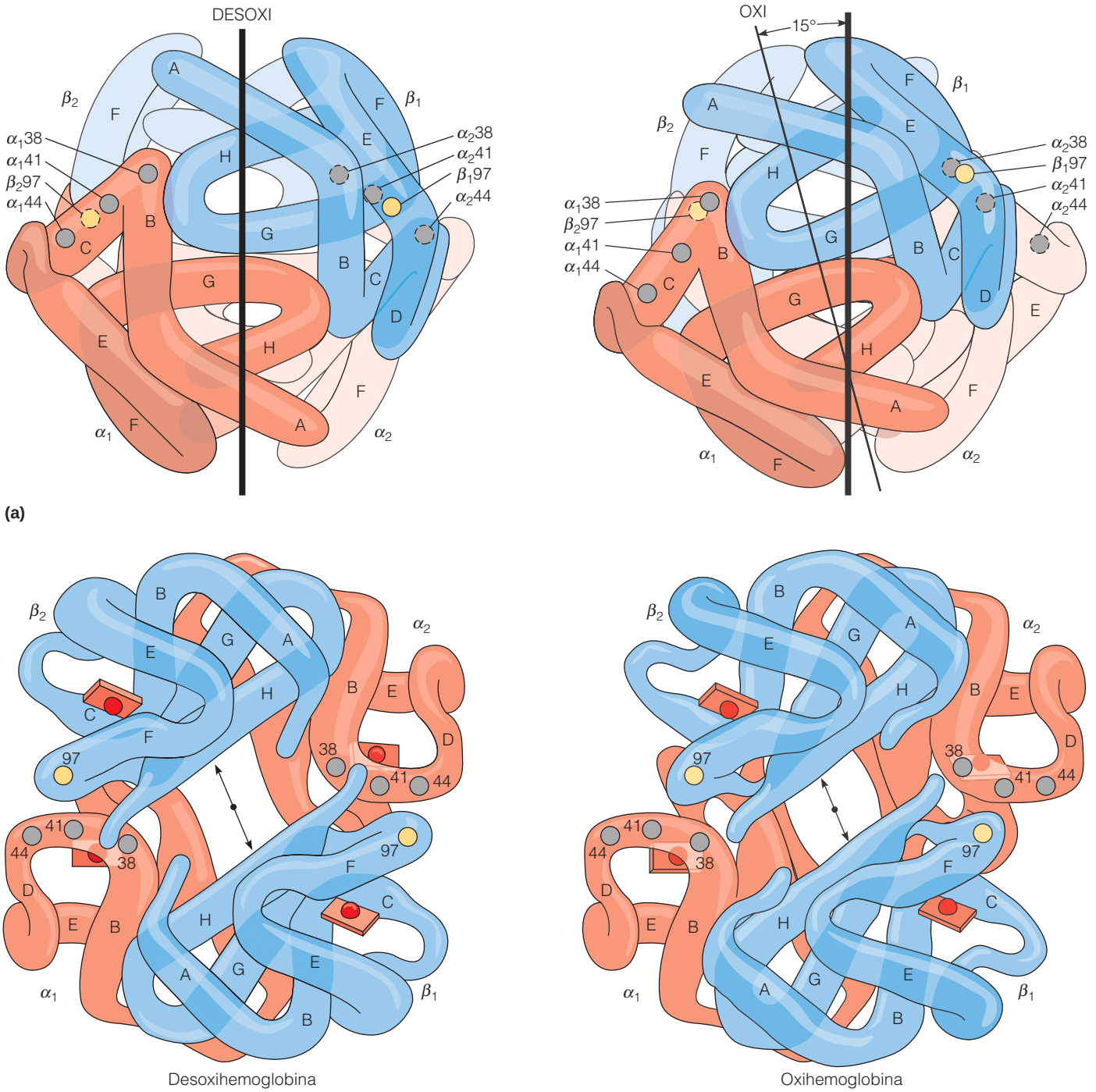


FIGURA **7.12**

Cambio de la estructura cuaternaria de la hemoglobina durante la oxigenación. **(a)** Se muestra la transición a lo largo de un eje perpendicular al eje binario, con el dímero $\alpha_1\beta_1$ (áreas de color azul y rojo oscuro) enfrente del dímero $\alpha_2\beta_2$. La desoxihemoglobina se muestra en el lado izquierdo, y la oxihemoglobina en el derecho. Obsérvese la rotación de $\alpha_1\beta_1$ con respecto a $\alpha_2\beta_2$, y el desplazamiento de β97 con respecto a α41 y α44. La rotación de aproximadamente 15° se acompaña de un deslizamiento, puesto que el centro de rotación no tiene una localización central. **(b)** Imágenes de la hemoglobina desde arriba, mirando hacia abajo del eje binario (punto en el centro). Las dos subunidades β están en primer plano; las subunidades α se encuentran en un segundo plano. Obsérvese que en la desoxihemoglobina la cavidad central es amplia, y que el residuo 97 de una cadena β se encuentra entre los residuos 41 y 44 de la cadena α adyacente. El cambio del estado desoxi al estado oxi es evidente por la reducción de tamaño de la cavidad central y el desplazamiento del contacto del residuo β97 con la cadena α.

© Irving Geis.

cha una cavidad central de la molécula, como puede verse en la Figura 7.12b. Así pues, en una primera aproximación, podemos considerar la molécula de hemoglobina como poseedora de dos estados de estructura cuaternaria, uno característico de la forma desoxi y el otro favorecido por la forma oxi. La estructura oxi es la que tiene mayor afinidad por el O_2, y el paso a este estado es lo que explica la cooperatividad de la unión.

Podemos interpretar ahora la representación de Hill de la Figura 7.9 en términos de un cambio alostérico de este tipo entre dos conformaciones moleculares. Las moléculas de hemoglobina completamente desoxigenadas se encuentran en la conformación desoxi, por lo que cuando se añade oxígeno a una disolución de moléculas de este tipo, la unión se produce inicialmente siguiendo la línea correspondiente al estado de unión débil. Sin embargo, la oxigenación parcial favorece la transición al estado oxi de unión fuerte. Con la unión del oxígeno, cada vez son más los lugares de unión restantes de las moléculas de hemoglobina que tienen esta conformación. En consecuencia, la curva de unión se traslada a la que corresponde al estado de unión fuerte. Cuando se ocupan los últimos lugares, todas las moléculas han adoptado la forma de unión fuerte. Sin embargo, esto deja sin contestar muchas cuestiones importantes. ¿Qué desencadena el cambio? ¿Son suficientes los modelos KNF o MWC para explicar los resultados?

Las hemoglobinas de los vertebrados son tetrámeros ($\alpha_2\beta_2$) formados por dos tipos de cadenas similares a la mioglobina.

UN EXAMEN MÁS DETALLADO DEL CAMBIO ALOSTÉRICO DE LA HEMOGLOBINA

Dado que la difracción de rayos X ha hecho posible determinar los detalles de los estados desoxi y oxi de la hemoglobina, es posible ya formular una descripción bastante completa del cambio global y especular con respecto a su mecanismo.

La transición desde la conformación desoxi a la conformación oxi comporta alteraciones importantes de las características de la interacción subunidad-subunidad. Puede obtenerse algún conocimiento de este proceso mediante un análisis más detenido de la Figura 7.12b. Obsérvese la región situada en el extremo inferior izquierdo, donde la subunidad β_2 interacciona con la cadena α_1. En la forma desoxi, el C-terminal de β_2 (residuo 146) se encuentra sobre la hélice C de α_1 (residuos 36-42) y se mantiene en esta posición mediante una red de enlaces de hidrógeno y puentes salinos. La His 97 de la esquina FG de la β_2 es empujada contra la esquina CD de la α_1 entre Thr 41 y Pro 44. En la forma oxi, la rotación y deslizamiento de las subunidades han empujado los C-terminales de las cadenas β apartándolos de los contactos α (Figura 7.12b). Los puentes salinos y los enlaces de hidrógeno que sostienen el C-terminal se han roto, y la His 97 de la β_2 se encuentra ahora entre Thr 38 y Thr 41 de α_1. Dada la simetría de la estructura, se producen una serie de cambios exactamente equivalentes en la interfase $\alpha_2\beta_1$. Es como si la molécula hubiera "saltado" a un nuevo conjunto de interacciones. En el proceso se han roto varias interacciones fuertes (en concreto las que afectan a los C-terminales). En términos del modelo MWC, esta conformación más laxa se denomina *relajada* (R). El precio energético de este cambio se paga mediante la unión del O_2 a la molécula. Una vez que ha salido el O_2, la molécula vuelve de manera natural a su conformación desoxi de menor energía. Esta conformación más ajustada es, en la nomenclatura MWC, el estado *tenso* (T).

La oxigenación hace que se modifique la estructura cuaternaria de la hemoglobina: una pareja $\alpha\beta$ rota y se desliza con respecto a la otra.

¿De qué forma se comunica exactamente la energía de la unión del O_2 para producir este cambio molecular? De nuevo, los detalles son complicados, aunque puede obtenerse una ligera idea del mismo examinando la Figura 7.13, que muestra la relación de la His F8 y de la Val adyacente (FG5) con el hemo de la desoxihemoglobina. La figura incluye un hecho importante que no se ha mencionado

La forma oxi de la hemoglobina tiene una mayor afinidad por el O_2, lo cual explica la cooperatividad de la unión.

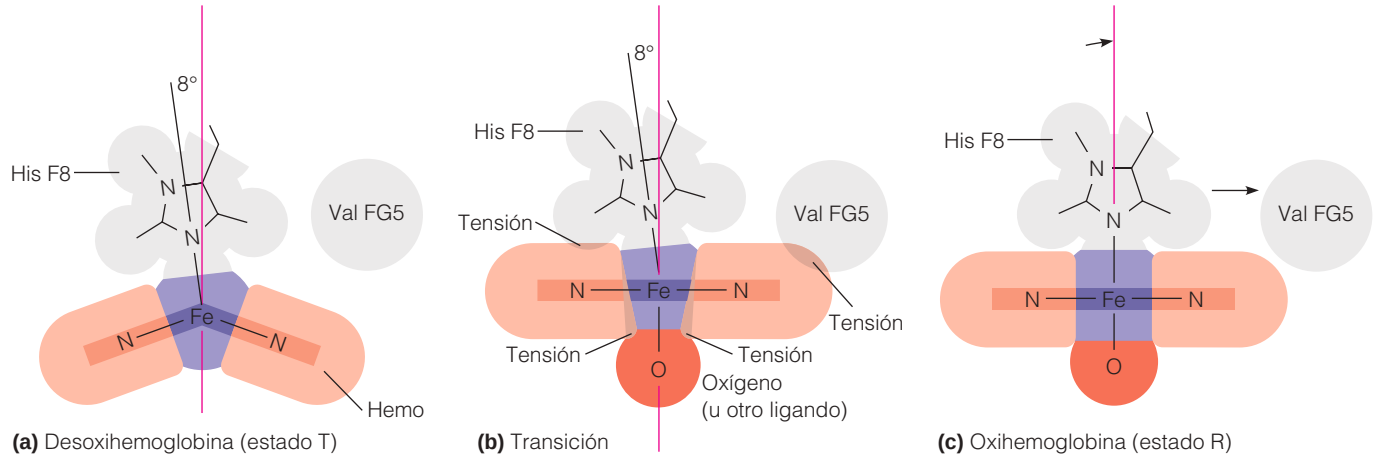


FIGURA **7.13**

Mecanismo de la transición T ⟶ R en la hemoglobina. La unión del oxígeno a la desoxihemoglobina produce cambios de conformación en el hemo. **(a)** En el estado desoxi, el hemo tiene una forma de cúpula, que se ha exagerado en esta figura. **(b)** La unión del ligando O_2 tira del hierro hacia el plano del hemo, aplanando el hemo y produciendo tensión. **(c)** Un cambio de la orientación de la His F8 alivia la tensión, debido en parte a que la Val FG5 es empujada hacia la derecha. De esta forma, el cambio terciario del hemo se comunica a la esquina FG.

antes: no sólo se encuentra el átomo de hierro de la conformación desoxi un poco por encima del plano del hemo, sino que el propio hemo no es del todo plano, sino que está distorsionado y adopta una forma de cúpula. Además, tanto en la desoximioglobina como en la desoxihemoglobina, el eje de His F8 no es exactamente perpendicular al hemo sino que presenta una inclinación de unos 8°. Cuando el oxígeno se une al otro lado, tira del átomo de hierro una corta distancia hacia abajo dentro del hemo y aplana éste (Figura 7.13b y c). Este cambio no puede producirse sin un reordenamiento molecular, puesto que un movimiento de este tipo acercaría demasiado al hemo el hidrógeno ε de His F8 y la cadena lateral de Val FG5. Lo que sucede es que la histidina cambia su orientación hacia la perpendicular, desplazando con ello la hélice F y la esquina FG. A su vez, este movimiento distorsiona y debilita todo el complejo de enlaces de H y puentes salinos que conectan las esquinas FG de una subunidad con las hélices C de otra. Por consiguiente, se produce el reordenamiento que se muestra en la Figura 7.12.

Expresado en términos más simples, lo que ha ocurrido es que la unión del O_2, al tirar del hierro una fracción de nanómetro dentro del hemo, ha producido mediante un efecto de palanca un desplazamiento mucho mayor de la estructura circundante, y en particular en las interfases cruciales α-β.

En 1970, M. F. Perutz, uno de los pioneros de los estudios de difracción de rayos X de las proteínas, propuso este mecanismo para explicar la cooperatividad de la unión del oxígeno. Pero, ¿corresponde con la realidad? Recientemente se han realizado experimentos ingeniosos que señalan que al menos es un planteamiento razonable. Barrick *et al.* (véase la Bibliografía) han utilizado la técnica de mutagénesis de lugar dirigida para sustituir los residuos de histidina proximales de las cadenas α y β por glicinas. A continuación, se estudió la proteína en presencia de imidazol 10 mM, de forma que la pequeña molécula de imidazol puede reemplazar al residuo de histidina *pero no está ligado a la hélice F* (véase la Figura 7.14). Como consecuencia, aunque la unión del oxígeno puede todavía aplastar al hemo, no desplaza a la hélice F. Lo que se observa es que, en gran medida, se pierde la cooperatividad de la unión, como predice el modelo de Perutz.

Los cambios descritos en el modelo de Perutz son un reordenamiento de la estructura *terciaria* de cada subunidad tras la unión del oxígeno. También sabemos que se produce un reordenamiento importante de la estructura cuaternaria entre los estados desoxi lleno y oxi lleno (T y R) del tetrámero completo. ¿Cómo se conectan los cambios estructurales terciarios y cuaternarios? Gran parte de la respuesta la ha proporcionado la investigación realizada en el laboratorio de Gary Ackers y se resume en la Figura 7.15. Los cambios de la estruc-

tura terciaria que acompañan a la unión del oxígeno pueden tolerarse hasta un punto determinado antes de que se produzca el cambio T ⟶ R. Concretamente, siempre que está ocupado un lugar en *cada* uno de los dos dímeros $\alpha\beta$, la molécula en su conjunto adopta la estructura cuaternaria R. Así pues, la hemoglobina *no sigue* completamente el modelo KNF ni el modelo MWC, sino una ruta novedosa que contiene características de ambos modelos. Este modelo más reciente no implica que los modelos anteriores sean en general incorrectos. Como veremos más adelante, existen proteínas alostéricas que parecen seguir de manera casi exacta el modelo MWC.

Efectos de otros ligandos sobre el comportamiento alostérico de la hemoglobina

La unión cooperativa y el transporte de oxígeno son tan sólo una parte del comportamiento alostérico de la hemoglobina. Las realidades de la fisiología animal imponen otras exigencias. En primer lugar, cuando el oxígeno se utiliza en los tejidos, se produce dióxido de carbono, que debe transportarse de vuelta a los pulmones o las branquias. La acumulación de CO_2 reduce también el pH en los eritrocitos mediante la *reacción del bicarbonato*,

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

Esta reacción de los eritrocitos la cataliza la enzima *anhidrasa carbónica*. Al mismo tiempo, la demanda de oxígeno elevada, especialmente en el músculo que está realizando una actividad enérgica, puede dar lugar a un déficit de oxígeno. Como se indicará en el Capítulo 13, una consecuencia de este déficit es la producción de ácido láctico, el cual reduce también el pH. La disminución del

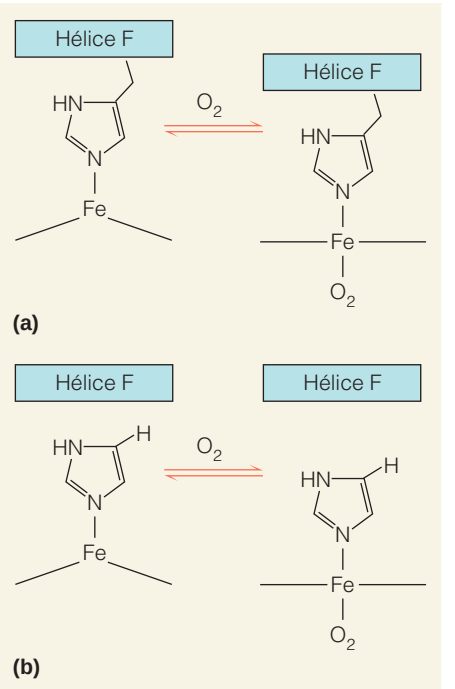


FIGURA **7.14**

Efecto de la sustitución de la histidina proximal de la hemoglobina por un residuo de glicina y la adición de un imidazol unido de forma no covalente. **(a)** Efecto de la unión del O_2 de acuerdo con el modelo de Perutz: la hélice F está dibujada hacia el hemo. **(b)** Ahora con la carencia de una conexión con el hemo, la hélice F no se altera por la unión del O_2 y no hay cooperatividad.

Adaptado de D. Barrick et al., *Nature Struct. Biol.* (1997) 4:78–83. © 1997 Macmillan Magazines, Ltd.

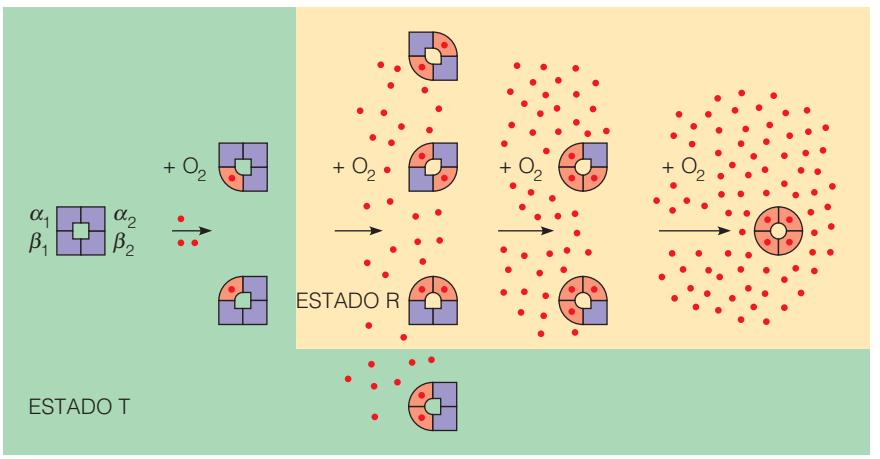


FIGURA **7.15**

Modelo reciente de la transición cooperativa de la hemoglobina. Este modelo, basado en estudios recientes, es más general que el de KNF o el de MWC (véase la Figura 7.10) e incluye características de ambos. Las subunidades se indican aquí con los dímeros $\alpha_1\beta_1$ a la izquierda, y los $\alpha_2\beta_2$ a la derecha. Las subunidades desoxigenadas tienen esquinas cuadradas, y las subunidades oxigenadas tienen esquinas curvas. A medida que progresa la oxigenación, se acumula la tensión terciaria. Siempre que los dos dímeros $\alpha\beta$ contengan una o más subunidades oxi, se produce la transición T ⟶ R. Así pues, las formas en el área verde son todas T, mientras que las del área amarilla son todas R. No se presentan todas las formas.

Adaptado de G. K. Ackers et al., *Science* (1992) 255:54–63. © 1992 American Association for the Advancement of Science.

pH en los tejidos y en la sangre venosa señala la exigencia de un mayor aporte de oxígeno.

La hemoglobina funciona de manera eficaz para satisfacer estas necesidades, utilizando para ello su transición alostérica entre estados de afinidad alta y de afinidad baja estructuralmente diferentes. El dióxido de carbono, los protones y otras sustancias que fomentan estos cambios se denominan **efectores alostéricos**.

RESPUESTA A LOS CAMBIOS DE pH: EFECTO BOHR

Un pH más bajo en los tejidos, indicativo de una demanda de O_2, facilita la descarga del O_2. Esta respuesta es el efecto Bohr.

Una caída del pH en los capilares tiene como consecuencia la reducción de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, lo cual permite una liberación aún más eficaz de las últimas trazas de oxígeno. Esta respuesta de la hemoglobina al cambio de pH se denomina **efecto Bohr**. La reacción completa puede escribirse de la forma siguiente

$$Hb \cdot 4O_2 + nH^+ \rightleftharpoons Hb \cdot nH^+ + 4O_2$$

en donde n tiene un valor algo superior a 2. Esta reacción tiene dos consecuencias fisiológicas. En primer lugar, en los capilares, los iones hidrógeno activan la liberación del O_2 al llevar la reacción hacia la derecha. Posteriormente, cuando la sangre venosa vuelve a circular hacia los pulmones o las branquias, la oxigenación tiene como efecto la liberación de H^+ mediante un desplazamiento del equilibrio hacia la izquierda. Esto tiende, a su vez, a liberar CO_2 del bicarbonato disuelto en la sangre mediante la inversión de la reacción del bicarbonato. El CO_2 libre puede espirarse ya.

El mecanismo del efecto Bohr puede explicarse mediante el modelo que se ha utilizado para explicar la unión cooperativa del O_2. Determinados lugares de unión de los protones de la hemoglobina tienen una afinidad más alta en la forma desoxi que en la forma oxi. Una contribución importante es la que procede del residuo histidina 146 que se encuentra en el C-terminal de cada cadena β. En la forma desoxi, este residuo puede formar un puente salino con Asp 94 de la misma cadena, *si la histidina está protonada*. Este residuo de histidina tiene un pK_a anormalmente alto, ya que el puente salino estabiliza el protón frente a la disociación. Pero en la forma oxi, este puente salino sencillamente no puede formarse, por lo que el pK_a disminuye hasta su valor normal de aproximadamente 6.5. Por consiguiente, al pH de la sangre (~7.4) la His 146 está en gran parte desprotonada en la oxihemoglobina, y una concentración elevada de protones, que favorece la protonación, también favorece la forma *desoxi* y activa por tanto la liberación de oxígeno.

También participan otros residuos en el efecto Bohr, incluyendo los grupos amino N-terminal de las cadenas α. El mecanismo básico es el mismo que para la His 146, a saber, los protones asociados con los residuos son efectores alostéricos que favorecen la conformación desoxi. En la Figura 7.16 se presenta el efecto de la reducción del pH sobre la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Obsérvese que una disminución del pH de tan sólo 0.8 unidades desplaza la P_{50} desde menos de 20 mm Hg a más de 40 mm Hg, aumentando en gran manera la cantidad de oxígeno descargada a la mioglobina.

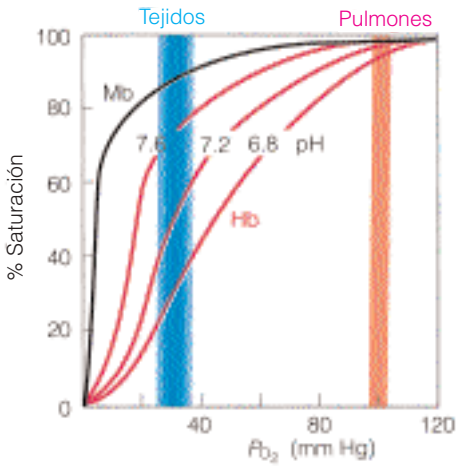


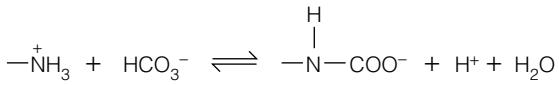
FIGURA **7.16**

Efecto Bohr en la hemoglobina. Se muestran las curvas de unión del oxígeno para la hemoglobina (Hb) a pH 7.6, 7.2 y 6.8. Obsérvese que la eficacia de la descarga del oxígeno, medida por las diferencias en las curvas a P_{O_2} = 30 mm Hg, aumenta en gran manera a medida que cae el pH. Cuando la sangre va de los pulmones a los tejidos, el pH inferior hace que se desplace la unión del oxígeno a las curvas de menor afinidad. La mioglobina (Mb) muestra poco efecto Bohr, por lo que su curva de unión de oxígeno es aproximadamente la misma a los tres valores de pH.

TRANSPORTE DEL DIÓXIDO DE CARBONO

La liberación del dióxido de carbono por parte de los tejidos que respiran reduce la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno de dos formas. En primer lugar, como se ha mencionado antes, parte del dióxido de carbono se convierte en bicarbonato, liberando protones que contribuyen al efecto Bohr. Parte de este

bicarbonato se transporta fuera de los eritrocitos y se lleva disuelto en el suero sanguíneo. Una parte reacciona directamente con la hemoglobina, uniéndose a los grupos amino N-terminales de las cadenas para formar **carbamatos**:



Esta *reacción de carbamación* permite a la hemoglobina facilitar el transporte del CO_2 desde los tejidos a los pulmones o las branquias. Tiene, además, otros dos efectos. En primer lugar, los protones liberados por la unión del HCO_3^- contribuyen al efecto Bohr. En segundo lugar, se introduce un grupo con carga negativa en el N-terminal de las cadenas, que estabiliza la formación de puentes salinos entre las cadenas α y β, que es característico del estado desoxi. Tanto este último efecto como el pH menor activan la liberación de oxígeno cuando es abundante el CO_2. La reacción en sentido contrario, que se produce en los pulmones y las branquias, es igualmente importante. En este caso, la concentración elevada de O_2 favorece la oxigenación y, por tanto, la forma oxi de la molécula. Cuando se produce este cambio, se reduce la estabilización de los N-terminales carbamados, y se expulsa y espira el CO_2.

Podemos resumir los efectos del H^+ y del CO_2 mediante el ciclo respiratorio que se muestra en la Figura 7.1. En los pulmones o las branquias de un animal, es abundante el O_2. La oxigenación favorece la conformación oxi de la hemoglobina, que estimula la liberación de CO_2. Cuando la sangre se desplaza por las arterias hacia los capilares de los tejidos, el pH menor y el contenido elevado de CO_2 favorecen la forma desoxi, con lo que se facilita la liberación de O_2 y la unión de CO_2. El dióxido de carbono, tanto al formar bicarbonato como al reaccionar con la hemoglobina, produce la liberación de más protones, con lo que estimula en mayor medida la liberación de O_2 y la unión de CO_2.

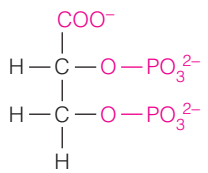
En la hiperventilación se observa una consecuencia de la falta de estimulación por el CO_2 de la liberación de O_2. Si una persona respira con demasiada rapidez, el CO_2 se elimina de manera eficaz desde los tejidos, y por consiguiente se ve dificultada la liberación de oxígeno hacia los mismos. Esta situación produce mareo y, en casos extremos, la pérdida del conocimiento. La hiperventilación puede corregirse fácilmente respirando dentro de una bolsa de papel, lo cual hace que el CO_2 espirado vuelva de nuevo a la sangre.

La hemoglobina transporta también CO_2 desde los tejidos a las branquias o los pulmones. El CO_2 actúa como efector alostérico de la unión del O_2.

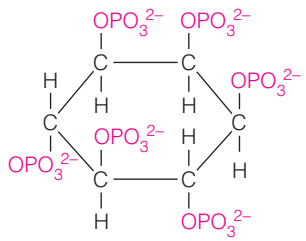
BISFOSFOGLICERATO

El H^+ y el CO_2 son los efectores que actúan rápidamente para facilitar el intercambio de O_2 y CO_2 en el ciclo respiratorio. Otro efector importante actúa en períodos de tiempo más largos para permitir a los organismos, como el ser humano, adaptarse a los cambios graduales de la disponibilidad de oxígeno. Es frecuente observar que las personas que se desplazan a zonas de gran altitud experimentan inicialmente cierta angustia, pero luego se aclimatan de manera gradual a la menor presión de oxígeno. Esta aclimatación se produce, en parte, mediante un aumento de la síntesis de hemoglobina, pero otro de sus efectos se debe a los cambios de la cantidad de un efector alostérico denominado **2,3-bisfosfoglicerato** (**BPG**) o glicerato-2,3-bisfosfato (Figura 7.17a). Al bisfosfoglicerato se le denominaba anteriormente difosfoglicerato (DPG), por lo que encontrará algunas veces esta denominación antigua en la literatura.

Al igual que los efectos producidos por el H^+ y el CO_2, la unión del BPG actúa reduciendo la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. A primera vista puede parecer una forma bastante extraña de adaptarse a una presión de O_2 más



(a) 2,3-Bisfosfoglicerato



(b) Inositol hexafosfato

FIGURA **7.17**

Dos compuestos aniónicos que se unen a la desoxihemoglobina.
(a) 2,3-bisfosfoglicerato (BPG), que se encuentra en los mamíferos. **(b)** Inositol hexafosfato (IHP), que se encuentra en las aves.

El bisfosfoglicerato (BPG) es un efector alostérico de la hemoglobina que regula los cambios a largo plazo de la afinidad por el O_2.

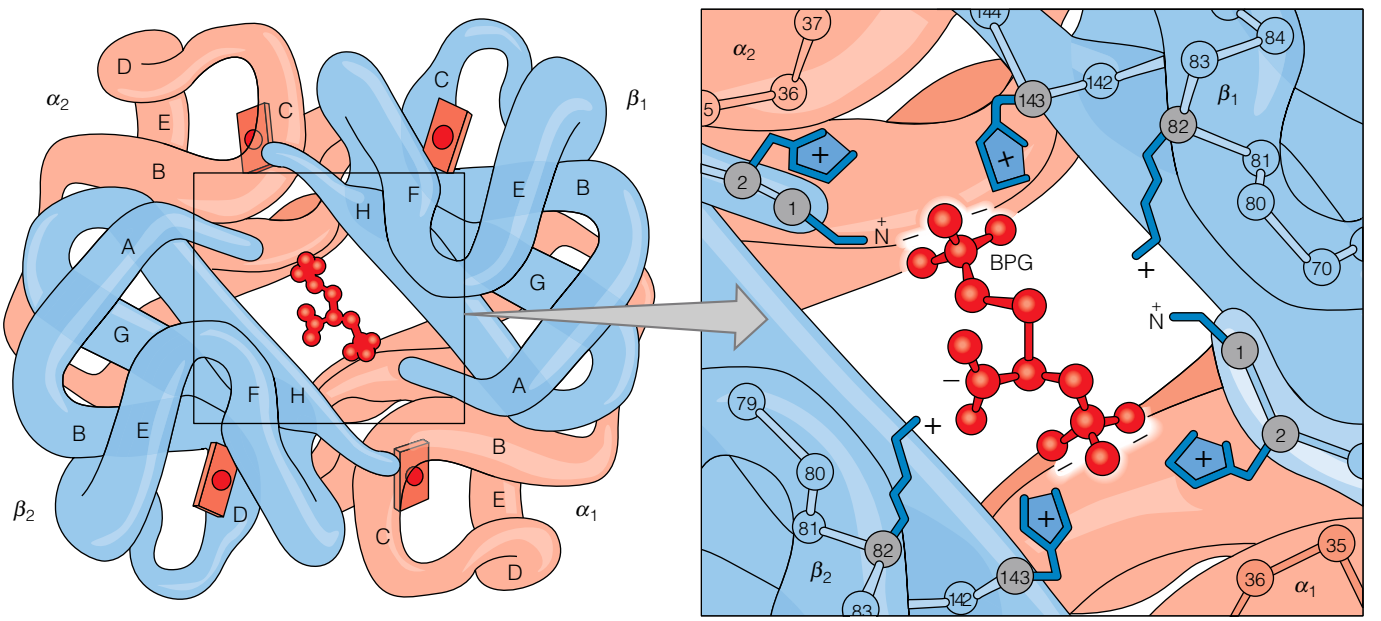
baja, pero de hecho, la descarga más eficaz del oxígeno en los tejidos compensa de manera sobrada la ligera reducción de la eficacia de carga en los pulmones. La acción del BPG se presenta en la Figura 7.18. El BPG se une en la cavidad existente entre las cadenas β, y establece interacciones electrostáticas con los grupos de carga positiva que circundan esta abertura. En la Figura 7.12b se muestra una comparación de las dos conformaciones de la hemoglobina, y en ella se observa que esta abertura es mucho más estrecha en la oxihemoglobina que en la desoxihemoglobina. De hecho, el BPG no puede acomodarse en la forma oxi. Cuanto mayor es el contenido de BPG de los eritrocitos, más estable es la estructura desoxi. De nuevo, una disminución de la afinidad por el O_2 se explica por la estabilización de la estructura desoxi. También se observan aumentos de las concentraciones de BPG en la sangre de los fumadores, ya que éstos, como consecuencia del monóxido de carbono existente en el humo, sufren también una limitación del aporte de oxígeno.

El BPG desempeña otro papel sutil, pero importante, en la respiración del ser humano y de otros mamíferos. Consideremos el problema con el que se enfrenta el feto, que debe obtener oxígeno de la sangre de la madre mediante el intercambio a través de la placenta. Para que este intercambio funcione bien, la sangre fetal debe tener una afinidad por el O_2 superior a la de la sangre de la madre. En realidad, el feto humano tiene una hemoglobina diferente de la del adulto. Mientras que la hemoglobina del adulto (HbA) tiene dos cadenas α y dos cadenas β ($\alpha_2\beta_2$), en el feto, las cadenas β están sustituidas por unos polipéptidos similares, pero que presentan claras diferencias. Estos polipéptidos se denominan cadenas γ, por lo que la estructura de la hemoglobina fetal (HbF) es $\alpha_2\gamma_2$. La afinidad intrínseca de la HbF por el oxígeno es muy similar a la de la HbA, pero la HbF tiene una afinidad por el BPG muy inferior a la que posee la HbA. Esta diferencia se debe en gran parte a la sustitución de la His 143 de la cadena β del adulto por una serina en la cadena γ fetal. Como se muestra en la Figura 7.18, la His 143 con carga positiva facilita la unión de la molécula de BPG negativa. La concentración de esta molécula pequeña y difusible es aproximadamente la misma en los sistemas circulatorios de la madre y del feto. En estas condiciones, la HbF tendrá menos BPG unido que la HbA, y por tanto la HbF tendrá una afinidad por el oxígeno superior.

FIGURA **7.18**

Unión del 2,3-bisfosfoglicerato a la desoxihemoglobina. El lugar de unión, en la cavidad central del tetrámero de hemoglobina (véase la Figura 7.12b), está recubierto con ocho grupos de carga positiva que facilitan la unión de la molécula de BPG de carga negativa. Obsérvese que los residuos de histidina (β143) están sustituidos por serina en la hemoglobina fetal.

© Irving Geis.



El empleo de efectores que facilitan la liberación del oxígeno no se limita a los mamíferos. La sangre de los pájaros contiene **inositol hexafosfato** (véase la Figura 7.17b), y los peces utilizan ATP con una finalidad similar. Todas estas moléculas tienen una carga negativa fuerte y se unen en la hendidura central de la desoxihemoglobina. Todos estos efectores alostéricos, como H^+, CO_2, y BPG, actúan de la misma forma general, es decir, inclinando el equilibrio conformacional de la hemoglobina hacia la forma desoxi. Sin embargo, interaccionan en lugares claramente distintos, y por tanto sus efectos pueden ser aditivos, como se ilustra en la Figura 7.19, para el CO_2 y el BPG.

La mioglobina y la hemoglobina constituyen maquinarias moleculares sofisticadas, cada una de ellas finamente ajustada a su función. En el apartado siguiente exploraremos cómo podrían haber evolucionado estas estructuras.

Evolución proteica: los ejemplos de la mioglobina y la hemoglobina

Hemos resaltado que para cada cadena polipeptídica que un organismo produce, existe un gen correspondiente. La secuencia de nucleótidos de ese gen dicta la secuencia de aminoácidos de la proteína, la cual define a su vez las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína. La evolución de las proteínas se produce mediante la acumulación de cambios en las secuencias de nucleótidos de los genes. Para explorar este proceso utilizaremos como ejemplo el desarrollo evolutivo de la familia de proteínas mioglobina-hemoglobina. Sin embargo, en primer lugar, debemos examinar con algo más de detalle la estructura de los genes eucariotas y los mecanismos mediante los que puede producirse una mutación.

ESTRUCTURA DE LOS GENES EUCARIOTAS: EXONES E INTRONES

En capítulos anteriores hemos dado a entender que existe una correspondencia directa entre la secuencia de nucleótidos de un gen y (a través del mRNA) la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica que codifica. Para la mayor parte de los genes de los organismos procariotas, este concepto es cierto; pero el estudio de los genomas de los organismos superiores ha producido un resultado sorprendente: dentro de la mayoría de los genes eucariotas existen secuencias de DNA que no se expresan nunca en la cadena polipeptídica. Estas regiones no codificantes, denominadas **intrones**, se alternan con regiones denominadas **exones**, que *sí* se expresan en la secuencia polipeptídica. La Figura 7.20 muestra la forma en que la estructura exón-intrón del gen de la β globina está relacionada con la estructura de la β globina. Tan sólo las partes del gen coloreadas corresponden a porciones de la cadena polipeptídica.

Evidentemente, esta situación da a entender que la producción de mRNA en los eucariotas debe ser un proceso mucho más complejo de lo que inicialmente se había supuesto. Como indica la Figura 7.20, lo que realmente ocurre es que la transcripción produce inicialmente un transcrito primario, o **pre-mRNA**, que corresponde a todo el gen (exones, intrones y porciones de las regiones flanqueantes). El pre-mRNA, cuando todavía se encuentra en el núcleo de la célula, se corta y empalma para eliminar las regiones que corresponden a los intrones, con lo que se produce un mRNA que codifica correctamente la cadena polipeptídica. Describiremos los detalles de este proceso en el Capítulo 28. Por el momento, tengamos presente que la mayor parte de los genes eucariotas son estructuras "parcheadas" que contienen regiones amplias que no corresponden a ninguna parte de la secuencia proteica.

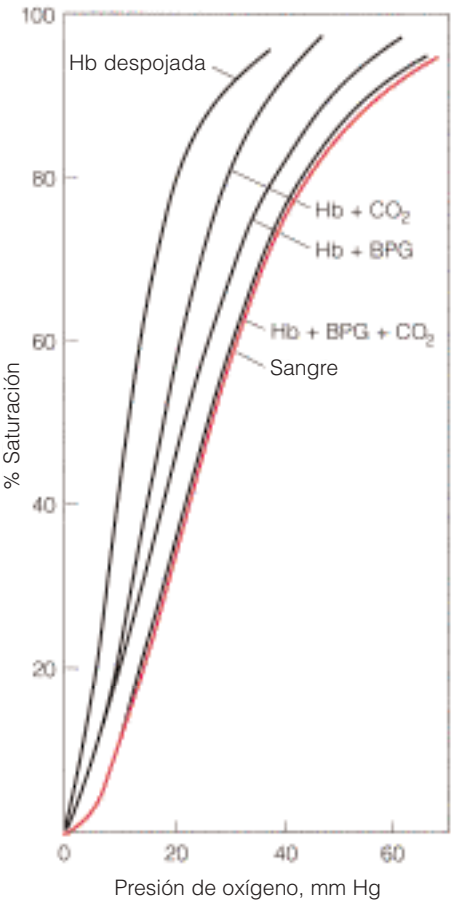


FIGURA **7.19**

Efectos combinados del CO_2 y del BPG sobre la unión del oxígeno por la hemoglobina. La hemoglobina desprovista de CO_2 y de BPG tiene una afinidad elevada por el oxígeno. Cuando se añaden ambas sustancias a la hemoglobina a las concentraciones que se dan en la sangre que sale de los capilares, la hemoglobina presenta casi exactamente la misma curva de unión que se observa para la sangre total.

J. V. Kilmartin, *Br. Med. Bull.* (1976) 32:209-212.

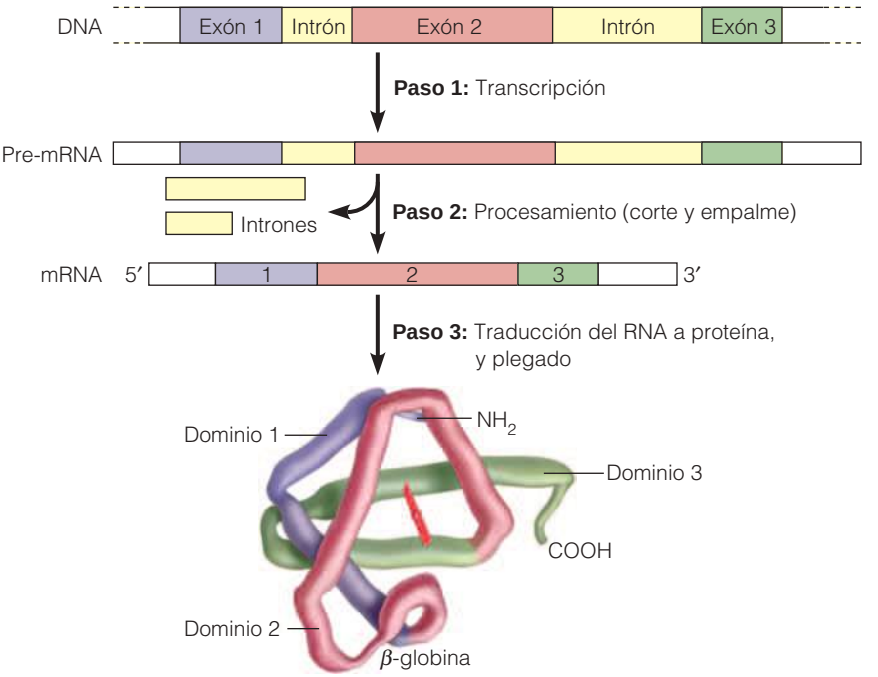


FIGURA **7.20**

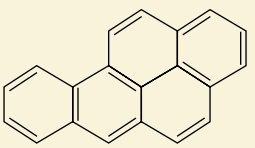
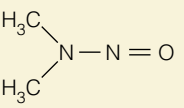
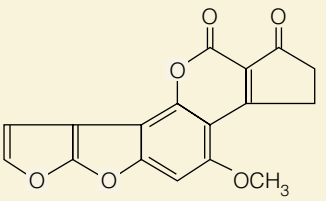
Regiones codificantes y no codificantes del gen de la hemoglobina β. El gen de la cadena β de la hemoglobina posee regiones codificantes, o exones, alternadas con regiones no codificantes, o intrones. En esta figura se muestra el proceso de transcripción y traducción del gen para producir la cadena β de hemoglobina final. **Paso 1, transcripción:** se produce un transcrito primario (pre-mRNA) que contiene copias complementarias de los exones y los intrones, a partir del gen. **Paso 2, corte y empalme:** se eliminan las secuencias intrónicas y los exones se empalman juntos para producir el mRNA final. **Paso 3, traducción:** las regiones codificantes del mRNA unidas producen una cadena β, que adopta su estructura tridimensional favorecida e incorpora un grupo hemo. Obsérvese que toda la región de unión del hemo (dominio 2) está codificada por un exón, al igual que la región C-terminal (dominio 3), que tanta importancia tiene para la interacción alostérica.

Los genes eucariotas son discontinuos y contienen tanto regiones que se expresan (exones) como regiones que no se expresan en forma de secuencias proteicas (intrones).

MECANISMOS DE MUTACIÓN PROTEICA

Cuando los organismos se reproducen, copian su DNA, y algunas veces se cometen errores. Estos errores pueden ser de tipo aleatorio, que tienen lugar durante el copiado, o pueden ser el resultado de un daño sufrido por el DNA como consecuencia de la radiación o de productos químicos **mutágenos**, es decir, sustancias que producen mutaciones (Tabla 7.1). En cualquier caso, estas alte-

TABLA 7.1 Algunos agentes mutágenos

Sustancia	Fórmula	Origen	Efectos
Benzo[a]pireno		Humo	Se intercala en el DNA, causa desplazamientos de marco; también se metaboliza a un producto que se une a residuos, lo cual da lugar a sustituciones de bases.
Ácido nitroso	HO—N = O	Algunos alimentos preparados	Desamina C a U, conduce a sentidos equivocados
Dimetilnitrosamina		Algunos alimentos preparados	Agente metilante, modifica las bases, produce sentidos equivocados (véase el Capítulo 25)
Aflatoxina		Frutos secos o semillas	Agente metilante, modifica la guanina, causa sentidos equivocados
Luz ultravioleta		Luz solar	Forma dímeros de pirimidina (véase el Capítulo 25)

raciones se manifiestan en forma de **mutaciones** en el DNA de la siguiente generación y las posteriores. Existen dos tipos básicos de cambios de la secuencia del DNA que pueden dar lugar a mutaciones en las proteínas: sustituciones de unas bases del DNA por otras y eliminaciones o inserciones de bases en el gen.

Las mutaciones se deben a cambios de la secuencia del DNA de los genes, que consisten en sustituciones, eliminaciones o adiciones de bases.

Sustitución de bases del DNA

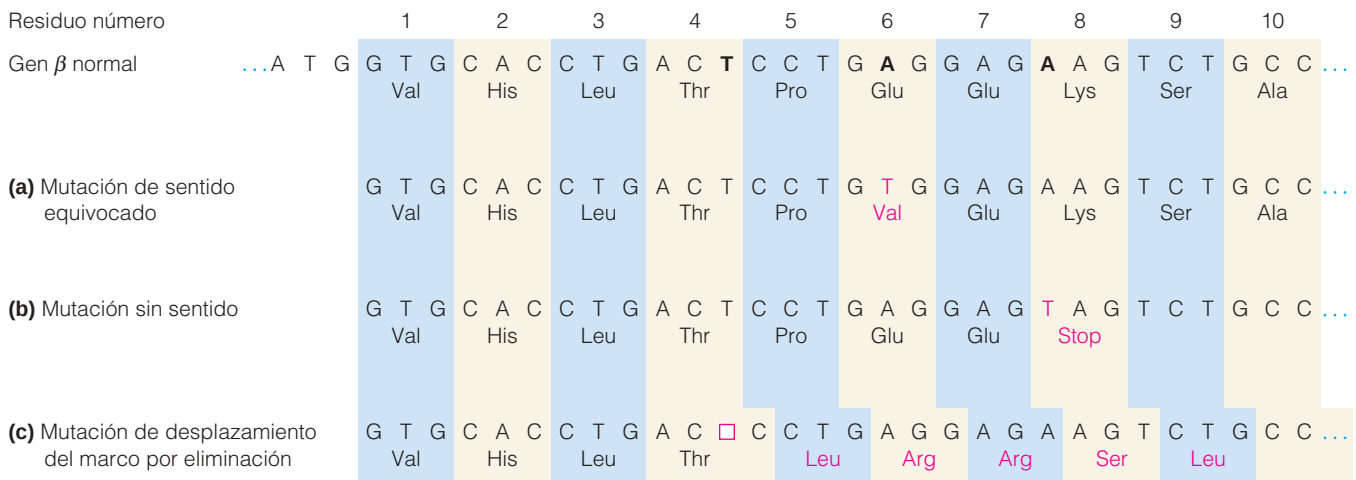
La sustitución de bases puede tener varias consecuencias. En primer lugar, el cambio de base puede no afectar en absoluto a la secuencia de la proteína. El cambio puede producirse, por ejemplo, en un intrón; pero aunque afecte a una región codificante de la proteína (exón), la sustitución no producirá diferencia alguna de la secuencia proteica si el nuevo codón codifica el mismo aminoácido que el codón original. La redundancia del código genético (véase la Figura 5.16, página 160) es tal, que con mucha frecuencia un cambio de base no altera el producto proteico. Por otra parte, un aminoácido de la proteína original puede sustituirse por un aminoácido diferente en la proteína mutada. Este tipo de sustitución se denomina **mutación de sentido equivocado** (Figura 7.21a). A veces, el codón correspondiente a un aminoácido en la proteína original pasa a ser un codón de *parada*. A esto lo llamamos una **mutación sin sentido**, puesto que la proteína se terminará prematuramente y generalmente no será funcional (Figura 7.21b). En ocasiones ocurre lo contrario, es decir, un codón de parada se transforma en un codón correspondiente a un aminoácido. En este caso la traducción continúa, con lo que se alarga la cadena.

Eliminaciones o inserciones de nucleótidos

Las eliminaciones o inserciones en el gen pueden ser grandes o pequeñas. Estas mutaciones fuera de las regiones codificantes, en general, no tendrán efecto, a no ser que modifiquen lugares de control de la transcripción. Las inserciones o eliminaciones grandes en regiones codificantes impiden casi invariablemente la producción de una proteína útil; en ocasiones, pueden suprimirse incluso genes completos de proteínas. El efecto de las eliminaciones o inserciones cortas depende de si afectan a múltiplos de tres bases. Si se eliminan o se añaden uno, dos o más *codones completos*, la consecuencia es la pérdida o adición de un número correspondiente de residuos de aminoácidos. Sin embargo, una eliminación o inserción en una región codificante de un número de bases que no sea múltiplo de tres tiene un efecto mucho más profundo, puesto que causa un desplazamiento del marco de lectura durante la traducción. Estas **mutaciones de desplazamiento de marco** se denominan a veces *mutaciones incoherentes*,

FIGURA **7.21**

Tipos de mutación. Se muestran en esta figura algunas de las formas en que pueden producirse mutaciones en la cadena β de la hemoglobina. Se indican arriba los 10 primeros residuos de la cadena β humana normal, junto con sus codones del DNA. **(a)** Se ha producido una mutación con sentido equivocado en el aminoácido 6. Ésta es la mutación drepanocítica. **(b)** Se ha producido una mutación sin sentido que ha introducido una señal de parada tras el residuo 7, con lo que se finaliza la cadena prematuramente. **(c)** Se ha producido una mutación de desplazamiento de marco como consecuencia de la eliminación de un único residuo T. El resto de la cadena, con una secuencia completamente alterada, continuará produciéndose hasta que se encuentre una señal de parada en el nuevo marco. Tanto (b) como (c) darán lugar a una β talasemia (véase la página 268).



ya que dan lugar a un cambio completo y carente de significado de la secuencia de aminoácidos en dirección C-terminal desde el punto de la mutación (Figura 7.21c).

Los efectos de estos tipos de mutaciones sobre la funcionalidad del producto proteico, y, por tanto, sobre el propio organismo, pueden ser muy diversos. En algunos casos, las sustituciones de bases pueden tener un efecto neutro, sin modificar el aminoácido codificado o cambiándolo por otro que funciona igualmente bien en esa posición de la proteína. Más frecuentemente, el resultado es nocivo. En ocasiones, estas mutaciones aumentan la eficacia de una proteína, y los organismos mutados pueden seleccionarse en generaciones futuras. En cambio, las mutaciones sin sentido y las mutaciones de desplazamiento de marco, dan lugar casi siempre a la destrucción de la función de la proteína. Si la proteína es importante para la vida del organismo, estas mutaciones sufren una intensa selección contraria en el curso de la evolución, ya que los que las heredan mueren antes de poder reproducirse.

Duplicaciones y reordenamiento génicos

Los genomas también pueden modificarse mediante duplicación de genes, fusión de genes o recombinaciones de exones.

Con la acumulación de muchos cambios mutacionales pequeños a lo largo de millones de años, las proteínas han evolucionado de manera gradual. La diversidad de funciones que pueden realizar colectivamente se incrementa mediante otros dos fenómenos: la **duplicación génica** y la **recombinación de exón**.

De manera muy ocasional, se produce una replicación del genoma, de tal manera que parte de la secuencia del DNA, que contiene un gen concreto, se copia dos veces. Inicialmente, la única consecuencia de esta duplicación es que los descendientes del organismo poseen dos copias del mismo gen. Esta mutación puede ser ventajosa si la proteína es necesaria en cantidades elevadas, puesto que se incrementará la eficacia de su producción. En estos casos, existirán presiones selectivas para mantener dos o incluso más copias del mismo gen. Otra posibilidad es que las dos copias evolucionen de manera independiente. Una copia puede continuar expresando la proteína que cumple la función original, mientras que la otra puede evolucionar mediante mutaciones, hasta dar lugar a una proteína totalmente diferente, con una nueva función. Otra forma por la que puede aumentar la diversidad de las proteínas es mediante la *fusión* de dos o más genes inicialmente independientes. Esta fusión puede dar lugar a la producción de proteínas con múltiples dominios que presentan nuevas combinaciones de funciones.

Las secuencias interpuestas en los genes eucariotas (intrones) ofrecen otra posibilidad de diversificación de la estructura y la función proteica. Como estas regiones no se utilizan para la codificación, representan posiciones en las que los genes pueden cortarse y recombinarse sin peligro en el proceso de **recombinación genética**. Los mecanismos de la recombinación se describirán en el Capítulo 25. En este punto nos ocupamos tan sólo de sus consecuencias. Supongamos que un exón de un gen, que codifica una región proteica con la función fisiológica B, se inserta en una región intrónica de un gen que codifica una proteína responsable de la función A. La nueva proteína híbrida es capaz ahora de realizar ambas funciones, A y B, y puede desempeñar una nueva función fisiológica.

Mediante los efectos combinados de las mutaciones, la duplicación génica y el reordenamiento genético, los organismos pueden obtener nuevas capacidades, adaptarse a nuevos ambientes y dar lugar a nuevas especies. El proceso de la evolución de los organismos, que observamos en los registros fósiles y en la increíble variedad de plantas, animales y microorganismos que existen, es en gran parte una consecuencia de esta evolución molecular de las proteínas.

EVOLUCIÓN DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS MIOGLOBINA-HEMOGLOBINA

La mioglobina y la hemoglobina han evolucionado a partir de una proteína ancestral semejante a la mioglobina.

Hemos visto ya un ejemplo del proceso de evolución proteica. Si comparamos las secuencias de las mioglobinas de cachalote y del ser humano (véase la Figura 5.14), encontramos 25 cambios de aminoácidos. Dado que la información que nos proporcionan los fósiles indica que las líneas evolutivas que conducen al cachalote y al ser humano se separaron a partir de un mamífero común antecesor hace unos 100 millones de años, podemos estimar, en cierta medida, la velocidad con la que se produce este proceso. Si esta velocidad fuera uniforme, se produciría un promedio de una sustitución cada 4 millones de años.

Si comparamos la mioglobina del ser humano con la del tiburón, encontramos alrededor de 88 diferencias. Dado que estas líneas evolutivas se separaron hace unos 400 millones de años, las diferencias acumuladas son aproximadamente las que cabría esperar con los datos del ejemplo anterior. En otras palabras, el número de sustituciones de aminoácidos en dos proteínas relacionadas es aproximadamente proporcional al tiempo de evolución que ha transcurrido desde que las proteínas (y las especies) tuvieron un antecesor común. Utilizando este principio, podemos comparar las secuencias de las hemoglobinas y las mioglobinas e intentar construir un "árbol genealógico" de las proteínas globínicas. La construcción de este árbol se ve dificultada por el hecho de que los eucariotas superiores, incluyendo el ser humano, contienen genes tanto para la mioglobina como para *diferentes* cadenas de hemoglobina. Estos genes diferentes se expresan en momentos distintos del desarrollo humano (Figura 7.22). Las cadenas α y β, como se mencionó antes, están normalmente presentes en los adultos; pero en el embrión en su fase inicial, los genes de la hemoglobina que se expresan son los correspondientes a las cadenas embrionarias ζ y ε. A medida que se desarrolla el feto, estas cadenas son reemplazadas por cadenas α y γ, y, finalmente, aproximadamente al nacer, las cadenas γ son sustituidas por cadenas β. Además, después del nacimiento se produce una pequeña cantidad de una cadena δ. Estos tipos de cadenas de hemoglobina que se dan durante el desarrollo presentan ligeras diferencias y cada una de ellas está codificada por un gen distinto en el genoma humano.

En la Figura 7.23 se presenta el árbol evolutivo obtenido mediante la comparación de las secuencias de muchas hemoglobinas procedentes de muchas especies distintas. Según estos resultados, los animales muy primitivos tenían tan sólo una globina ancestral de cadena única similar a la mioglobina, para el almacenamiento del oxígeno. La mayor parte de estos animales, como los protozoos y los platelmintos, eran tan pequeños que no necesitaban una proteína

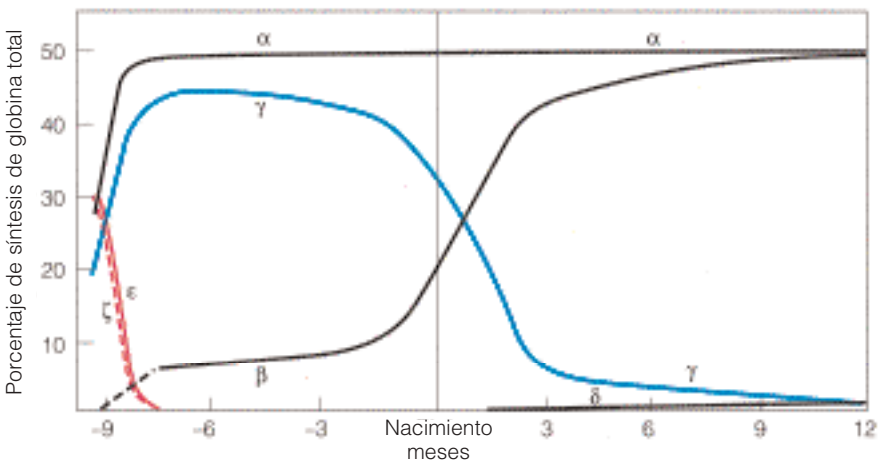


FIGURA **7.22**

Expresión de los genes de las globinas humanas en diferentes fases del desarrollo. Los genes humanos ζ y ε dan lugar a la hemoglobina $\zeta_2\varepsilon_2$, que se encuentra en la fase embrionaria más temprana. Esta hemoglobina se sustituye pronto por la hemoglobina $\alpha_2\gamma_2$ del feto. Aproximadamente al nacer, cesa la transcripción del gen γ y empieza a transcribirse el gen β. Al llegar a los seis meses de edad, el niño tendrá una hemoglobina que será $\alpha_2\beta_2$ (adulto) en su casi totalidad. El gen δ no se transcribe nunca en una cuantía importante. Existen dos copias del gen α: α_1 y α_2. Ambas contribuyen a la producción de las cadenas α.

W. G. Wood, *Br. Med. Bull.* (1976) 32:282–287.

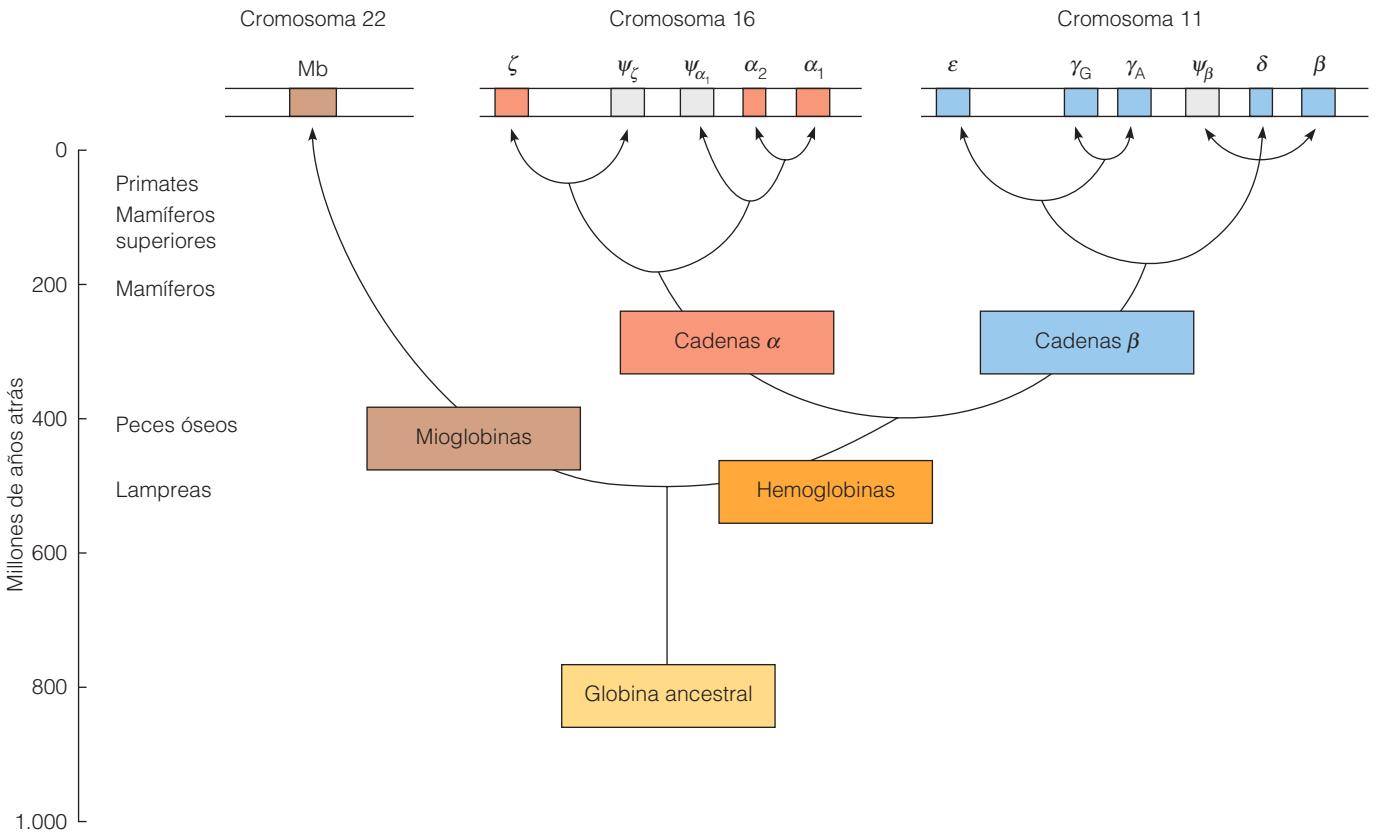


FIGURA **7.23**

Evolución de los genes de la globina. En la parte superior se muestra la disposición de los genes humanos de la globina. Obsérvese que se encuentran en tres cromosomas diferentes. Se indican en color los genes funcionales, mientras que los pseudogenes, que son variantes no transcritas de un gen, se indican en gris. El esquema inferior muestra la probable evolución de la familia de genes de la globina, en función de las diferencias de secuencia existentes entre los diversos genes de la globina del ser humano y de otros animales. Las épocas en las que se produjeron las duplicaciones de los genes se infieren mediante una combinación de la secuencia y los datos procedentes de los fósiles, y son sólo aproximadas. Los dos genes α y los dos genes γ son demasiado similares en su secuencia para que pueda valorarse la época de su divergencia. Tan sólo sabemos que debe haberse producido en un período bastante reciente.

La evolución de las globinas ha conservado el "pliegue de globina" común que mantiene al hemo.

transportadora. Hace aproximadamente 500 millones de años se produjo un acontecimiento importante: el gen de la mioglobina ancestral se duplicó. Una de las copias pasó a ser el antecesor de los genes de la mioglobina de todos los organismos superiores; el otro evolucionó para dar lugar al gen de una proteína transportadora de oxígeno y dio origen a las hemoglobinas.

En la línea evolutiva que conduce a los vertebrados y a los mamíferos, los animales más primitivos que poseen hemoglobina son las lampreas. La hemoglobina de la lamprea puede formar dímeros pero no tetrámeros, y sólo es débilmente cooperativa; constituye un primer paso hacia la unión alostérica, pero posteriormente se produjo una *segunda* duplicación génica, dando lugar a los antecesores de las familias de las cadenas de hemoglobina α y β existentes en la actualidad. La reconstrucción, a partir de la comparación de secuencias, indica que esto debió ocurrir hace unos 400 millones de años, aproximadamente en el momento de la divergencia de los tiburones y los peces óseos. La línea evolutiva de estos últimos condujo a los reptiles y finalmente a los mamíferos, todos los cuales poseen genes tanto para la globina α como para la β, y son capaces de formar hemoglobinas tetraméricas $\alpha_2\beta_2$. Se han producido otras duplicaciones de los genes en la línea de la hemoglobina, que han dado origen a las formas embrionarias ζ y ε, y a la forma fetal γ. Como indica la Figura 7.23, las duplicaciones que dieron origen a una distinción entre los subtipos adulto y embrionario coinciden bastante bien con la aparición de los mamíferos placentarios, hace unos 200 millones de años. Esta coincidencia es funcionalmente adecuada, puesto que en estos mamíferos, las fases más adelantadas del desarrollo embrionario se producen en el interior de la madre, y es esencial disponer para ello de una hemoglobina especial, adaptada para facilitar el paso del oxígeno de la madre al feto, a través de la placenta (véase la página 256).

Durante la larga evolución de la familia de proteínas mioglobina-hemoglobina, tan sólo unos pocos aminoácidos se han mantenido sin variación. Estos *residuos conservados* pueden indicar las posiciones realmente esenciales de la molécula. Como muestra la Figura 7.11, se trata de las histidinas proximal y distal al hierro del hemo (F8 y E7; véase la Figura 7.5b). Es interesante señalar que el aminoácido Val FG5, al que se ha involucrado recientemente en el cambio de conformación desoxi-oxi de la hemoglobina, que se ha descrito antes, se mantiene sin variación en las hemoglobinas, y sustituye a la isoleucina que se encuentra en esta posición en la mayor parte de las mioglobinas. Otras regiones muy conservadas de las hemoglobinas son las que están próximas a los contactos α_1-β_2 y α_2-β_1 Estos contactos son los que participan más directamente en el cambio de conformación alostérico.

A pesar de los cambios importantes que se han producido en la estructura primaria de la familia mioglobina-hemoglobina a lo largo de centenares de millones de años, las estructuras secundaria y terciaria de estas proteínas se han mantenido sorprendentemente inalteradas. En la Figura 7.24 se indica la estructura básica de los miembros de esta familia, desde un insecto hasta el caballo. En todas ellas se puede identificar el mismo plegado básico y la semejanza es especialmente intensa en la región que une el hemo. A primera vista, esta semejanza parece incongruente con nuestras afirmaciones anteriores respecto a que la estructura primaria determina la estructura secundaria y terciaria. Sin embargo, un examen cuidadoso de muchas secuencias pone de manifiesto que muchas de las sustituciones han sido *conservadoras*, es decir, un aminoácido se ha sustituido por otro de su misma clase general. Evidentemente, la evolución de estas proteínas no se ha producido de manera aleatoria, sino sometida a las limitaciones que imponía el mantenimiento de una estructura fisiológica funcional. La supervivencia de las proteínas mutantes en la familia de la globina ha quedado limitada a aquellas que mantenían el "plegado de la globina" básico.

Variantes de la hemoglobina: la evolución en curso

LAS VARIANTES Y SU HERENCIA

Pueden observarse los signos de la evolución continuada de los genes de la hemoglobina en la existencia de variantes de hemoglobina o, como se les suele denominar, hemoglobinas anormales. En la actualidad se han identificado varios centenares de hemoglobinas mutantes en la población humana. En la Figura 7.25, se presentan algunas de las posiciones de las mutaciones en el tetrámero. La mayor parte de las proteínas de las plantas y los animales exis-

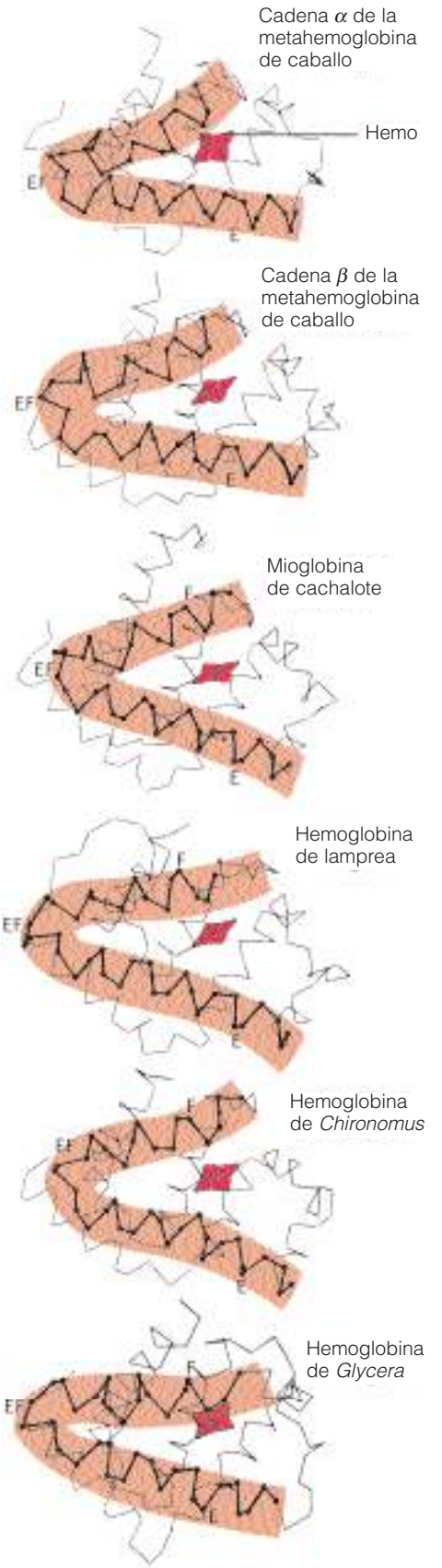


FIGURA **7.24**

Conservación del patrón de plegado de la globina a lo largo de la evolución. Como resaltan estos dibujos, la estructura terciaria global de la mioglobina y de las cadenas de la hemoglobina se ha mantenido casi constante a pesar de los importantes cambios que se han producido en la estructura primaria. Las zonas sombreadas delinean las hélices E y F, que rodean al hemo. Obsérvese que son casi invariables y que los cambios tienden a concentrarse cerca de los extremos de las cadenas. Las proteínas más primitivas que se indican son las de las "hemoglobinas" de una sola cadena del gusano marino *Glycera* y de la mosca *Chironomus*. La lamprea es la criatura más primitiva que posee mioglobina y hemoglobina diferenciadas. La hemoglobina de la lamprea forma dímeros y presenta una cierta cooperatividad de unión. Las cadenas α y β de la hemoglobina de caballo son casi idénticas a las de todos los demás mamíferos.

© Irving Geis.

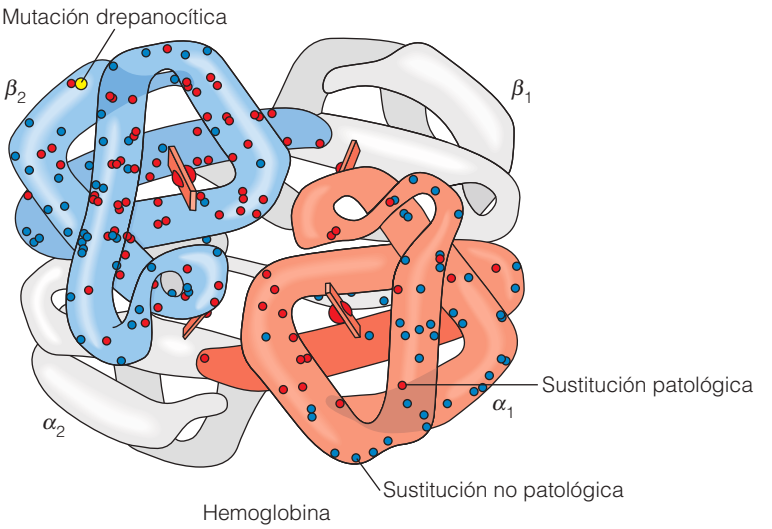


FIGURA **7.25**

Distribución de las mutaciones en las hemoglobinas humanas. Los puntos azules y rojos indican todas las posiciones en las que se han encontrado sustituciones de aminoácidos en las cadenas α y β (para mayor claridad, tan sólo se muestra un par). Aquellas sustituciones que tienen efectos patológicos conocidos se indican en rojo. En muchas de estas posiciones se ha observado más de una sustitución. La posición 6 en la cadena β, en la que se produce la mutación drepanocítica, se indica en amarillo.

© Irving Geis.

La prueba que indica una evolución continuada se encuentra en las muchas proteínas variantes que se dan en las especies existentes.

tentes presentan probablemente una diversidad comparable, pero son pocas las que se han estudiado con tanto detalle como las hemoglobinas humanas. Cada una de las formas mutantes de la hemoglobina existe tan sólo en una pequeña fracción de la población humana global; algunas formas se han identificado tan sólo en unas pocas personas. Algunas de estas formas mutantes son nocivas y dan lugar a patologías conocidas; en las condiciones de la selección natural, con el tiempo acabarían por desaparecer. La mayor parte son, hasta donde sabemos, inocuas, y a menudo se las denomina mutaciones neutras. Un número muy reducido de ellas podrían tener, sin embargo, ventajas no identificadas y, con el tiempo, podrían llegar a dominar en la población.

Consideraremos tan sólo algunas de estas hemoglobinas anormales. En primer lugar, es necesario revisar algunos conceptos de genética. Todas las células humanas, excepto las células germinales (espermatozoides y óvulos) son **diploides**, es decir, contienen dos copias de cada cromosoma. En consecuencia, contienen dos copias de cada gen, uno en cada miembro de la pareja de cromosomas. Consideremos un gen como el de la hemoglobina β del adulto, que puede existir en dos formas: el tipo "normal", β, y el tipo variante (mutante) β^*. Una persona puede tener tres combinaciones posibles de estos genes en sus cromosomas apareados:

A. $\beta + \beta$: **homocigoto** (mismos genes) en el tipo normal

B. $\beta + \beta^*$: **heterocigoto** (genes mixtos)

C. $\beta^* + \beta^*$: homocigoto en el tipo variante

Dado que sólo posee genes para la hemoglobina β normal, la persona A producirá tan sólo cadenas de hemoglobina β normales. La persona C, que sólo tiene genes para el tipo variante, producirá únicamente cadenas de hemoglobina variante. La persona B, que posee genes para ambos tipos, producirá las dos cadenas. Si la mutación es nociva, la persona C tendrá dificultades importantes. En cambio, la persona B puede tener una función bastante buena, puesto que elaborará cadenas de proteína normales junto con las de la variante.

Cuando dos personas tienen hijos, cada progenitor dona a un hijo una copia del gen de la hemoglobina β cuya selección será aleatoria. Si los dos progenitores sólo portan el gen normal, el hijo debe recibir dos copias del mismo. Si ambos portan sólo el gen variante, el hijo debe ser también homocigoto para ese gen. Si ambos progenitores son heterocigotos para el gen, la Figura 7.26 mues-

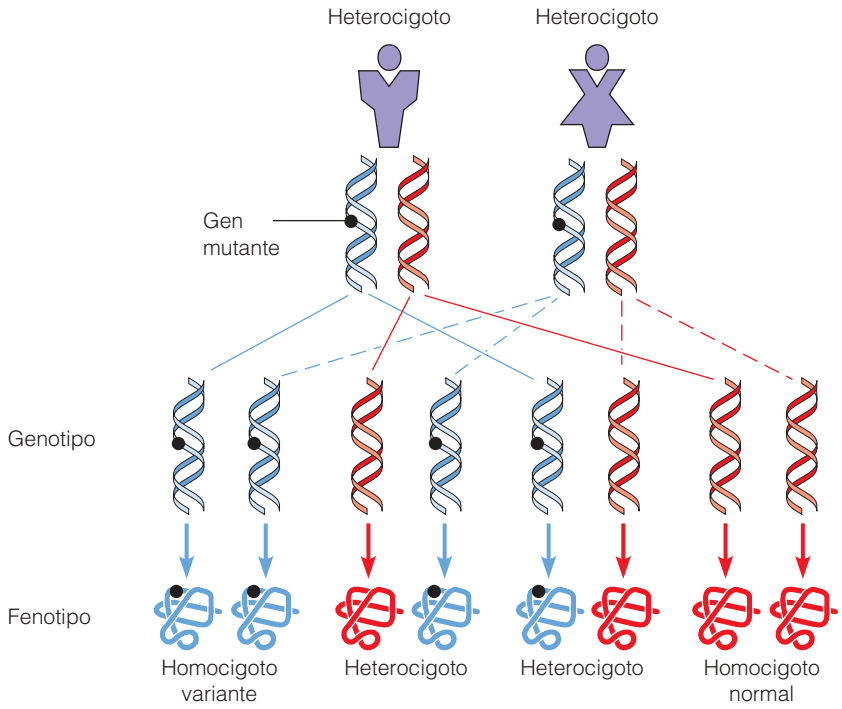


FIGURA **7.26**

Transmisión hereditaria de proteínas normales y variantes en un cruce heterocigoto. Los organismos diploides pueden existir en tres posibles tipos respecto a cualquier gen: homocigoto normal, homocigoto variante o heterocigoto. Los hijos de una pareja heterocigota pueden ser de cualquiera de los tres tipos, como se muestra aquí: homocigoto normal, heterocigoto u homocigoto variante, con una proporción de probabilidad de 1:2:1. Dejaremos como ejercicio el averiguar otras posibilidades, por ejemplo, los hijos de un progenitor homocigoto normal y un progenitor homocigoto variante. Este patrón se denomina herencia Mendeliana clásica.

tra que el hijo tiene una probabilidad de uno sobre cuatro de ser homocigoto normal, uno sobre cuatro de ser homocigoto para el gen variante, y dos sobre cuatro de ser heterocigoto. Debido a que los genes de la mayor parte de las hemoglobinas variantes son raros en la población humana, tan sólo ocasionalmente encontramos una persona homocigota para el tipo variante.

EFECTOS PATOLÓGICOS DE LAS HEMOGLOBINAS VARIANTES

Aunque la mayor parte de las mutaciones de la hemoglobina parecen ser neutras, algunas de ellas son nocivas.

Del elevado número de mutaciones de la hemoglobina, una parte significativa tiene efectos nocivos. Como se indica en la Figura 7.25, las mutaciones nocivas conocidas se agrupan principalmente alrededor de los bolsillos del hemo y en la proximidad de la región de contacto α-β, que tanta importancia tiene para la transición alostérica. En la Tabla 7.2 se indican algunas de las mutaciones de sentido equivocado patológicas que se han estudiado bien. Así por ejemplo, una clase de variantes denominadas *hemoglobinas M* tiende a oxidarse con facilidad para dar metahemoglobina, que no puede unir el O_2. Muchas de estas mutaciones comportan una sustitución de la histidina proximal o distal, por otros residuos. Las personas que portan estas mutaciones presentan dificultades para el transporte de O_2 suficiente a los tejidos. Otras variantes que comportan cambios en las superficies de contacto de las subunidades pueden tener diversos tipos de efectos. Algunas, como la *hemoglobina St. Lukes*, desestabilizan el tetrámero de hemoglobina, mientras que otras (p. ej., la *hemoglobina Suresnes*) tienden a estabilizar la conformación oxi o la desoxi, con lo que inhiben el cambio alostérico. Por último, las hay como la *hemoglobina Hammersmith*, en las que la estructura terciaria de la molécula es tan inestable que algunas de estas variantes no pueden mantener el hemo de manera eficaz.

La tristemente más conocida de las variantes de la hemoglobina es la *hemoglobina drepanocítica*, que es una causa de sufrimiento y muerte prematura de muchas personas. La variante recibe este nombre porque hace que los eritrocitos adopten una forma alargada, como una hoz, a concentraciones bajas de

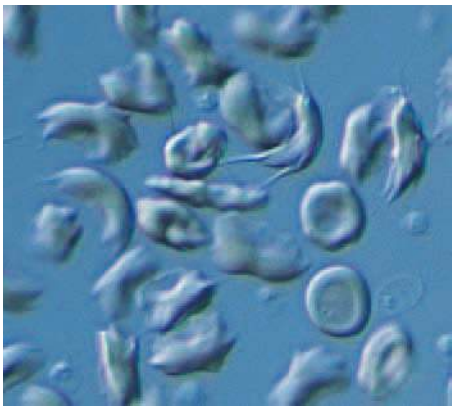
TABLA 7.2 Relación de algunas de las mutaciones de sentido equivocado de las hemoglobinas humanas

Efecto	Aminoácido cambiado	Cambio	Nombre	Consecuencias de la mutación	Explicación
Drepanocitosis	β6 (A3)	Glu ⟶ Val	S	Drepanocitosis	La Val encaja en el bolsillo EF de la cadena de otra molécula de hemoglobina.
	β6 (A3)	Glu ⟶ Ala	G Makassar	No significativas	Probablemente la Ala no encaja tan bien en el bolsillo.
	β121 (GH4)	Glu ⟶ Lys	O Arabia, Egipto	Aumenta la deformación drepanocitica en los heterocigotos S/O	El β121 está próximo al residuo β6; la Lys aumenta la interacción entre las moléculas.
Cambio de la afinidad por el O_2	α87 (F8)	His ⟶ Tyr	M Iwate	Forma metahemoglobina, afinidad por el O_2 reducida	La His que normalmente está ligada al Fe ha sido sustituida por Tyr.
	α141 (HC3)	Arg ⟶ His	Suresnes	Aumenta la afinidad por el O_2, favoreciendo el estado R	La sustitución elimina el enlace entre la Arg 141 y la Asn 126 en el estado desoxi.
	β74 (E18)	Gly ⟶ Asp	Shepherds Bush	Aumenta la afinidad por el O_2, reduciendo la unión del BGP	La carga negativa en este punto reduce la unión del BPG.
	β146 (HC3)	His ⟶ Asp	Hiroshima	Aumenta la afinidad por O_2, reducido efecto Bohr	Se altera el puente salino en el estado desoxi y se elimina una His que une un protón por efecto Bohr.
	β92 (F8)	His ⟶ Gln	St. Etienne	Pérdida del hemo	El enlace normal desde F8 al Fe se pierde, y la glutamina polar tiende a abrir el bolsillo del hemo.
Pérdida del hemo	β42 (CD1)	Phe ⟶ Ser	Hammersmith	Inestable, pierde el hemo	La sustitución de la Phe hidrófoba por Ser atrae agua hacia el bolsillo del hemo.
Disociación del tetrámero	α95 (G2)	Pro ⟶ Arg	St. Lukes	Disociación	Se altera la geometría de la cadena en la región de contacto de la subunidad.
	α136 (H19)	Leu ⟶ Pro	Bibba	Disociación	La Pro interrumpe la hélice H.

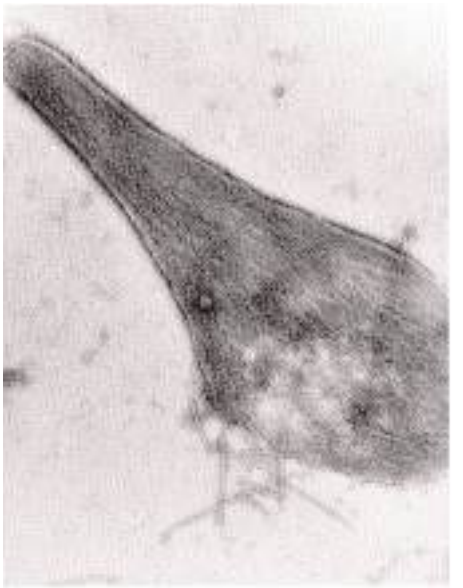
La drepanocitosis se debe a la sustitución de una sola base en la cadena β.

oxígeno (Figura 7.27a). Esta "drepanocitosis" es consecuencia de la tendencia de la hemoglobina mutante, en su estado desoxigenado, para agregarse en estructuras largas como bastones (Figura 7.28). Las células alargadas tienden a obstruir los capilares, causando una inflamación y un dolor considerable. Más grave aún es el hecho de que las células drepanocíticas son frágiles (Figura 7.27b). Su ruptura produce una anemia que hace que la víctima del trastorno sea vulnerable a las infecciones y a las enfermedades. Es frecuente que las personas homocigotas para la mutación drepanocítica no sobrevivan hasta la edad adulta, y quienes llegan a esta edad presentan un grave debilitamiento. Las personas heterocigotas, que pueden producir aún una cierta cantidad de hemoglobina normal, presentan generalmente trastornos tan sólo en condiciones de privación grave de oxígeno. Por ejemplo, volar puede ser peligroso para los heterocigotos HbS debido al bajo nivel de oxígeno.

Linus Pauling, en una de sus múltiples inspiraciones, sugirió ya en 1949 (véase la Bibliografía) que la drepanocitosis era una "enfermedad molecular" debida a una mutación en la molécula de hemoglobina. Es de destacar que la drepanocitosis deriva de lo que cabría prever que fuera una mutación inocua en una parte de la molécula muy alejada de las zonas críticas que se han mencionado antes. El residuo de ácido glutámico, que normalmente se encuentra en la posición 6 de las cadenas β, está reemplazado por una valina (véase la Figura 7.21a). Esta valina hidrófoba puede ajustarse en un bolsillo de la esquina EF de



(a)

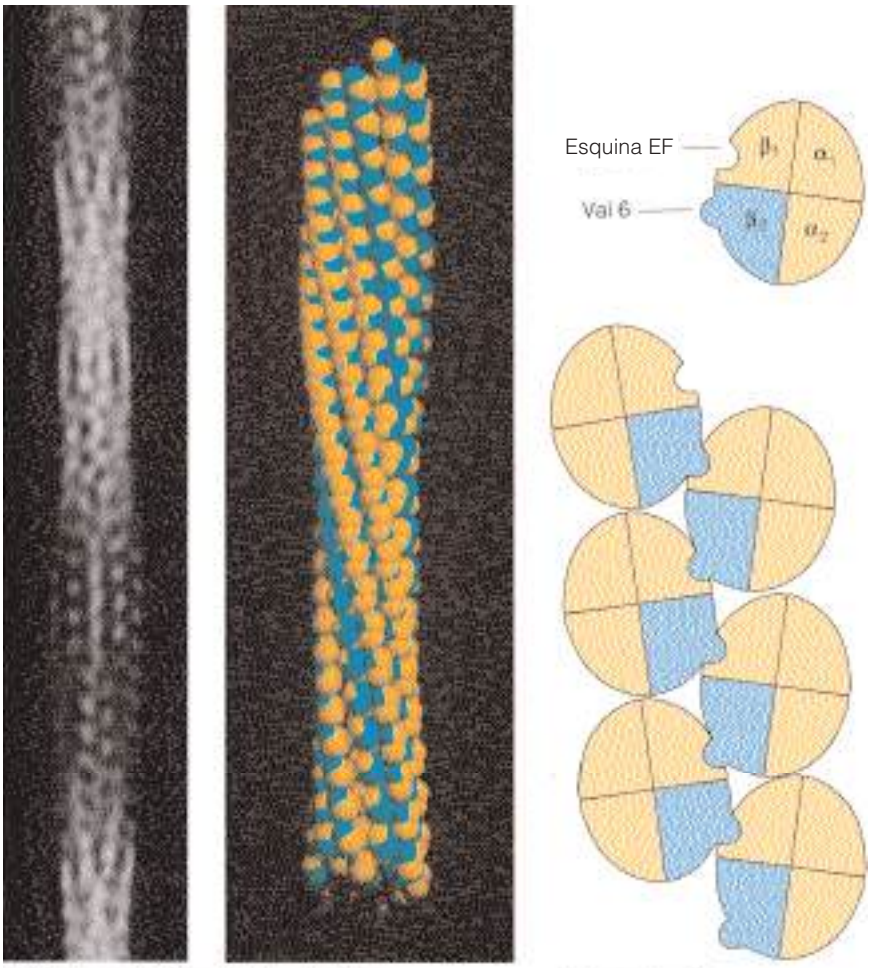


(b)

FIGURA **7.27**

Eritrocitos en la drepanocitosis. **(a)** Células drepanocíticas características junto con algunos eritrocitos redondos normales. **(b)** Imagen de microscopia electrónica de barrido de una célula drepanocítica que ha sufrido una ruptura, con vertido de las fibras de hemoglobina.

(a) © G. W. Willis, M.D./BPS; **(b)** Cortesía de T. Wellems y R. Josephs.



(a) Fibra de Hb de la drepanocitosis **(b)** Modelo de fibra **(c)** Formación de la fibra

FIGURA **7.28**

Hemoglobina drepanocítica. Las moléculas de hemoglobina drepanocítica tienden a agregarse formando largas fibras. **(a)** Imagen de microscopia electrónica de una fibra drepanocítica. **(b)** Imagen gráfica generada por ordenador de una fibra. **(c)** Modelo esquemático de la formación de las fibras. Las moléculas de hemoglobina se unen formando una agrupación de doble hebra, ya que la Val 6 de la cadena β de una molécula de hemoglobina se ajusta en un bolsillo de una molécula adyacente. La interacción de estas estructuras de doble cadena entre sí produce las fibras de múltiples cadenas que se muestran en (a) y (b).

Cortesía de B. Carragher, D. Bluemke, M. Potell, y R. Josephs.

una cadena β de otra molécula de hemoglobina, y con ello, tal como se muestra en la Figura 7.28c, las moléculas de hemoglobina adyacentes pueden acoplarse unas a otras formando una fibra helicoidal alargada en forma de bastón. La explicación de por qué se produce la drepanocitosis con la desoxihemoglobina y no en cambio con la forma oxigenada es sencilla: en la forma oxi, el reordenamiento de las subunidades hace inaccesible el bolsillo EF a la Val 6.

La drepanocitosis está limitada en gran parte a las poblaciones originarias de zonas tropicales del mundo. A primera vista, esta distribución parece inespera-

da. ¿Por qué debe tener una enfermedad *genética* una relación con el clima? La respuesta nos informa en cierta medida sobre la persistencia de lo que parecen ser rasgos desfavorables. La incidencia elevada de la drepanocitosis en una población coincide generalmente con una incidencia elevada de paludismo, una enfermedad parasitaria que transmite un mosquito tropical. Las personas *heterocigotas* para la hemoglobina drepanocítica tienen una resistencia al paludismo superior a la de los que no son portadores de la mutación drepanocítica. El parásito del paludismo pasa una parte de su ciclo vital en los eritrocitos humanos, y la mayor fragilidad de las células drepanocíticas, incluso en las personas heterocigotas, tiende a interrumpir este ciclo. Además, la distorsión de la membrana celular de las células drepanocíticas intactas conduce a una pérdida de iones potasio de estas células, lo cual crea un entorno menos favorables para el parásito. Las personas heterocigotas presentan una tasa de supervivencia más elevada (y por tanto, mayores probabilidades de transmitir sus genes) en las regiones con infestación de paludismo. Sin embargo, la elevada incidencia de estos genes en la población hace que nazcan muchas personas que son homocigotas para el rasgo mutante.

La drepanocitosis es también la clase de enfermedad genética que muchos científicos esperan que llegue a poder tratarse mediante terapia génica recombinante. Si pudiera hallarse una forma de introducir los genes de la β globina funcionales en una persona homocigota para la mutación drepanocítica, esta persona pasaría a ser funcionalmente heterocigota, con lo que aumentaría en gran manera su probabilidad de tener una vida prolongada y productiva.

TALASEMIAS: EFECTOS DE LA DISFUNCIÓN DE LOS GENES DE LA HEMOGLOBINA

Las talasemias son mutaciones de la hemoglobina en las que son total o parcialmente disfuncionales uno o más genes.

Las variantes de la hemoglobina humana que hemos mencionado hasta ahora son consecuencias de mutaciones de sentido equivocado. A causa de la sustitución de una base en un gen que codifica una de las cadenas, un aminoácido está reemplazado por otro. Sin embargo, existen otros defectos genéticos que afectan a la hemoglobina, en los que una o varias de las cadenas simplemente no se produce o se produce en una cantidad insuficiente. El trastorno patológico que aparece entonces se denomina **talasemia**. La talasemia puede originarse de varias formas:

1. Uno o varios de los genes que codifican las cadenas de la hemoglobina pueden haberse perdido.
2. Pueden estar presentes todos los genes, pero uno o varios de ellos pueden haber sufrido una mutación sin sentido que dé lugar a una cadena acortada o a una mutación de desplazamiento de marco que produzca una cadena no funcional (véase la Figura 7.21b y c).
3. Pueden estar presentes todos los genes, pero haberse producido una mutación fuera de las regiones codificantes, que dé lugar a un bloqueo de la transcripción o a un procesamiento inadecuado del pre-mRNA, de tal manera que no se produzca la proteína o que ésta no sea funcional.

En el caso 1 ó 2, el gen produce una proteína que no es funcional. En el caso 3, puede producirse una transcripción y traducción limitada de la secuencia polipeptídica correcta.

El genoma humano contiene varios genes de globina, que corresponden a las cadenas proteicas utilizadas en distintas fases del desarrollo, y ello hace que existan muchas variedades de talasemia. Aquí describimos tan sólo las dos clases principales, las que comportan una pérdida o una mala función de los genes correspondientes a las cadenas α y β del adulto.

β Talasemia

Si se ha perdido o no puede expresarse el gen de la β globina, se produce un trastorno muy grave en las personas homocigotas para este defecto. Estas personas *no* pueden elaborar las cadenas β y deben utilizar una producción continuada de las cadenas fetales γ para formar una hemoglobina funcional $\alpha_2\gamma_2$ (véase la Figura 7.22). Estas personas pueden producir cadenas γ hasta una fase avanzada de la infancia, pero generalmente fallecen antes de alcanzar la madurez. El estado heterocigoto, en el que continúa funcionando aún un gen β, es mucho menos grave. También existen talasemias más leves (denominadas β^+) en las que la transcripción o el procesamiento de los genes β se inhibe parcialmente, de forma que está limitada la producción de β globina aunque no enteramente bloqueada.

α Talasemias

Las talasemias que afectan a la cadena α presentan una situación más complicada. Hay dos copias del gen (α_1 y α_2) una junto a otra en el cromosoma humano (Figura 7.23). Sus cadenas α_1 y α_2 difieren tan sólo en un aminoácido, y una cadena puede sustituir a la otra en el tetrámero de hemoglobina ensamblado. Una persona puede tener 4, 3, 2, 1 ó 0 copias de un gen α. Sólo si tres o más genes no son funcionales se observan unos efectos graves. Las personas con un solo gen α son anémicas, debido a que su producción total de hemoglobina es baja. La baja concentración de hemoglobina α se compensa, en parte, por la formación de tetrámeros β_4 (*hemoglobina H*) y tetrámeros γ_4 (*hemoglobina de Bart*). Estos tetrámeros pueden unir y transportar oxígeno, pero no presentan la transición alostérica (permanecen siempre en el estado R), ni muestran efecto Bohr. Ello hace que la descarga de oxígeno a los tejidos sea poco eficaz. En el trastorno denominado *hidropesía fetal*, faltan las cuatro copias del gen α y los afectados por este trastorno nacen inevitablemente muertos. Tan sólo pueden formar una hemoglobina γ_4, y puesto que la producción de estas cadenas disminuye al aproximarse el momento del nacimiento, no disponen de la hemoglobina suficiente para mantener la vida del feto próximo a término.

Dado que hay dos copias del gen α y sólo una del gen β, la mayor parte de las mutaciones nocivas de las hemoglobinas de los mamíferos se producen en las cadenas β (véase la Figura 7.25). Este fenómeno puede sugerir un papel funcional para la duplicación génica. Así, si existen dos o más copias de un gen, la especie está en cierto modo protegida frente a los efectos nocivos de las mutaciones.

Hemos centrado nuestro análisis sobre la mutación proteica en la hemoglobina, pero debe tenerse en cuenta que estos mismos principios son aplicables a todas las demás proteínas. Aunque nuestro conocimiento de las mutaciones de la hemoglobina es el más completo, se encuentran mutaciones de sentido equivocado y pérdidas en otras muchas proteínas, y las que son nocivas dan lugar a la amplia gama de *enfermedades genéticas*, de las que las hemoglobinopatías no son más que una subclase. En los capítulos dedicados al metabolismo encontraremos otros muchos ejemplos.

Inmunoglobulinas: la variabilidad de la estructura produce la versatilidad de la unión

En el resto de este capítulo, examinaremos un grupo de proteínas cuya función principal, como la de la mioglobina y la hemoglobina, es la unión de otras sustancias, pero cuyo papel biológico es totalmente diferente. Estas proteínas son las **inmunoglobulinas**, que presentan una unión muy específica a otras sustancias.

RESPUESTA INMUNITARIA

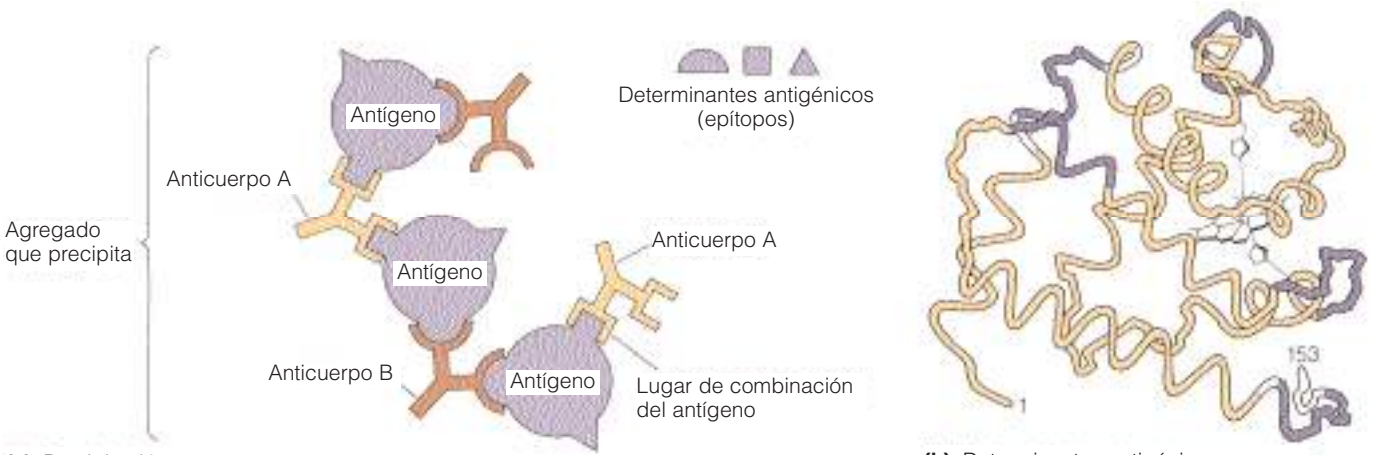
La respuesta inmunitaria se encarga de la defensa del cuerpo frente a las sustancias extrañas o los patógenos.

Cuando una sustancia extraña, un virus, una bacteria o incluso una proteína extraña, invade los tejidos de un vertebrado superior (como el ser humano), el organismo se defiende a sí mismo mediante lo que se denomina la **respuesta inmunitaria**. Esta defensa tiene dos vertientes. En la **respuesta inmunitaria humoral**, las células linfáticas, denominadas **linfocitos B**, sintetizan moléculas de inmunoglobulina específicas que son secretadas de la célula y se unen a la sustancia invasora. Esta unión agrega la sustancia extraña y la marca para que sea destruida por las células denominadas **macrófagos**. En la **respuesta inmunitaria celular**, las células linfáticas, denominadas **linfocitos T**, que llevan moléculas similares a las inmunoglobulinas en sus superficies, identifican y destruyen a las células extrañas o aberrantes. En este apartado examinaremos fundamentalmente la respuesta inmunitaria humoral.

En la respuesta inmunitaria humoral, los linfocitos B secretan anticuerpos (inmunoglobulinas) que reaccionan con antígenos específicos.

La sustancia que desencadena una respuesta inmunitaria se denomina **antígeno**, y una inmunoglobulina específica que se una a esta sustancia se denomina **anticuerpo**. Si la partícula invasora es grande, como una célula, un virus o una proteína, puede provocar la formación de muchos anticuerpos diferentes, cada uno de los cuales se une específicamente a un **determinante antigénico** (o **epítopo**) dado en la superficie de la partícula (Figura 7.29a). Estos determinantes antigénicos pueden ser, por ejemplo, grupos de aminoácidos de la superficie de una proteína, o grupos de residuos de azúcares de un hidrato de carbono, como se muestra en el ejemplo de la Figura 7.29b.

La respuesta inmunitaria constituye nuestra primera línea de defensa frente a la infección, y probablemente también frente a las células cancerosas. Es la inhabilitación del sistema inmunitario producida por el virus de la inmunode-



(a) Precipitación

(b) Determinantes antigénicos, mioglobina de cachalote

FIGURA **7.29**

Determinantes antigénicos. (a) Un objeto extraño, o antígeno (como un virus, una célula bacteriana o una molécula proteica extraña), puede desencadenar la producción de anticuerpos frente a varios determinantes antigénicos distintos de su superficie. Cuando el antígeno se mezcla con su colección de anticuerpos, se produce la precipitación ya que cada molécula de anticuerpo posee dos lugares de unión para su determinante, de manera que se forma una red. **(b)** Determinantes antigénicos de la mioglobina de cachalote. Las porciones púrpuras corresponden a segmentos de la cadena polipeptídica que actúan como determinantes. Algunos determinantes incluyen porciones de la cadena que están muy alejadas en la secuencia primaria, pero que se encuentran próximas en la estructura terciaria. Las zonas blancas forman parte del determinante antigénico con tan sólo algunos anticuerpos.

(b) M. Z. Atassi, *Immunochem.* (1975) 12:435. © 1975 con permiso de Elsevier Science.

ficiencia humana (VIH) la que hace que el **SIDA** (**síndrome de inmunodeficiencia adquirida**) sea una enfermedad que ha resultado tan devastadora. Las víctimas del SIDA no fallecen por los efectos directos del virus, sino que mueren a causa de enfermedades infecciosas o cánceres, de los que su sistema inmunitario no es capaz ya de defenderles. (Véase la página 278.)

La respuesta inmunitaria tiene algunas características destacables. En primer lugar, es increíblemente versátil, y puede responder frente a un enorme número de sustancias extrañas diferentes. Estas sustancias extrañas van desde las células de otra persona de la misma especie (la base del rechazo de los trasplantes de órganos o tejidos) hasta las moléculas sintéticas que nunca podría haber encontrado en la naturaleza. En segundo lugar, la respuesta inmunitaria tiene lo que se denomina *memoria*. Así, después de una exposición inicial a un determinado antígeno, una segunda exposición en una fecha posterior dará lugar a una producción rápida y mucho más masiva de los anticuerpos específicos.

A los científicos les ha confundido durante mucho tiempo la respuesta inmunitaria. Concretamente, parecía difícil explicar de qué manera podían generarse anticuerpos específicos frente a millones de antígenos diferentes, algunos de los cuales ningún organismo había encontrado nunca con anterioridad. Las teorías iniciales, denominadas **teorías instructivas**, sugerían que un determinante antigénico podía inducir de alguna manera el que una molécula de anticuerpo adoptara un plegado terciario concreto, que actuaría luego como lugar de unión para ese determinante. Sin embargo, los modelos de este tipo vulneran el principio que se ha comentado en el Capítulo 6, es decir, que el orden superior de la estructura proteica viene dado enteramente por la estructura primaria. Los datos que indican que este mismo principio es válido para los lugares de unión de los anticuerpos proceden de los experimentos en los que se desnaturalizaba un anticuerpo frente a un determinante específico y se permitía luego que se renaturalizara. La capacidad de unir el antígeno, que se había perdido con la desnaturalización, se recuperaba a pesar de que el nuevo plegado tenía lugar en ausencia del antígeno.

Así pues, los datos existentes sugerían que el cuerpo posee una capacidad inherente para producir una inmensa diversidad de anticuerpos con distintas secuencias de aminoácidos que son capaces de unir una enorme gama de antígenos. La forma en la que puede actuar un sistema de este tipo se describe mediante la denominada **teoría de la selección clonal**, que está respaldada en la actualidad por pruebas totalmente convincentes. Los postulados básicos de la teoría de la selección clonal, que se ilustra en la Figura 7.30, son los siguientes:

Las explicaciones modernas de la respuesta inmunitaria se basan en la teoría de la selección clonal.

1. Las **células madre B** de la médula ósea se diferencian para hacerse linfocitos B, cada uno de los cuales produce un único tipo de molécula de inmunoglobulina; cada tipo tiene un lugar de unión que reconocerá una forma molecular específica. (Describiremos la generación de esta variación más adelante en este mismo capítulo.) Estas inmunoglobulinas o anticuerpos están unidas a la membrana celular y expuestas en las superficies externas de los linfocitos B.
2. La unión de un antígeno a uno de estos anticuerpos estimula a la célula portadora para que se replique, generando un **clon** (un conjunto de células con una información genética idéntica). Esta *respuesta primaria* se facilita por una clase especial de células T denominadas **células T colaboradoras**. Si una célula T colaboradora identifica un antígeno ligado, se une al linfocito B adecuado y le transmite una proteína señal (**interleucina-2**) que estimula la reproducción de la célula B. Así pues, sólo aquellos clones de células B que identifican a los antígenos se estimulan a una división celular continuada.

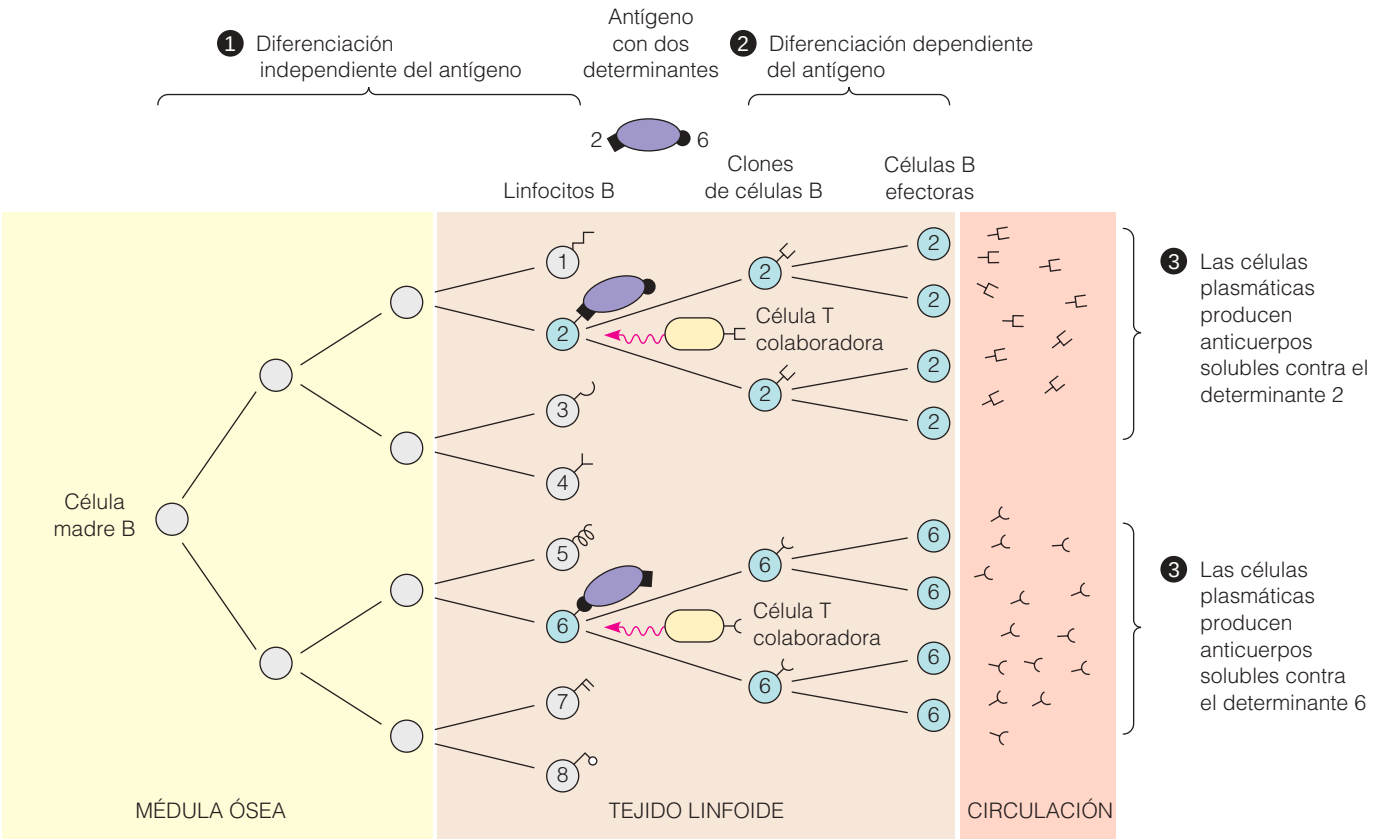


FIGURA **7.30**

Teoría de la selección clonal de la respuesta inmunitaria. **Paso 1:** las células madre de la médula ósea (células madre B, izquierda) se diferencian y emigran hacia el tejido linfoide. Cada una de las células diferenciadas (linfocitos B) sintetiza una clase particular de anticuerpo, que lleva en su superficie. Los linfocitos B de esta figura llevan los anticuerpos numerados del 1 al 8. **Paso 2:** cuando los linfocitos B encuentran a los antígenos, las células B que llevan los anticuerpos correspondientes a los determinantes antigénicos son estimuladas por las células T colaboradoras para que se multipliquen, formando clones de células B. En este caso, las células seleccionadas para formar clones son las que llevan los anticuerpos 2 y 6. **Paso 3:** algunas de las células B clonadas, denominadas células plasmáticas, producen anticuerpos solubles, de tal manera que cada clon produce un anticuerpo contra un único determinante. Otras células B clonadas se denominan células de memoria; su función se ilustra en la Figura 7.31.

Adaptado con permiso de J. Darnell, H. Lodish, and D. Baltimore, *Molecular Cell Biology;* ©1986 Scientific American Books, Inc.

3. Como se muestra en las Figuras 7.30 y 7.31, se producen dos clases de células B clonadas. Las **células B efectoras** o **células plasmáticas**, producen ahora anticuerpos *solubles*, que se excretan al sistema circulatorio. Estos anticuerpos tienen los mismos lugares de unión del antígeno que los anticuerpos de superficie del linfocito B a partir del cual han surgido las células efectoras, pero carecen de la cola hidrófoba que une los anticuerpos de superficie a la membrana del linfocito. La otra clase de células del clon (las **células de memoria**) persistirá durante un cierto tiempo, aun después de que el antígeno haya desaparecido. Esta persistencia constituye la memoria inmunitaria, que permite que se produzca una *respuesta secundaria* rápida ante una segunda estimulación por parte del mismo antígeno, como se muestra en la Figura 7.31.

La teoría de la selección clonal explica muchas de las características de la respuesta inmunitaria y lo hace de manera compatible con lo que sabemos acerca de los determinantes del plegado de las proteínas. Pero tal vez se le haya ocurrido una pregunta crucial: ¿por qué no encontramos clones que produzcan anticuerpos contra *nuestras propias* proteínas y tejidos? La respuesta es fascinante y nos explica mucho sobre la forma en que se establece cuál es el contenido bioquímico "propio". Cuando las células B inmaduras del feto se encuentran con sustancias que se unen a sus anticuerpos de superficie, *no* se estimulan para replicarse. En vez de ello, estas células B fetales son destruidas. Ello hace que las células B que producen anticuerpos contra todos los posibles antígenos "propios" con los que podrían reaccionar se eliminen antes del nacimiento. Las únicas células B que maduran son las que producen anticuerpos contra las sustancias "no propias".

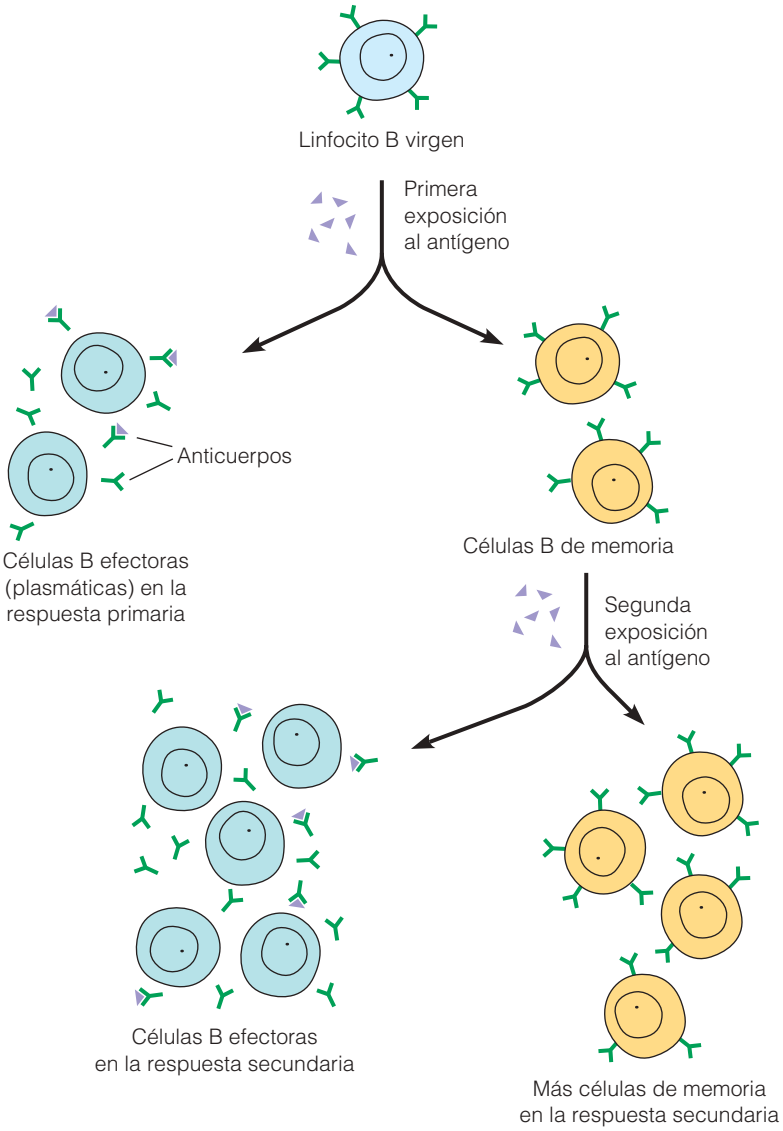


FIGURA **7.31**

Dos vías de desarrollo para los linfocitos B estimulados. La exposición al antígeno hace que se desarrollen dos tipos de células a partir de los linfocitos B. Las de un tipo (células B efectoras o células plasmáticas) sintetizan el anticuerpo soluble. Las células del segundo tipo (células de memoria) llevan el anticuerpo ligado a la membrana para permitir una respuesta rápida ante una segunda exposición.

A veces, el sistema inmunitario se altera y produce anticuerpos contra los tejidos normales de un adulto. Las causas de esta **autoinmunidad** no se conocen del todo, pero las enfermedades producidas pueden ser devastadoras. Por ejemplo, en el *lupus eritematoso* son los propios ácidos nucleicos de la persona los que son objeto del ataque.

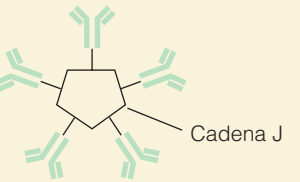
ESTRUCTURA DE LOS ANTICUERPOS

Para ver cómo actúa realmente la selección clonal a nivel molecular, debemos explorar la estructura de las moléculas de inmunoglobulina que constituyen el arsenal de anticuerpos. Existen cinco clases de moléculas de inmunoglobulina, que desempeñan diversas funciones en el sistema inmunitario (Tabla 7.3). Sin embargo, todas ellas se construyen a partir del mismo patrón de inmunoglobulina básico, que se presenta en un esquema molecular en la Figura 7.32. Las distintas clases de anticuerpos pueden contener de una a cinco moléculas de inmunoglobulina; cuando hay más de una, los monómeros están unidos por un segundo tipo de polipéptido denominado cadena J (véase la Tabla 7.3).

Las moléculas de inmunoglobulina contienen regiones constantes y regiones variables. Estas últimas son los lugares de unión del antígeno.

TABLA 7.3 Las cinco clases de inmunoglobulinas

La IgM se produce durante la respuesta inicial contra un microorganismo invasor. Es la inmunoglobulina más grande y contiene cinco unidades en forma de Y con dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas cada una. Las unidades se mantienen juntas mediante un componente denominado cadena J. El tamaño relativamente grande de la IgM limita su presencia al torrente sanguíneo. Es también eficaz en desencadenar un mecanismo importante para la destrucción de las células extrañas, que se denomina sistema del complemento.

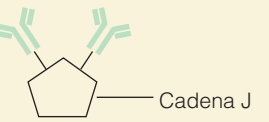


IgM
(pentámero)

Las moléculas de IgG, también denominadas *γ-globulinas*, son los anticuerpos circulantes más abundantes. Una variante de ellas se fija a las superficies de las células B. Las moléculas de IgG están formadas por una sola unidad en forma de Y y pueden atravesar con bastante facilidad las paredes de los vasos sanguíneos; también atraviesan la placenta y llevan parte de la protección inmunitaria materna al feto en desarrollo. Este paso está permitido por receptores específicos. La IgG desencadena también el sistema del complemento.

IgG
(monómero)

La IgA se encuentra en las secreciones corporales, como la saliva, el sudor y las lágrimas, y a lo largo de las paredes del intestino. Es el principal anticuerpo del calostro, la secreción inicial mamaria de la madre tras el parto, y de la leche. La IgA se encuentra en forma de monómero o de agregados de dos unidades de la molécula proteica en forma de Y. Las moléculas de IgA tienden a disponerse a lo largo de la superficie de las células corporales y a combinarse allí con los antígenos, como los situados en la superficie de una bacteria, con lo que impiden que la sustancia extraña se fije directamente a la célula corporal. La sustancia invasora puede eliminarse entonces del organismo junto con la molécula de IgA.



IgA
(monómero
o dímero)

Se sabe menos sobre las inmunoglobulinas IgD e IgE. Las moléculas de IgD se encuentran en la superficie de las células B, pero no se sabe mucho sobre su función. La IgE se asocia con algunas de las respuestas alérgicas del cuerpo, y sus concentraciones están elevadas en las personas que sufren alergias. Las regiones constantes de las moléculas de IgE pueden unirse fuertemente a los mastocitos, un tipo de células del tejido epitelial y conjuntivo que libera histaminas como parte de la respuesta alérgica. Tanto las IgD como las IgE están formadas por unidades sencillas en forma de Y.

IgD
(monómero)

IgE
(monómero)

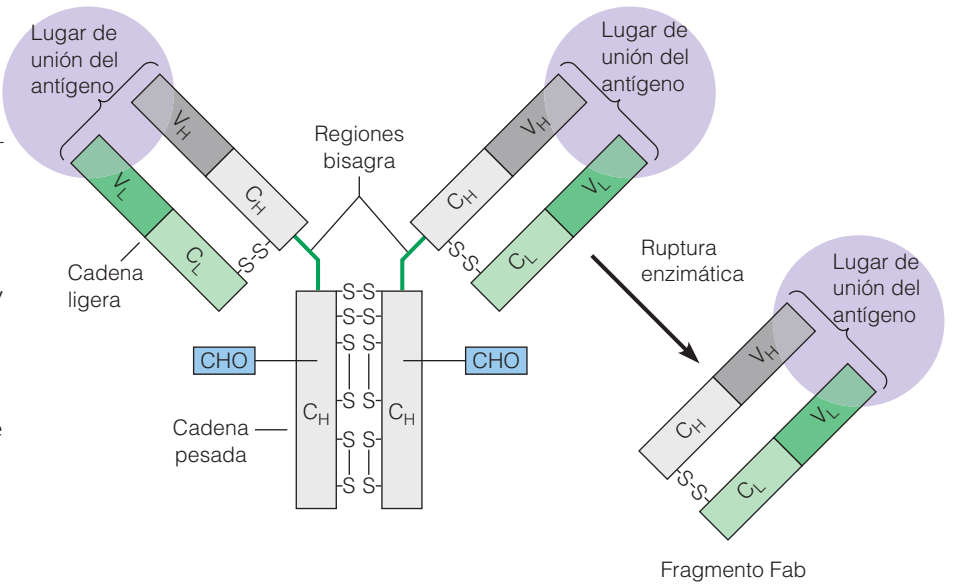


FIGURA **7.32**

Modelos esquemáticos de una molécula de anticuerpo y un fragmento Fab. La molécula de anticuerpo se construye con dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, que se mantienen juntas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena contiene dominios *constantes* (C) y dominios *variables* (V). Los dominios constantes son los mismos en todas las moléculas de anticuerpo de una determinada clase (véase la Tabla 7.3), mientras que los dominios variables confieren especificidad frente a un determinante antigénico concreto. La rotura mediante determinadas enzimas proteolíticas, como la papaína, en la *región bisagra* permite la producción de *fragmentos Fab* monovalentes. El hidrato de carbono (CHO) unido a las cadenas pesadas facilita la determinación de los destinos de los anticuerpos en los tejidos y la estimulación de las respuestas secundarias como la fagocitosis. En la Figura 7.33 se muestra un modelo molecular de una molécula de inmunoglobulina, derivado de los estudios de difracción de rayos X.

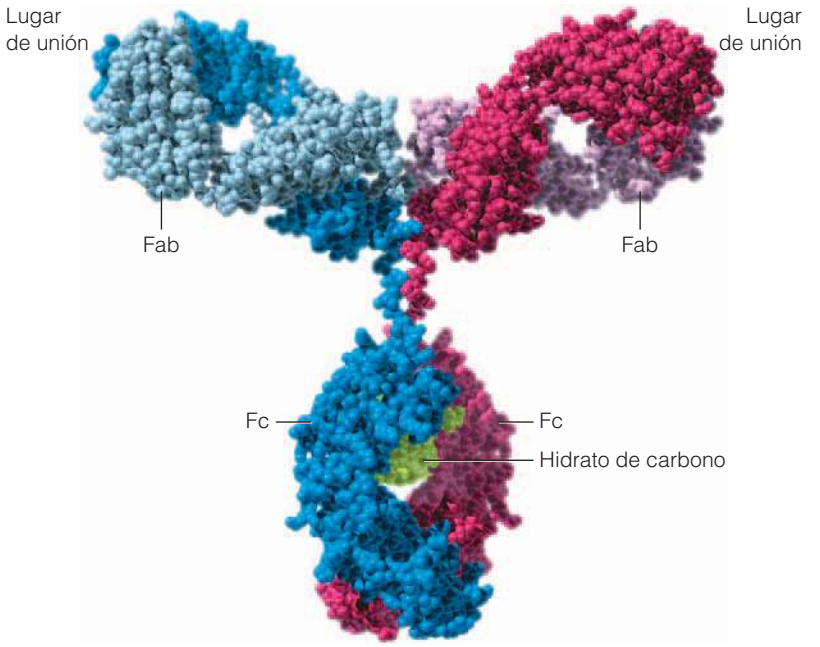


FIGURA **7.33**

Modelo de la molécula de IgG a partir de los estudios de difracción de rayos X. Las cadenas pesadas están coloreadas de rojo oscuro y de azul oscuro, y las cadenas ligeras correspondientes, de rojo claro y azul claro. Los hidratos de carbono unidos a la cadena pesada están en verde.

Adaptado de E. A. Padlan *Mol. Immunol.* (1994) 31:169–217. © 1975 con permiso de Elsevier Science.

Cada monómero de inmunoglobulina está formado por cuatro cadenas, dos cadenas pesadas (M = 53 000 cada una) y dos cadenas ligeras (M = 23 000 cada una), que se mantienen unidas mediante enlaces disulfuro. En cada cadena existen **dominios constantes** (idénticos para todos los anticuerpos de una clase determinada) y un **dominio variable**. Son las variaciones de la secuencia de aminoácidos (y por tanto de la estructura terciaria) de los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas lo que crea la enorme diversidad de especificidades de los antígenos para distintos determinantes. Obsérvese que los cuatro dominios variables se encuentran en los extremos de la horquilla en forma de Y de la molécula, en donde forman dos lugares de unión para los determinantes antigénicos.

Una proteína grande, un virus o una célula bacteriana tienen en su superficie muchos posibles determinantes antigénicos potenciales. Pueden generarse anticuerpos frente a varios de estos determinantes, uniendo muchas moléculas de antígeno juntas, y de esta manera agregando el antígeno (véase la Figura 7.29a). Si el antígeno es tan pequeño que sólo posee un determinante, se producirá la unión pero no habrá agregación. La precipitación requiere también que el anticuerpo sea *bivalente* (es decir, que tenga dos lugares de unión). Mediante una proteólisis cuidadosa, es posible romper los anticuerpos por la región bisagra (véase la Figura 7.32) para producir **fragmentos Fab** con un solo lugar de unión cada uno. Estos fragmentos unirán el antígeno pero no lo precipitarán.

El lugar de unión del antígeno se encuentra en el final del extremo de los dominios variables y en él participan aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. Diferentes secuencias de estas regiones variables originan distintas estructuras secundarias y terciarias locales y pueden definir de esta manera lugares de unión adaptados a distintos antígenos. La Figura 7.34 muestra los resultados de los estudios de difracción de rayos X de la interacción de un fragmento Fab con un antígeno proteico, la lisozima. Se establecen contactos estrechos entre 16 residuos de la lisozima, y 10 residuos de la cadena pesada y 7 de la cadena ligera. Las superficies del antígeno y del anticuerpo encajan juntas de una forma muy complementaria.

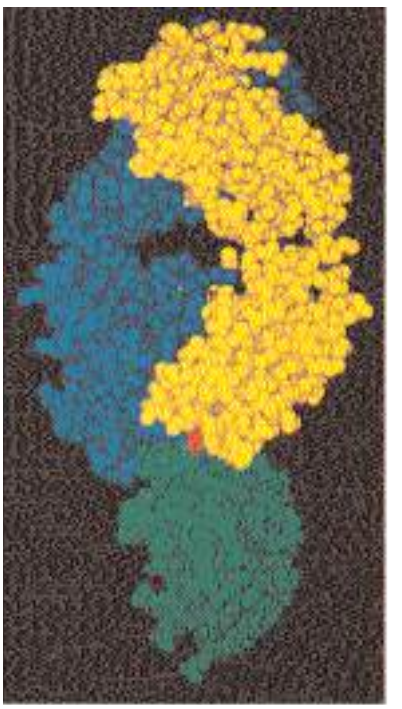


FIGURA **7.34**

Unión del antígeno por un fragmento Fab. La unión de un fragmento Fab a un antígeno específico, la proteína lisozima, muestra el estrecho contacto que se produce entre las superficies del antígeno y el anticuerpo. La cadena ligera del anticuerpo se indica en amarillo, el fragmento de cadena pesada en azul, y la molécula de lisozima en verde. El punto rojo corresponde a la Glu 121 de la lisozima, que encaja ajustadamente dentro de la hendidura existente entre las cadenas ligeras y pesadas. Las superficies de la lisozima y del lugar de unión del anticuerpo encajan ajustadamente juntos, y se establecen diversos enlaces de hidrógeno específicos a través de esta superficie.

Cortesía de A. G. Amit, R. A. Mariuzza, S. E. Phillips, y R. J. Poljiak, *Science* (1986) 233:747–753; © 1986 AAAS.

Los dominios constantes de las cadenas pesadas de la base de la molécula en forma de Y no sólo sirven para mantener las cadenas unidas. Estas regiones actúan también como efectores, para señalar a los macrófagos del sistema circulatorio que ataquen a las partículas o células que han sido marcadas por la unión del anticuerpo. Los macrófagos son leucocitos grandes que están especialmente adaptados para la función de engullir y digerir las partículas extrañas. Además, las diferencias de las cadenas pesadas identifican los tipos de inmunoglobulinas para su descarga a los distintos tejidos, o para su secreción (véase la Tabla 7.3).

GENERACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE ANTICUERPOS

¿Cómo puede generarse la enorme diversidad de moléculas de inmunoglobulina que hace que se formen anticuerpos frente a una gama casi ilimitada de antígenos? El genoma humano no dispone de espacio suficiente para codificar un gen para cada una de los millones de moléculas de inmunoglobulina diferentes que se producen en las células madre B. En su lugar, en estas células tienen lugar dos procesos especiales.

El principal origen de la diversidad de anticuerpos es la *recombinación de exones*. Los genomas de los vertebrados superiores contienen "bibliotecas" de exones que corresponden a distintas partes de la molécula de inmunoglobulina y mecanismos para el reordenamiento de estos exones con objeto de crear distintas combinaciones tanto en las cadenas pesadas como en las ligeras. Hemos mencionado ya que estos reordenamientos, cuando se producen en las células productoras de espermatozoides o de óvulos, desempeñan un importante papel en la evolución proteica. El mismo proceso, cuando se produce en las células B, crea nuevas inmunoglobulinas en las células individuales. Las características y el mecanismo de este proceso se describirán en el Capítulo 25.

Mediante la recombinación somática y la mutación rápida, un ser humano es capaz de generar más de 100 millones de anticuerpos diferentes.

Un origen adicional de la diversidad de anticuerpos son las *mutaciones somáticas*, mutaciones que no se heredan, puesto que se producen en las células somáticas (es decir, las células que no son de la línea germinal). En las células que generan los anticuerpos, determinadas partes de las regiones variables de los genes de las inmunoglobulinas, sufren mutaciones con una frecuencia excepcionalmente elevada. La causa de estas tasas elevadas de mutación localizadas continúa sin estar clara, pero este proceso, junto con la recombinación de fragmentos génicos, puede explicar la generación de una inmensa diversidad de moléculas de inmunoglobulinas. Se ha calculado que pueden formarse alrededor de 100 millones de combinaciones a partir de la biblioteca de los fragmentos génicos de las inmunoglobulinas existentes en el genoma humano.

CÉLULAS T Y RESPUESTA CELULAR

Mientras que la respuesta inmunitaria humoral se basa en la agregación producida por los anticuerpos, seguida normalmente por la digestión por los macrófagos, la respuesta inmunitaria celular se basa en un mecanismo muy diferente para destruir las células extrañas. La respuesta celular desempeña un papel importante en el rechazo de los tejidos y en la destrucción de las células infectadas por los virus. También puede destruir posibles células cancerosas antes de que éstas hayan tenido la posibilidad de propagarse. Aunque el mecanismo de los procesos humoral y celular es muy diferente, en ambos casos intervienen moléculas de inmunoglobulina similares (Figura 7.35), lo cual apunta a un origen evolutivo común para las respuestas humoral y celular.

La respuesta inmunitaria celular utiliza las células T destructoras para destruir las células extrañas o infectadas.

Los principales participantes en la respuesta inmunitaria celular son las **células T citotóxicas**, también denominadas **células T destructoras**. Estas células

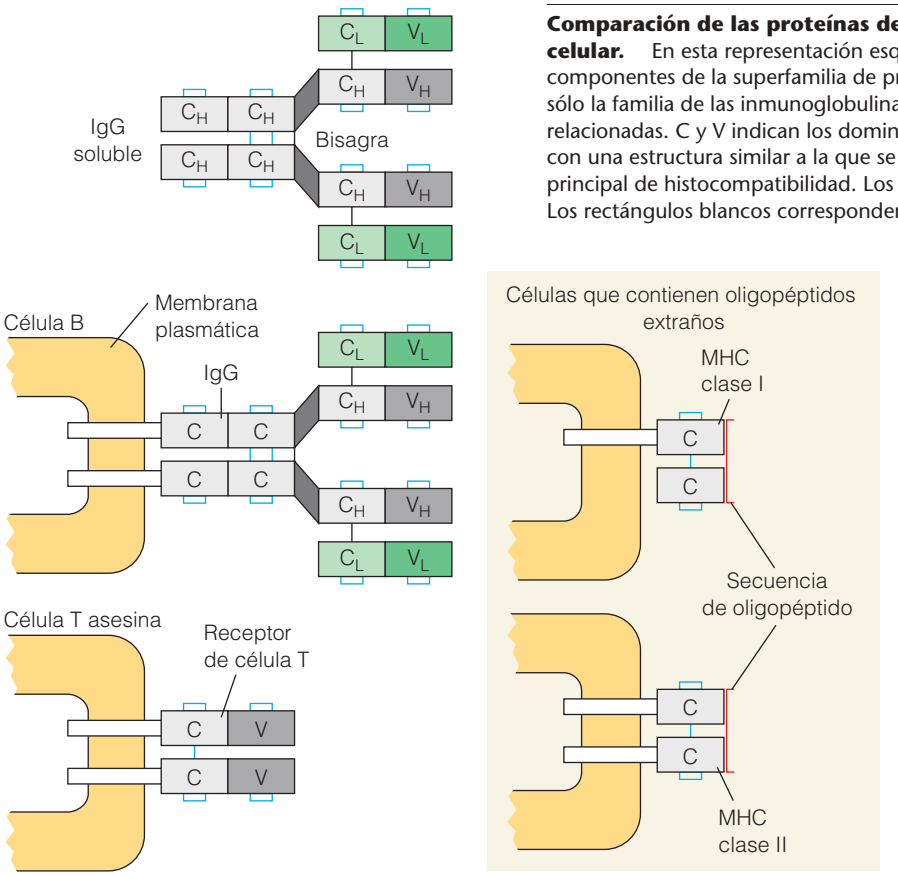


FIGURA **7.35**

Comparación de las proteínas de las respuestas inmunitarias humoral y celular. En esta representación esquemática se muestra la semejanza estructural de los componentes de la superfamilia de proteínas de las inmunoglobulinas, que incluye no sólo la familia de las inmunoglobulinas, sino también muchas familias de proteínas relacionadas. C y V indican los dominios constante y variable, respectivamente, cada uno con una estructura similar a la que se muestra en la Figura 7.36. MHC indica el complejo principal de histocompatibilidad. Los puentes disulfuro de conexión se indican en azul. Los rectángulos blancos corresponden a los dominios de unión a la membrana.

llevan en su superficie moléculas receptoras que son muy similares a los fragmentos Fab de las moléculas de anticuerpos. Al igual que los anticuerpos, estos fragmentos poseen una amplia gama de especificidades de unión en su mayor parte dirigidas hacia secuencias oligopeptídicas cortas. Estos oligopéptidos podrían producirse, por ejemplo, por una célula infectada por un virus cuando se produce una digestión parcial de las partículas víricas en su interior. El receptor de las células T no reconoce los oligopéptidos libres, sino que éstos deben presentarse sobre la superficie de las células infectadas y unidos a otra clase de moléculas similares a las inmunoglobulinas, las proteínas del **complejo principal de histocompatibilidad** (proteínas **MHC**, véase la Figura 7.35). Cuando una célula T destructora identifica (mediante su receptor) un antígeno adecuado transportado en la superficie de otra célula por una proteína MHC, libera una proteína denominada **perforina**. Esta proteína forma poros en la membrana plasmática de la célula que está siendo atacada, lo cual permite la difusión hacia el exterior de iones esenciales y, de esta manera se destruye la célula.

Como se resalta en la Figura 7.35, tanto los anticuerpos de la respuesta humoral como las moléculas que intervienen en la respuesta celular contienen elementos de estructura común. Esta semejanza es aún mayor que la que sugiere la figura. Los dominios de estas moléculas se construyen con un motivo común, el *pliegue de inmunoglobulina*, en el que dos láminas β antiparalelas se encuentran una frente a otra (Figura 7.36). Esta estructura constituye probablemente el elemento estructural primitivo en el proceso evolutivo de la respuesta inmunitaria. De hecho, el pliegue de inmunoglobulina se encuentra también en otras proteínas que intervienen en el reconocimiento celular.

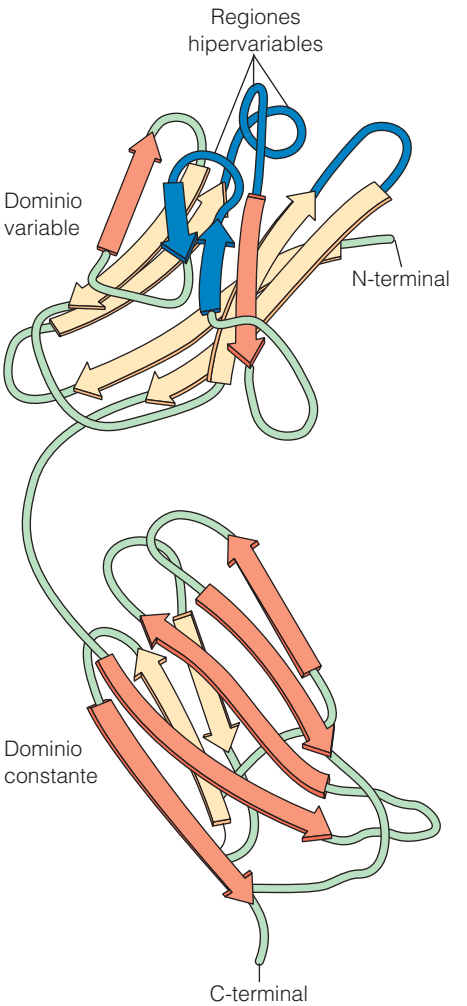


FIGURA **7.36**

Pliegue de inmunoglobulina. El pliegue de inmunoglobulina es una estructura común en los dominios de muchas proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Hay dos capas de láminas β antiparalelas apiladas una frente a la otra. En este modelo de una cadena ligera de inmunoglobulina, el pliegue se produce dos veces: una vez en la región constante y otra en la región variable.

Tomado de C. Branden y J. Tooze, *Introduction to Protein Structure* (Nueva York: Garland Publishing 1991), p. 187. © 1991 Garland Publishing.

Resulta instructivo comparar la familia de proteínas de las inmunoglobulinas con la familia mioglobina-hemoglobina. En ambos casos, la función primaria de las proteínas es la unión. En la familia mioglobina-hemoglobina observamos indicios de la evolución progresiva de métodos cada vez más sofisticados para regular la unión de una molécula concreta (el oxígeno) y para acoplar la unión del oxígeno con la unión del CO_2. En la familia de las inmunoglobulinas, la evolución a partir de un motivo sencillo ha conducido a una enorme diversificación de la función de unión. La evolución ha dado lugar a un mecanismo que permite la producción de una inmensa gama de moléculas con capacidades de unión específicas. Distintas tareas requieren distintas herramientas.

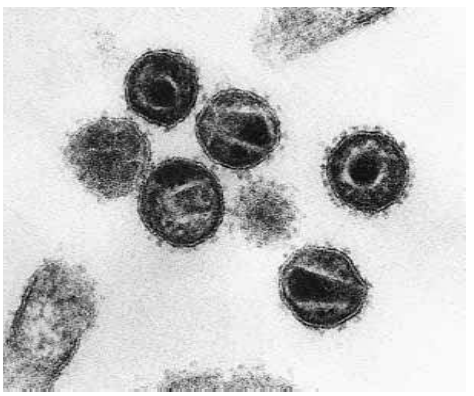
SIDA y respuesta inmunitaria

El SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) es una enfermedad del sistema inmunitario. La produce el virus de la inmunodeficiencia humana o VIH (Figura 7.37), que ataca a numerosos tipos de células pero es especialmente virulento frente a una clase de células T colaboradoras. El virus libra una prolongada batalla con las células T de replicación rápida, pero finalmente la velocidad de destrucción celular supera el ritmo de replicación. La consecuencia es un deterioro de toda la respuesta inmunitaria, en especial de la capacidad de las células B de proliferar en respuesta a la estimulación antigénica. Además, se produce un fallo general de la activación de las células T. La mayor parte de los pacientes con SIDA sucumben ante enfermedades a las que podrían haber resistido con facilidad antes de contraer el SIDA, o ante determinados tipos de cáncer. El SIDA tiene unos efectos tan mortíferos porque afecta a nuestras defensas más fundamentales frente a toda enfermedad.

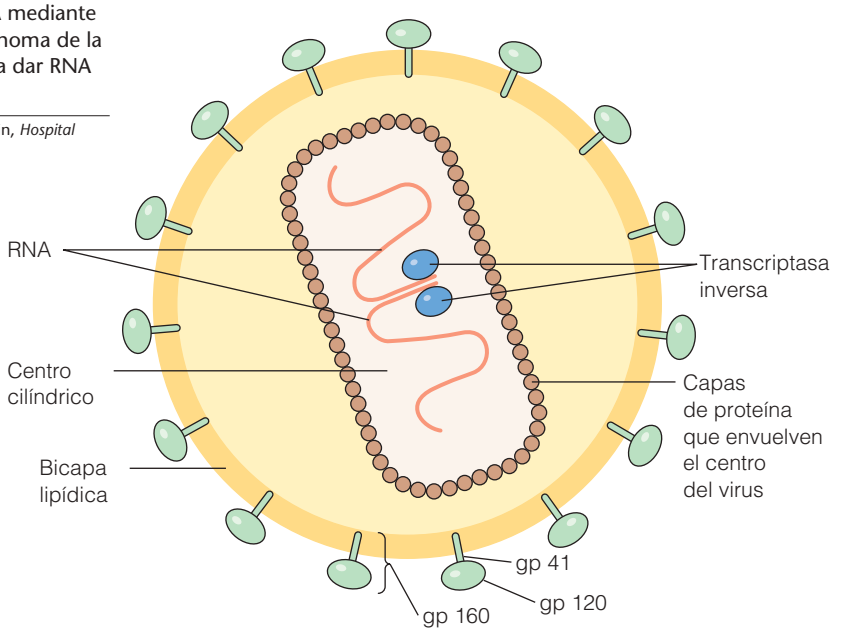
FIGURA **7.37**

(a) Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que es el responsable del SIDA. **(b)** Modelo esquemático del VIH. La proteína de superficie gp160 está formada por dos fragmentos, gp41 y gp120. El genoma de RNA se transcribe a DNA mediante una transcriptasa inversa. Este DNA se integra en el genoma de la célula hospedadora y posteriormente se transcribe para dar RNA vírico nuevo.

(a) Cortesía de Hans Gelderblom; **(b)** Tomado de Hoth, Jr., Myers, y Stein, *Hospital Practice* 27:9, p. 154. Ilustración © Alan D. Iselin.



(a)



(b)

En el SIDA, el virus causal ataca a las células T colaboradoras, destruyendo el sistema de defensa inmunológico del cuerpo.

Dado que el SIDA plantea una amenaza tan grave para la salud mundial, se está trabajando intensamente en la búsqueda de una vacuna. Estas investigaciones comportan problemas poco habituales, puesto que el virus del SIDA tiene una capacidad sin igual de mutar y desarrollar, por tanto, cepas resistentes frente a cualquier vacuna. Las mutaciones se producen en el genoma del VIH a un ritmo muy superior al que se da en el genoma humano. La variación genética se ve incrementada por los muchos ciclos de replicación del virus y por el hecho de que la transcriptasa inversa (Figura 7.37) es muy propensa a los errores. La magnitud del problema puede apreciarse teniendo en cuenta nuestra experiencia con el virus de la gripe. Nunca hemos sido capaces de producir una vacuna "antigripal" de por vida, dada la gran variabilidad del virus de la gripe. El VIH sufre mutaciones con una rapidez unas 60 veces superior a la del virus de la gripe.

Debido a la dificultad para producir vacunas y al hecho de que la infección por el VIH se ha extendido ya tanto, deben continuar realizándose esfuerzos igualmente activos para producir un tratamiento. Los esfuerzos que han tenido más éxito han utilizado una combinación de estrategias. Por un lado, puede enlentecerse la replicación del virus mediante inhibidores específicos de la transcriptasa inversa. Una estrategia bastante diferente utiliza un inhibidor de proteasa para bloquear el paso proteolítico esencial en la maduración de nuevos virus dentro de las células infectadas. Puede esperarse que las combinaciones de estos tratamientos, junto con una vacuna definitiva, detendrá esta plaga.

RESUMEN

La mayor parte de los organismos necesitan oxígeno. Los vertebrados utilizan la hemoglobina para el transporte de oxígeno y la mioglobina para el almacenamiento del mismo. En estas proteínas, el O_2 está unido a una Fe(II)-porfirina (hemo); el hemo se transporta en un bolsillo hidrófobo, que inhibe la oxidación del hierro. La mioglobina lleva un único lugar de unión de oxígeno y, por consiguiente, presenta una curva de unión hiperbólica no cooperativa. La hemoglobina une el O_2 de manera cooperativa, con una curva de unión sigmoidea que da lugar a una transferencia más eficaz. Esta cooperatividad la consigue al ser una proteína tetramérica alostérica. La unión del O_2 a los lugares de la hemoglobina da lugar a modificaciones de la estructura terciaria. Cuando se acumula la tensión de estos cambios, se produce una transición cuaternaria ($T \longrightarrow R$), con un desplazamiento de la molécula desde la forma de unión débil a la de unión fuerte. La transición alostérica permite también que los efectores alostéricos (H^+, CO_2, BPG) modifiquen la unión del oxígeno, dando lugar a un transporte de O_2 y CO_2 más eficaz.

La mioglobina y la hemoglobina, al igual que otras proteínas, evolucionan mediante mutaciones, duplicaciones y recombinaciones de sus genes. Ambos tipos de globinas han evolucionado a partir de una proteína ancestral similar a la mioglobina, de tal manera que la aparición de una hemoglobina verdadera coincide aproximadamente con la aparición de los vertebrados. La evolución de estas proteínas continúa, tal como indica la existencia de una multitud de hemoglobinas variantes en la población humana. La mayor parte de las mutaciones por sustitución de bases (sentido equivocado) son neutras, pero algunas, como la mutación de la hemoglobina drepanocítica, son nocivas. Las talasemias son hemoglobinopatías que se deben a la eliminación o a la expresión defectuosa de genes completos o de conjuntos de genes.

La respuesta inmunitaria es la principal defensa del cuerpo frente a la infección. En la respuesta humoral, se generan y secretan anticuerpos (moléculas de inmunoglobulina específicas) que se unirán a los antígenos específicos. Este proceso se produce porque el reconocimiento del antígeno por parte de unas pocas células da lugar a la selección clonal de un gran número de células que producen el anticuerpo adecuado. La inmensa diversidad de anticuerpos se consigue mediante múltiples recombinaciones somáticas y mutaciones rápidas en las células productoras de anticuerpos. La respuesta inmunitaria celular implica células T destructoras portadoras de receptores. El SIDA es una enfermedad del sistema inmunitario, en la que el VIH ataca a las células T que son esenciales para la proliferación de los clones de células B.

BIBLIOGRAFÍA

General

Dickerson, R. E. e I. Geis (1983) *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology*. Benjamin/Cummings, Redwood City, Calif. Una información muy detallada sobre la mioglobina y la hemoglobina, que incluye muchos datos sobre la evolución y las variantes de la hemoglobina.

van Holde, K. E., W. C. Johnson y P.-S. Ho (1998) *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J. El Capítulo 15 contiene un tratamiento más detallado del equilibrio de unión del que se presenta aquí.

Modelos alostéricos

Los artículos de Koshland et al. y de Monod et al. presentaron las principales clases de modelos alostéricos. Los otros artículos describen estudios más recientes.

Ackers, G. (1998) Deciphering the molecular code of hemoglobin allostery. *Adv. Protein Chem.* 51:185-253.

Barrick, D., N. T. Ho, V. Simplaceanu, F. Dahlquist y C. Ho (1997) A test of the role of the proximal histidines in the Perutz model for cooperativity in haemoglobin. *Nature Struct. Biol.* 4:78-83.

Gelin, B. R., A. W.-M. Lee y M. Karplus (1983) Hemoglobin tertiary structural change on ligand binding. *J. Mol. Biol.* 171:489-559. Detallado y difícil.

Koshland, D. E., G. Nemethy y D. Filmer (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5:365-385.

Monod, J., J. Wyman y J.-P. Changeux (1965) On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* 12:88-118.

Dinámica de la unión y liberación del oxígeno

Case, D. A. y M. Karplus (1979) Dynamics of ligand binding to heme proteins. *J. Mol. Biol.* 132:343-368. Un artículo pionero sobre la dinámica proteica.

Evolución de la hemoglobina

Hardison, R. (1991) Evolution of globin gene families. En: *Evolution at the Molecular Level*, editado por R. K. Selander, A. G. Clark y T. S. Whittam, pp. 272-295. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

Hemoglobinas variantes y hemoglobinopatías

Embury, S. H. (1986) The clinical pathophysiology of sickle cell disease. *Annu. Rev. Med.* 37:361-376.

Honig, G. R. y J. G. Adams (1986) *Human Hemoglobin Genetics*. Springer-Verlag, Berlín, Nueva York. Un tratamiento completo.

Ingram, V. M. (1957) Gene mutation in human haemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature* 180:326-328. Un artículo clásico, en el que se identificó por primera vez el locus del aminoácido y el cambio genético de una enfermedad genética.

Orkin, S. H. y D. G. Nathan (1981) The molecular genetics of thalassemia. *Adv. Hum. Genet.* 11:233-280.

Pauling, L., H. A. Itano, S. J. Singer e I. C. Wells (1949) Sickle cell anemia: A molecular disease. *Science* 110:543-548. Introducción del concepto de enfermedades moleculares.

Anticuerpos

Darnell, J., H. Lodish y D. Baltimore (1986) *Molecular Cell Biology*, Capítulo 24. Scientific American Publishing Co., Nueva York. Una presentación elegante y detallada.

Kuby, J. (1992) *Immunology*. W. H. Freeman, Nueva York. Un texto lúcido y completo.

Stanfield, R. L., T. M. Fieser, R. A. Lerner e I. A. Wilson (1990) Crystal structures of an antibody to a peptide and its complex with peptide antigen at 2.8 Å. *Science* 248:712-719. Detalles de la interacción.

Tonegawa, S. (1985) The molecules of the immune system. *Sci. Am.* 253(4):104-115. Descripción concisa y de fácil lectura.

SIDA

El número del 19 de junio de 1998 de *Science* tiene varios artículos sobre el SIDA y el VIH.

Coffin, J. M. (1995) HIV population dynamics in vivo: Implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267:483-489.

PROBLEMAS

1. Los datos que se presentan a continuación describen la unión del oxígeno a la mioglobina humana a 37°C.

P_{O_2} (mm Hg)	θ	P_{O_2} (mm Hg)	θ
0.5	0.161	6	0.697
1	0.277	8	0.754
2	0.434	12	0.821
3	0.535	20	0.885
4	0.605		

A partir de estos datos, calcular: (a) el valor de la P_{50} y (b) el porcentaje de saturación de la mioglobina a 30 mm de Hg, la presión parcial de O_2 en la sangre venosa.

2. ¿Qué efecto cualitativo cabría prever que tuviera cada una de las siguientes modificaciones sobre la P_{50} de la hemoglobina?
   (a) Aumento del pH desde 7.2 a 7.4
   (b) Aumento de la P_{CO_2} desde 20 a 40 mm Hg
   (c) Disociación en cadenas polipeptídicas monoméricas

*3. Las medidas de la unión del oxígeno por la sangre humana total, a 37°C, pH 7.4, en presencia de 40 mm de CO_2, y con unas concentraciones fisiológicas normales de BPG (5 mmol/L de células), dan los siguientes resultados:

P_{O_2} (mm Hg)	% de saturación (= 100 × θ)
10.6	10
19.5	30
27.4	50
37.5	70
50.4	85
77.3	96
92.3	98

   (a) A partir de estos datos, dibuje la curva de unión y calcule el porcentaje de saturación de oxígeno de la sangre a: (1) 100 mm Hg, la presión parcial aproximada de O_2 en los pulmones, y (2) 30 mm Hg, la presión parcial aproximada de O_2 en la sangre venosa.
   (b) En estas condiciones, ¿qué porcentaje del oxígeno unido en los pulmones se descarga en los tejidos?
   (c) Con el empleo de los datos de la Figura 7.16, repetir el cálculo de la parte (b) si el pH disminuye a 6.8 en los capilares, pero vuelve a 7.4 cuando se descarga el CO_2 en los pulmones.

4. Se observa que el ion cloruro actúa como efector alostérico negativo de la hemoglobina. Sugiera una explicación posible de por qué debe ser así.

5. Se han obtenido datos precisos para la unión del oxígeno de la hemoglobina humana aislada a 25°C:

P_{O_2} (mm Hg)	% de saturación (= 100 × θ)	P_{O_2} (mm Hg)	% de saturación (= 100 × θ)
0.10	0.315	5.75	76.0
0.350	0.990	7.94	90.9
0.794	3.06	12.88	96.9
1.748	9.09	29.51	99.0
2.884	24.0	67.60	99.7
4.467	50.0		

Utilizar una representación de Hill para determinar: (a) la P_{50}, (b) n_H (pendiente máxima) y (c) los valores de P_{50} correspondientes a los estados T y R.

*6. G. Ackers, M. L. Johnson, F. C. Mills et al., en *Biochemistry* (1975) 14:5128-5134, han observado que la P_{50} de la hemoglobina purificada disminuye a medida que se reduce la concentración de hemoglobina en la disolución. Sugerir una explicación.

7. Se ha medido la unión del oxígeno por la hemocianina de la gamba *Callianassa*. Con el empleo de los siguientes datos, preparar una representación de Hill y determinar: (a) la P_{50}, (b) el n_H (el coeficiente de Hill) y (c) el número *mínimo* de lugares de unión de oxígeno en la molécula proteica.

P_{O_2} (mm Hg)	θ	P_{O_2} (mm Hg)	θ
1.1	0.003	136.7	0.557
7.7	0.019	166.8	0.673
10.7	0.035	203.2	0.734
31.7	0.084	262.2	0.794
71.9	0.190	327.0	0.834
100.5	0.329	452.0	0.875
123.3	0.487	736.7	0.913

8. Sugerir las consecuencias probables de las siguientes mutaciones reales o posibles de la hemoglobina. [Nota: Consulte las Figuras 7.12 y 7.18.]
   (a) En β 146 (HC3) His ⟶ Asp
   (b) En β 92 (F8) His ⟶ Leu
   (c) En β 2 (NA2) His ⟶ Asp

   Indicar en cada caso si el cambio de una sola base es suficiente para la mutación.

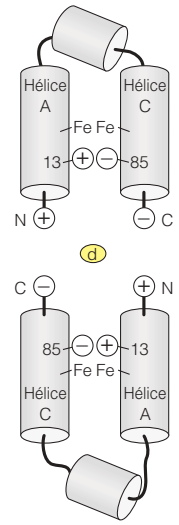
9. Supóngase que cada uno de los mutantes indicados en el Problema 8 se estudiara mediante electroforesis en comparación con la hemoglobina nativa (pI = 7.0) a pH 8.0. ¿Cuál se desplazaría hacia el ánodo con mayor rapidez que la proteína nativa, y cuál se desplazaría de forma más lenta?

*10. En principio, una molécula alostérica podría presentar una cooperatividad *negativa*, es decir, la unión de los primeros ligandos podría reducir la afinidad por otros adicionales.
   (a) ¿Qué aspecto tendría una representación de Hill para la cooperatividad negativa?
   (b) Se ha observado que la teoría KNF permite una cooperatividad negativa, mientras que la teoría MHC no la permite. Explíquelo.

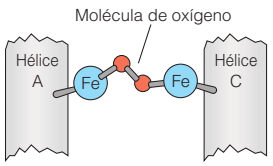
11. En el experimento de Barrick et al. (véase la página 23) se observó que la sustitución de histidina por un imidazol no unido de forma covalente, no sólo redujo la cooperatividad sino que también aumentó la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Sugerir una explicación.

12. Suponga que se ha descubierto una nueva proteína de transporte de oxígeno en determinados animales invertebrados. La difracción de rayos X de la proteína desoxi ha demostrado que tiene la estructura dimérica que se presenta en la parte (a) con un puente salino entre los residuos histidina 13 y ácido aspártico 85. Los dos monómeros interactúan mediante puentes salinos entre el carboxilo terminal y el N-terminal. El lugar del O_2 se encuentra *entre* los dos átomos de hierro que se ven, que

están ligados de forma rígida a las hélices α A y C (véase la parte (b)). En la forma desoxi, el espacio entre los átomos de hierro es demasiado pequeño para ubicar al O_2, por lo que los átomos de Fe deben apartarse cuando se une el O_2.



(a) Estructura de la proteína desoxi. N y C indican los N-terminales y C-terminales. El eje diádico (d) es perpendicular a esta página.



(b) Detalle del lugar de unión del oxígeno en la forma oxi.

Contestar a las preguntas siguientes, explicando la respuesta, en cada caso, en términos de la estructura.

(a) ¿Mostrará esta molécula unión cooperativa del oxígeno?
(b) ¿Exhibirá esta molécula efecto Bohr?
(c) ¿Cuál sería el efecto de una mutación que sustituyera el ácido aspártico 85 por un residuo de lisina?

*13. La unión de los antígenos a los anticuerpos puede contemplarse de una forma similar a la que se ha utilizado para analizar la unión del oxígeno. Suponiendo que tenemos antígenos monovalentes y anticuerpos *n*-valentes, podemos escribir la siguiente ecuación para el número (r) de moléculas de antígeno unidas a un anticuerpo a una concentración (c) de antígeno libre:

$$r = \frac{nKc}{1 + Kc}$$

donde K es la constante de equilibrio de la unión (la constante de afinidad).

(a) Demuestre que esta ecuación puede reordenarse de la siguiente forma:

$$\frac{r}{c} = Kn - Kr$$

Ésta se denomina *ecuación de Scatchard*, y predice que un gráfico de r/c frente a r será una línea recta.

(b) Utilice los datos siguientes y un gráfico según la ecuación de Scatchard para obtener n y K para una reacción antígeno-anticuerpo.

c(M)	r
1.43×10^{-5}	0.50
2.57×10^{-5}	0.77
6.00×10^{-5}	1.20
1.68×10^{-4}	1.68
3.70×10^{-4}	1.85

14. ¿Qué efecto fisiológico puede predecir de una mutación que sustituya por serina la cisteína de la parte constante de la cadena ligera de inmunoglobulina que participa en la formación del enlace disulfuro con la cadena pesada? (Véase la Figura 7.32.)

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 7A

Métodos inmunológicos

Dada la facilidad con la que pueden prepararse en el laboratorio los anticuerpos contra las sustancias biológicas, y dada su gran especificidad, los anticuerpos constituyen el núcleo central de muchos procedimientos bioquímicos importantes analíticos y preparativos. Presentaremos aquí algunos de los métodos que tienen mayor importancia para los bioquímicos. En el apartado de Herramientas de la Bioquímica 23A se describen otras técnicas inmunológicas.

Los experimentos en los que se inyecta un antígeno en un conejo indican que un antígeno puede provocar la formación de varios anticuerpos diferentes. Cada uno de estos anticuerpos reconoce una parte concreta de la molécula de antígeno, denominada *determinante antigénico* o *epítopo*. En la Figura 7.29b se muestran los epítopos que se han identificado en la mioglobina de cachalote. Cada epítopo es una región que engloba cinco o seis aminoácidos de la secuencia de la mioglobina. Así pues, un **antisuero** para la mioglobina (es decir, el suero procedente de un animal inmunizado contra la mioglobina) contiene al menos cinco anticuerpos diferentes contra la mioglobina, cada uno de los cuales va

dirigido contra uno de los cinco epítopos que se muestran en la figura.

En términos generales, las sustancias inmunógenas (sustancias que provocan una reacción inmunitaria, como la síntesis de anticuerpos) son macromoléculas. Sin embargo, algunos de los reactivos inmunológicos más útiles son los anticuerpos dirigidos contra sustancias de bajo peso molecular. Así, por ejemplo, el radioinmunoanálisis (Herramientas de la Bioquímica 23A) se utiliza para determinar las concentraciones de hormonas esteroideas o de fármacos. Estos compuestos, de por sí, no estimulan la síntesis de anticuerpos, pero cuando uno de ellos se acopla a una proteína antigénica, el conjugado resultante es inmunógeno. Algunos de los anticuerpos producidos en respuesta al conjugado van dirigidos contra el componente no proteico de bajo peso molecular que se denomina **hapteno**.

La mayor parte de los anticuerpos que resultan útiles en bioquímica son de tipo IgG (véase la Tabla 7.3). Cada uno de estos monómeros con forma de Y tiene dos lugares de combinación del antígeno. En una reacción antígeno-anticuerpo, cada lugar suele unirse a una molécula de antígeno diferente si existe una cantidad suficiente de antígeno. Si el antígeno posee dos o más lugares de combinación del anticuerpo, como ocurre en la mayor parte de los casos, se forma una red gigante insoluble de moléculas de antígeno y anticuerpo ligadas, que se denomina **reacción de precipitina** (véase la Figura 7.29a). La naturaleza insoluble de este complejo es la base de algunas de las técnicas analíticas más antiguas, como la inmunodifusión y la inmunoelectroforesis.

En la **inmunodifusión**, se llenan pocillos excavados en una placa de agar con antígeno y anticuerpo, que difunden el uno hacia el otro en el agar. Cuando las sustancias se encuentran, una reacción de precipitina forma un precipitado insoluble, que puede observarse bien directamente o tras una tinción con azul Coomassie o un colorante de proteínas similar. Esta técnica puede emplearse para comparar diferentes antígenos (Figura 7A.1). Por ejemplo, supongamos que se desea saber si la proteína citocromo *c* de corazón de caballo está relacionada con el citocromo *c* de la levadura. Se colocaría el citocromo *c* del caballo en un pocillo, la proteína de la levadura en otro, y el anticuerpo contra la proteína del caballo en un tercero. Si las proteínas están estrechamente relacionadas, el anticuerpo puede reaccionar con ambas proteínas En ese caso, las líneas de precipitina se cortarán, como se muestra en la Figura 7A.1a, generalmente con una "punta" que señala hacia el antígeno menos reactivo (en este experimento, la proteína de la levadura). Si los dos antígenos no están relacionados, pero son lo suficientemente similares para que cada uno de ellos reaccione con un anticuerpo del antisuero que se ha colocado en el pocillo, se forman dos líneas de precipitina que simplemente se cortan (Figura 7A.1b). Si las proteínas son inmunológicamente idénticas, se observa una única línea de precipitina ininterrumpida (Figura 7A.1c). Por último, si el anticuerpo se une a una proteína, pero no a todas las demás, tan sólo se observa una línea corta (Figura 7A.1d).

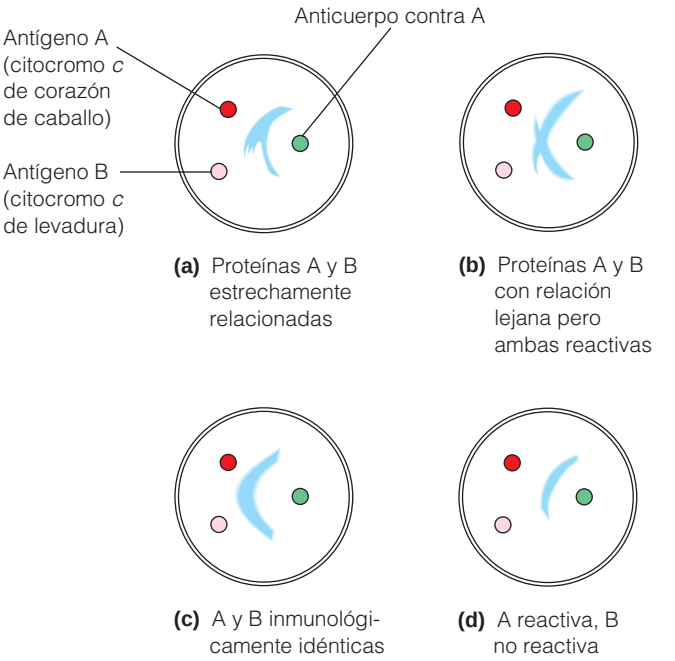
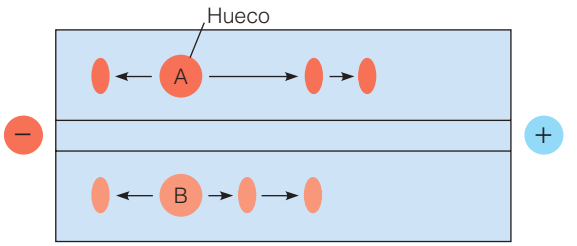


FIGURA **7A.1**
Prueba de precipitina mediante difusión en gel.

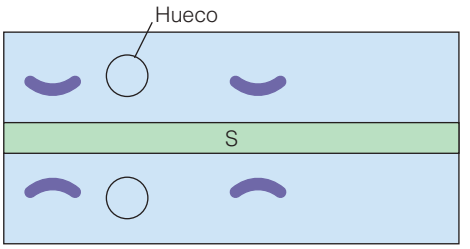
La inmunodifusión puede utilizarse para caracterizar organismos mutantes que pueden presentar deficiencias en la síntesis de una proteína biológicamente activa. La presencia de un antígeno que reacciona de forma cruzada como se observa en el patrón de la Figura 7A.1a, sugiere que se forma una proteína completa, pero que se ha cambiado uno de los residuos esenciales para la actividad biológica como consecuencia de la mutación. Así pues, las proteínas están estrechamente relacionadas, de manera que comparten epítopos, pero no son idénticas.

La **inmunoelectroforesis** permite el análisis de mezclas más complejas de antígenos y anticuerpos. Las proteínas de una mezcla compleja, como el suero, se someten a una electroforesis, tras lo cual se aplica un anticuerpo en una depresión o hueco, como se indica en la Figura 7A.2. Este método produce múltiples reacciones de precipitina diferentes en un experimento, y con variaciones relativamente sencillas puede adaptarse para cuantificar los antígenos de una mezcla.

En la actualidad se utiliza de manera mucho más general para cuantificar las reacciones antígeno-anticuerpo el análisis **inmunosorbente ligado a enzimas** (**ELISA**). Se emplea un reactivo de entrecruzamiento para acoplar covalentemente una enzima a un anticuerpo que se utiliza para analizar una sustancia concreta. La enzima elegida es una cuya actividad pueda determinarse con facilidad con una técnica espectrofotométrica. Aunque este método tiene muchas



Se colocan mezclas A y B de antígenos en huecos practicados en un gel y se someten a un campo eléctrico. Las proteínas, indicadas por bandas, migran desde esos huecos.



El antisuero (S), colocado entre A y B, difunde en el gel. Se forman arcos de precipitina con todos los componentes que reaccionan con el antisuero.

FIGURA **7A.2**
Inmunoelectroforesis.

variaciones, el principio es analizar los anticuerpos unidos midiendo la actividad de la enzima conjugada. Esta técnica constituye la base de muchas pruebas clínicas diagnósticas, como el análisis más ampliamente utilizado en la actualidad para la infección por el VIH. Se utiliza un anticuerpo ligado a una enzima contra una de las proteínas de superficie del virus de la inmunodeficiencia humana, para detectar la presencia del antígeno vírico en las muestras de sangre humana. La presencia de la actividad enzimática en los complejos antígeno-anticuerpo puede detectarse con gran sensibilidad.

Otra técnica analítica útil para caracterizar proteínas es la **transferencia Western**, denominada así por su semejanza superficial con una técnica analítica para ácidos nucleicos a la que se llama transferencia Southern (descrita en Herramientas de la Bioquímica 25D). La transferencia Western (denominada más recientemente **inmunotransferencia**) se emplea para detectar, en una mezcla de proteínas o fragmentos de proteínas, las que reaccionan con el mismo anticuerpo. Puede utilizarse, por ejemplo, para el estudio de la fragmentación posterior a la traducción de las proteínas que, a menudo, se produce como parte del proceso de maduración proteica. En esta técnica, se analizan las proteínas que reaccionan con el anticuerpo en una mezcla separando primero las proteínas de dicha mezcla mediante una electroforesis en gel desnaturalizante; con frecuencia, se emplean geles 2-D. Tras la electroforesis, el gel se pone en contacto con una hoja de nitrocelulosa, y las proteínas se transfieren a la nitrocelulosa mediante una corriente eléctrica. Las proteínas quedan unidas de manera irreversible a la hoja de nitrocelulosa, con lo que las reacciones antígeno-anticuerpo pueden observarse después de tratar la hoja con un anticuerpo. La visualización se realiza con el empleo de un anticuerpo marcado radiactivamente con yodo 125, seguido de autorradiografía, o bien con una forma de la técnica ELISA. En la Figura 7A.3 se muestra un ejemplo.

Debido a su elevada especificidad en la unión de proteínas, los anticuerpos pueden utilizarse también para purificar proteínas. En esta técnica, denominada **cromatografía de inmunoafinidad**, el anticuerpo se acopla a un soporte cromatográfico y se utiliza una columna de este material para adsorber selectivamente la proteína que se purifica. A continuación, se desadsorbe la proteína, generalmente mediante un ajuste de pH de la solución de elución y a menudo en un estado próximo a la homogeneidad.

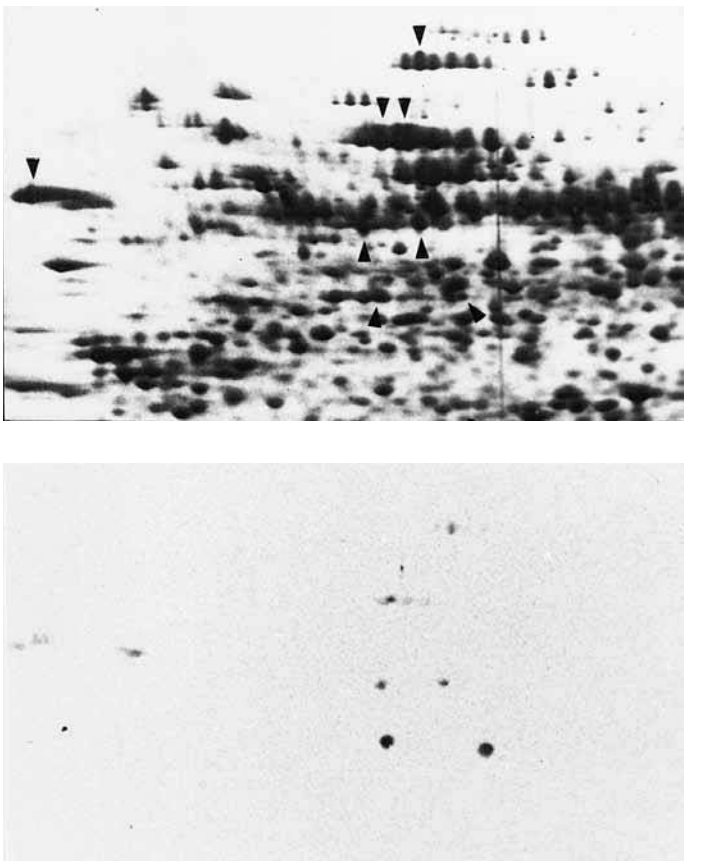


FIGURA **7A.3**
Transferencia Western. En la parte superior hay un gel bidimensional de las proteínas totales de la hoja de tabaco. En la parte inferior, el mismo gel transferido frente a anticuerpos para las proteínas fosforiladas en la treonina en la mitosis.

Cortesía de J. A. Traas, A. F. Bevan, J. H. Doonan, J. Cordewener, y P. J. Shaw, *Plant J.* (1992) 2:723–732, con permiso de Blackwell Scientific Ltd. y Bios Scientific Publishers.

Los bioquímicos, al igual que los biólogos celulares, se ocupan de la organización intracelular y de la localización de las enzimas que catalizan las reacciones de interés. Existen una serie de técnicas, a las que se aplica el término genérico de **inmunocitoquímica**, que utilizan anticuerpos para facilitar la localización de antígenos concretos en preparaciones citológicas. En su forma más sencilla, se conjuga un anticuerpo con un colorante fluorescente como la fluoresceína. A continuación, se sumerge un corte fino de la célula o tejido en una disolución del anticuerpo fluorescente. Una vez eliminado el exceso mediante lavado, puede verse el anticuerpo unido mediante microscopia de fluorescencia. En el cuadro superior de la Figura 7A.4, se ha preparado un anticuerpo fluorescente contra una proteína citoplasmática; en el cuadro inferior se estudia una proteína nuclear. Otra posibilidad es que pueda unirse el anticuerpo a la proteína ligadora de hierro ferritina, y verse el hierro unido gracias a su densidad electrónica elevada en el microscopio electrónico. Otra técnica se basa en la unión del anticuerpo ligado a peroxidasa de rábano picante, una enzima que puede visualizarse mediante técnicas de microscopia óptica o de microscopia electrónica.

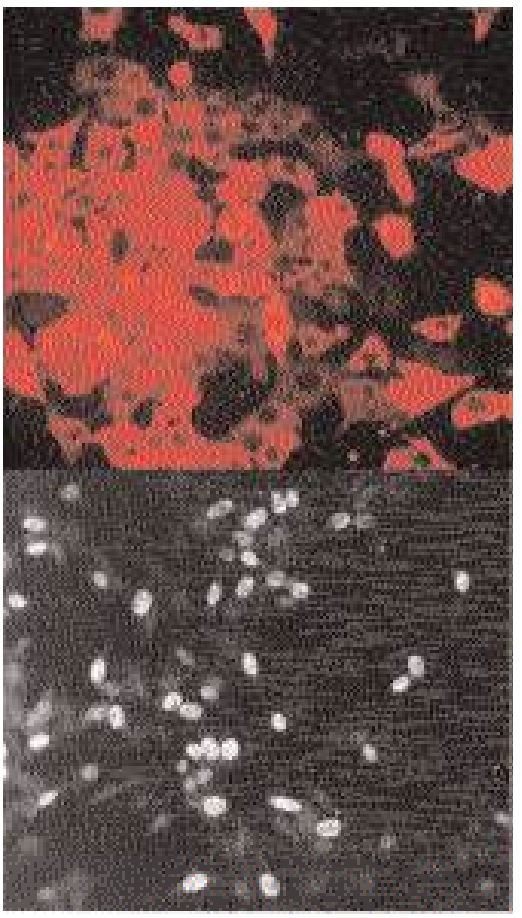


FIGURA **7A.4**

Microscopia de inmunofluorescencia. Esta técnica se utiliza para diferenciar las proteínas citoplasmáticas (arriba) de las nucleares (abajo) en células de ratón 3T6 en cultivo.

Cortesía de Y. Engström et al., *EMBO J.* (1988) 7:1617.

Como se ha indicado antes, un antisuero preparado contra un antígeno puro, como una proteína, contiene generalmente varios anticuerpos contra ese antígeno. Además, el suero contiene también todos los demás anticuerpos que el animal tenía en su torrente circulatorio en el momento en que fue inmunizado frente a la proteína de interés. Evidentemente, la especificidad, sensibilidad y reproducibilidad de todas las técnicas citadas aumentaría en gran medida si pudieran realizarse con anticuerpos puros. Dadas las semejanzas químicas existentes entre las distintas IgG, su purificación mediante técnicas estándar de fraccionamiento de proteínas es prácticamente imposible. Por fortuna, el empleo de los **anticuerpos monoclonales** constituye una forma alternativa de alcanzar anticuerpos puros en cantidad ilimitada.

Cada linfocito B formador de anticuerpos está especializado en la síntesis y secreción de un anticuerpo y sólo uno. Si estas células pudieran proliferar en un cultivo de tejidos, sería posible en principio aislar un clon, es decir, una población derivada de una célula que sintetiza un anticuerpo dirigido contra la proteína de interés. Aunque los linfocitos B en sí no proliferan en cultivo, Georges Kohler y Cesar Milstein descubrieron en 1975 una forma de propagar linfocitos formadores de anticuerpos con células cultivadas procedentes de un ratón con mieloma múltiple, una proliferación cancerosa de leucocitos (Figura 7A.5). Se inmuniza a un ratón con el antígeno de interés y, a continuación, se fusionan los linfocitos de su bazo con las células de mieloma. Esta fusión da origen a líneas celulares denominadas **hibridomas** (células que proliferan de manera indefinida en cultivo, como las células cancerosas, pero que sólo sintetizan un anticuerpo). Mediante el examen sistemático de un gran número de clones de hibridoma, generalmente pueden aislarse varios que sintetizan anticuerpos contra el antígeno de interés, elaborando cada uno un anticuerpo contra un determinante antigénico diferente. Los anticuerpos pueden purificarse con facilidad a partir de cultivos de los hibridomas adecuados, y pueden tener muchos usos además de las técnicas ya descritas. Obsérvese que este método no requiere un antígeno homogéneo. Un investigador que tenga la paciencia de examinar muchos hibridomas puede inmunizar al animal al principio con un preparado bruto del antígeno de interés. Luego, después de haber obtenido el anticuerpo monoclonal deseado, puede utilizarlo como base de una purificación de inmunoafinidad del antígeno.

Bibliografía

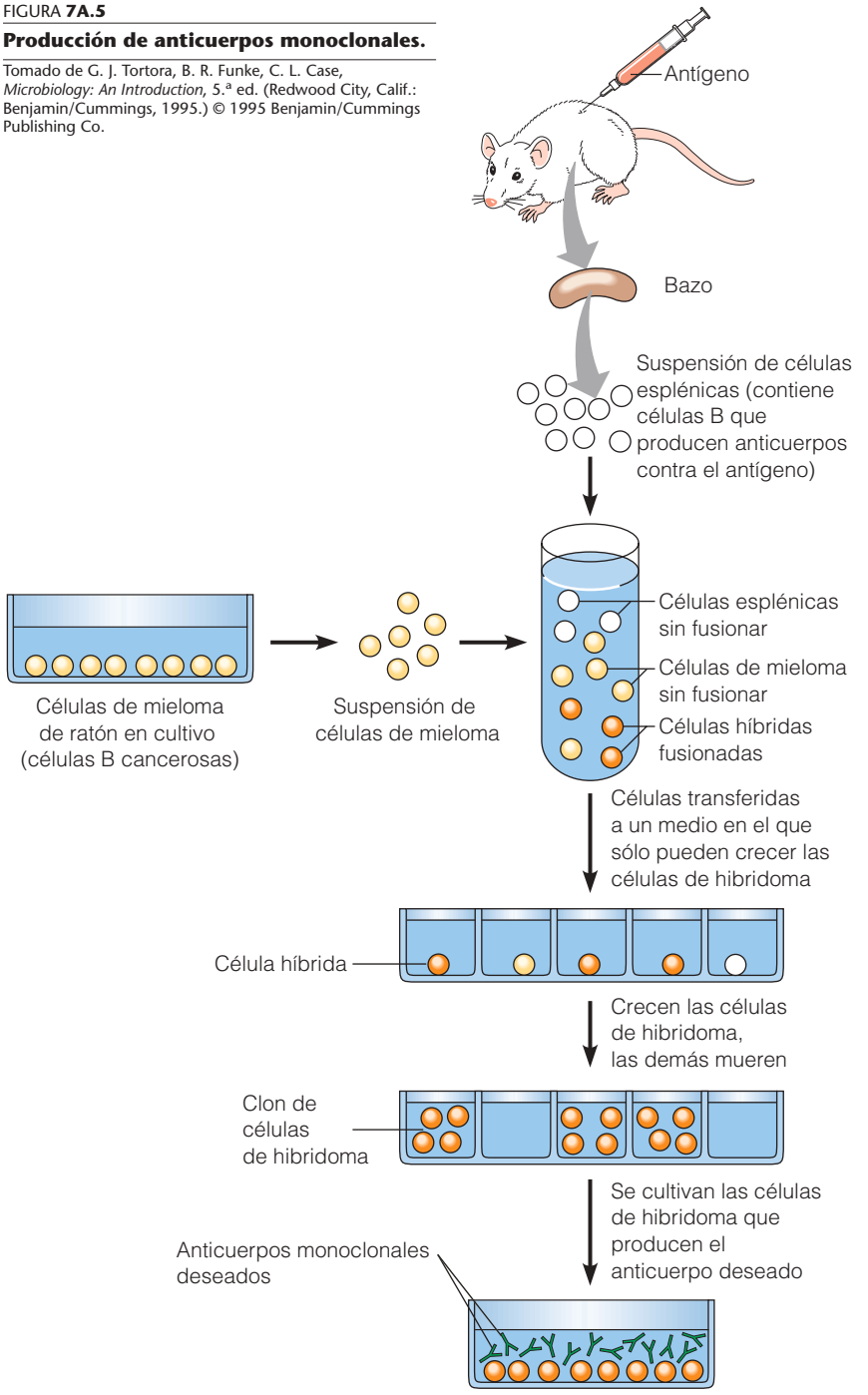
Harlow, E. y D. Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.

Weir, D. M., ed. (1986) *Handbook of Experimental Immunology.* Oxford University Press, Londres, Nueva York. Una buena descripción de las técnicas modernas.

FIGURA **7A.5**

Producción de anticuerpos monoclonales.

Tomado de G. J. Tortora, B. R. Funke, C. L. Case, *Microbiology: An Introduction*, 5.ª ed. (Redwood City, Calif.: Benjamin/Cummings, 1995.) © 1995 Benjamin/Cummings Publishing Co.



CAPÍTULO 8

Proteínas en movimiento: sistemas contráctiles y motores moleculares

En los dos capítulos anteriores hemos visto cómo pueden llevar a cabo diversas funciones las moléculas proteicas, ya sea de manera individual, ya sea en estructuras de múltiples subunidades definidas. Para continuar explorando esta idea, pasaremos ahora a ejemplos en los que las moléculas proteicas se organizan formando estructuras grandes y complejas en las que intervienen muchos tipos de cadenas polipeptídicas. Estas estructuras supramoleculares realizan muchas funciones celulares, de las cuales aquí analizaremos la producción de movimiento. Este movimiento puede afectar a todo el organismo, a partes del mismo, a células o a elementos subcelulares.

De los muchos tipos de movimiento que realizan los sistemas vivos, el que conocemos mejor es la contracción muscular necesaria para el movimiento corporal. Sin embargo, la contracción muscular lleva a cabo también una amplia gama de otras acciones. Incluso la emisión de un sonido es una acción muscular, como lo es la inyección de veneno que realiza un insecto o una serpiente. Otros movimientos musculares de igual importancia mantienen el medio interno de un animal, como el latido de su corazón, la respiración de sus pulmones o branquias y los movimientos peristálticos de su sistema digestivo. Cada uno de estos tipos de movimiento lo produce un tejido muscular específico.

Todos los músculos, al igual que algunos otros sistemas contráctiles que encontraremos, se basan en la interacción de dos proteínas principales, la **actina** y la **miosina**. A menudo denominamos a estos sistemas, **sistemas contráctiles de actina-miosina**. Sin embargo, existen algunos tipos de movimientos dirigidos, como los movimientos de las células individuales y de partes de las células, que no dependen del sistema actina-miosina, sino que utilizan otros mecanismos proteicos. Por ejemplo, el batimiento de los cilios y los flagelos, y el movimiento de los cromosomas y de los orgánulos en el interior de las células se realizan mediante interacciones internas de diversas proteínas con los **microtúbulos**, estructuras filamentosas formadas por una proteína denominada **tubulina**. Aún más notables son la diversidad de "motores moleculares" que se han descubierto en los últimos años. Algunos de ellos se emplean para trasladar moléculas y vesículas a lo largo de los microtúbulos y otros filamentos; otros producen la rotación de los flagelos y son verdaderos motores microscópicos.

Determinadas proteínas actúan como transductores de energía y utilizan la energía libre procedente de la hidrólisis del ATP para realizar un trabajo mecánico.

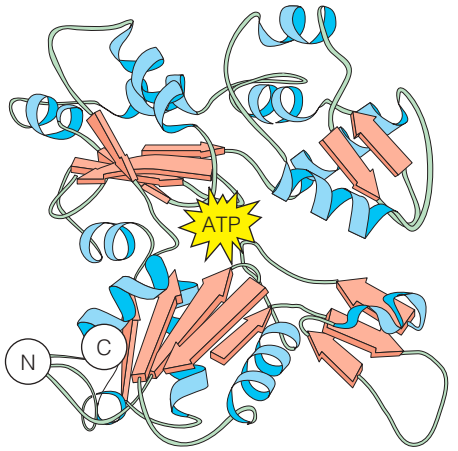


FIGURA **8.1**

Actina G. La estructura del monómero de actina, deducida mediante difracción de rayos X, muestra claramente la conformación con dos dominios. Se muestra también la posición del nucleótido unido.

Adaptado del Dr. W. Kabsch.

Asimismo, algunas moléculas muy bien conocidas, como las RNA polimerasas (Capítulos 26 y 28), se consideran motores moleculares que se desplazan a lo largo del DNA desenrollando el molde, impulsadas por la hidrólisis de ésteres fosfato.

Todos estos sistemas biológicos que producen movimiento tienen una característica en común: la energía liberada por la hidrólisis del ATP se convierte en trabajo mediante la producción de movimientos en partes de moléculas proteicas. Así pues, las proteínas pueden actuar como **transductores energéticos**. Esto es, algunas proteínas pueden convertir la energía química de la hidrólisis del ATP en trabajo mecánico. Cuando los movimientos de las proteínas están coordinados adecuadamente, se produce un movimiento macroscópico dirigido.

Los músculos y otros sistemas contráctiles de actina-miosina

Las principales proteínas del músculo son la actina y la miosina. La función mejor conocida de estas proteínas se produce en las células musculares. Sin embargo, la actina y la miosina se encuentran también en otros muchos tipos de células y participan en diversas clases de movimientos celulares e intracelulares. Para comprender cómo actúan los músculos y otros sistemas de actina-miosina, debemos considerar las propiedades de estas dos proteínas.

Los principales sistemas musculares de la mayor parte de los animales se basan en las proteínas actina y miosina.

ACTINA Y MIOSINA

Actina

En condiciones fisiológicas, la actina se encuentra en forma de un polímero helicoidal alargado (actina fibrosa o actina F) de un monómero proteico globular (actina G). El monómero de actina G, que se muestra en la Figura 8.1, es una molécula de dos dominios, con una masa de 42 000 dalton. La unión de ATP por un monómero de actina G conduce a la polimerización; a continuación, se hidroliza el ATP pero el ADP se mantiene en el filamento de actina. En los filamentos de actina F, los monómeros de actina G están dispuestos en una hélice de doble cadena (Figura 8.2; véase también la Figura 6.31a). Como consecuencia de la asimetría de las subunidades, el filamento de actina F tiene una direccionalidad definida, y a sus dos extremos se les denomina **extremo más** y **extremo menos**. La reacción de polimerización presenta una dirección de preferencia, de tal manera que el extremo más es el que crece con mucha mayor rapidez. El filamento de actina contiene lugares en cada subunidad que pueden unirse a la miosina.

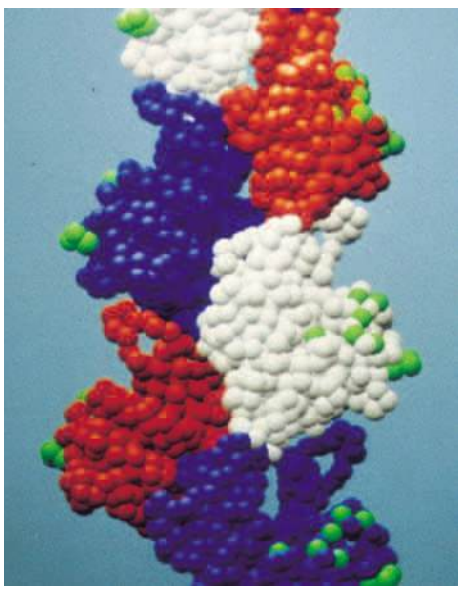


FIGURA **8.2**

Actina F. Modelo de los filamentos de actina F. Los monómeros de actina G se indican mediante colores distintos. Los residuos verdes se unen a la miosina.

Cortesía del Dr. Kenneth Holmes de *Nature* (1990) 347:44-49.

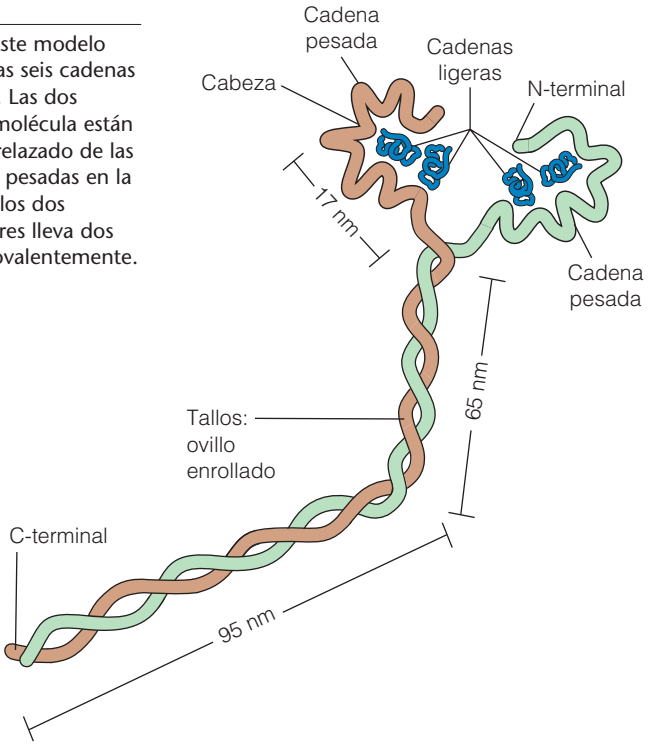
Miosina

La molécula funcional de miosina (Figura 8.3) está formada por seis cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas ($M = 230\,000$) y dos de cada una de las dos clases de cadenas ligeras ($M = 20\,000$). Juntas forman un complejo de peso molecular 540 000. Las cadenas pesadas poseen colas largas de hélice α, que están entrelazadas en un ovillo enrollado de doble cadena, y unos dominios de cabeza globulares a los que están unidas las cadenas ligeras. Entre cada dominio de cabeza y dominio de cola, la cadena pesada actúa como un tallo flexible. La estructura de ovillo enrollado de las colas recuerda la estructura de la α-queratina (véase la Figura 6.11).

La molécula de miosina puede fraccionarse por proteasas, como se indica en la Figura 8.4. El dominio de cola puede fraccionarse en un punto específico por la tripsina para dar fragmentos denominados **meromiosina ligera** y **meromio-**

FIGURA **8.3**

Molécula de miosina. Este modelo muy esquemático muestra las seis cadenas polipeptídicas de la miosina. Las dos subunidades grandes de la molécula están conectadas mediante el entrelazado de las dos hélices α de las cadenas pesadas en la cola alargada. Cada uno de los dos dominios de cabeza globulares lleva dos cadenas ligeras unidas no covalentemente.



sina pesada. La ulterior ruptura de la meromiosina pesada por la papaína corta los tallos para dar **fragmentos S1**, cada uno de los cuales está formado por dominios de cabeza que llevan las cadenas ligeras. El tallo separado por la papaína se denomina fragmento S2. La capacidad de fragmentar la molécula de miosina de estas formas específicas ha ayudado a los investigadores a comprender las funciones de sus diversas partes. La miosina tiene aspectos de las proteínas fibrosas y de las globulares, y sus dominios funcionales desempeñan papeles muy diferentes. Los dominios de cola tienen una pronunciada tendencia a la agregación, que hace que las moléculas de miosina formen el tipo de filamentos bipolares gruesos que se muestran en la Figura 8.5. Los dominios de

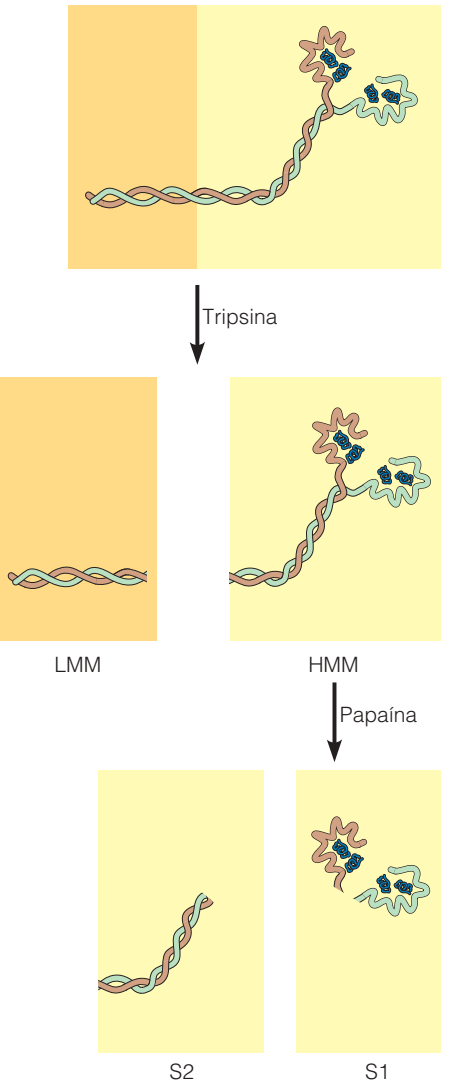
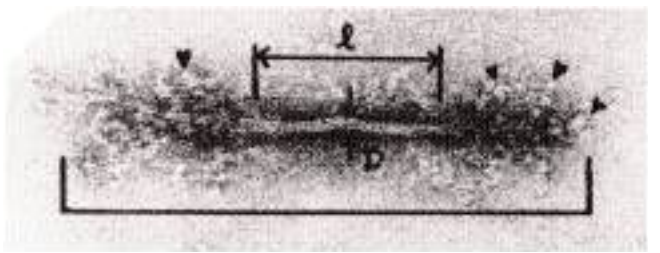
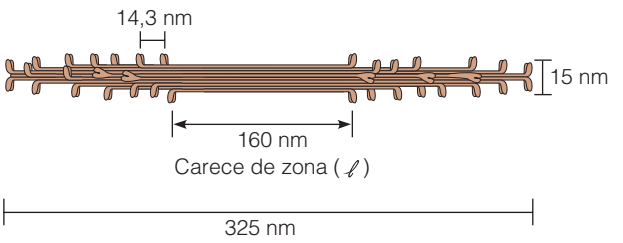


FIGURA **8.4**

Disección de la miosina mediante proteasas. La tripsina rompe la cola de la miosina para dar lugar a meromiosina ligera (LMM) y meromiosina pesada (HMM). El tratamiento de la meromiosina pesada con la proteasa papaína digiere parte de la estructura del tallo, permitiendo la separación de las dos cabeceras (dominios de cabeza con sus cadenas ligeras unidas). Estas cabeceras separadas se denominan fragmentos S1 y el resto de la cola recibe el nombre de fragmento S2.



(a)



(b)

FIGURA **8.5**

Un filamento grueso de las moléculas de miosina. (a) Fotografía de microscopia electrónica. La zona que carece de cabeceras se indica con una ℓ; se indican con puntas de flecha algunas de las cabeceras de miosina. **(b)** Dibujo de la estructura del filamento, en que se indican las dimensiones en nanómetros. Las proyecciones son los pares de cabeceras sobre cada molécula de miosina. Obsérvese que la zona desnuda tiene la misma longitud que la cola de miosina, tal como se presenta en la Figura 8.3.

Cortesía de T. Pollard.

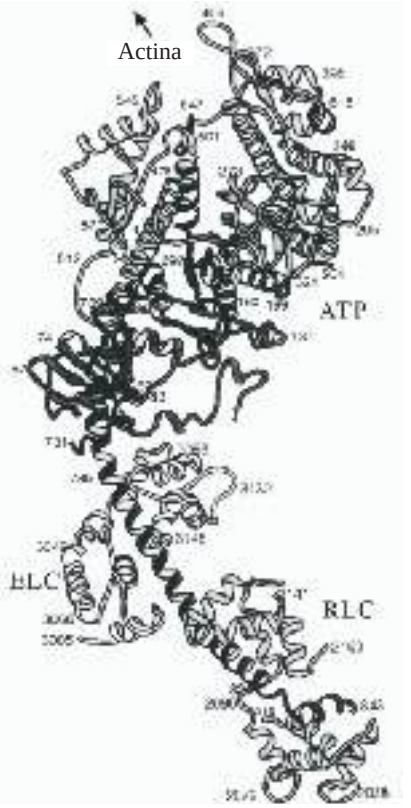


FIGURA **8.6**

Estructura del fragmento S1 de la miosina. La cadena pesada ocupa la mayor parte de la estructura; ELC y RLC indican las dos cadenas ligeras. Se señala la posición de unión del ATP, así como el punto de contacto con la actina.

Cortesía de S. Lowey, *Biophys. J.* (1995) 68:120s-127s, modificado por M. K. Reedy a partir de Rayment et al. (1993). Con permiso de Elsevier Science.

cabeza, con sus cadenas ligeras unidas se denominan **cabeceras** y tienen una fuerte tendencia a unirse a la actina. Los fragmentos S1 se han cristalizado y se ha determinado su estructura mediante difracción de rayos X (Figura 8.6).

Reacción de la miosina y la actina

Si se deja que un filamento de actina reaccione con fragmentos S1 aislados, el filamento quedará "decorado" con estas cabeceras de miosina, dando lugar a un patrón asimétrico "en punta de flecha" que pone de manifiesto la polaridad del filamento de actina (Figura 8.7). En presencia de actina, las moléculas completas de miosina o los fragmentos S1 aislados tienen actividad ATPasa, y la hidrólisis del ATP rompe la unión. Como veremos, estas observaciones junto con la estructura detallada del fragmento S1 tienen consecuencias importantes en cuanto a los mecanismos de la contracción muscular.

ESTRUCTURA DEL MÚSCULO

En el tejido muscular, los filamentos de actina y miosina interactúan para producir la estructura contráctil. Los vertebrados como nosotros poseen tres tipos de músculo con morfologías diferentes. El *músculo estriado* es el tipo que asociamos con más frecuencia al término *músculo*, ya que son los músculos estriados de los brazos, las piernas, los párpados, etcétera, los que hacen posible los movimientos voluntarios. El *músculo liso* rodea los órganos internos como los vasos sanguíneos, el intestino y la vesícula biliar, que son capaces de realizar unas contracciones lentas y mantenidas, que no están bajo un control voluntario. El *músculo cardíaco* puede considerarse una forma especializada de músculo estriado, adaptado para realizar los latidos involuntarios repetidos del corazón. En esta exposición analizaremos sólo la estructura del músculo estriado.

En la Figura 8.8 se muestran los niveles sucesivos de organización de un músculo estriado característico de un vertebrado. Las fibras musculares individuales, o **miofibras**, son en realidad células multinucleadas muy largas (1-40 mm) formadas por la fusión de células precursoras musculares. Cada miofibra

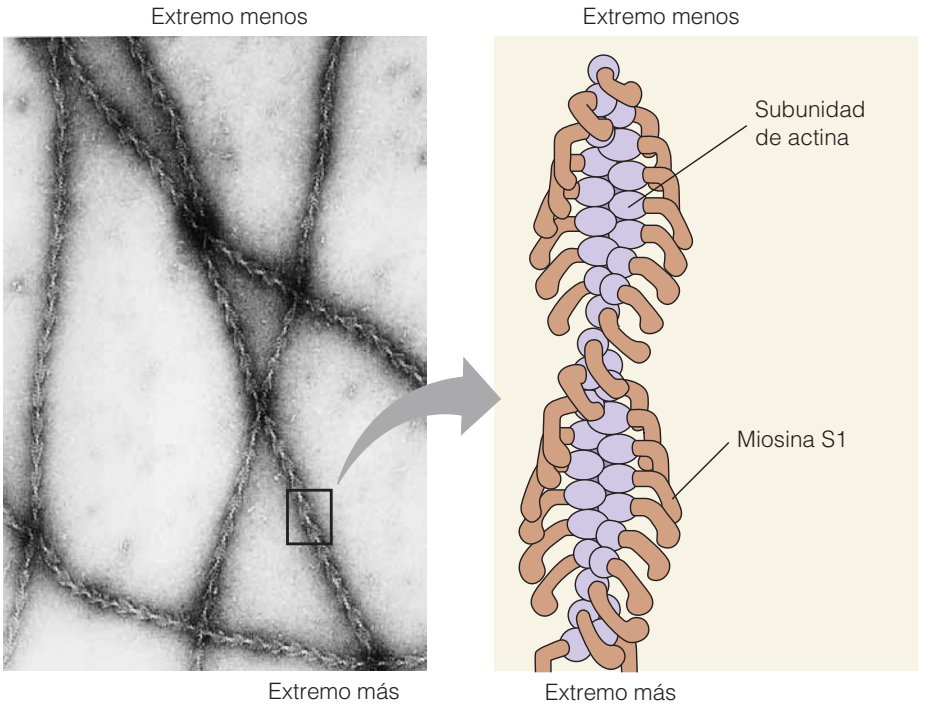


FIGURA **8.7**

Filamento de actina decorado con cabeceras de miosina. (Izquierda) Fotografía de microscopia electrónica. **(Derecha)** Esquema a mayor aumento. Las cabeceras señaladas en el esquema producen el patrón de punta de flecha visible en la fotografía de microscopia.

Fotografía cortesía de Roger Craig.

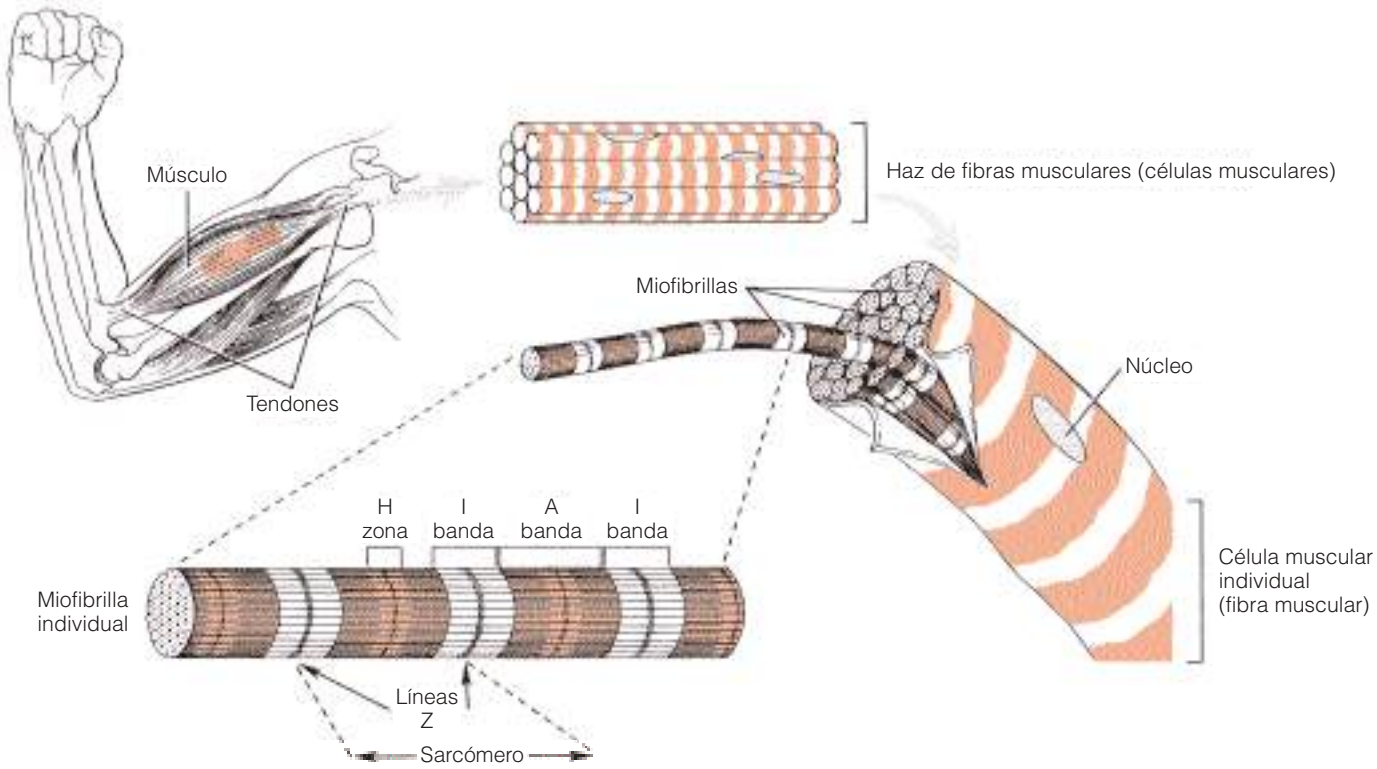


FIGURA **8.8**

Niveles de organización en el músculo estriado.

Tomado de W. M. Becker, L. J. Kleinsmith y J. Hardin, *The World of the Cell*, 4ª ed. (San Francisco, CA: Addison Wesley Longman, 2000). © Addison Wesley Longman, Inc.

contiene un haz de estructuras proteicas denominadas **miofibrillas**. Una miofibrilla presenta una estructura periódica cuando se observa al microscopio óptico. Las **bandas A** oscuras se alternan con **bandas I** claras. Estas últimas están divididas por unas líneas finas denominadas **discos Z** (o, a veces, **líneas Z**). En el centro de la banda A se encuentra una región más clara, denominada **zona H**. Puede considerarse que la unidad de la estructura muscular que se repite es la que va de un disco Z al siguiente. Se la denomina **sarcómero** y tiene una longitud de aproximadamente 2.3 μm en el músculo relajado.

La base molecular de esta estructura periódica de la miofibrilla puede observarse mediante estudios de microscopia electrónica de cortes finos de músculo, como se observa en la Figura 8.9. Los **filamentos finos** de actina se proyectan en ambas direcciones desde los discos Z, interdigitados con los **filamentos gruesos** de miosina. Las regiones en las que se solapan los filamentos gruesos y finos forman las áreas oscuras de la banda A. Las bandas I contienen sólo filamentos finos que se prolongan hasta los bordes de las zonas H. Dentro de las zonas H, sólo se encuentran filamentos gruesos. Se cree que la línea oscura del centro de la zona H (denominada a veces banda M) señala posiciones en las que se asocian los filamentos gruesos unos con otros.

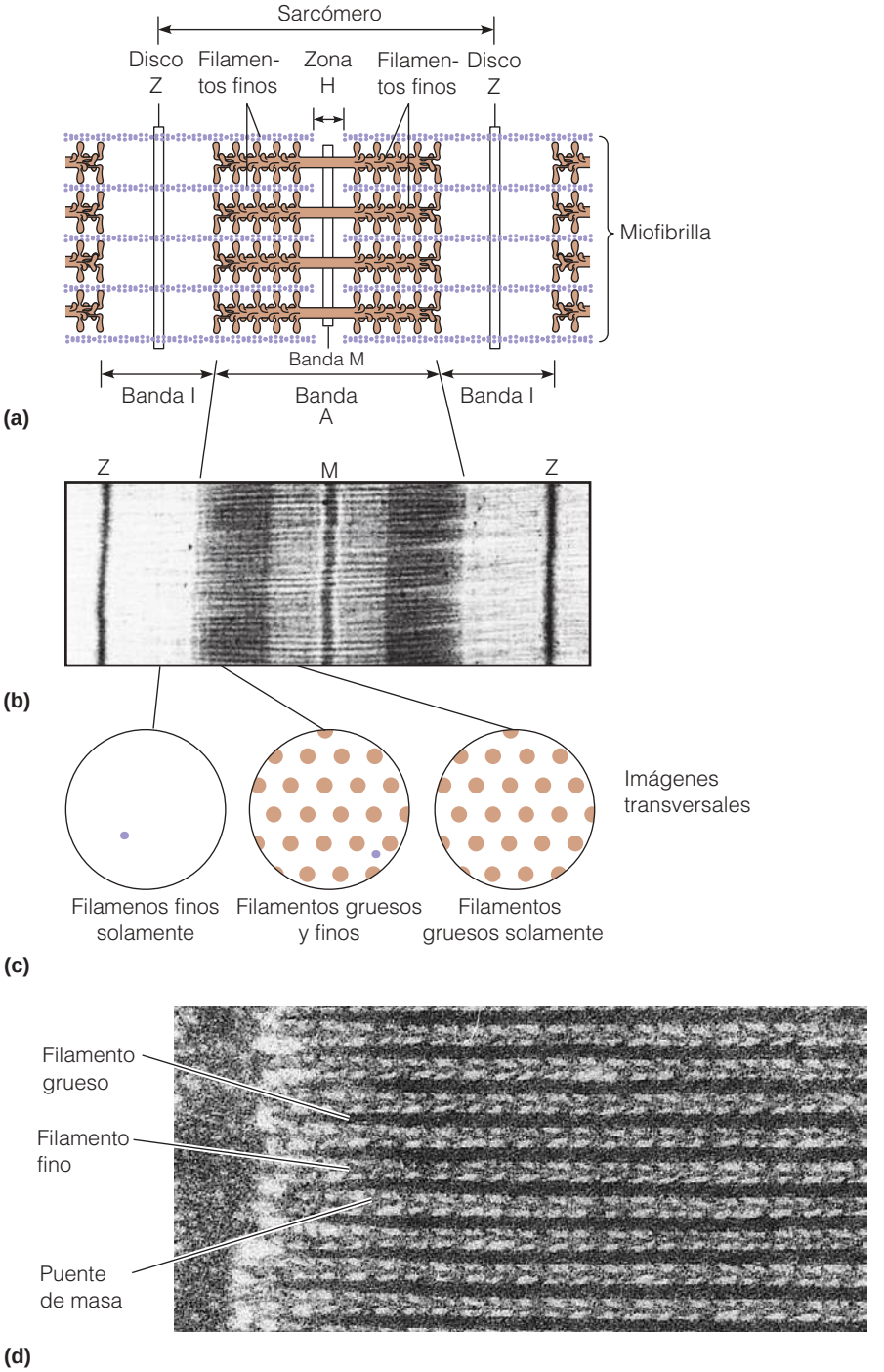
La composición de los filamentos gruesos y finos se ha puesto de relieve mediante la extracción de las miofibrillas con las disoluciones salinas o los detergentes adecuados para eliminar prácticamente toda la miosina. Dado que con este proceso desaparecen las bandas A, los filamentos gruesos de la banda A deben estar formados por miosina. Los filamentos gruesos de miosina son estructuras bipolares del tipo que se muestra en la Figura 8.5, en los que las colas helicoidales de las moléculas de miosina se unen juntas, con las cabeceras proyectadas con un espaciamiento regular de 14.3 nm en cada extremo. Este espaciamiento parece generarse por una periodicidad de 14.3 nm en la secuencia de aminoácidos de las colas de miosina.

El sarcómero es la unidad básica que se repite en la miofibrilla muscular.

FIGURA **8.9**

Estructura muscular que se observa con microscopia electrónica. **(a)** Modelo del sarcómero, la unidad de repetición del músculo estriado. Se identifican las bandas I, las bandas A y los discos Z que se observan en la Figura 8.8, y se indican los elementos estructurales del sarcómero. **(b)** Fotografía de microscopia electrónica en la que se aprecian las mismas características. **(c)** Representación esquemática de cortes transversales de un sarcómero en las diversas regiones que se muestran en (a) y (b). Los filamentos gruesos se indican mediante puntos de color marrón intenso y los filamentos finos mediante puntos pequeños de color púrpura. **(d)** Imagen a mayor aumento en una banda A que presenta puentes cruzados entre los filamentos de actina y miosina.

(b) Cortesía de H. E. Huxley; **(d)** cortesía de Mary Reedy.



Puede demostrarse que los filamentos finos contienen actina de la siguiente forma. Si las miofibrillas de las que se ha extraído la miosina se perfunden con una solución de fragmentos S1, los filamentos finos quedan decorados según el patrón de punta de flecha (Figura 8.7), con lo que los filamentos finos contienen actina. Además, los patrones de punta de flecha apuntan siempre hacia fuera a partir de los discos Z, lo que demuestra la polaridad de estos filamentos finos. Sin embargo, los filamentos finos no están formados únicamente por actina F. Como veremos más adelante en este capítulo, contienen también otras proteínas importantes.

Si observamos con más detalle las fotografías de microscopia electrónica de las miofibrillas (véase la Figura 8.9d), podemos ver pequeñas proyecciones que se extienden desde los filamentos gruesos (miosina) y que a menudo entran en contacto con los filamentos finos (actina). Las proyecciones corresponden a las cabeceras de las moléculas de miosina. Estos *puentes cruzados* entre los filamentos de miosina y actina son la clave de la contracción muscular.

La organización de la actina, la miosina y otras proteínas musculares para dar lugar a la estructura compleja, pero específica, que se observa en el sarcómero constituye un ejemplo notable de la forma en la que pueden combinarse de una forma específica para constituir una estructura funcional diversos tipos de proteínas. Analizaremos ahora cómo opera esta estructura.

MECANISMO DE LA CONTRACCIÓN: MODELO DEL FILAMENTO DESLIZANTE

El conocimiento del mecanismo de la contracción muscular procede de la observación de los detalles finos de la estructura muscular y de los cambios del patrón de bandas del sarcómero durante la contracción. Los cortes musculares que se presentan en las Figuras 8.8 y 8.9 y en la parte superior de la Figura 8.10 corresponden al estado relajado o extendido. En una contracción completa del músculo, cada sarcómero se acorta desde una longitud de unos 2.3 nm hasta 1.0 μm. Durante este proceso, desaparecen las bandas I y las zonas H, y los discos Z se desplazan directamente contra las bandas A (parte inferior de la Figura 8.10). Estas observaciones llevaron a dos investigadores independientes (y no emparentados), Hugh Huxley y Andrew Huxley, a proponer en los años 1950 el **modelo de filamento deslizante** para la contracción muscular, que se muestra en la Figura 8.10. Según este modelo, que está respaldado actualmente por datos indiscutibles, las cabeceras de miosina "caminan" a lo largo de los filamentos de actina interdigitados, traccionando de ellos y acortando, por tanto, el sarcómero.

Para producir este tipo de movimiento dirigido en contra de una fuerza que se opone en el músculo, es preciso un gasto de energía. Cabe prever que la energía proceda de algún modo de la hidrólisis del ATP, y nuestra mención previa de la actividad ATPasa del complejo actina-miosina señala la forma en que podría obtenerse esta energía. Recuérdese que la unión y la hidrólisis del ATP producen la *liberación* de la interacción actina-miosina. Según el mecanismo actualmente aceptado, cada cabecera de miosina participa en un ciclo repetitivo de creación y ruptura de puentes cruzados con un filamento fino adyacente. Podemos imaginar que el ciclo comienza con la miosina unida a la actina, como se muestra en la parte superior de la Figura 8.11. La unión del ATP conduce a la liberación del puente cruzado de miosina (paso 1). La hidrólisis del ATP produce entonces un cambio de conformación, que "carga" la cabecera (paso 2). La unión de Ca^{2+} hace que la cabecera vuelva a unirse al filamento fino (paso 3), aunque en un lugar por encima de su posición previa, puesto que está cargada. La liberación de fosfato (paso 4) prepara para el golpe de fuerza (paso 5) que tracciona del filamento fino hacia el centro del sarcómero. La unión de un nuevo ATP reiniciará el ciclo y preparará la cabecera para otro golpe.

Al final de cada ciclo, el filamento de actina se ha desplazado con respecto a la miosina, de forma que cada cabecera realiza pasos sucesivos a lo largo del filamento fino. El "caminar" es bastante similar al de un ciempiés: siempre hay algunas patas en contacto con el filamento fino, por lo que éste no puede retroceder durante la contracción. Debe señalarse que algunos de los detalles del movimiento de la cabeza continúan siendo objeto de discusión, y que el proceso puede ser más complejo de lo que se ha descrito.

Los filamentos finos están formados principalmente por actina, mientras que los filamentos gruesos los forma básicamente la miosina. Están conectados por puentes cruzados que pueden romperse.

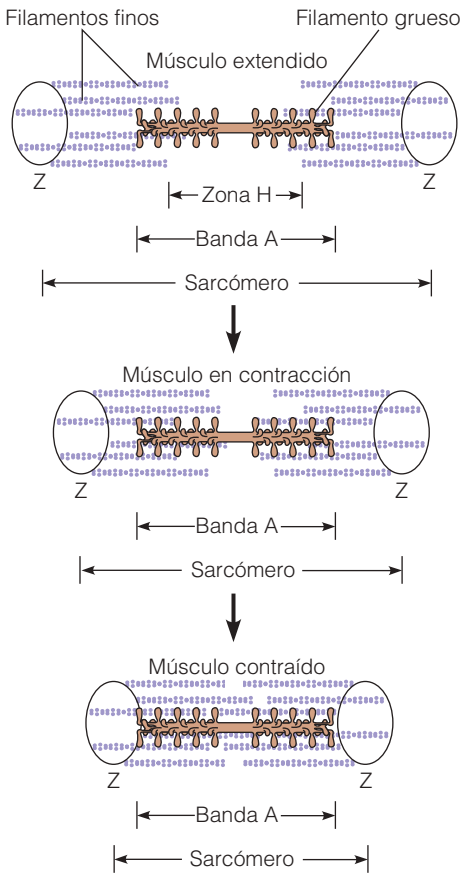


FIGURA **8.10**

Modelo del filamento deslizante de la contracción muscular. La contracción del músculo estriado se produce cuando las cabeceras de miosina traccionan de los filamentos de actina hacia el centro del sarcómero.

En el modelo del filamento deslizante, la fijación y la liberación periódicas de los puentes cruzados, con un cambio conformacional del puente cruzado, desliza los filamentos finos y gruesos uno sobre otro.

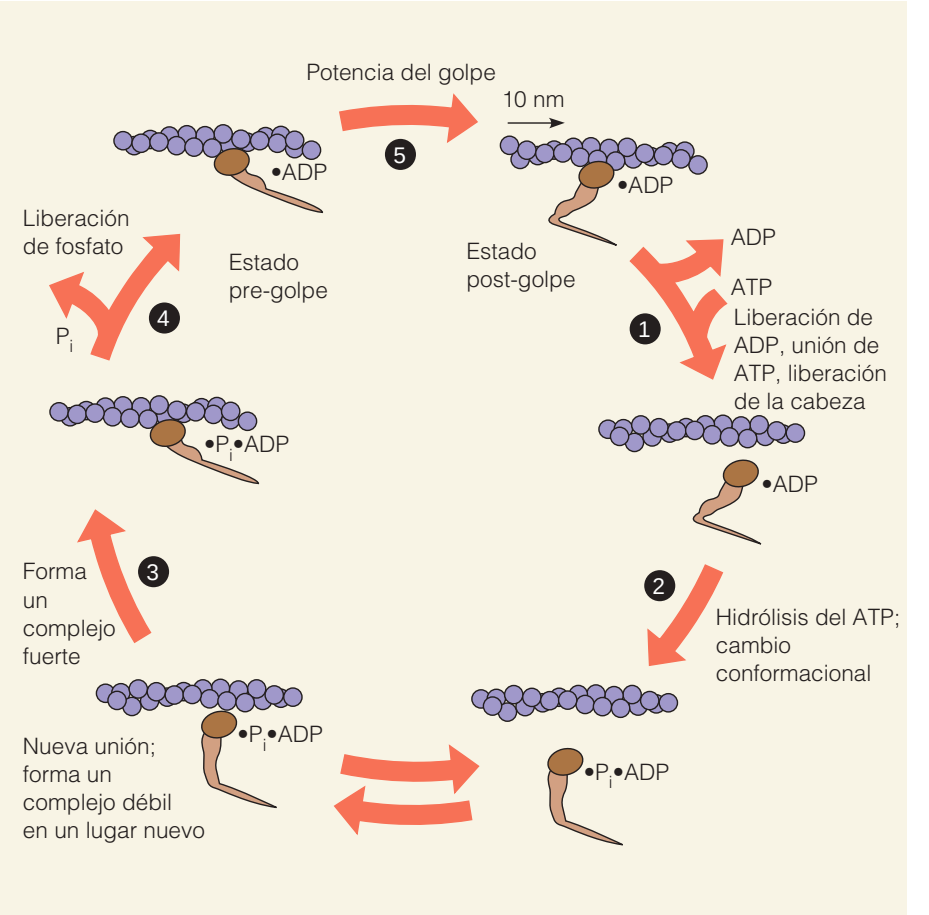


FIGURA **8.11**

Perspectiva actual del ciclo del ATP en la contracción muscular. El paso lento del proceso es el (3), la conversión del complejo "débil" al complejo "fuerte". No se conoce exactamente en qué punto del ciclo se produce el cambio conformacional completo de la cabecera.

Adaptado de J. Spudich, *Nature* (1994) 372:515-518. © 1994 Macmillan Magazines, Ltd.

Recientemente, varios métodos experimentales nuevos han hecho posible medir la fuerza desarrollada y la distancia desplazada con cada golpe de fuerza (véase la Figura 8.12). La fuerza depende de la carga colocada sobre el par miosina-filamento de actina y con una carga elevada tiene en promedio alrededor de 5 pN (piconewton), lo cual corresponde a un gasto energético de unos 10^{-20} J por golpe de fuerza, aproximadamente una quinta parte de la energía liberada cuando se hidroliza una molécula de ATP. A cargas menores hay datos que señalan que pueden realizarse varios golpes de fuerza con cada ciclo de ATP. La distancia que se desplaza el filamento de actina con cada golpe de fuerza es de

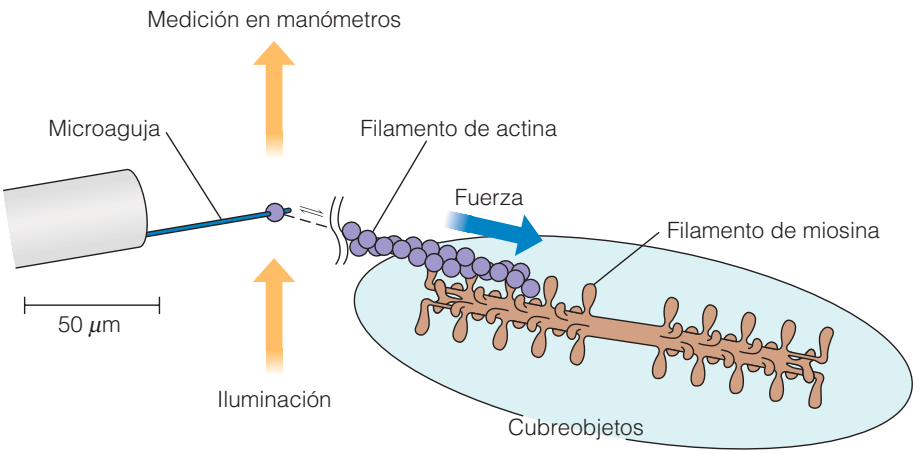


FIGURA **8.12**

Medida del movimiento y la fuerza generados por la interacción de un único filamento de actina con un único filamento de miosina. La miosina se fija a un cubreobjetos y la actina se fija a una aguja microscópica de rigidez conocida. La actina y la miosina se hacen visibles por fluorescencia. La deflexión de la aguja mide el movimiento del filamento de actina así como la fuerza que se genera tras añadir ATP.

Tomado de T. Yanagida y A. Ishijima, *Biophys. J.* (1995) 68:312s-320s.

unos 10-20 nm, que es lo que puede conseguirse con cada ciclo de ATP a cargas elevadas. Cuando se trabaja contra una resistencia más débil, los múltiples golpes de fuerza pueden impulsar a la actina hasta 100 nm por ATP.

ESTIMULACIÓN DE LA CONTRACCIÓN: PAPEL DEL CALCIO

La sustancia crucial que estimula la contracción no es el ATP, que generalmente está disponible en la miofibrilla, sino el Ca^{2+} que entra en el paso 3 de la Figura 8.11. Para comprender cómo regula el calcio la contracción muscular, debemos examinar la estructura molecular del filamento fino con un poco más de detalle.

Un filamento fino, como el que se encuentra en el músculo estriado, es algo más que un simple polímero de actina F. Hay otras cuatro proteínas, que se muestran en la Figura 8.13, que son esenciales para la función contráctil de los filamentos finos. Una de estas proteínas es la **tropomiosina**, una proteína fibrosa que se encuentra en forma de dímeros alargados situados a lo largo del surco de la hélice de actina F o cerca del mismo. Unidas a cada molécula de tropomiosina hay tres proteínas pequeñas denominadas **troponinas I, C y T**. La presencia de la tropomiosina y de las troponinas inhibe la unión de las cabezas de miosina a la actina, *a menos que haya calcio* en una concentración de aproximadamente 10^{-5} M. En el músculo en reposo, las concentraciones de Ca^{2+} están próximas a 10^{-7} M, por lo que no pueden formarse nuevos puentes cruzados. Una entrada de Ca^{2+} estimula la contracción, porque el ion se une a la troponina C, lo que da lugar a un reordenamiento del complejo troponina-tropomiosina. Este desplazamiento hace disponibles lugares nuevos en la actina para la unión por las cabeceras de miosina. El mecanismo propuesto que se muestra en la Figura 8.14 permite que se produzcan el paso 3 y los pasos siguientes en el ciclo de la Figura 8.11.

Hemos delineado la activación de la contracción muscular hasta la entrada de calcio a las miofibrillas. Pero, ¿por qué se produce esta entrada? Y en concreto, ¿cómo puede producirse por los impulsos nerviosos que excitan los músculos para que se contraigan? La respuesta puede hallarse con una observación

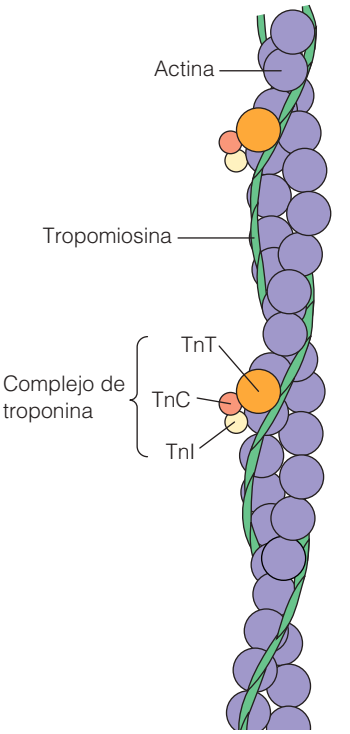
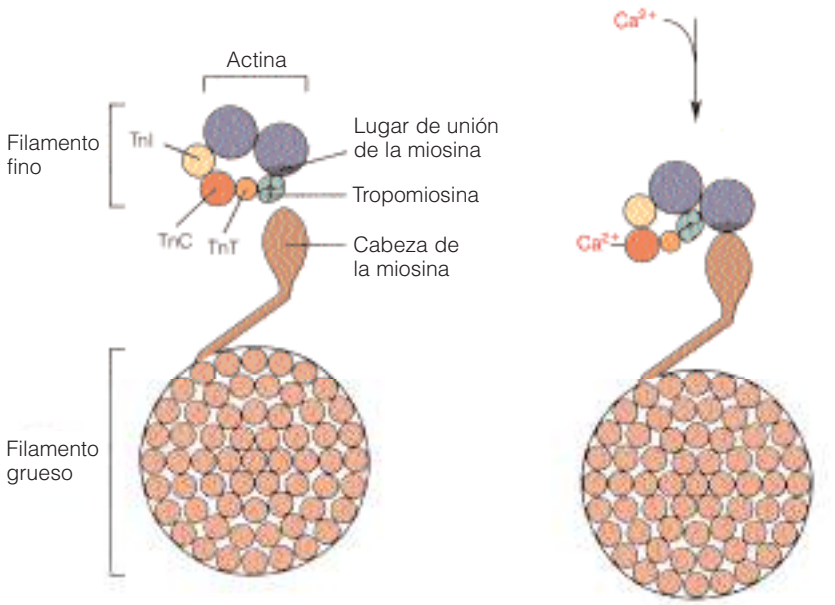


FIGURA **8.13**

Actina F y sus proteínas asociadas. En este dibujo esquemático se muestran las proteínas presentes en los filamentos finos del músculo estriado: actina F, tropomiosina y troponinas (Tn) I, C y T.



(a) Concentración de calcio baja ($Ca^{2+} < 10^{-7}$ M)

(b) Concentración de calcio alta ($Ca^{2+} > 10^{-6}$ M)

FIGURA **8.14**

Regulación de la contracción muscular por el calcio. Se muestra una única cabecera de miosina junto a un filamento fino, en una imagen transversal. **(a)** Músculo relajado. A concentraciones de Ca^{2+} bajas, la configuración de la actina, la tropomiosina y el complejo de troponina en el filamento fino impiden el contacto de la mayor parte de las cabeceras de miosina con el filamento fino. **(b)** La unión de Ca^{2+} a la troponina C produce un reordenamiento de los componentes del filamento fino, de tal manera que quedan libres los lugares de unión de la miosina en la actina. Puede producirse entonces la formación de puentes cruzados (paso 3 de la Figura 8.11) y el músculo se contrae.

Tomado de W. M. Becker, L. J. Kleinsmith y J. Hardin, *The World of the Cell*, 4ª ed. (San Francisco, CA: Addison Wesley Longman, 2000). © Addison Wesley Longman, Inc.

La contracción muscular se estimula por la entrada de Ca^{2+} en el sarcómero. La unión de Ca^{2+} por la troponina C produce un reordenamiento del complejo troponina-tropomiosina-actina, que permite que se formen los puentes cruzados de actina-miosina.

más detallada de la miofibra, o célula muscular (Figura 8.15). En el interior de la célula, cada miofibrilla está rodeada por una estructura denominada **retículo sarcoplásmico**, formada por túbulos membranosos. En los músculos en reposo, la concentración de Ca^{2+} en las miofibrillas se mantiene aproximadamente en 10^{-7} M, mientras que la concentración de Ca^{2+} en la luz del retículo sarcoplásmico puede ser 10 000 veces mayor. Los impulsos de los nervios motores despolarizan la membrana del retículo sarcoplásmico, con lo que se abren los canales de Ca^{2+} (véase el Capítulo 10) y se vierte el Ca^{2+} fuera de la luz en las miofibrillas, estimulando la contracción. La señal se transmite rápidamente a todo el retículo sarcoplásmico de una miofibra a través de los **túbulos transversales**, invaginaciones de la membrana plasmática a intervalos periódicos con el retículo.

Aunque un cambio brusco de la concentración de Ca^{2+} es la *señal* universal para la contracción muscular, evidentemente no puede proporcionar de por sí la energía necesaria. ¿De dónde viene la energía necesaria para el trabajo muscular?

ENERGÉTICA Y APORTES DE ENERGÍA EN EL MÚSCULO

Básicamente, el músculo es un mecanismo para convertir la energía libre química, liberada en la hidrólisis del ATP, en trabajo mecánico. La conversión puede ser muy eficaz, aproximándose a cifras del 80% en circunstancias óptimas. Esta eficacia es muy superior a la que puede conseguirse mediante máquinas químicas artificiales.

¿Cómo se genera el ATP? Incluso en el músculo estriado, la respuesta puede variar en función de la *clase* concreta de músculo de que se trate y de su función. Los músculos estriados pueden dividirse en dos categorías, el *músculo rojo*, concebido para un uso relativamente continuado, y el *músculo blanco*, que se utiliza para movimientos ocasionales frecuentemente rápidos. El músculo rojo debe su color oscuro a sus abundantes hemoproteínas: está bien abastecido de vasos sanguíneos y, por tanto, de hemoglobina, tiene muchas mitocondrias con citocromos y posee depósitos importantes de mioglobina. El músculo rojo de-

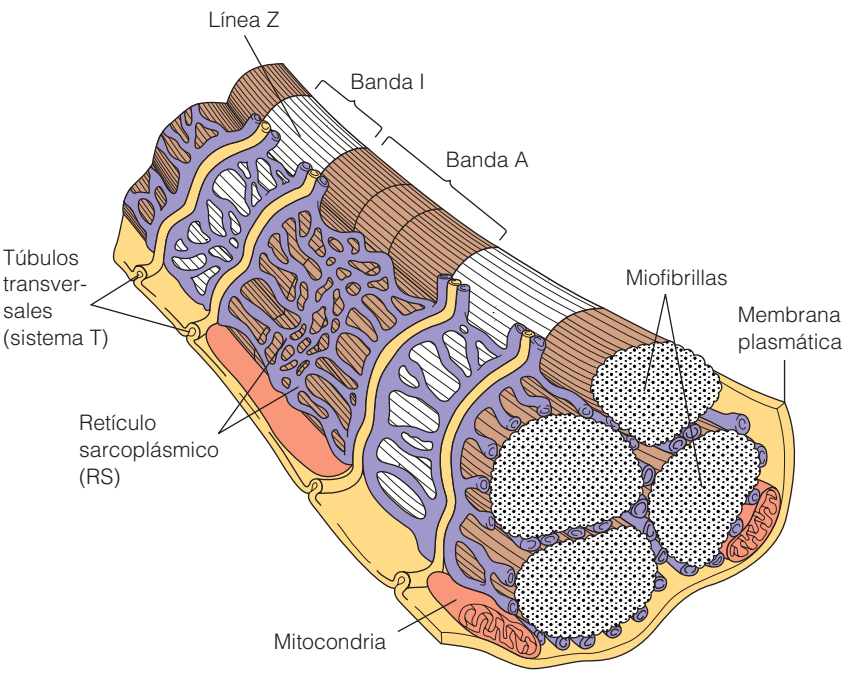


FIGURA **8.15**

Estructura de una miofibra (célula muscular). El retículo sarcoplásmico (RS) es una red de túbulos de retículo endoplasmático especializados que envuelven a las miofibrillas en el interior de la fibra muscular. En el músculo en reposo, el RS acumula Ca^{2+}, que libera luego hacia las miofibrillas cuando llega a la membrana plasmática una señal nerviosa. Los túbulos transversales (sistema T) son invaginaciones de la membrana plasmática que están en contacto con el RS en muchos puntos y garantizan que se produzca una respuesta uniforme a la señal.

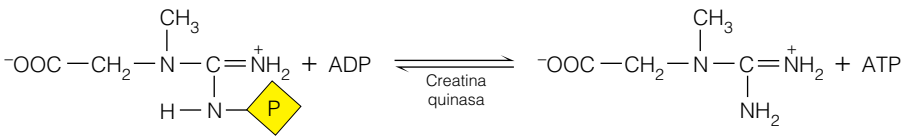
Tomado de W. M. Becker, L. J. Kleinsmith y J. Hardin, *The World of the Cell*, 4ª ed. (San Francisco, CA: Addison Wesley Longman, 2000). © Addison Wesley Longman, Inc.

pende en gran medida del metabolismo aerobio de las mitocondrias, de forma que la fuente de energía principal del músculo rojo es la oxidación de las grasas. En cambio, el músculo blanco utiliza el glucógeno como fuente de energía principal. El glucógeno es excelente para una producción rápida de energía, pero no puede mantener la actividad durante períodos de tiempo prolongados. (Véanse la Tabla 8.1 donde se da una comparación más detallada del músculo rojo y el músculo blanco, y los Capítulos 13 y 23 para un tratamiento más detallado del metabolismo energético.)

Las diferencias funcionales entre los dos tipos de músculo estriado se ponen claramente de manifiesto en las aves. En los pollos domésticos, los músculos del vuelo de la pechuga, que se utilizan sólo para un aleteo breve o para vuelos cortos, son blancos, mientras que los músculos de las piernas que se utilizan intensamente son rojos. Los pájaros silvestres que vuelan en libertad y realizan vuelos largos, pero que rara vez caminan, tienen una distribución exactamente opuesta de la carne clara y oscura.

Una observación cuidadosa de las concentraciones de ATP en el músculo estriado rojo ha puesto de manifiesto que el aporte de energía es más complicado de lo que podría parecer a primera vista. La cantidad de ATP necesaria para una única contracción puede ser superior a todo el ATP disponible de manera inmediata para un sarcómero. Sin embargo, aún después de un ejercicio relativamente prolongado, las concentraciones de ATP de los sarcómeros se mantienen básicamente constantes. Tan sólo después de un agotamiento extremo empiezan a disminuir las concentraciones de ATP. Esta observación sugiere que el ATP es un intermediario y no el compuesto final de almacenamiento de energía en estos músculos. De hecho, se sabe desde hace años que el compuesto de energía elevada que sufre una reducción mantenida durante la actividad muscular es la *creatina fosfato*. Como sugiere su elevado potencial de transferencia de fosfato (véase la Figura 3.7), este compuesto es capaz de fosforilar el ADP de manera muy eficaz. La reacción la cataliza la enzima *creatina quinasa*.

La fuente de energía en el músculo rojo es la creatina fosfato, que regenera continuamente ATP cuando éste se consume por la contracción muscular.



Creatina fosfato **Creatina**

$\Delta G^{\circ\prime} = -12$ kJ/mol

Dado que el equilibro está muy desplazado hacia el lado derecho, prácticamente todo el adenilato muscular se mantiene en forma de ATP, en vez de ADP o AMP, en tanto en cuanto haya creatina fosfato disponible. El consumo de creatina fosfato durante el ejercicio, mientras se mantiene una concentración

TABLA 8.1 Comparación del músculo estriado rojo y blanco

	Rojo	Blanco
Tamaño relativo de la fibra	Pequeño	Grande
Modo de contracción	Lenta	Rápida (unas 5 veces más rápida)
Vascularización	Intensa	Más ligera
Mitocondrias	Muchas	Pocas
Mioglobina	Mucha	Poca
Principal combustible almacenado	Células grasas	Glucógeno del músculo
Principal fuente de ATP	Oxidación de los ácidos grasos	Glucólisis

casi constante de ATP, se pone claramente de manifiesto en los estudios de RMN del músculo humano que se muestran en la Figura 12.14.

ACTINA Y MIOSINA NO MUSCULARES

El movimiento y los cambios de forma de muchos tipos de células se producen mediante un sistema de actina-miosina no muscular.

Aunque la actina y la miosina se han asociado tradicionalmente con el músculo, en realidad, se han encontrado miembros de las familias de la actina y la miosina en la mayor parte de las células eucariotas, incluso aquellas que no tienen relación alguna con los tejidos musculares. La actina y la miosina parecen desempeñar funciones importantes en la motilidad celular y en los cambios de forma de la célula. La actina es un componente importante del **citoesqueleto**: la estructura fibrosa que existe en casi todos los tipos de células y que les confiere una forma específica (Figura 8.16a). La tinción con anticuerpos fluorescentes muestra que la miosina está también asociada con esta red (Figura 8.16b). La miosina de estas redes intracelulares tiene una secuencia distinta de la miosina muscular. En vez de formar filamentos gruesos, la miosina no muscular tiende a formar dímeros, interactuando con la actina citoplasmática para formar el tipo de red contráctil laxa que se muestra en el esquema de la Figura 8.16c. La contracción y relajación organizadas de estas redes pueden dar lugar a una amplia variedad de movimientos y respuestas celulares, que incluyen el desplazamiento ameboide.

Otro proceso intracelular en el que parece participar un complejo contráctil de actina-miosina intracelular es la **citocinesis**, la división de las células en las

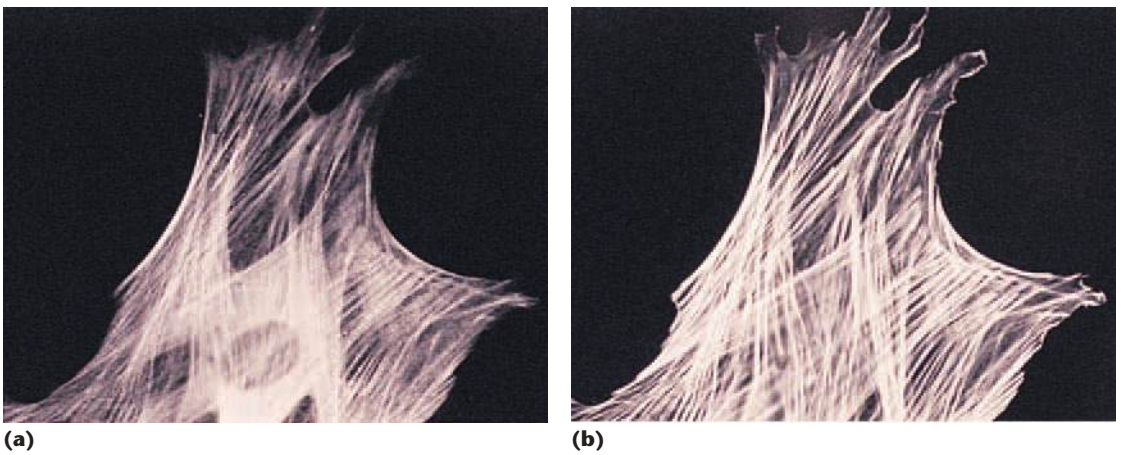


FIGURA **8.16**

Actina y miosina del citoesqueleto de los fibroblastos. **(a)** Fibras de actina detectadas mediante faloidina fluorescente, que se une de manera específica a la actina. **(b)** Miosina en la misma célula, detectada mediante la inyección de un anticuerpo fluorescente. **(c)** Un posible mecanismo de la contractilidad del citoesqueleto. Las proteínas globulares (en verde) que unen las moléculas de actina entre sí y con la membrana celular se denominan *filamina*.

(a, b) Tomado de B. M. Jockusch et al., en *J. Cell Sci., Suppl. 14*, editado por R. A. Cross y J. Kendrick-Jones, pp. 41-47 (Cambridge: The Company of Biologists, Ltd., 1991).

fases finales de la mitosis (Capítulo 28). El proceso puede observarse claramente en el óvulo del erizo de mar, que es un modelo muy utilizado para estos estudios (Figura 8.17). Hacia el final de la mitosis, cuando los núcleos destinados a las células hijas están claramente separados en los dos polos de la célula, se observa la aparición de un anillo de indentación en la superficie celular, que define un plano perpendicular al huso mitótico. Este anillo se contrae, formando el **pliegue de ruptura** que finalmente divide a la célula en dos. La microscopia electrónica pone de relieve que el anillo está formado por fibras y la tinción con anticuerpos fluorescentes indica que las fibras contienen actina y miosina.

La participación de la miosina en la citocinesis se ha puesto de manifiesto de manera muy elegante por S. Inoue y sus colaboradores en el experimento que se muestra en la Figura 8.18. Tras experimentar una división el óvulo del erizo de mar, se inyectaron a la célula hija de la derecha anticuerpos antimiosina, que deben hacer que la miosina no sea funcional. Al cabo de 10 horas, la célula de control (izquierda) había sufrido muchas divisiones hasta elaborar medio embrión. En la célula tratada, la mitosis continuó, como demuestran los muchos núcleos presentes, pero la *citocinesis había quedado completamente bloqueada*. En consecuencia, la miosina es esencial para la citocinesis.

El experimento demuestra otro hecho importante. Dado que la mitosis continuó aún en la célula tratada con anticuerpos antimiosina, el proceso contráctil que se produce en el huso mitótico *no* parece requerir la participación de la miosina. Se han publicado muchos estudios sobre la presencia de actina y miosina en el huso, y durante mucho tiempo se pensó que eran esenciales para la separación de los cromosomas. Sin embargo, éstos y otros experimentos indican que debe participar algún otro sistema contráctil. Nos ocuparemos ahora de esta segunda clase general de sistemas generadores de motilidad.

Sistemas de microtúbulos para la motilidad

Se utiliza una clase de sistemas de motilidad completamente diferente y no relacionada con los sistemas contráctiles de actina-miosina en lugares tan diversos como el huso mitótico, los flagelos de los protozoos y los espermatozoides, y los axones nerviosos, por citar tan sólo algunos. Estos sistemas están formados por **microtúbulos**, estructuras tubulares muy largas construidas a partir de una envoltura helicoidal de la proteína **tubulina** (Figura 8.19). Existen dos clases de

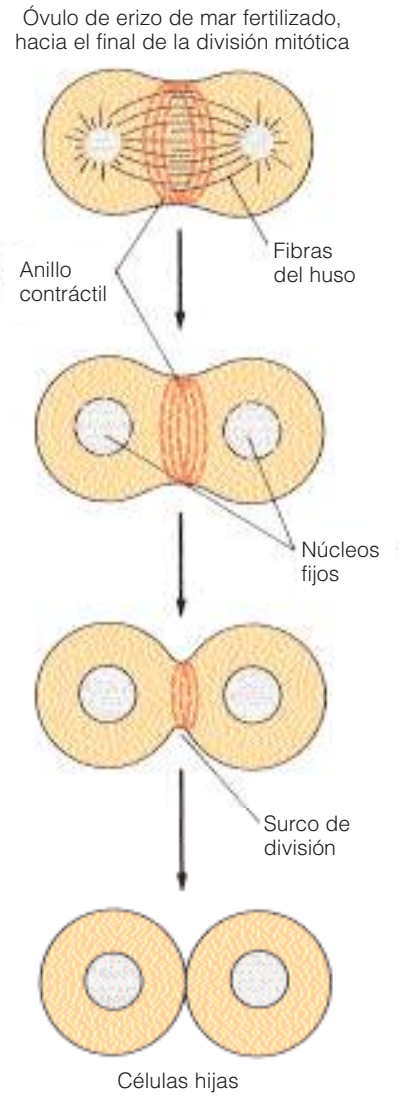


FIGURA **8.17**

Actina y miosina en la citocinesis. En este dibujo se muestra la citocinesis en un óvulo de erizo de mar fertilizado. El anillo contráctil que divide la célula en dos es un complejo de actina-miosina situado inmediatamente por debajo de la membrana plasmática.

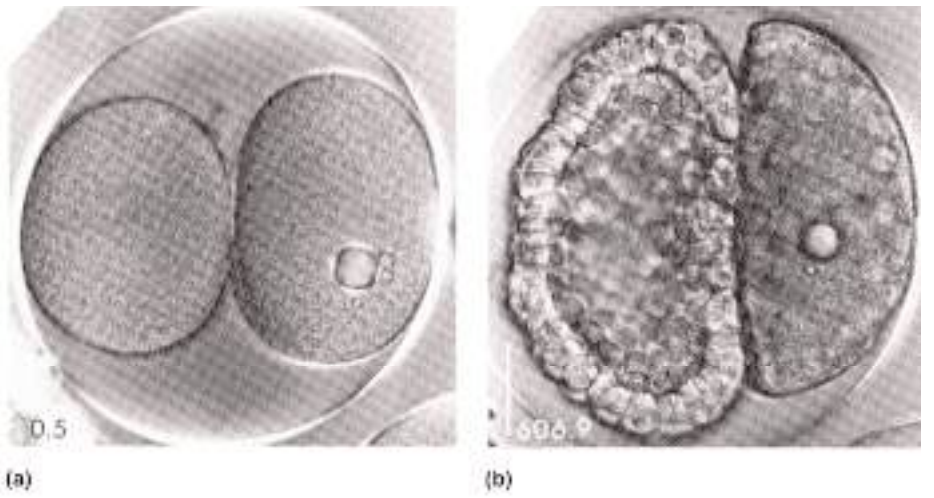


FIGURA **8.18**

La miosina es esencial para la citocinesis pero no para la mitosis. **(a)** Un embrión de erizo de mar en la fase de dos células. A la célula de la derecha se le han inyectado anticuerpos antimiosina; la gota de aceite indica el lugar de inyección. **(b)** Al cabo de 10 horas, la célula de la izquierda ha tenido muchas divisiones, y ha formado la mitad de un embrión normal. En la célula de la derecha, la citocinesis ha quedado completamente bloqueada, pero la presencia de muchos núcleos nuevos indica que el proceso de la mitosis ha continuado.

Cortesía de D. P. Kiehart, I. Mabuchi y S. Inoue, *J. Cell Biol.* (1982) 94:165, con permiso de © Rockefeller University Press.

Los microtúbulos son polímeros tubulares helicoidales formados por dos tipos de subunidades de tubulina.

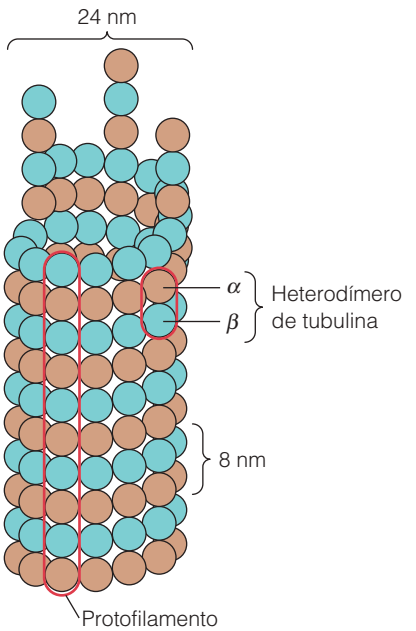


FIGURA **8.19**

Parte de un microtúbulo. Se muestran las subunidades α y β en azul y marrón, respectivamente. El microtúbulo puede considerarse una disposición helicoidal de dímeros $\alpha\beta$ o bien una estructura de 13 hileras paralelas de dímeros $\alpha\beta$. Estas hileras se denominan protofilamentos.

subunidades de tubulina, α y β, con un peso molecular de 55 000 cada una. Están presentes en cantidades equimolares en el microtúbulo, que puede considerarse una disposición helicoidal de dímeros $\alpha\beta$. Otra posibilidad es considerar el microtúbulo formado por 13 filas o **protofilamentos** de unidades α y β alternadas. Dado que las unidades α y β son proteínas asimétricas, con una orientación definida y reproducible en la fibra, el microtúbulo tiene una direccionalidad definida. Se ha resuelto recientemente la estructura de los dímeros $\alpha\beta$ de tubulina (véase en la Bibliografía Nogales *et al.*). Las dos subunidades son muy semejantes como se esperaba de sus secuencias similares.

El ensamblaje de los microtúbulos tiene ciertas semejanzas con el de la actina, pero requiere GTP en vez de ATP. Los dímeros $\alpha\beta$ unen GTP y se asocian posteriormente para formar oligómeros. Estos oligómeros forman lugares de nucleación para el crecimiento de los microtúbulos (Figura 8.20). Un extremo, denominado extremo más, crece con mayor rapidez que el otro, el extremo menos. Al igual que en la polimerización de la actina, el nucleótido se hidroliza, pero se mantiene en el filamento. El ensamblaje final de un microtúbulo funcional comporta generalmente la unión de otras proteínas a su superficie. Algunas de estas **proteínas asociadas a los microtúbulos** (**MAP**) desempeñan, como veremos, funciones importantes. Otras MAP estabilizan la estructura de los microtúbulos y/o estimulan la asociación de los microtúbulos en haces. La MAP tau (τ) que se encuentra en el tejido neuronal es un miembro de esta familia que ha acaparado bastante interés. La fosforilación de tau da lugar a su disociación de los microtúbulos y su desestabilización. La hiperfosforilación tiene un efecto mucho más grave, ya que da lugar a la formación de ovillos de filamentos τ en los axones nerviosos, uno de los principales síntomas celulares de la enfermedad de Alzheimer. A su vez, esto puede implicar que la síntesis o la activación de las enzimas (quinasas) inadecuadas implicadas en la fosforilación de tau pueden desencadenar el inicio de la enfermedad. Consideremos ahora algunas de las cosas que hacen los microtúbulos.

MOVIMIENTOS DE CILIOS Y FLAGELOS

Muchas células eucariotas se impulsan por el batir de cilios y flagelos. Los cilios son más cortos que los flagelos y producen un movimiento de remo coordinado para mover un microorganismo a través de la disolución (Figura 8.21a). Los

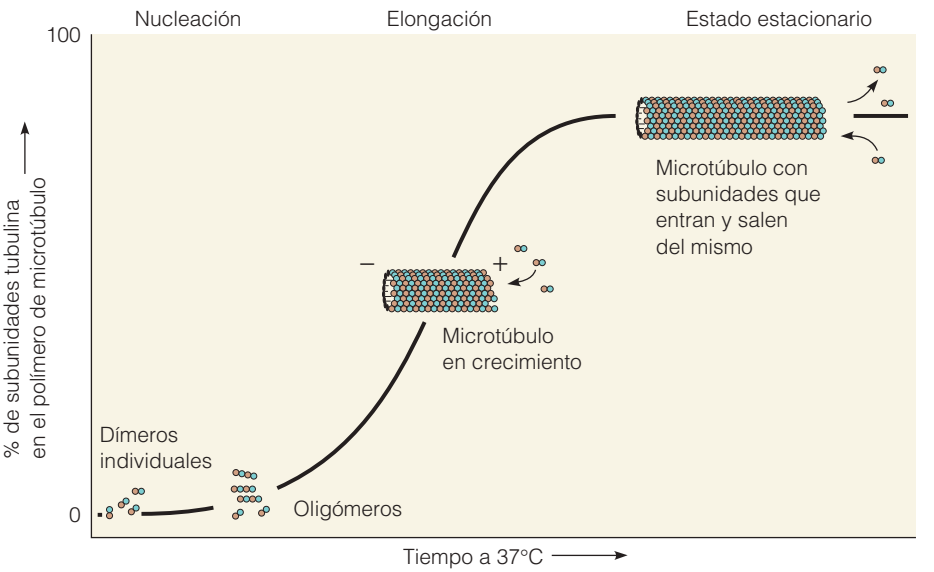


FIGURA **8.20**

Ensamblaje de los microtúbulos. Durante un período inicial, los dímeros $\alpha\beta$ forman oligómeros lo suficientemente grandes como para nuclear la formación de la fibra. A continuación, los microtúbulos van creciendo hasta emplear la mayor parte de los dímeros libres y se alcanza un equilibrio entre el crecimiento y la disociación. Para mayor simplicidad, mostramos el crecimiento tan sólo en uno de los extremos, ya que el crecimiento es más rápido en el extremo más.

Tomado de Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell* (Nueva York: Garland Publishing, 1994), fig. 16.23. © 1994 Garland Publishing.

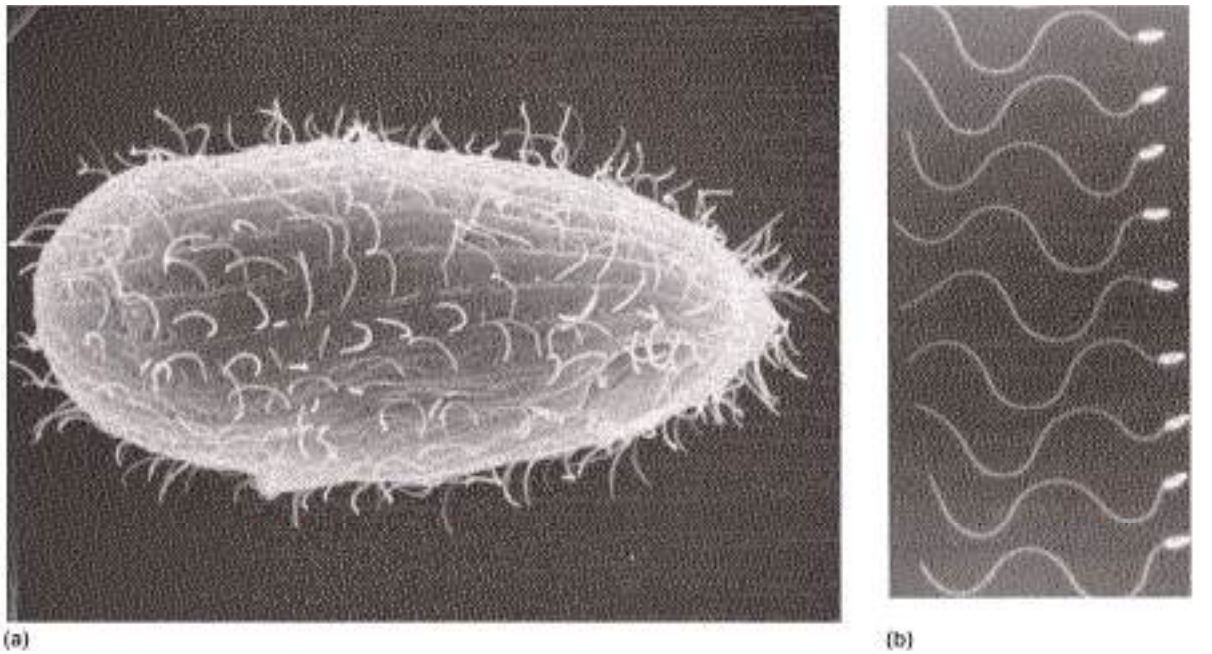


FIGURA **8.21**

Cilios y flagelos. **(a)** El protozoo *Tetrahymena* está cubierto por hileras de cilios. **(b)** Un espermatozoide del tunicado *Ciona*. En una serie de fotografías realizadas a intervalos regulares se observa la manera en la que las ondulaciones del flagelo impulsan al espermatozoide.

(a) Cortesía de U. W. Goodenough, *J. Cell Biol.* (1983) 96:1610, con permiso de © Rockefeller University Press; **(b)** cortesía de C. J. Brokaw, California Institute of Technology.

flagelos eucariotas, como las colas de los espermatozoides, son más largos e impulsan a la célula mediante un movimiento ondulante (Figura 8.21b). Las estructuras de los dos tipos de apéndices móviles tienen muchos elementos en común (Figura 8.22). Todos ellos contienen un haz de microtúbulos muy organizado al que se denomina **axonema**, que está envuelto por una prolongación de

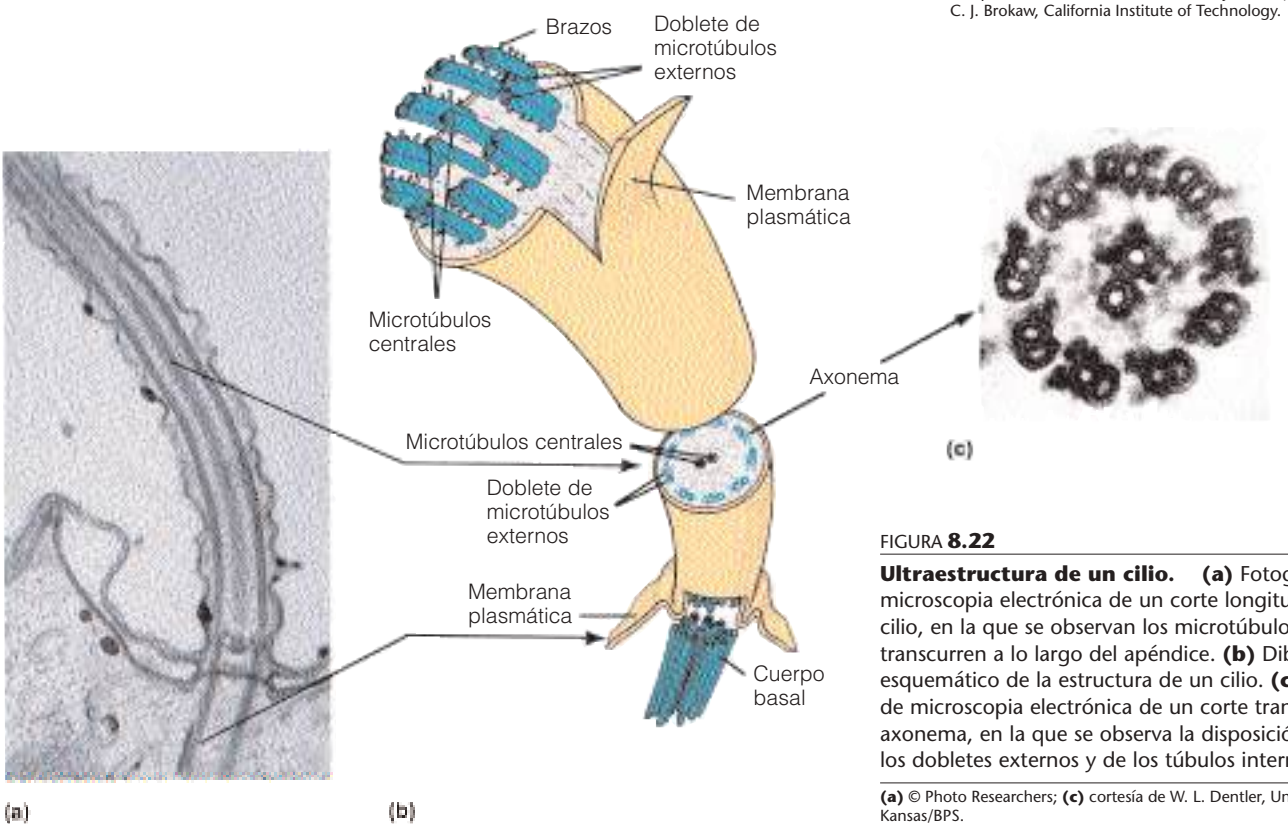


FIGURA **8.22**

Ultraestructura de un cilio. **(a)** Fotografía de microscopia electrónica de un corte longitudinal de un cilio, en la que se observan los microtúbulos que transcurren a lo largo del apéndice. **(b)** Dibujo esquemático de la estructura de un cilio. **(c)** Fotografía de microscopia electrónica de un corte transversal del axonema, en la que se observa la disposición 9 + 2 de los dobletes externos y de los túbulos internos.

(a) © Photo Researchers; **(c)** cortesía de W. L. Dentler, Universidad de Kansas/BPS.

Muchos tipos de células son impulsadas por cilios o flagelos que contienen microtúbulos.

la membrana plasmática y conectado a un **cuerpo basal**, una estructura de anclaje en el interior de la célula.

La estructura interna del axonema es realmente notable. Como se observa en el corte transversal de la Figura 8.22c, la característica más evidente es la disposición de los microtúbulos, que se denomina formación 9 + 2: dos microtúbulos centrales rodeados por nueve dobletes de microtúbulos. Los microtúbulos individuales del centro están completos, y cada uno posee 13 protofilamentos de dímeros de tubulina $\alpha\beta$. En cambio, cada uno de los nueve dobletes circundantes está formado por un microtúbulo completo (**fibra A**) al que se fusiona un microtúbulo incompleto, que sólo contiene 10 u 11 protofilamentos (**fibra B**). Una observación más detallada de las fotografías de microscopia electrónica descubre una complejidad aún mayor, como se muestra en la Figura 8.23. Los dobletes exteriores están interconectados de manera periódica por una proteína denominada *nexina* y tienen a intervalos regulares unos *brazos* laterales formados por la proteína **dineína**. Además, existen unos *radios*, formados por una cabeza y un brazo, que se proyectan desde los dobletes externos para conectarlos con el par de túbulos centrales.

La flexión de cilios y flagelos se realiza mediante el deslizamiento de microtúbulos que se cruzan impulsados por la dineína.

La complejidad total de la estructura del axonema sólo se observa mediante estudios de electroforesis en gel de axonemas aislados. En ellos pueden separarse unos 200 polipéptidos. El análisis indica que hay como mínimo 6 proteínas en las cabezas de los radios y otras 11 en los brazos de los radios. Gran parte de este aparato parece intervenir directamente en los movimientos de batido de cilios y flagelos. Si se añade ATP a los axonemas aislados, puede verse cómo los dobletes adyacentes se deslizan uno respecto al otro. El mejor modelo de que actualmente disponemos sostiene que este deslizamiento se produce mediante el "caminar" de los brazos laterales de dineína a lo largo del doblete adyacente (Figura 8.24a). Los dobletes se deslizan cruzándose primero en un lado del axonema y luego en el otro, de tal manera que la longitud del deslizamiento está limitada por los radios centrales y los conectores de nexina. De esta forma, el deslizamiento de los dobletes se transforma en un cimbreo hacia atrás y hacia delante de todo el cilio o el flagelo (Figura 8.24b). Si se eliminan las conexiones dentro del axonema mediante una proteólisis cuidadosa, el ATP hace simplemente que los axonemas se alarguen y adelgacen, ya que los dobletes exteriores se deslizan cruzándose sin que exista ningún punto de detención.

Se ha demostrado que la dineína tiene actividad ATPasa, con la unión del ATP asociada a la *ruptura* de los puentes cruzados de dineína. Existe una semejanza evidente entre los mecanismos de batido de cilios y flagelos y el cami-

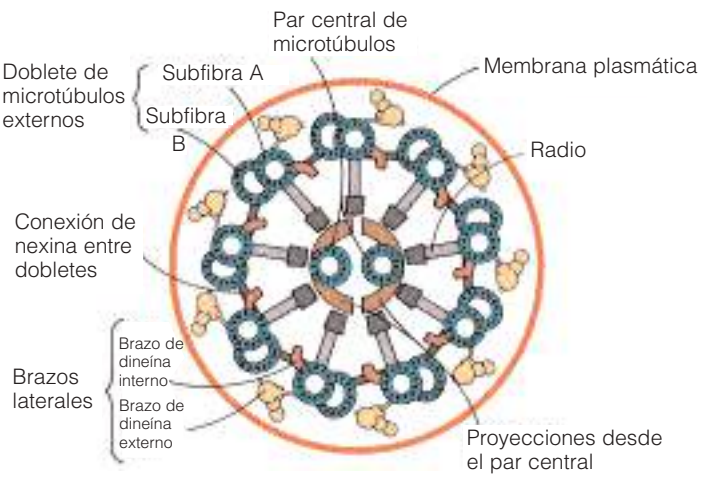
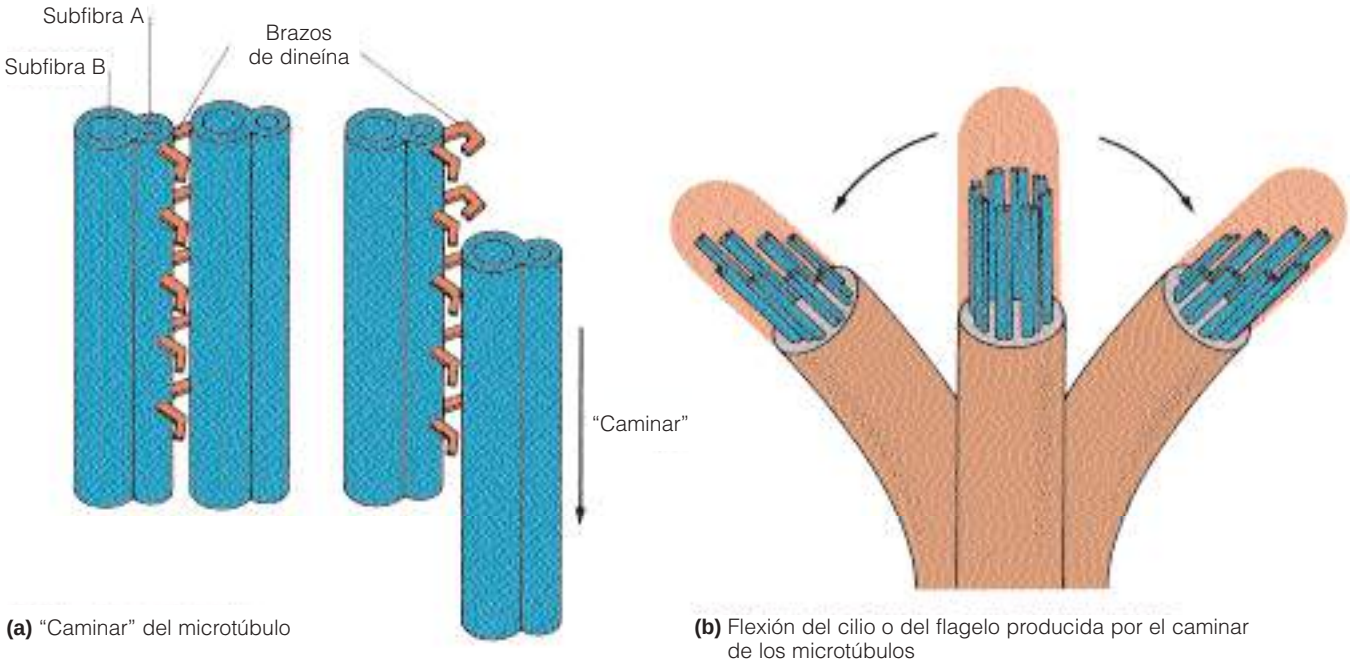


FIGURA **8.23**

Diagrama de la sección transversal de un axonema. Los brazos de dineína poseen actividad ATPasa y pueden hacer que los dobletes adyacentes se deslicen unos respecto a otros. Las conexiones de nexina entre los dobletes y el sistema radial dan estabilidad al conjunto completo.



(a) "Caminar" del microtúbulo

(b) Flexión del cilio o del flagelo producida por el caminar de los microtúbulos

FIGURA **8.24**

Modelo de la flexión de los cilios y flagelos. **(a)** Los dobletes de los microtúbulos aislados pueden "caminar", unos sobre otros formando y rompiendo los contactos del brazo de dineína, si hay ATP. **(b)** La flexión hacia uno y otro lado de un cilio o un flagelo se produce mediante "desplazamientos", cortos de los microtúbulos en los lados opuestos del apéndice. Los desplazamientos largos se evitan mediante las conexiones cruzadas entre los microtúbulos.

nar de las cabezas de miosina impulsado por el ATP a lo largo de la fibra de actina, y parece existir semejanza entre los dos sistemas en cuanto a la estructura proteica. De hecho, la dineína se asemeja a la cabeza S1 de la molécula de miosina.

TRANSPORTE INTRACELULAR

En un tiempo se pensó que todo el transporte de sustancias dentro del citoplasma de las células se produce mediante difusión simple. Actualmente se sabe que algunas proteínas y orgánulos se transportan rápidamente a grandes distancias a lo largo de los microtúbulos, que actúan como pistas que dirigen y facilitan el movimiento.

Los datos más claros que existen al respecto proceden de los estudios del transporte en los **axones**, las proyecciones largas que permiten a una célula nerviosa entrar en contacto con otra. Dado que los axones nerviosos pueden tener muchos centímetros de longitud, no es posible que se produzca un movimiento suficientemente rápido de sustancias entre el cuerpo celular y el extremo del axón mediante difusión. El problema puede estudiarse directamente con el empleo del nervio ciático de mamífero, que tiene unos axones muy largos que parten del cuerpo celular en la médula espinal. Si se inyectan aminoácidos marcados radiactivamente en el cuerpo celular, éstos se incorporan a las proteínas por los ribosomas de las células. Al cabo de un cierto tiempo, puede seccionarse el axón y determinarse la posición de las proteínas de nueva formación, marcadas radiactivamente. Este método pone de manifiesto que, aunque la rapidez del transporte presenta grandes variaciones, algunas proteínas, especialmente aquellas asociadas con las vesículas lipídicas, se desplazan con una rapidez de hasta 40 cm/día, mucho más deprisa de lo que cabría esperar que sucediera mediante difusión.

Los avances recientes de la microscopia que emplea la televisión han permitido estudiar estos procesos dinámicos con más detalle. Como se observa en la Figura 8.25, realmente pueden verse pequeñas vesículas u orgánulos com-

Algunos orgánulos y otros objetos se transportan en el interior de las células siguiendo "pistas" moleculares de microtúbulos o fragmentos de actina.

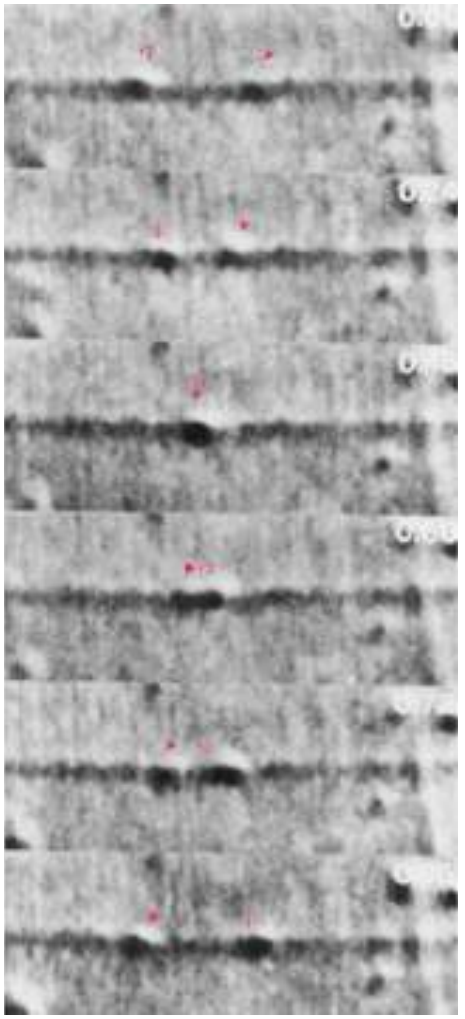


FIGURA **8.25**

Movimiento en las pistas de los microtúbulos. Una serie de imágenes de vídeo obtenidas a intervalos regulares pone de manifiesto el movimiento bidireccional de las vesículas de orgánulos en un único filamento de microtúbulo del axón gigante del calamar. Los dos orgánulos (señalados con los triángulos rojos abiertos y sólidos) se desplazan en direcciones contrarias y se cruzan. El tiempo transcurrido (s) se indica en el ángulo superior derecho de cada imagen.

B. J. Schnapp, R. D. Vale, M. Sheetz y T. S. Reese, *Cell* (1985) 40:455-462. © 1985 Cell Press.

pletos que se desplazan a lo largo de los haces de microtúbulos en un axón. El transporte a lo largo de los microtúbulos se produce en ambas direcciones, y siempre mediante el enganche de "motores moleculares" a los objetos que se van a transportar. Estos motores son de dos tipos. Uno de ellos, denominado **dineína citoplasmática**, se parece a la dineína que participa en el movimiento de cilios y flagelos (véase el apartado anterior) y se encarga del transporte desde el extremo más del microtúbulo hacia el extremo menos. El otro, denominado **cinesina**, se utiliza para transportar objetos en sentido contrario. La cinesina y la dineína citoplasmática representan familias de proteínas con funciones de transporte semejantes aunque diferentes en una amplia variedad de tipos celulares. Las dos proteínas tienen una estructura semejante y cierta semejanza con la familia de la miosina. En la Figura 8.26, que representa la estructura del dímero de cinesina, puede verse esta semejanza. Como en la miosina, hay dos grupos de cabeza, conectados por una cola de ovillo aleatorio extendida. Además, hay dos cadenas ligeras asociadas cuya función se desconoce (no se muestran en la Figura 8.26). Los estudios detallados del movimiento de la cinesina y la dineína sobre los microtúbulos señalan que "caminan" a lo largo de la pista de microtúbulos, con un tamaño de paso de unos 8 nm, que es exactamente la distancia desde un dímero de tubulina al siguiente. En la Figura 8.27, se ilustra un modelo que se ha propuesto para el ciclo de paso de la dineína, en el que se supone que la molécula pivota, engranando un grupo de cabeza y luego el otro a los monómeros de tubulina. La cola helicoidal de la molécula la conecta con cualquier cosa "cargada" que estén transportando la dineína o cinesina, quizás a través de proteínas asociadas (que pueden incluir a las cadenas ligeras).

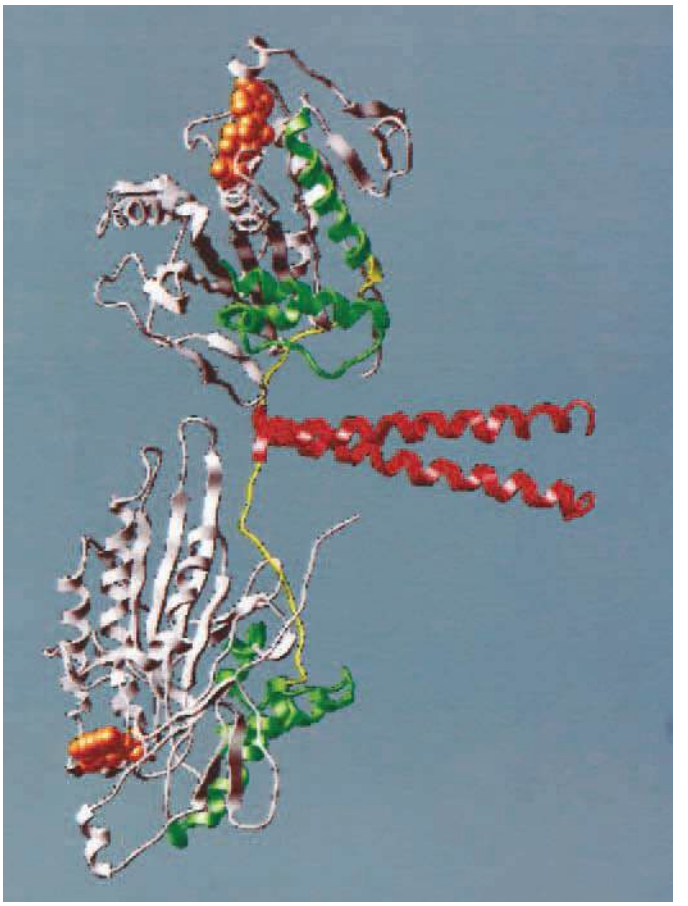


FIGURA **8.26**

El dímero de cinesina. Las regiones globulares están unidas mediante un ovillo enrollado de hélice α (rojo). La porción verde de cada región globular participa en la unión a la tubulina. En naranja se presentan las moléculas de ADP unidas.

Adaptado de E. Mandelkow y A. Hoenger, *Curr. Opin. Cell. Biol.* (1999) 11:34-44.

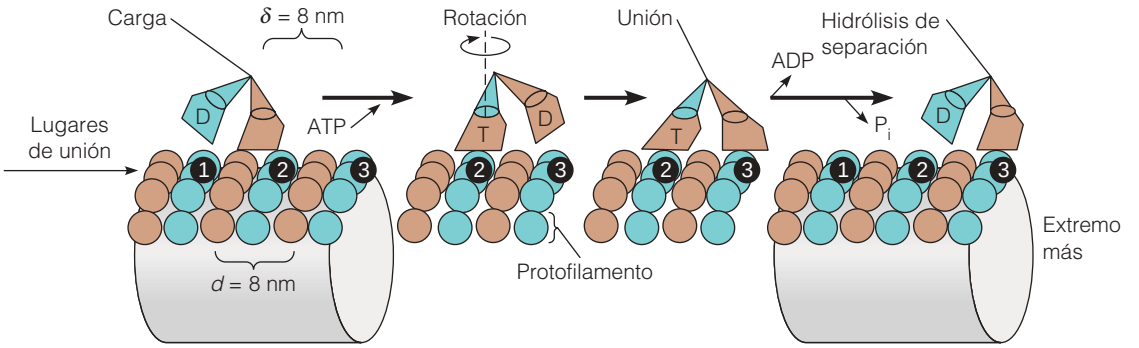


FIGURA **8.27**

Modelo del movimiento de la cinesina en un microtúbulo. Las subunidades α y β de los microtúbulos se presentan con esferas marrones y verdes, respectivamente. Los símbolos T y D señalan la presencia de ATP y ADP, respectivamente. La unión de ATP a una cabeza de cinesina se presume produce una rotación del dímero, llevando la cabeza con el ADP (D) donde éste puede contactar con el siguiente dímero de tubulina. La unión da lugar a la pérdida de ADP de su subunidad. La hidrólisis del ATP en la otra cabeza permite liberarlo de la tubulina, comenzando el ciclo de nuevo. Se hidroliza un ATP por cada paso de 8 nm. Obsérvese la semejanza del mecanismo con la acción de la miosina.

Adaptado de J. Howard, *Nature* (1997) 389:561-567. © 1997 Macmillan Magazines, Ltd.

Hay también pruebas claras de otro mecanismo de transporte más en el citoplasma. La observación atenta de los movimientos de los orgánulos en los microtúbulos en el axoplasma del calamar ha demostrado que algunos orgánulos realizan periódicamente movimientos lineales cortos, con cambios bruscos de dirección, en regiones donde *no pueden observarse microtúbulos*. Esta investigación ha llegado a la conclusión de que el movimiento puede producirse también en algunas o todas las fibras de actina que son comunes en ésta y otras células. Estudios más detallados han demostrado que aquí los motores son miosinas especiales y que un orgánulo puede tener cinesina y miosina simultáneamente. La observación plantea la interesante idea de que mientras los microtúbulos pueden constituir las "autopistas" para el transporte intracelular, las fibras de actina pueden ser las "carreteras locales". Evidentemente, es mucho lo que sucede en el interior de las células que tan sólo ahora estamos empezando a comprender.

MICROTÚBULOS Y MITOSIS

Los estudios indican que el huso mitótico (véase el Capítulo 28) está formado principalmente por microtúbulos. Concretamente, diversas situaciones que bloquean la formación de los microtúbulos (determinados alcaloides de las plantas, la temperatura baja, la presión elevada) impiden también la formación del huso y la finalización de la mitosis. El huso mitótico contiene microtúbulos que cumplen diversas funciones (Figura 8.28). Algunos de ellos, denominados **microtúbulos polares**, se extienden entre los centríolos y parecen separarlos.

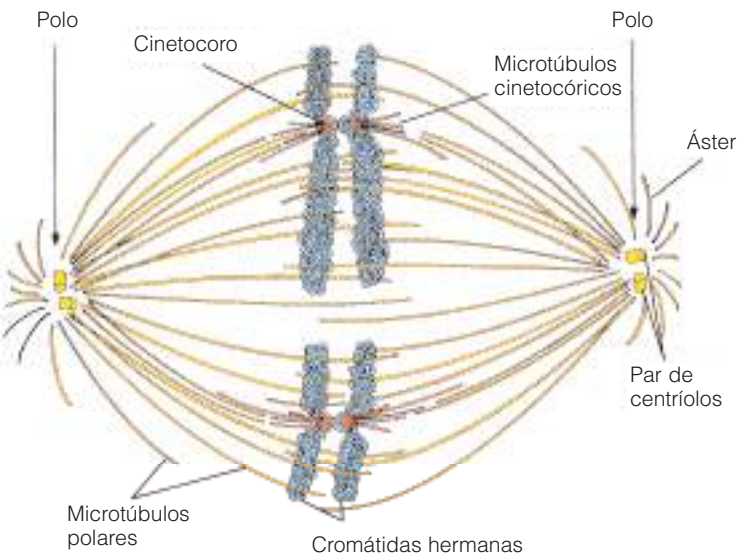


FIGURA **8.28**

Microtúbulos en el huso mitótico. La separación tanto de los centríolos como de las cromátidas durante la mitosis parece realizarse mediante los microtúbulos del huso. Los microtúbulos polares tienen una estructura radial a partir de los centríolos y parecen empujarles separándolos. Los microtúbulos cinetocóricos surgen de puntos situados cerca del cinetocoro de cada cromosoma y se cree que traccionan de las cromátidas hacia los centríolos.

La separación de los cromosomas en la mitosis la realizan los microtúbulos.

Otros, los **microtúbulos cinetocóricos**, están unidos a los cinetocoros de los cromosomas y parecen traccionar de las cromátidas hacia los polos en la telofase.

No se conoce todavía bien el mecanismo por el que se genera el movimiento de los microtúbulos para realizar el complejo proceso de la mitosis, aunque es un tema objeto de muchos estudios. Ha quedado claro que participan varios miembros de las familias de la cinesina y la dineína citoplasmáticas y que durante el proceso se empujan y se estiran los microtúbulos.

Motilidad bacteriana: proteínas rotatorias

Es adecuado concluir este capítulo examinando un sistema que carece casi de rival en cuanto a su elegancia y simplicidad. En la motilidad bacteriana encontramos un mecanismo que nunca hubiéramos creído si las pruebas no fueran irrefutables. El flagelo de las bacterias es una fibra helicoidal a derechas, formada casi enteramente por una proteína fibrosa, la **flagelina**. No contiene microtúbulos, actina, miosina ni sistema contráctil alguno. Sin embargo, durante muchos años se supuso que el flagelo bacteriano realizaba movimientos de flexión en el plano, como los de las colas de los espermatozoides. Fue pues una sorpresa para los investigadores observar que, en realidad, realiza una *rotación*. Este mecanismo se puso de relieve de una forma muy sencilla al pegar el flagelo de una bacteria a una lámina de vidrio mediante anticuerpos antiflagelina. Dado que el flagelo no podía ya rotar, era la bacteria la que lo hacía.

Algunas bacterias se desplazan por la rotación de flagelos, utilizando motores de rotación moleculares que se encuentran en la membrana celular.

En la Figura 8.29 se muestra la notable estructura que une el flagelo a la bacteria y genera la rotación. La fibra del flagelo está unida mediante una estructura de gancho a un cilindro que pasa a través de un "cojinete" de la membrana bacteriana externa y penetra en la membrana interna, donde acaba en un "rotor" con varias subunidades, que está rodeado por un anillo "estator". Cada uno de estos componentes está formado por moléculas proteicas, la mayoría de las

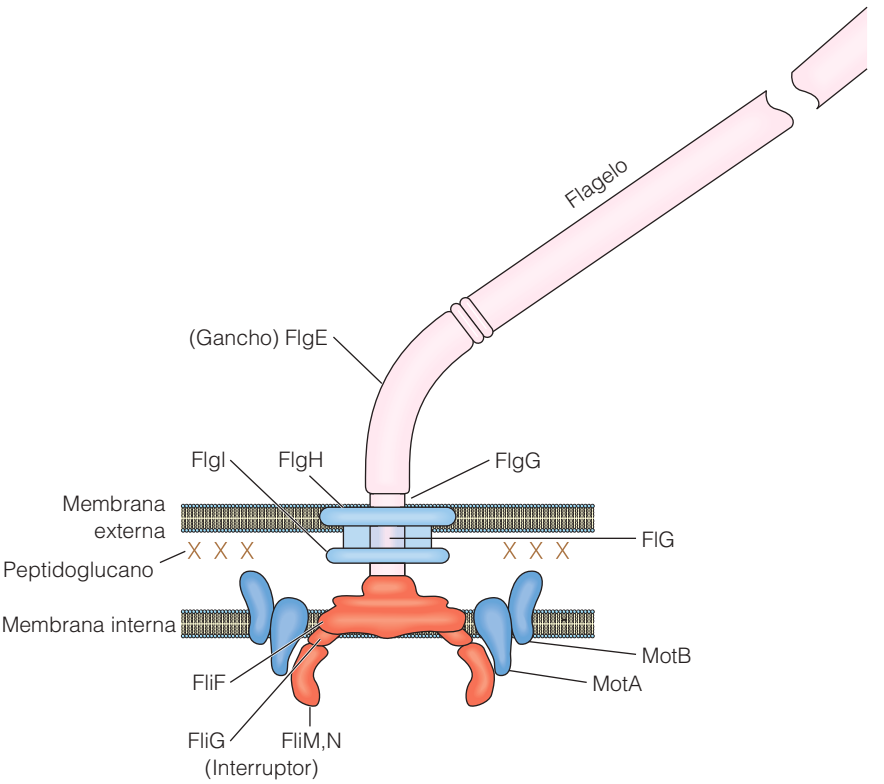


FIGURA **8.29**

Estructura del motor flagelar bacteriano. Los componentes que corresponden a proteínas específicas se denominan de la forma siguiente: FlgE y FlgG forman el cilindro y el gancho, respectivamente. El cilindro pasa a través de dos "casquillos" (FlgH y FlgI), que lo conectan a la membrana externa y a la capa de peptidoglucano (véase el Capítulo 9), respectivamente. A continuación, el cilindro conecta con el rotor (FliF, FliG), que gira dentro de un estator formado por MotA y MotB. Los protones pasan a través de MotA, dentro del citoplasma, para impulsar el motor. El elemento FliM,N forma el "interruptor" que puede invertir el motor. Las partes móviles se presentan en rojo o rosa y las partes estacionarias, en azul.

Adaptado de H. C. Berg, *Biophys. J.* (1995) 68:163s-167s.

cuales ya se han caracterizado. En otras palabras, el flagelo se hace rotar mediante un motor ultramicroscópico, formado en su totalidad por subunidades proteicas. En cierto sentido, es un motor eléctrico, ya que la fuerza impulsora procede de los protones que se desplazan a través de la membrana interna de la bacteria. El gradiente de protones se genera por la hidrólisis del ATP (véase el Capítulo 15). El motor gira a unas 60 revoluciones por segundo y requiere el paso de unos 1000 protones por revolución. Estos motores rotatorios parecen ser muy frecuentes en biología y presentan una gran variedad de funciones y mecanismos. Determinadas bacterias marinas se mueven utilizando motores impulsados por flujos de iones sodio en lugar de flujos de protones. Por otro lado, en la mayoría de los organismos, se emplean flujos de protones a través de un dispositivo rotatorio para generar el ATP del metabolismo oxidativo, de la forma que se describirá en el Capítulo 15.

El motor flagelar tiene aún otra propiedad notable: puede invertir su movimiento, es decir, puede provocar la rotación del flagelo en el sentido de las agujas del reloj o en el sentido contrario. Esta capacidad es importante para la bacteria, puesto que permite que se produzcan movimientos rectilíneos constantes y cambios de dirección. Si los múltiples flagelos rotan todos en sentido contrario a las agujas del reloj (Figura 8.30a), el sentido de su hélice a derechas les *empuja* reuniéndolos. Tienden a colocarse juntos formando un haz e impulsan a la bacteria en línea recta, en un movimiento que se denomina *carrera*. Pero si los flagelos rotan en el sentido de las agujas del reloj (Figura 8.30b), se apartan de la superficie y *traccionan* en todas direcciones. El resultado es que la bacteria realiza un movimiento de *volteo*.

Escherichia coli y otras bacterias con flagelos presentan una respuesta a los productos químicos a la que se denomina **quimiotaxia**. (El fenómeno general de la **taxia**, que se da de manera muy generalizada en los mundos animal y vegetal, comprende la realización de movimientos en respuesta a estímulos externos.) Las bacterias quimiotácticas se desplazan preferentemente hacia los atra-

FIGURA **8.30**

Efecto de la dirección de rotación flagelar. Estas fotografías de microscopia electrónica y los diagramas adjuntos muestran cómo la dirección de rotación flagelar afecta a una bacteria que dispone de varios flagelos. **(a)** Si los flagelos rotan en sentido contrario a las agujas del reloj, su estructura helicoidal a derechas hace que se junten en un haz e impulsen a la bacteria en línea recta (carrera). **(b)** Cuando la rotación es en el sentido de las agujas del reloj, los flagelos se dispersan en todas las direcciones y la bacteria realiza volteos al azar.

Fotografías de microscopia electrónica cortesía de R. M. McNab y M. K. Ornston, *J. Mol. Biol.* (1977) 112:1-30. © 1977 Academic Press.

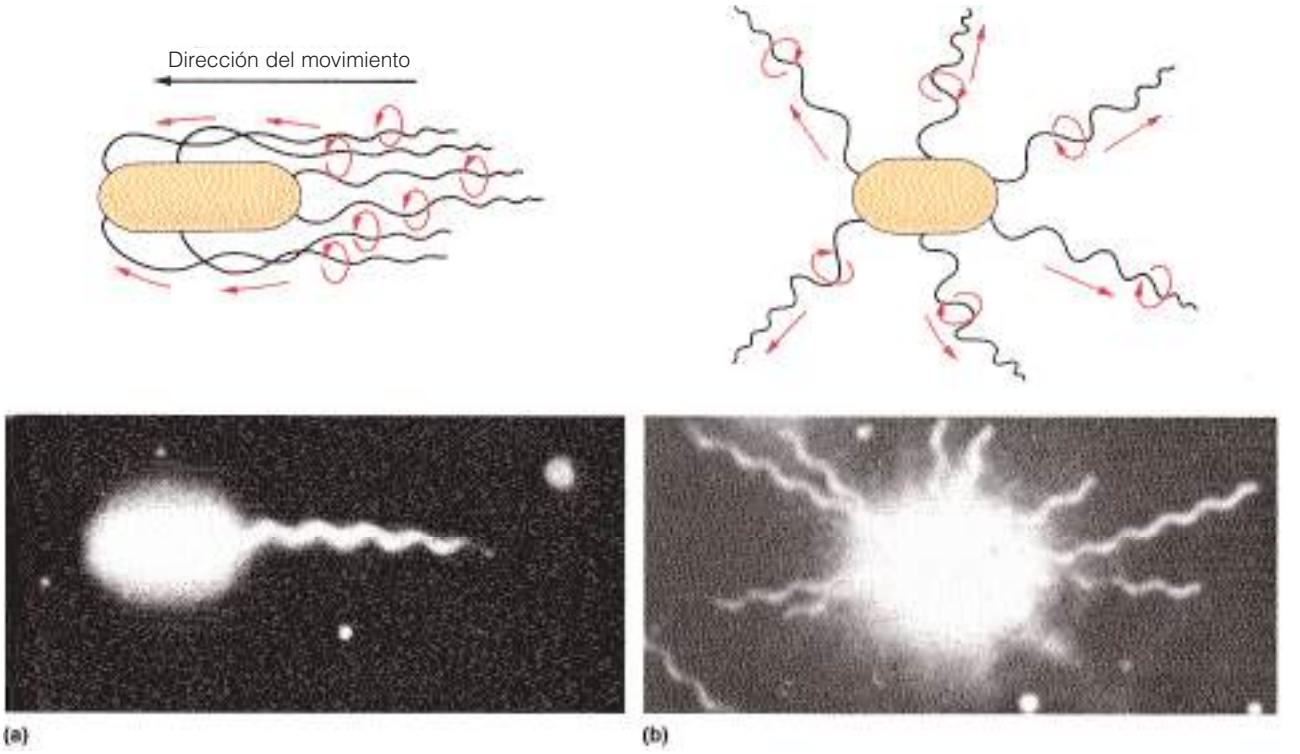
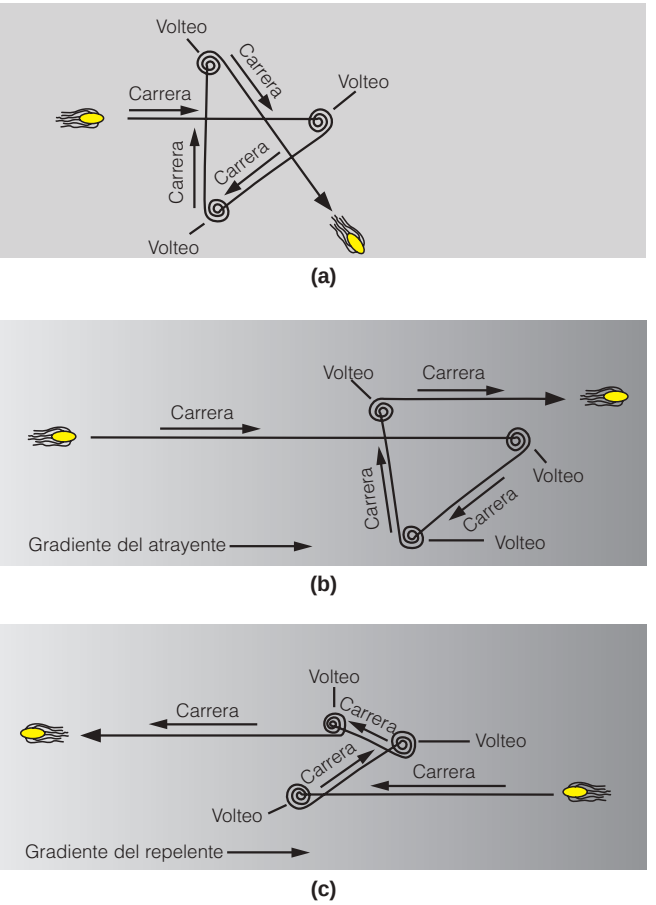


FIGURA **8.31**

Movimiento quimiotáctico de las bacterias. **(a)** En ausencia de atrayentes o repelentes, la bacteria se detiene y realiza volteos de manera frecuente, iniciando cada vez una nueva dirección aleatoria del movimiento. **(b)** Cuando existe un gradiente de un atrayente, el desplazamiento de la bacteria hacia el atrayente tiende a mantenerse durante períodos de tiempo más prolongados sin realizar volteos. **(c)** Un gradiente de un repelente tiene el efecto contrario y favorece los desplazamientos prolongados en dirección contraria al origen del repelente.

Tomado de W. M. Becker, L. J. Kleinsmith y J. Hardin, *The World of the Cell,* 4ª ed. (San Francisco, CA: Addison Wesley Longman, 2000). © Addison Wesley Longman, Inc.



yentes, como los nutrientes, y se alejan de los repelentes, como los productos tóxicos. En la actualidad, podemos describir la quimiotaxia bacteriana mediante los movimientos de carrera y volteo (Figura 8.31). En un medio neutro y uniforme, se producen períodos de carrera de unos segundos de duración, que se alternan con períodos breves de volteo, y la bacteria se desplaza de manera aleatoria (Figura 8.31a). La presencia de un gradiente de un nutriente o de un repelente nocivo desplaza esta distribución de carrera y volteo. Si una bacteria se mueve en la dirección de un gradiente de nutriente, el movimiento de volteo se retarda, con lo que se produce un movimiento neto hacia el origen de la nutrición (Figura 8.31b). Y a la inversa, una bacteria que se aleja de un repelente continúa haciéndolo durante un período superior al habitual antes de voltearse, con lo que se produce una reacción de evasión (Figura 8.31c).

Estas observaciones implican que las bacterias flageladas deben poseer algún mecanismo de percepción de los gradientes de atrayentes o de repelentes, y han de ser capaces de transmitir esta información a los motores de sus flagelos. Y en realidad es así. No disponemos de espacio para describir aquí este notable mecanismo. El lector interesado puede consultar las citas bibliográficas que se incluyen al final del capítulo.

RESUMEN

En los animales existen diversos sistemas de proteínas macromoleculares que convierten la energía del ATP en trabajo físico. Un ejemplo importante es el sistema actina-miosina del músculo. En este tejido, los filamentos interdigitados de

actina y miosina se desplazan unos sobre otros mediante la fijación, el desplazamiento y el desprendimiento de puentes cruzados de miosina. La contracción muscular se estimula por la entrada de calcio, que produce un reordenamiento de las proteínas asociadas con la actina. El origen directo de la energía contráctil es el ATP, y el depósito final de la energía es la creatina fosfato.

Existen también otros muchos sistemas no musculares para producir movimiento y realizar trabajo. Muchos tipos de movimiento celular, como el desplazamiento ameboide y la citocinesis, utilizan actina y miosina no musculares. Por otro lado, los flagelos y los cilios se impulsan mediante el deslizamiento, impulsado por el ATP, de los microtúbulos, que son filamentos formados por la polimerización de tubulina. Los microtúbulos realizan otras muchas funciones, como la de actuar como "caminos" para el transporte de orgánulos y proteínas en el interior de las células, y producir la separación de los cromosomas en la mitosis.

Existe un motor molecular notable que produce la rotación de los flagelos de las bacterias. Este motor, al revertir la dirección de su movimiento, puede hacer que la bacteria realice un volteo y cambie su dirección de movimiento, y busque así nuevas direcciones en las que encontrar los nutrientes o evitar las sustancias tóxicas.

BIBLIOGRAFÍA

General

Cook, R. (Coordinador de la Discusión) (1995) *The Seventh Biophysical Discussion: Molecular Motors, Structure, Mechanics, and Energy Transduction.* Suplemento del Volumen 68 de *Biophysical Journal.* Una colección excelente de trabajos cortos y resúmenes, que se completa con una discusión por los miembros de la reunión.

Cross, R. A. y J. Kendrick-Jones, eds. (1991) *Motor Proteins: Supplement 14 of the Journal of Cell Science.* The Company of Biologists, Ltd., Cambridge. Una espléndida colección de artículos. Aproximadamente la mitad se refieren al sistema actina-miosina, y la otra mitad al transporte en los microtúbulos.

Músculo

Rayment, I. y H. M. Holden (1994) The three-dimensional structure of a molecular motor. *Trends Biochem. Sci.* 19:129-134.

Spudich, J. (1994) How molecular motors work. *Nature* 372:515-518. Un breve resumen (la mayor parte sobre el músculo) por una autoridad en la materia.

Stroud, R. M. (1996) Balancing ATP in the cell. *Nature Struct. Biol.* 3:567-569. La estructura de la cretina quinasa establecida recientemente clarifica el mecanismo por el que los compuestos que participan en la producción de energía se canalizan desde la mitocondria al citoplasma.

Yanagida, T. y A. Ishijima (1995) Forces and steps generated by single myosin molecules. *Biophys. J.* 68:312s-320s.

Microtúbulos, dineína y cinesina

Amos, L. W., R. W. Linck y A. Klug (1976) Molecular structure of flagellar microtubules. En: *Cell Motility*, editado por R. Goldman, T. Pollard y J. Rosenbaum, pp. 847-868. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Un artículo clásico sobre la estructura de los microtúbulos.

Goodenough, U. y J. E. Heuser (1985) Substructure of inner dynein arms, radial spokes, and the central pair/projection complex of cilia and flagella. *J. Cell Biol.* 100:2008-2018.

Hirokawa, N., Y. Noda y Y. Okada (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:60-73.

Nogales, E., S. C. Wolf y K. H. Downing (1998) Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391:199-203.

Schnapp, B. J., R. D. Vale, M. P. Sheetz y T. S. Reese (1985) Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles. *Cell* 40:455-462. Un estudio precursor.

El motor bacteriano y la quimiotaxia

Berg, H. C. (1995) Torque generation by the flagellar rotary motor. *Biophys. J.* 68:163s-167s.

Meister, M., G. Lowe y H. C. Berg (1987) The proton flux through the bacterial flagellar motor. *Cell* 49:643-650.

Schuster, S. C. y S. Kahn (1994) The bacterial flagellar motor. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:509-539.

Segall, J. E., S. M. Block y H. C. Berg (1986) Temporal comparisons in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8987-8991.

Wolfe, A. J., M. P. Conley, T. J. Kramer y H. C. Berg (1987) Reconstitution of signaling in bacterial chemotaxis. *J. Bacteriol.* 169:1878-1885.

PROBLEMAS

1. Un sarcómero característico relajado tiene unos 2.3 μm de longitud y se contrae hasta una longitud de unos 2 μm. En el interior del sarcómero, los filamentos finos tienen una longitud de aproximadamente 1 μm y los filamentos gruesos de alrededor de 1.5 μm.
   (a) Describa el solapamiento de los filamentos gruesos y finos en el sarcómero relajado y contraído.

(b) Un "paso" individual por una cabeza de miosina en un ciclo tracciona del filamento fino alrededor de 15 nm. ¿Cuántos pasos debe realizar cada fibra de actina en una contracción?

2. Cada gramo de músculo esquelético de mamífero consume ATP a un ritmo de aproximadamente 1×10^{-3} mol/min durante la contracción. Las concentraciones de ATP y de creatina fosfato del músculo son de aproximadamente 4 mM y 25 mM, respectivamente, y la densidad del tejido muscular es de 1.2 g/cm^3.
   (a) ¿Durante cuánto tiempo podría mantenerse la contracción sólo con ATP?
   (b) Si toda la creatina fosfato se convirtiera en ATP y se utilizara también, ¿durante cuánto tiempo podría continuar la contracción?
   (c) ¿Qué le indican estas respuestas?

3. Se sabe que el fármaco citocolasina se une a los extremos de las fibras de actina. Carece de efecto en la contracción del músculo estriado, pero inhibe por completo la motilidad y los cambios de forma celular en las células eucariotas. ¿Qué sugieren estas observaciones?

*4. La tubulina une GTP, y la polimerización de un microtúbulo se estimula de manera intensa cuando una molécula de tubulina del extremo de crecimiento lleva unida GTP. La tubulina tiene también actividad GTPasa, con un número de recambio bajo. Los microtúbulos que llevan GDP en sus extremos es más probable que pierdan monómeros de tubulina. Indique de qué manera estos hechos pueden explicar la notable observación de que a determinadas concentraciones de GTP, algunos microtúbulos de una mezcla crecerán mientras que, al mismo tiempo, otros se encogen.

*5. Suponga que un orgánulo esférico de 0.1 μm de diámetro está siendo transportado a lo largo de un microtúbulo por la cinesina a una velocidad de 10 μm/min. Calcule la distancia máxima que puede desplazarse por la hidrólisis de una molécula de ATP, suponiendo un valor de $\Delta G = -40$ kJ/mol en condiciones celulares. [Pista: Consulte Herramientas de la Bioquímica 5A y observe que la fuerza resultante sobre una partícula en movimiento viene dada por fv, en donde v es la velocidad y f el coeficiente de fricción. Para las esferas, $f = 6\pi\eta r$, en donde r es el radio y η es la viscosidad del medio. Puede considerar que la viscosidad del citoplasma es de aproximadamente 0.5 kg/s · m, que corresponde a 5 veces la viscosidad del agua. Por último, recuerde que trabajo (energía) = fuerza × distancia.]

*6. En el momento actual, existe controversia con relación a la distancia que los filamentos de actina y miosina pueden deslizarse uno sobre otro como consecuencia de la hidrólisis de una molécula de ATP. A cargas elevadas, el resultado parece ser consistente con la longitud del golpe (unos 10 nm), pero a cargas bajas algunos investigadores han apuntado distancias mucho mayores. Comente el problema de acuerdo con el modelo que se ha propuesto en la Figura 8.11.

CAPÍTULO 9

Hidratos de carbono

PASAMOS AHORA AL TERCER GRAN GRUPO DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS, los **hidratos de carbono** o **sacáridos**. Muchas de estas sustancias le serán ya familiares. Los hidratos de carbono más sencillos son moléculas monoméricas pequeñas, los **monosacáridos**, que comprenden los azúcares simples como la *glucosa* (Figura 9.1a). Otros hidratos de carbono importantes son los que se forman mediante la unión de estos monosacáridos. Si sólo interviene en el proceso un número reducido de unidades monoméricas, la molécula se denomina un **oligosacárido**. Un ejemplo es la *maltosa* (Figura 9.1b), **disacárido** formado por la unión de dos moléculas de glucosa. Los polímeros largos de monosacáridos, como la *amilosa* del almidón (Figura 9.1c), se denominan **polisacáridos**. Existen muchos tipos de polisacáridos, algunos de los cuales son polímeros complejos formados por muchos tipos de monómeros de azúcar.

Los sacáridos reciben también el nombre más conocido de *hidratos de carbono* porque muchos de ellos pueden representarse con la fórmula estequiométrica simple $(CH_2O)_n$. Esta denominación se dio por primera vez cuando los químicos conocían tan sólo la estequiometría de los sacáridos y pensaban que eran "carbonos hidratados". Sin embargo, esta fórmula es una simplificación excesiva, ya que muchos sacáridos están modificados y algunos contienen grupos amino, sulfato y fosfato. No obstante, todos los compuestos que se describen en este capítulo o bien tienen esta fórmula o bien pueden obtenerse a partir de sustancias que la tienen.

Los hidratos de carbono son compuestos que tienen la fórmula estequiométrica $(CH_2O)_n$ o son derivados de estos compuestos.

Los sacáridos desempeñan una gran variedad de funciones en los organismos vivos. De hecho, el principal ciclo energético de la biosfera depende en gran parte del metabolismo de los hidratos de carbono. Antes de pasar a la estructura de los *hidratos de carbono,* echemos una breve mirada a este ciclo, que se muestra en la Figura 9.2. En la *fotosíntesis*, las plantas captan CO_2 de la atmósfera y lo "fijan" en hidratos de carbono. La reacción básica puede describirse (de una manera enormemente simplificada) como la reducción del CO_2 a hidratos de carbono, en este caso representados por la glucosa, producida por la luz. Gran parte de estos hidratos de carbono se almacena en las plantas en forma de almidón o celulosa. Los animales obtienen los hidratos de carbono ingiriendo las plantas o los animales herbívoros. Así pues, los hidratos de carbono sintetizados por las plantas pasan a ser en última instancia las principales fuentes de carbo-

La formación de los hidratos de carbono en la fotosíntesis y la oxidación en el metabolismo constituyen juntos el principal ciclo energético de la vida.

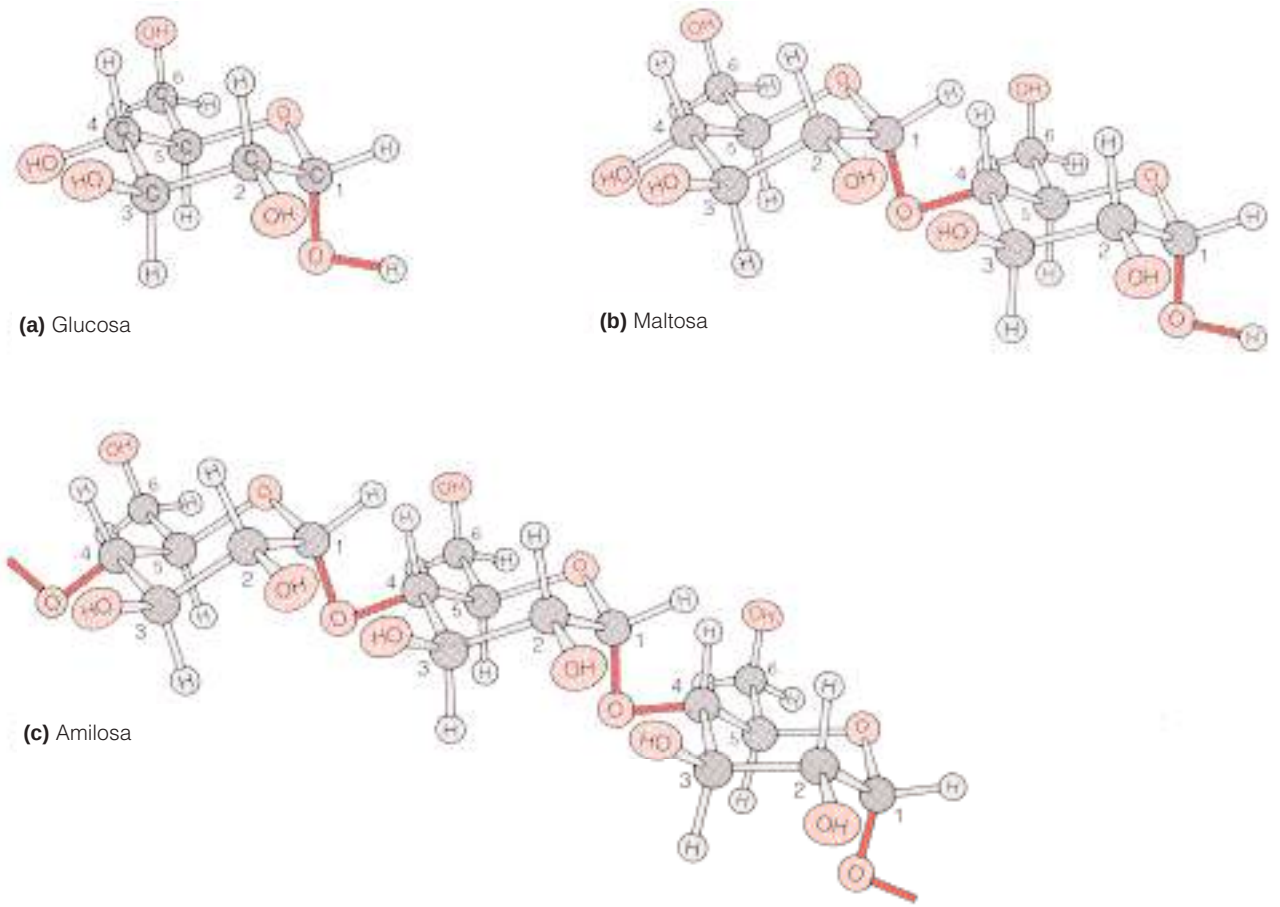


FIGURA **9.1**

Hidratos de carbono representativos. Los tres compuestos que se muestran aquí están formados únicamente por C, H y O, y la glucosa es el monómero que forma el oligómero y el polímero. **(a)** Glucosa, un monosacárido. **(b)** Maltosa, un disacárido que contiene dos unidades de glucosa. **(c)** Parte de una molécula de amilosa, un polímero de glucosa.

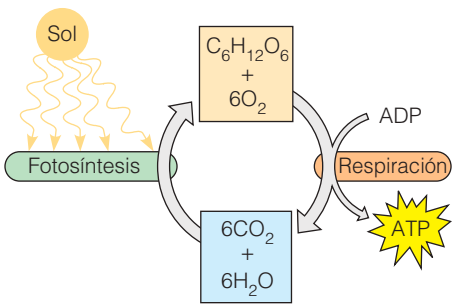


FIGURA **9.2**

Ciclo energético de la vida. En la fotosíntesis, las plantas utilizan la energía de la luz solar para combinar dióxido de carbono y agua en hidratos de carbono, liberando oxígeno en el proceso. En la respiración, tanto las plantas como los animales oxidan los hidratos de carbono elaborados por las plantas, liberando energía y volviendo a formar CO_2 y H_2O.

no de todos los tejidos animales. En la otra mitad del ciclo, tanto las plantas como los animales realizan, a través del metabolismo oxidativo, una reacción que es esencialmente la inversa de la fotosíntesis, mediante la cual producen de nuevo CO_2 y H_2O (Figura 9.2). Esta oxidación de los hidratos de carbono es el principal proceso de generación de energía del metabolismo. El papel central que desempeñan los hidratos de carbono es evidente si tenemos en cuenta que el elemento básico de la alimentación de la mayor parte de los seres humanos es el almidón de los alimentos vegetales como el arroz, el trigo o las patatas. Incluso la carne que consumimos, en última instancia, puede llegar a atribuirse en gran parte a los hidratos de carbono que ingieren los animales que pastan.

Por cruciales que sean el almacenamiento y la generación de energía, no son éstas las únicas funciones de los hidratos de carbono. Muchos materiales estructurales biológicos son polisacáridos en parte o en su totalidad. Como ejemplos importantes de ello cabe citar la celulosa de las plantas leñosas, las paredes celulares de las bacterias, y los exoesqueletos de los insectos y otros artrópodos. Además, los polisacáridos de las superficies celulares o los que están adheridos a las proteínas facilitan el reconocimiento molecular. Entre los ejemplos, están los procesos muy específicos como la unión de los virus o los anticuerpos a determinadas células. Así pues, al igual que las proteínas, los hidratos de carbono son moléculas extremadamente versátiles, esenciales para todo tipo de organismo vivo.

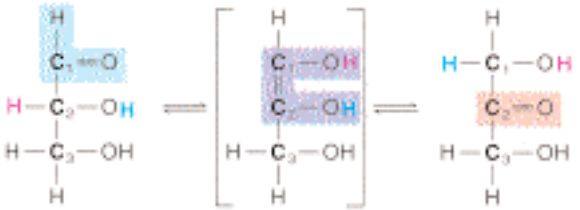
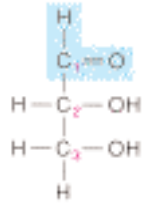


FIGURA **9.4**

Interconversión aldosa-cetosa a través de un intermediario enediol. El intermediario es inestable y no puede aislarse.



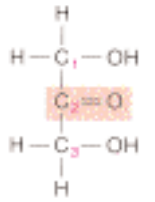


FIGURA **9.3**

Triosas, los monosacáridos más sencillos. Los dos tautómeros de triosa ilustran la diferencia que existe entre los monosacáridos de aldosa y cetosa. La numeración de los carbonos se inicia en todas las aldosas por el aldehído, y en las cetosas por el carbono terminal más próximo al grupo cetona. (Dado que la dihidroxiacetona sólo posee tres carbonos, los dos carbonos terminales son equivalentes y cualquiera de ellos puede designarse con el número uno.)

Monosacáridos

Iniciamos nuestra exposición de los hidratos de carbono con los azúcares monoméricos simples, los monosacáridos. El compuesto más sencillo con la fórmula empírica de la clase $(CH_2O)_n$ se encuentra cuando $n = 1$. Sin embargo, el *formaldehído*, $H_2C{=}O$, tiene poco en común con nuestro concepto habitual de azúcares; de hecho, se trata de un gas nocivo y tóxico. Las moléculas más pequeñas que generalmente se consideran monosacáridos son las **triosas**, con $n = 3$. (El sufijo *osa* se utiliza habitualmente para designar los compuestos como los sacáridos.)

Los dos grupos principales de monosacáridos son las aldosas y las cetosas.

ALDOSAS Y ACETOSAS

Existen dos triosas: el *gliceraldehído* y la *dihidroxiacetona* (Figura 9.3). Estas moléculas, aun siendo muy simples, presentan determinadas características que encontraremos una y otra vez al considerar los azúcares. De hecho, representan las dos clases principales de monosacáridos. El gliceraldehído es un aldehído de una clase de monosacáridos denominados **aldosas**. La dihidroxiacetona es una cetona, y estos monosacáridos reciben el nombre de **cetosas**. Obsérvese que el gliceraldehído y la dihidroxiacetona poseen la misma composición atómica. Son **tautómeros** (isómeros estructurales que difieren en la disposición de sus hidrógenos y dobles enlaces) y pueden interconvertirse a través de un intermediario *enediol* inestable, como se indica en la Figura 9.4. Estas interconversiones tautoméricas se producen en cierta medida entre todos los pares de monosacáridos aldosas y cetosas, pero las reacciones suelen ser muy lentas si no están catalizadas. Así pues, el gliceraldehído y la dihidroxiacetona pueden existir como compuestos bastante estables.

ENANTIÓMEROS

Una característica importante de la estructura de los monosacáridos es la que puede apreciarse mediante la observación algo más detenida de la fórmula del gliceraldehído. El segundo átomo de carbono tiene cuatro sustituyentes diferentes, por lo que es un carbono *quiral*, como el carbono α de la mayoría de los α-aminoácidos. Por lo tanto, el gliceraldehído tiene dos estereoisómeros del tipo denominado **enantiómeros**, que son imágenes especulares, no superponibles, uno del otro. En la Figura 9.5 se muestran dibujos tridimensionales de las dos formas, a las que se denomina gliceraldehído D y L. Esta orientación tridimensional alrededor del carbono asimétrico puede re-

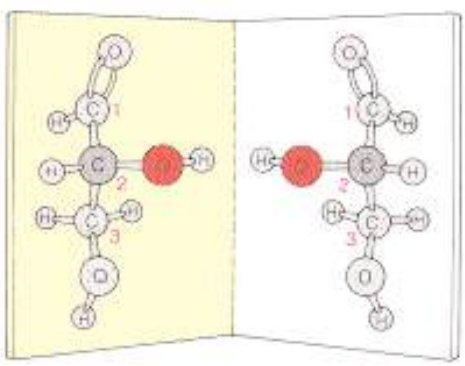


FIGURA **9.5**

Enantiómeros del gliceraldehído. La configuración de los grupos alrededor del carbono quiral 2 (en un color gris más oscuro) diferencia el D-gliceraldehído del L-gliceraldehído. Las dos moléculas son imágenes especulares y no pueden superponerse.

Las formas D y L de un monosacárido son imágenes especulares no superponibles y se denominan enantiómeros.

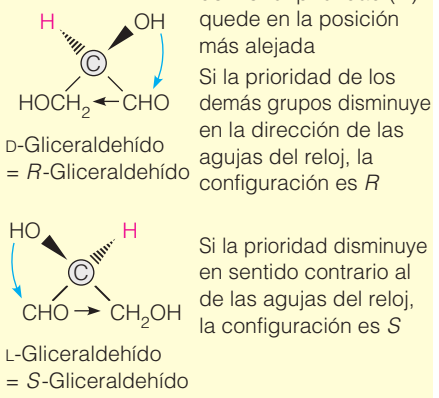
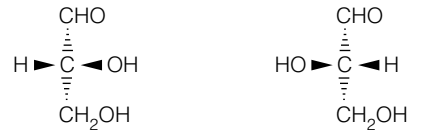


FIGURA **9.6**

Nomenclatura *R-S*. El sistema *R-S* describe la configuración estereoquímica absoluta, como se demuestra en este ejemplo. A cada tipo de grupo unido a un carbono quiral (gris) se le asigna una prioridad, según un conjunto de reglas definidas. Las prioridades para los grupos comunes en la química de los hidratos de carbono son OR > OH > NH_2 > CO_2H > CHO > CH_2OH > CH_3 > H. Observamos la molécula con el grupo de menor prioridad alejado de nosotros (en nuestro ejemplo, H). Si la prioridad de los tres grupos restantes *disminuye en el sentido de las agujas del reloj*, la configuración absoluta se denomina *R* (del latín *rectus*, "derecha"). Si la prioridad *disminuye en sentido contrario al de las agujas del reloj*, la configuración es *S* (del latín *sinister*, "izquierda"). En esta notación, el D-gliceraldehído es el *R*-gliceraldehído, y el L-gliceraldehído es el *S*-gliceraldehído.

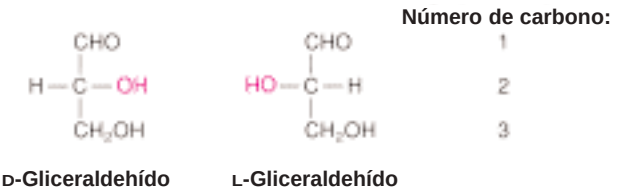
Los sacáridos más importantes que existen en la naturaleza son los enantiómeros D.

presentarse también mediante el convenio de enlaces utilizado en el Capítulo 5:



Obsérvese que no es necesario indicar la orientación espacial de los átomos alrededor de los carbonos 1 ó 3, puesto que estos carbonos no son centros quirales.

La forma más compacta de representar los enantiómeros es utilizar una **proyección de Fischer**, en la que los enlaces que se dibujan horizontalmente van hacia el espectador y los que se dibujan verticalmente van hacia atrás. Así pues, para el D-gliceraldehído y el L-gliceraldehído tenemos



Otras formas de designar los enantiómeros: D-L y *R-S*

Inicialmente, con las letras D y L se pretendía indicar la dirección de la rotación del plano de polarización de la luz polarizada: D para la derecha (dextro) y L para la izquierda (levo). Es cierto que una disolución de D-gliceraldehído rota el plano de polarización hacia la derecha, como hacen otros muchos D-monosacáridos, pero esta correspondencia no siempre es cierta, ya que la magnitud e incluso la dirección de la rotación óptica son una función complicada de la estructura electrónica que rodea al centro quiral. Otra desventaja de la nomenclatura D-L es que no es absoluta, ya que la designación se hace siempre con relación a algún compuesto de referencia. En consecuencia, se ha creado un convenio *absoluto* que nos permite asignar una designación estereoquímica a cualquier compuesto a partir de la observación de su estructura tridimensional. En la Figura 9.6 se muestra un ejemplo de cómo funciona este convenio denominado *R-S*. Aunque el convenio *R-S* es más general, los bioquímicos lo utilizan poco, ya que resulta difícil de aplicar en la situación frecuente en la que una molécula contiene más de un átomo de carbono asimétrico.

Enantiómeros de los monosacáridos en la naturaleza

Al igual que ocurre para los aminoácidos, en los organismos vivos domina una forma enantiomérica de los monosacáridos. En las proteínas se trataba de los aminoácidos L; en los hidratos de carbono se trata de los monosacáridos D. De nuevo, no existe una razón obvia para explicar por qué se estableció esta preferencia en la naturaleza. Sin embargo, una vez fijada en la fase inicial de la evolución, ha persistido, y la mayor parte de la maquinaria celular ha pasado a actuar con los azúcares de tipo D. No obstante, de la misma forma que a veces se encuentran aminoácidos D en los organismos vivos, también hay monosacáridos L. Igual que los aminoácidos D "anormales", los monosacáridos L desempeñan funciones bastante especializadas. En la Tabla 9.1 se indican, junto con los monosacáridos D, los monosacáridos L que se dan con más frecuencia, así como algunos ejemplos de los lugares en los que se encuentran y las funciones que realizan.

TABLA 9.1 Ejemplos de presencia y funciones bioquímicas de los monosacáridos

Monosacáridos	Presencia natural	Función Fisiológica[a]
Triosas		
Gliceraldehído	Generalizada (como fosfato)	E 3-fosfato es un intermediario de la glucólisis
Dihidroxiacetona	Generalizada (como fosfato)	El 1-fosfato es un intermediario de la glucólisis
Tetrosas		
D-Eritrosa	Generalizada	El 4-fosfato es un intermediario del metabolismo de los hidratos de carbono
Pentosas		
D-Arabinosa	Algunas plantas, bacilos de la tuberculosis	Glucósidos vegetales, paredes celulares
L-Arabinosa	Distribución generalizada en las plantas, paredes celulares bacterianas	Componente de la paredes celulares, glucoproteínas vegetales
D-Ribosa	Generalizada, en todos los organismos	Componente del ácido ribonucleico
2-D-Deoxiribosa	Generalizada, en todos los organismos	Componente del ácido desoxirribonucleico
D-Xilosa	Sustancias leñosas	Componente de los polisacáridos de las plantas
Hexosas		
D-Galactosa	Generalizada	Leche (formando parte de la lactosa); polisacáridos estructurales
L-Galactosa	Agar, otros polisacáridos	Estructuras de los polisacáridos
D-Glucosa	Generalizada	Una fuente de energía importante en el metabolismo animal; función estructural en la celulosa
D-Manosa	Polisacáridos de las plantas, glucoproteínas animales	Estructuras de polisacáridos
D-Fructosa	Un importante azúcar de las plantas; forma parte de la sacarosa	Intermediario de la glucólisis (ésteres fosfato)
Heptosas		
D-Sedoheptulosa	Muchas plantas	Intermediario en el ciclo de Calvin de la fotosíntesis y en la ruta de las pentosas fosfato

[a]Algunos de estos monosacáridos tienen otras funciones adicionales que no se indican.

DIASTEREÓMEROS

Cuando se consideran los monosacáridos con más de tres carbonos, aparece una nueva complicación estructural. Un monosacárido de este tipo puede tener más de un carbono quiral, y ello hace que existan dos tipos de estereoisómeros. Estos tipos son los *enantiómeros* (isómeros especulares), que hemos comentado ya, y los *diastereómeros*, que encontramos por primera vez en los monosacáridos de tetrosa.

Diastereómeros de las tetrosas

Las tetrosas, con la fórmula empírica $(CH_2O)_4$, tienen dos carbonos quirales en las formas aldosa. En consecuencia, una aldotetrosa tendrá cuatro estereoisómeros, como se expone en la Figura 9.7. En general, una molécula con n centros quirales tendrá 2^n estereoisómeros, puesto que existen dos posibilidades en cada centro quiral. El convenio siguiente intenta proporcionar un método racional para la denominación y distinción de los estereoisómeros de una molécula de este tipo: se utiliza el prefijo D o L para designar la orientación alrededor del carbono quiral *más alejado* del grupo carbonilo, el carbono número 3 en este caso. Las moléculas con distintas orientaciones alrededor de los carbonos que preceden a este carbono de referencia reciben nombres distintos. Así, la *treosa* y la *eritrosa* son dos aldotetrosas con orientaciones contrarias alrededor del carbono 2. Los estereoisómeros de este tipo, que *no* son imágenes especulares, se denominan **diastereómeros**. La treosa y la eritrosa son diastereómeros, y cada uno tiene dos enantiómeros (D y L) que son imágenes especulares no superponibles. Lamentablemente, no existe una regla lógica general para la formación de los nombres específicos (como treosa y eritrosa). Simplemente, es necesario aprenderlos, como los nombres de los aminoácidos.

Cuando los monosacáridos contienen más de un carbono quiral, el prefijo D o L indica la configuración alrededor del carbono más alejado del grupo carbonilo. Los isómeros que difieren en su orientación alrededor de otros carbonos se denominan diastereómeros y reciben nombres diferentes.

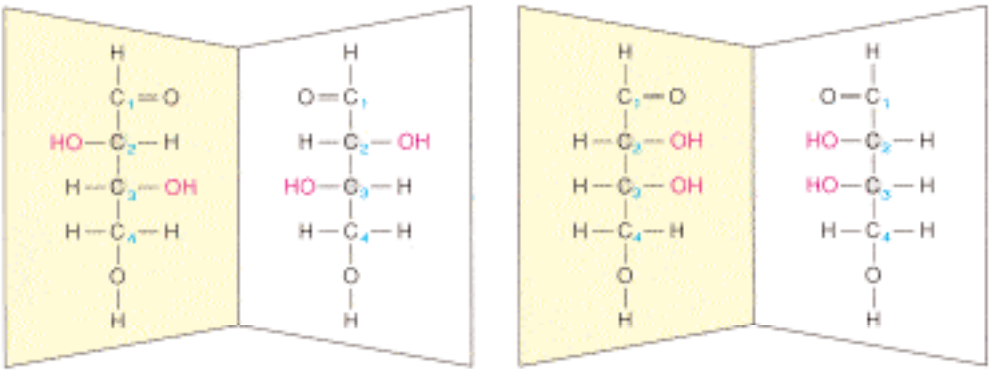


FIGURA **9.7**

Estereoquímica de las aldotetrosas. Estas moléculas poseen dos carbonos quirales (2 y 3) y, por tanto, tienen dos formas diastereoméricas, la treosa y la eritrosa, cada una con un par de enantiómeros. Obsérvese que los enantiómeros de treosa tienen una configuración *contraria* alrededor de los carbonos 2 y 3, mientras que los enantiómeros de eritrosa tienen la *misma* configuración alrededor de estos dos carbonos.

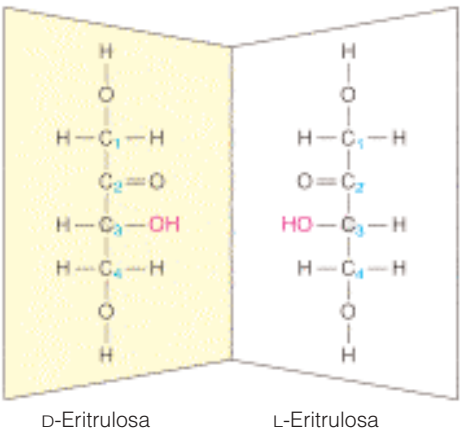


FIGURA **9.8**

Los dos enantiómeros de la eritrulosa. A diferencia de las aldosas de cuatro carbonos (véase la Figura 9.7), la cetosa de cuatro carbonos sólo tiene un carbono quiral (C_3) y un único par de enantiómeros.

La *cetosa* de cuatro carbonos, a la que se denomina *eritrulosa*, sólo tiene un par de enantiómeros, puesto que este monosacárido solamente posee un carbono quiral (Figura 9.8). En este punto se plantea otro convenio de denominación: generalmente el nombre de la cetosa deriva del de la correspondiente aldosa, mediante la inserción de las letras *ul*. Así, de *eritrosa* se obtiene *eritrulosa*. Al igual que ocurre con el gliceraldehído (y otros monosacáridos), las formas cetosa y aldosa son interconvertibles mediante tautomerización en álcali diluido. La conversión aldosa-cetosa proporciona también una ruta para la interconversión de los diastereómeros de aldosa, utilizando la cetosa como intermediario.

Diastereómeros de las pentosas

Con la adición de un carbono más, obtenemos las **pentosas**. Las **aldopentosas** tienen tres centros quirales y, por lo tanto, cabe prever 2^3, es decir, ocho estereoisómeros en cuatro pares de enantiómeros. Las formas D de las pentosas se exponen en la Figura 9.9a, en la que se resumen las aldosas que contienen de tres a seis átomos de carbono. Obsérvese que todas las aldopentosas que se exponen tienen la orientación D alrededor del carbono 4, y que se incluyen todas las combinaciones posibles de orientaciones alrededor de los carbonos 2 y 3. (A partir de aquí, en nuestra exposición de la estructura de los hidratos de carbono mostraremos solamente las formas D; podrá dibujar con facilidad las formas L ateniéndose a las reglas que se han dado anteriormente.) Las **cetopentosas**, como se pone de manifiesto en la Figura 9.9b, tienen dos carbonos quirales, por lo que deben existir cuatro isómeros (dos pares de enantiómeros). Los diastereómeros D se denominan D-*ribulosa* y D-*xilulosa*.

Diastereómeros de las hexosas

Los monosacáridos que contienen seis átomos de carbono se denominan **hexosas**. Como habrá podido imaginar, existe un gran número de hexosas posibles. Para recordar sus estructuras, resulta útil relacionarlas con las estructuras más sencillas de las pentosas, las tetrosas y las triosas. En la Figura 9.9 se presenta un resumen conciso de estas relaciones. Las hexosas que encontraremos con más frecuencia son la *glucosa* y la *fructosa*. Sin embargo, la *manosa* y la *galactosa* se encuentran también de manera muy generalizada en la naturaleza (véase la Tabla 9.1). De hecho, casi todas las hexosas desempeñan alguna función biológica importante.

ESTRUCTURAS DE ANILLO

Con las pentosas y las hexosas, hay otra característica de la química de los monosacáridos que adquiere una gran importancia. La presencia de cinco o seis

carbonos en la cadena proporciona a estos compuestos la posibilidad de formar estructuras de anillo muy estables mediante la formación de un *hemiacetal* interno. Los ángulos de enlace característicos de los enlaces del carbono y del oxígeno son tales que hacen que los anillos que contienen menos de cinco átomos tengan un considerable grado de tensión, mientras que los anillos de cinco o seis eslabones se forman con facilidad. En principio, las aldotetrosas pueden formar también estructuras de anillo de cinco eslabones, aunque rara vez lo hacen.

Anillos de pentosa

Considérese esta formación de anillo hemiacetálica en una aldopentosa, como la D-ribosa (véase la Figura 9.9a). Son posibles dos formas de cerrar el anillo, como se indica en la Figura 9.10. La reacción del oxígeno del C-1 de la D-ribosa con el hidroxilo del C-4 produce una estructura de anillo de cinco eslabones denominada **furanosa**; el nombre refleja su semejanza estructural con el compuesto heterocíclico furano. Otra posibilidad es la formación de un anillo de seis eslabones si la reacción se produce con el hidroxilo del C-5. Este anillo de seis eslabones se denomina **piranosa**, para indicar su relación con el compuesto heterocíclico pirano.

Las dos reacciones de la Figura 9.10 tienen equilibrios que favorecen en gran medida las estructuras cíclicas de las pentosas o de los azúcares mayores. En condiciones fisiológicas en disolución, los monosacáridos con cinco o más carbonos se encuentran habitualmente en más del 99% en las formas de anillo. La distribución entre las formas piranosa y furanosa depende de la estructura concreta del azúcar, del pH, de la composición del disolvente y de la temperatura. En la Tabla 9.2 se presentan algunos datos representativos obtenidos mediante estudios de resonancia magnética nuclear. Cuando los monómeros pasan a formar parte de los polisacáridos, la estructura del polímero puede también influir en la forma de anillo elegida. Así, por ejemplo, como se indica en la Tabla 9.2, la D-ribosa en disolución está formada por una mezcla de las dos formas de anillo. Pero en los polisacáridos biológicos, se estabilizan formas específicas. Así, por ejemplo, el ácido ribonucleico contiene exclusivamente ribofuranosa, mientras que los polisacáridos de las paredes celulares de algunas plantas tienen pentosas únicamente en la forma piranosa.

Los monosacáridos de cinco o más carbonos se encuentran preferentemente en forma de estructuras de anillo de cinco o seis eslabones, que proceden de la formación de un hemiacetal interno.

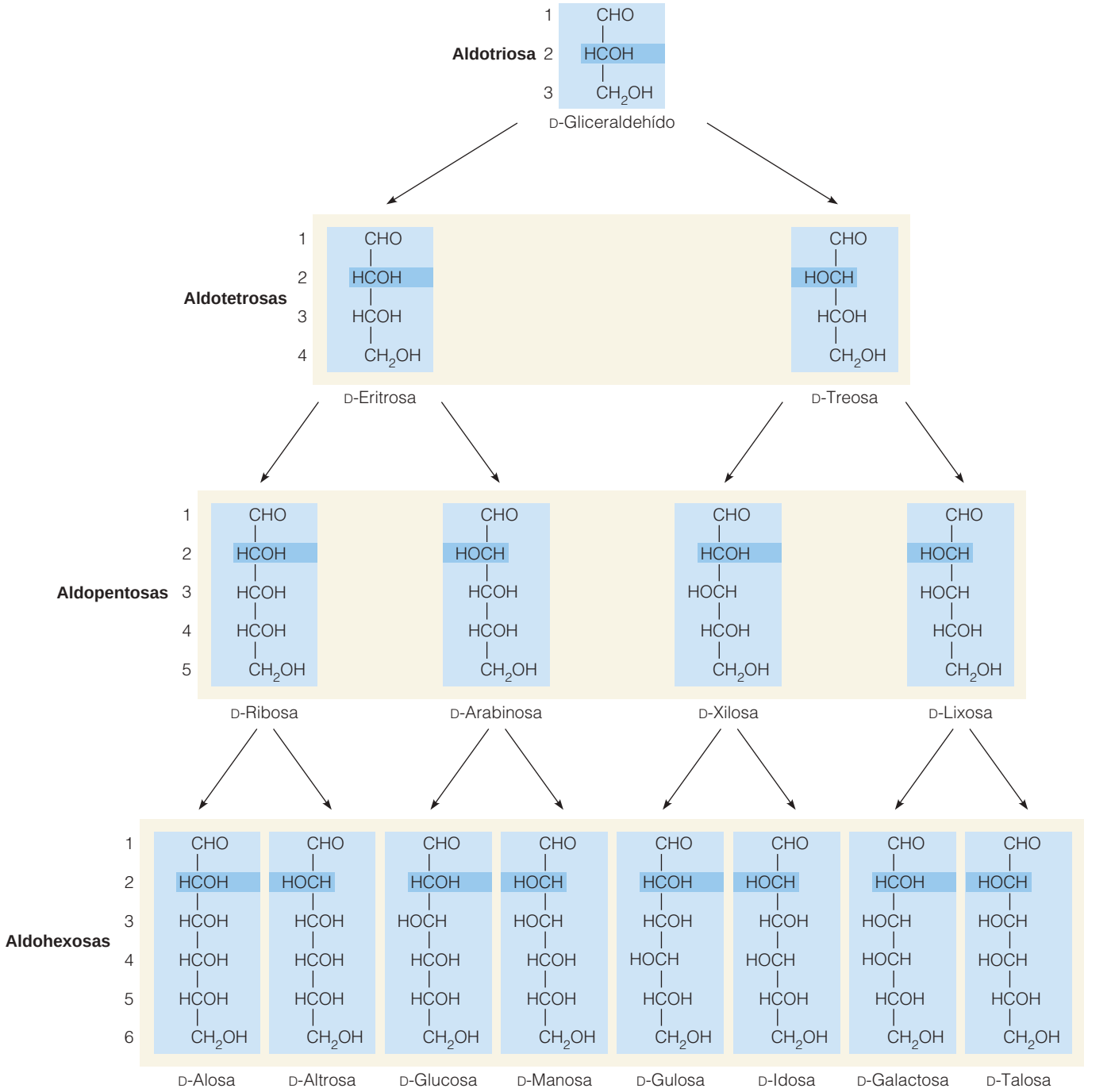
Resulta instructivo examinar con algo más de detalle las estructuras de anillo de la Figura 9.10. La ciclación ha creado un nuevo centro asimétrico en el

TABLA 9.2 Cantidades relativas de las formas tautómeras de algunos monosacáridos en equilibrio en agua a 40°C

	Cantidad relativa (%)				
Monosacárido	α-Piranosa	β-Piranosa	α-Furanosa	β-Furanosa	Furanosa total
Ribosa	20	56	6	18	24
Lixosa	71	29	—[a]	—[a]	<1
Altrosa	27	40	20	13	33
Glucosa	36	64	—[a]	—[a]	<1
Manosa	67	33	—[a]	—[a]	<1
Fructosa	3	57	9	31	40

Nota: En todos los casos, la forma de cadena abierta es muy inferior al 1%. Para los datos sobre otros azúcares, véase S. J. Angyal, The composition and conformation of sugars in solution, *Angew. Chem.* (1969) 8:157-226.

[a]Muy inferior al 1%.

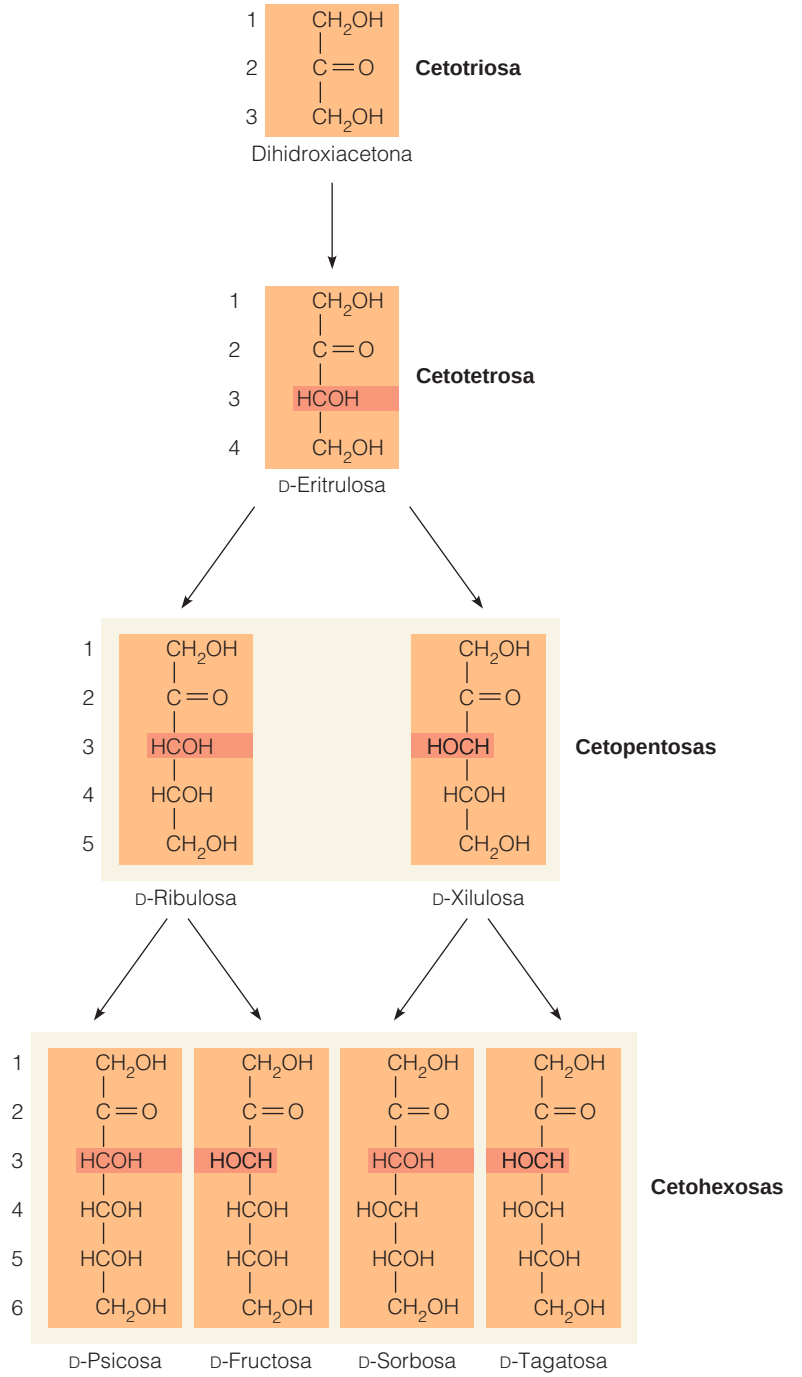


(a) D-Aldosas

FIGURA ***9.9***

Relaciones estereoquímicas de las D-aldosas y las D-cetosas. En esta figura se ponen de manifiesto las relaciones entre los pares de diastereómeros de la serie D-aldosa **(a)** y la serie D-cetosa **(b)**. Cada serie se genera por adiciones sucesivas de un grupo CHOH (sombreado) inmediatamente por debajo del carbono carbonilo. En cada caso, las dos posibles orientaciones del grupo añadido generan un par de diastereómeros. No se presentan las formas L, que son simplemente las imágenes especulares de las formas D.

carbono 1. Éste es el motivo de que hayamos dibujado dos estereoisómeros de la D-ribofuranosa, a los que se denomina α-D-ribofuranosa y β-D-ribofuranosa, así como un par correspondiente de ribopiranosas. Al igual que ocurre con

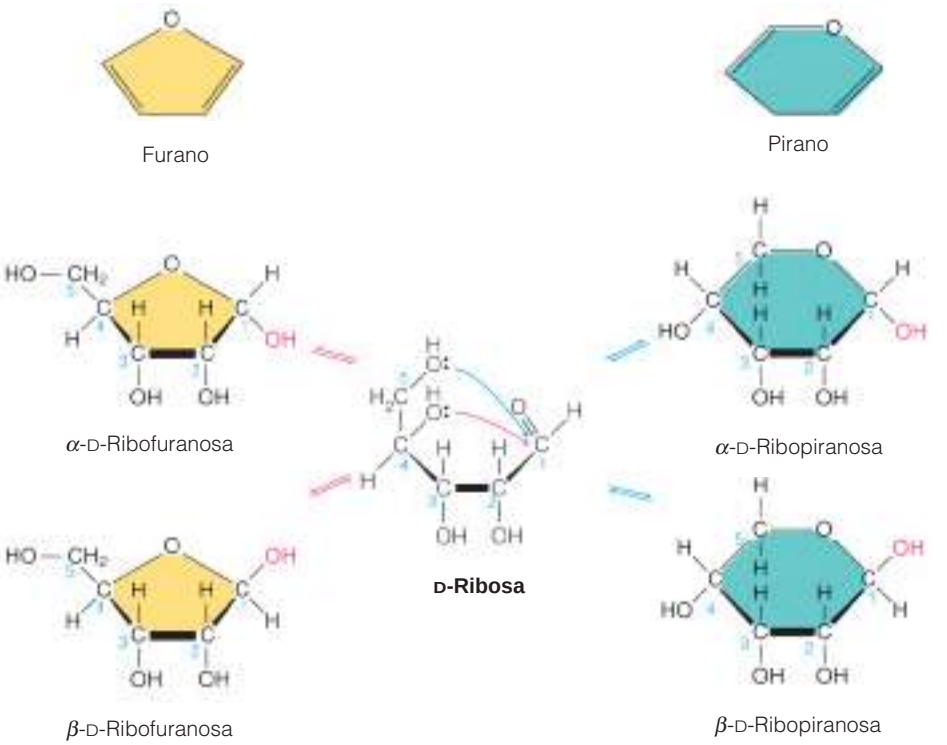


(b) D-Cetosas

otros tipos de estereoisómeros, estas formas α y β rotan el plano de la luz polarizada de forma diferente, y pueden diferenciarse de esta forma. Estos isómeros, que difieren en la configuración tan sólo del carbono 1, se denominan **anómeros**, y al carbono 1 se le denomina *átomo de carbono anomérico*. Los monosacáridos pueden experimentar una interconversión entre las formas α y β, utilizando como intermediario la estructura de cadena abierta. Este proceso se denomina **mutarrotación**. Un anómero purificado, disuelto en disolución

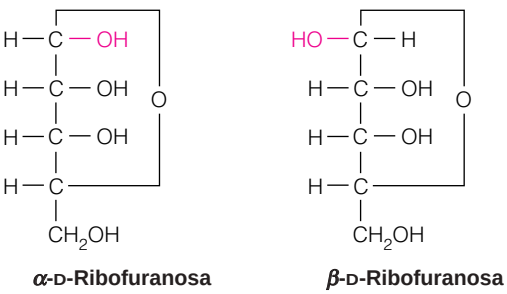
FIGURA **9.10**

Formación de las estructuras de anillo por las pentosas. El ejemplo que se expone aquí es el de la D-ribosa, que puede formar un anillo de furanosa de cinco eslabones o un anillo de piranosa de seis eslabones. Las reacciones comportan la formación de hemiacetales a partir del grupo aldehído. En cada caso, son posibles dos formas anoméricas, α y β. (Los anómeros difieren en su conformación tan sólo en el carbono 1.) Los anillos de azúcar se dibujan como *proyecciones de Haworth*, con los enlaces más cercanos al espectador dibujados más oscuros para dar sensación de perspectiva.



acuosa, se aproximará a la mezcla de equilibrio, con un cambio asociado de la rotación óptica de la disolución. Las enzimas denominadas **mutarrotasas** catalizan este proceso in vivo.

La representación de una estructura de azúcar cíclica que hemos utilizado en la Figura 9.10 se denomina **proyección de Haworth**. Puede imaginar que está observando el anillo en perspectiva, y que los grupos unidos a los carbonos del anillo (H, OH, CH_2OH) se representan situados por encima o por debajo del anillo. En todos los monosacáridos D el $—CH_2OH$ está por encima del anillo. La relación entre las orientaciones de los hidroxilos en una proyección de Fischer y la proyección de Haworth es directa. Los que están representados a la derecha de la cadena en una proyección de Fischer se muestran por debajo del anillo en una de Haworth. Así, por ejemplo, las proyecciones de Fischer de la α-D-ribofuranosa y la β-D-ribofuranosa serían las siguientes:

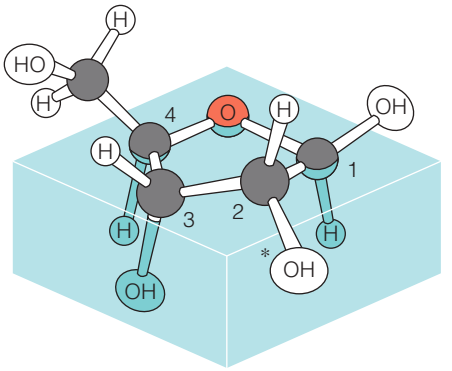


Ni siquiera las proyecciones de Haworth describen de manera exacta la estructura tridimensional de las moléculas como la ribofuranosa o la ribopiranosa. Los anillos saturados de cinco o seis eslabones no pueden ser planos, puesto que los ángulos de enlace C—C—C son de alrededor de 109°, y el ángulo C—O—C es de unos 118°. Además, el anillo puede plegarse fuera del plano

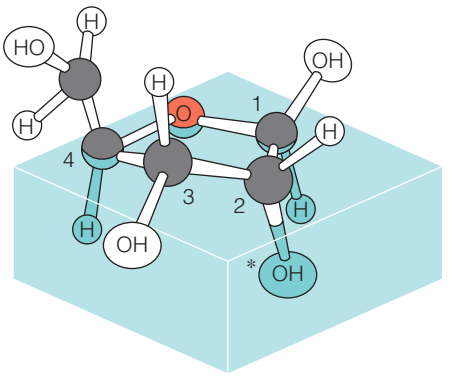
de muchas formas diferentes. Las distintas conformaciones del anillo producidas por ángulos de enlace ligeramente diferentes se denominan **isómeros conformacionales**. En la Figura 9.11 se muestran los modelos de bolas y bastones de dos de los diversos isómeros conformacionales posibles de la β-D-ribofuranosa.

Hemos encontrado ya en el Capítulo 4 a la β-D-ribofuranosa (y su pariente cercano, la β-D-2-desoxirribofuranosa). Estos azúcares desempeñan un papel importante en bioquímica, puesto que forman parte de las estructuras del armazón del ácido ribonucleico y del ácido desoxirribonucleico, respectivamente. En la estructura de los ácidos nucleicos participan solamente los anómeros β, y están favorecidas las conformaciones 2-endo y 3-endo que se exponen en la Figura 9.11. Sin embargo, existe una cierta variación en la conformación del anillo, incluso de manera local, a lo largo de las cadenas de DNA y RNA que producen cambios de la estructura secundaria. Esta flexibilidad señala una diferencia fundamental entre *conformación* y *configuración*. Los isómeros conformacionales pueden interconvertirse mediante una simple deformación de la molécula. Sin embargo, los isómeros de *configuración*, como los diversos tipos de estereoisómeros que se han descrito antes, pueden interconvertirse tan sólo mediante la ruptura y la nueva formación de enlaces covalentes.

Al igual que las aldopentosas, en condiciones fisiológicas las cetopentosas se encuentran casi por completo en la forma de anillo. Sin embargo, para las cetopentosas tan sólo es posible la forma furanosa. Un ejemplo es la α-D-*ribulosa*, que es un intermediario en los procesos de fijación del carbono de la fotosíntesis.



(a) β-D-Ribofuranosa, C-2 endo



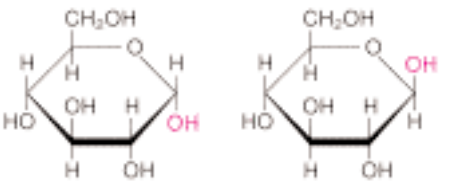
(b) β-D-Ribofuranosa, C-3 endo

FIGURA **9.11**

Isómeros conformacionales. Estos modelos muestran dos de las posibles conformaciones de anillo de la β-D-ribofuranosa. En ambos, C-1, O y C-4 definen un plano. En la conformación endo C-2 **(a)**, el C-2 está por encima del plano. En la conformación endo C-3 **(b)**, C-3 está por encima del plano. Estos isómeros son las dos conformaciones más frecuentes de la ribosa y la desoxirribosa en los ácidos nucleicos. (En el DNA, el hidroxilo del carbono 2, que se indica aquí mediante *, está sustituido por hidrógeno.) Una conformación exo C-3 tendría el mismo aspecto que la de la figura de (b), pero el C-3 estaría suelto por debajo del plano.

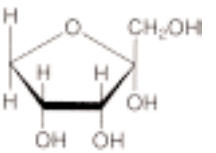
Anillos de hexosa

Las hexosas se encuentran también fundamentalmente en las formas de anillo en condiciones fisiológicas. Al igual que ocurre con las aldopentosas, se observan dos tipos de anillos: furanosas de cinco eslabones y piranosas de seis eslabones. En ambos casos, son posibles los anómeros α y β. Un ejemplo, que se representa mediante las proyecciones de Haworth, es el siguiente:



α-D-Glucopiranosa **β-D-Glucopiranosa**

En la Figura 9.12 se muestran las proyecciones de Haworth de las estructuras de las cuatro hexosas más comunes, en sus configuraciones habituales. En la Tabla 9.2 se indican las fracciones de las formas furanosa y piranosa que se encuentran en el equilibrio para diversas hexosas. Es evidente que las formas que se ven favorecidas dependen en gran medida de la estructura del azúcar concreto y del medio en el que se encuentre, aunque podemos hacer la generalización de que las hexosas prefieren la estructura de anillo de piranosa cuando se encuentran en disolución acuosa. Esta preferencia se da también para la fructosa, aunque en la Figura 9.12 hemos representado la D-fructosa en su configuración de furanosa, puesto que es así como se encuentra en su origen biológico más frecuente, el disacárido sacarosa. La determinación de la distribución de las formas anoméricas y tautoméricas de los azúcares que se encuentran en las disoluciones se ha visto facilitada en gran medida por la técnica de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (véase Herramientas de la Bioquímica 6A). Tan



α-D-Ribulosa

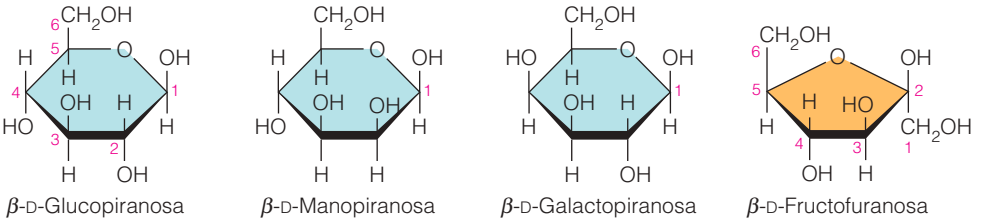


FIGURA **9.12**

Las cuatro hexosas más comunes. Estas proyecciones de Haworth corresponden a los enantiómeros D; tan sólo se muestran los anómeros β.

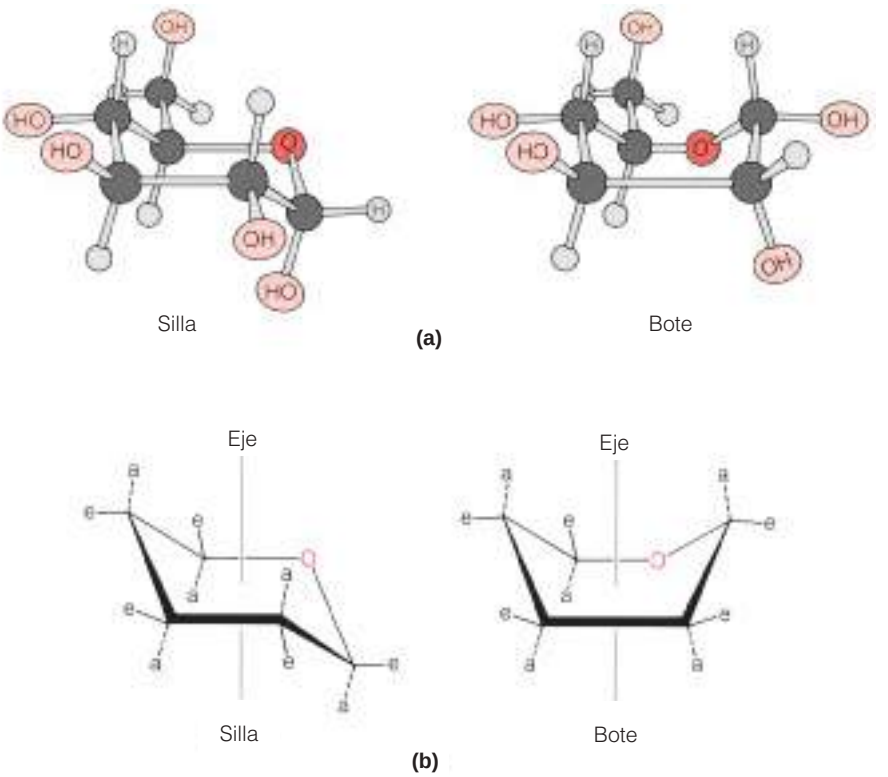
Las hexosas pueden encontrarse en conformaciones de bote y de silla. Generalmente la silla es más estable.

sólo esta técnica posee la elevada sensibilidad necesaria para determinar la estructura de las moléculas en disolución.

Hemos indicado ya que las proyecciones de Haworth de las furanosas no describen correctamente la estructura tridimensional real. Lo mismo ocurre para las piranosas. Existen dos clases principales de conformaciones de piranosa para los azúcares de 6 carbonos: la forma de "silla", más estable, y la forma de "bote", menos favorecida. En la Figura 9.13a se representan estas dos conformaciones mediante modelos de bolas y bastones. Utilizaremos con frecuencia la representación de diagramas esqueléticos del tipo de los que se muestran en la Figura 9.13b. Tanto en la forma de bote como en la forma de silla de los anillos de piranosa, puede definirse un eje molecular perpendicular al plano central de la molécula. Los enlaces de los sustituyentes en los carbonos del anillo pueden clasificarse pues como *axiales* (*a*) o *ecuatoriales* (*e*), según sean aproximadamente paralelos o perpendiculares al eje (Figura 9.13b). En la mayor parte de los

FIGURA **9.13**

El anillo de piranosa en las conformaciones de silla y de bote. Representaciones tridimensionales de la α-D-glucopiranosa en la forma de silla (izquierda) y de bote (derecha). **(a)** Modelos de bolas y bastones. **(b)** Diagramas de los enlaces. Se indican los enlaces axiales (a) y los ecuatoriales (e).

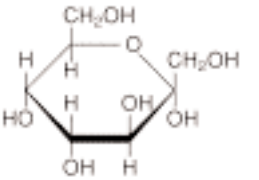


azúcares, la forma de silla es más estable, ya que los sustituyentes en los enlaces axiales tienden a estar más apiñados en la forma de bote.

Azúcares con más de seis carbonos

Existen en la naturaleza monosacáridos con siete o aún más carbonos, pero la mayor parte de ellos son de escasa importancia. No obstante, una heptosa, la *sedoheptulosa*, desempeña un cometido importante en la fijación del CO_2 en la fotosíntesis (véanse la Tabla 9.1 y el Capítulo 17).

En este punto, es posible que tenga una cierta confusión debido a todos los términos utilizados para describir las estructuras de las moléculas de azúcar: enantiómeros, diastereómeros, anómeros y conformaciones de anillo. A modo de revisión, se resume esta terminología en la Figura 9.14.



α-D-Sedoheptulopiranosa

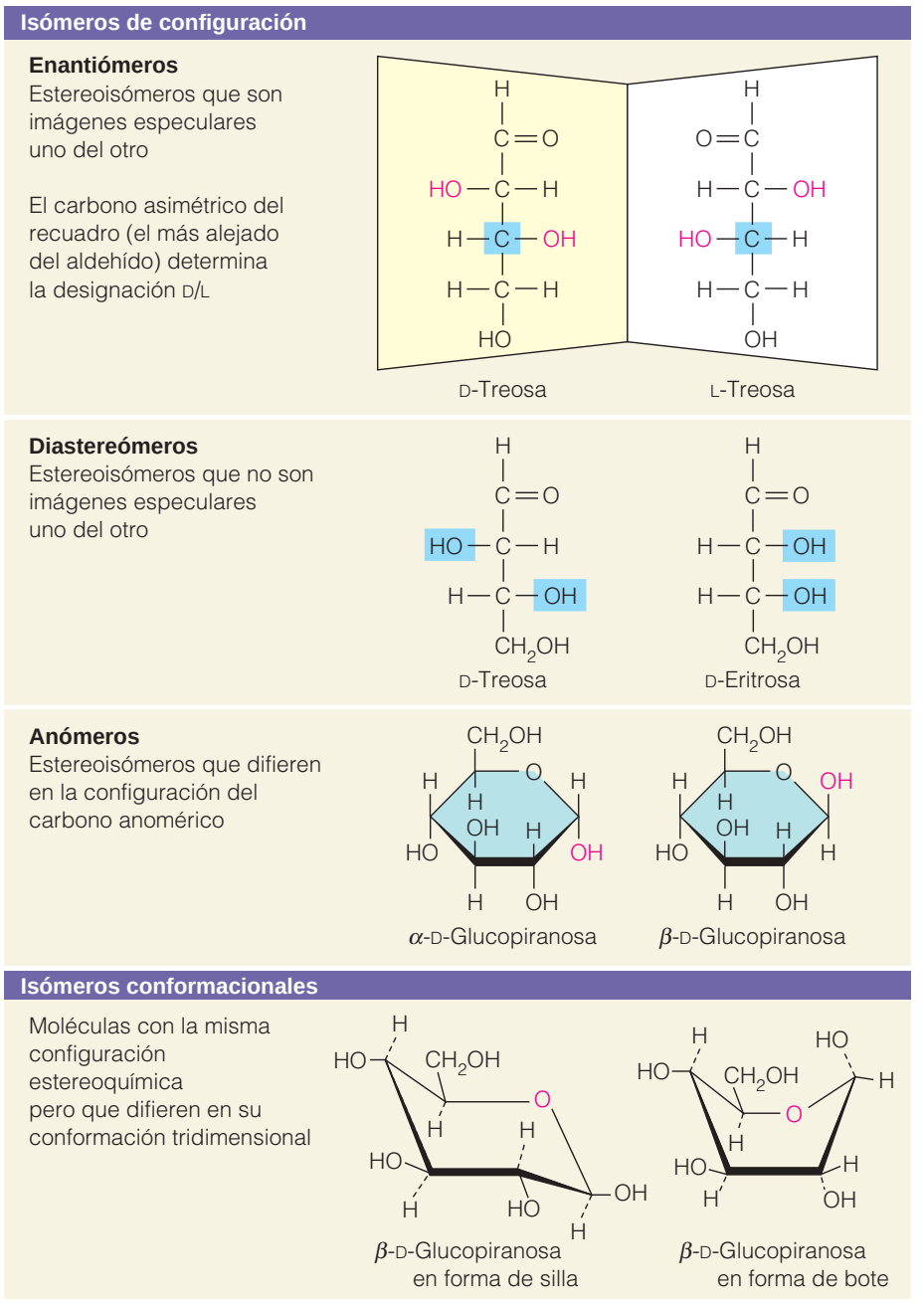


FIGURA **9.14**

Terminología que describe la estructura de las moléculas de azúcar. Los isómeros de conformación se diferencian de los isómeros de configuración en que los primeros pueden interconvertirse sin que se rompan y se vuelvan a formar los enlaces.

Derivados de los monosacáridos

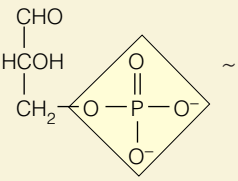
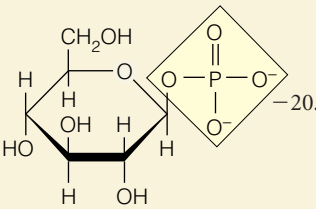
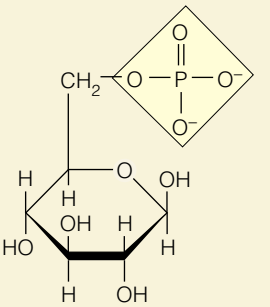
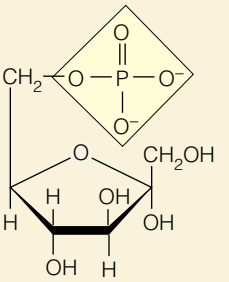
Los monosacáridos llevan cada uno varios grupos hidroxilo a los que pueden unirse sustituyentes o que pueden sustituirse por otros grupos funcionales. De hecho, hay un número enorme de azúcares modificados de esta manera. Describiremos aquí tan sólo un reducido número de ellos, principalmente los que desempeñan funciones biológicas importantes.

ÉSTERES FOSFATO

Los azúcares fosfato son intermediarios importantes del metabolismo, y actúan como compuestos activados en las síntesis.

Hemos visto ya la fosforilación de los azúcares en compuestos como el AMP, el ATP y los ácidos nucleicos. Como veremos en capítulos posteriores, los ésteres fosfato de los monosacáridos participan de manera importante en muchas rutas metabólicas. En la Tabla 9.3 se indican algunos de los ésteres fosfato más importantes y se in-

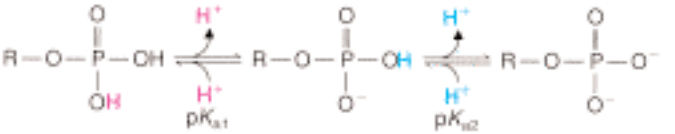
TABLA 9.3 Algunos ésteres fosfato de monosacáridos importantes desde el punto de vista bioquímico

Nombre	Estructura	$\Delta G^{o\prime}$[a] (kJ/mol)	pK_{a1}	pK_{a2}
D-Gliceraldehído-3-fosfato		~−12	2.10	6.75
β-D-Glucosa-1-fosfato		−20.9	1.10	6.13
β-D-Glucosa-6-fosfato		−13.8	0.94	6.11
α-D-Fructosa-6-fosfato		−13.8	0.97	6.11

[a]Energía libre de hidrólisis a pH 7.0 y 37°C.

cluyen los valores correspondientes a las energías libres de hidrólisis del estado estándar. En todos los casos, estos valores son menos negativos que la energía libre de hidrólisis del ATP (−31 kJ/mol); así pues, el ATP puede actuar como donador de fosfato a los monosacáridos. En cambio, dado que la hidrólisis de los ésteres fosfato de los azúcares es termodinámicamente favorable, estos derivados pueden comportarse como compuestos "activados" en muchas reacciones metabólicas.

Los ésteres azúcar fosfato son bastante ácidos, con valores de pK_a para las dos fases de la ionización del fosfato de alrededor de 1-2 y 6-7, respectivamente (véase la Tabla 9.3).

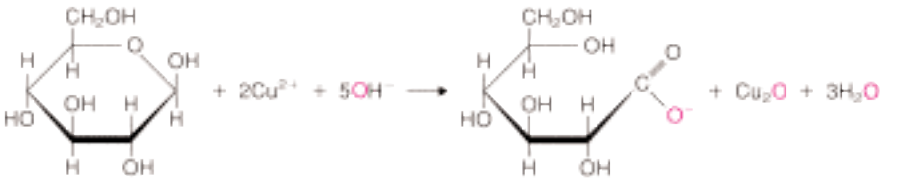


Por consiguiente, en condiciones fisiológicas, estos compuestos se encuentran como una mezcla de monoaniones y dianiones.

Además de los azúcares fosfato, un gran número de otros derivados de monosacáridos desempeñan funciones variadas e importantes en bioquímica. Aquí consideramos unos pocos, así como las reacciones mediante las cuales se forman a partir de los monosacáridos.

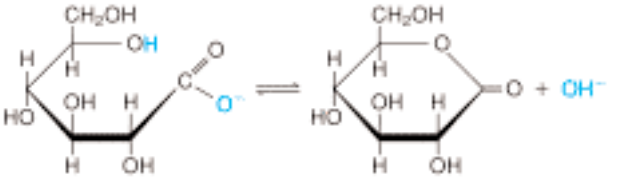
ÁCIDOS Y LACTONAS

La oxidación de los monosacáridos puede producirse de diversas formas, según el agente oxidante utilizado. Así, por ejemplo, la oxidación suave de una aldosa con Cu(II) alcalino (solución de Fehling) produce los **ácidos aldónicos**, como en el siguiente ejemplo:



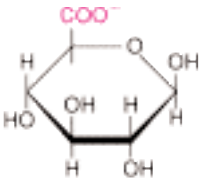
β-D-Glucopiranosa **Ácido D-glucónico**

La producción de un precipitado rojo de Cu_2O es una prueba clásica de detección de azúcar y se utilizó antiguamente para analizar el exceso de azúcar en la orina de las personas que se pensaba tenían diabetes. Otra reacción similar comporta el uso del ion Ag^+ como oxidante, y su reducción a plata metálica deja un "espejo" característico en el recipiente de vidrio. Estos métodos antiguos se han sustituido en la actualidad por análisis enzimáticos más específicos. Los ácidos aldónicos libres, como el ácido glucónico, están en equilibrio con las **lactonas** en disolución.



Ácido D-glucónico **D-δ-Gluconolactona**

La oxidación de los monosacáridos catalizada por enzimas da lugar a diversos productos específicos, entre ellos las lactonas y los **ácidos urónicos** como el

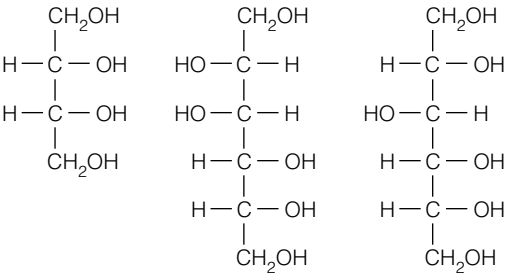


Ácido β-D-glucurónico

ácido glucurónico, en el que la oxidación se ha producido en el carbono 6. Como veremos más adelante en este capítulo, los ácidos urónicos son componentes importantes de determinados polisacáridos naturales.

ALDITOLES

La reducción del grupo carbonilo de un azúcar da lugar a la clase de compuestos polihidroxilo denominados **alditoles**. De entre los que se encuentran en la naturaleza, son importantes el *eritritol*, el D-*manitol* y el D-*glucitol*, al que se suele denominar *sorbitol*.

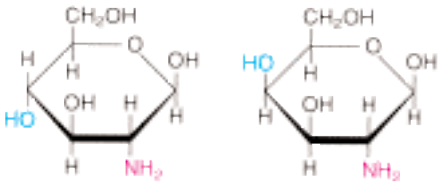


Eritritol* **D-Manitol** **D-Glucitol (sorbitol)**

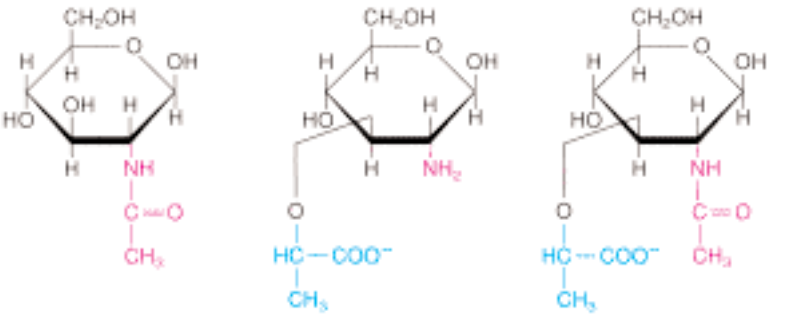
Cada uno recibe su nombre del monosacárido correspondiente. Cuando el sorbitol se acumula en el cristalino del ojo en las personas con diabetes, puede dar lugar a la formación de cataratas.

AMINOAZÚCARES

Hay dos derivados aminados de los azúcares simples que se encuentran en muchos polisacáridos naturales: la *glucosamina* y la *galactosamina*, que proceden, respectivamente, de la glucosa y la galactosa. Son frecuentes también las modificaciones de estos aminoazúcares. Así, por ejemplo, los siguientes compuestos proceden de la β-D-glucosamina:



β-D-Glucosamina **β-D-Galactosamina**

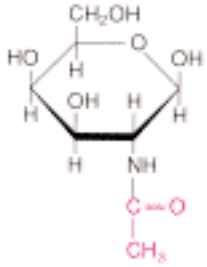


β-D-*N*-Acetilglucosamina **Ácido murámico** **Ácido *N*-acetilmurámico**

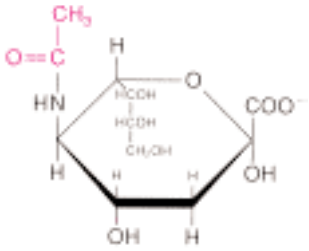
Los aminoazúcares se encuentran en muchos polisacáridos.

Estos derivados de los azúcares son componentes importantes de muchos polisacáridos naturales. Otros dos que encontraremos más adelante son los siguientes:

* El eritritol, aunque contiene carbonos quirales, no es ópticamente activo, ya que tiene un plano de simetría entre C-2 y C-3.



β-D-*N*-Acetilgalactosamina



Ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico)

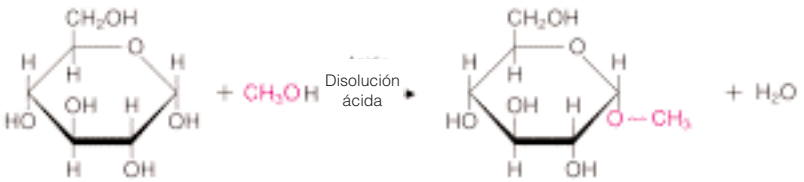
Los azúcares modificados, especialmente los aminoazúcares, se encuentran la mayor parte de las veces como residuos monoméricos en oligosacáridos y polisacáridos complejos. Para facilitar la escritura de las estructuras de estas moléculas, resulta útil disponer de una forma de anotación breve, como la que se utiliza para describir la estructura de los ácidos nucleicos y las proteínas. En consecuencia, se han definido una serie de abreviaturas para los azúcares simples y sus derivados. Algunas de las más importantes son las que se indican en la Tabla 9.4.

TABLA 9.4 Abreviaturas utilizadas para algunos residuos de monosacáridos frecuentes

Monosacáridos	
Arabinosa	Ara
Fructosa	Fru
Fucosa	Fuc
Galactosa	Gal
Glucosa	Glc
Lixosa	Lyx
Manosa	Man
Ribosa	Rib
Xilosa	Xyl
Derivados de Monosacáridos	
Ácido glucónico	GlcA
Ácido glucurónico	GlcUA
Galactosamina	GalN
Glucosamina	GlcN
N-Acetilgalactosamina	GalNAc
N-Acetilglucosamina	GlcNAc (or NAG)
Ácido murámico	Mur
Ácido *N*-acetilmurámico	MurNAc (or NAM)
Ácido *N*-acetilneuramínico (o ácido siálico)	NeuNAc (o Sia)

GLUCÓSIDOS

La eliminación de una molécula de agua entre el hidroxilo anomérico de un monosacárido cíclico y el grupo hidroxilo de otro compuesto da lugar a un **O-glucósido** (la O indica la unión a un hidroxilo). El enlace éter que se forma se denomina **enlace glucosídico**. Un ejemplo sencillo es la formación del metil-α-D-glucopiranósido:

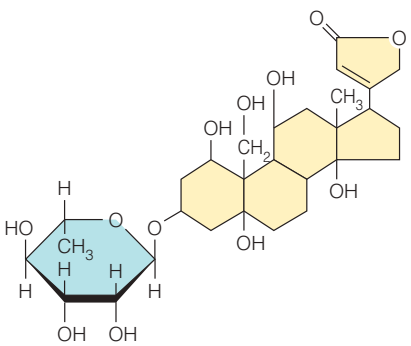


α-D-Glucopiranosa **Metil α-D-glucopiranósido**

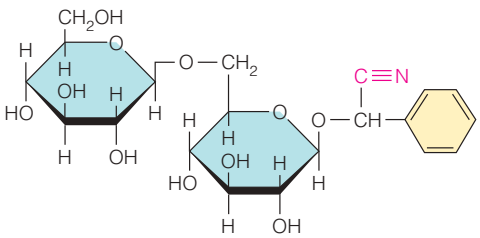
A diferencia de los anómeros de los propios azúcares, los glucósidos anoméricos (es decir, el metil-α-D-glucopiranósido y el metil-β-D-glucopiranósido) no se interconvierten mediante mutarrotación en ausencia de un catalizador ácido, propiedad que los hace útiles en la determinación de las configuraciones de los azúcares.

Hay muchos glucósidos que se encuentran en los tejidos animales y vegetales. Algunos son sustancias muy tóxicas, en la mayor parte de los casos debido a que actúan como inhibidores de las enzimas que participan en la utilización del ATP. En la Figura 9.15 se indican dos glucósidos tóxicos, la ouabaína

Los O-glucósidos se forman por la eliminación de una molécula de agua entre un grupo hidroxilo de un sacárido y un hidroxilo de otro compuesto.



Ouabaína



Amigdalina

FIGURA **9.15**

Dos glucósidos presentes en la naturaleza. La ouabaína y la amigdalina son glucósidos muy tóxicos, producidos por las plantas.

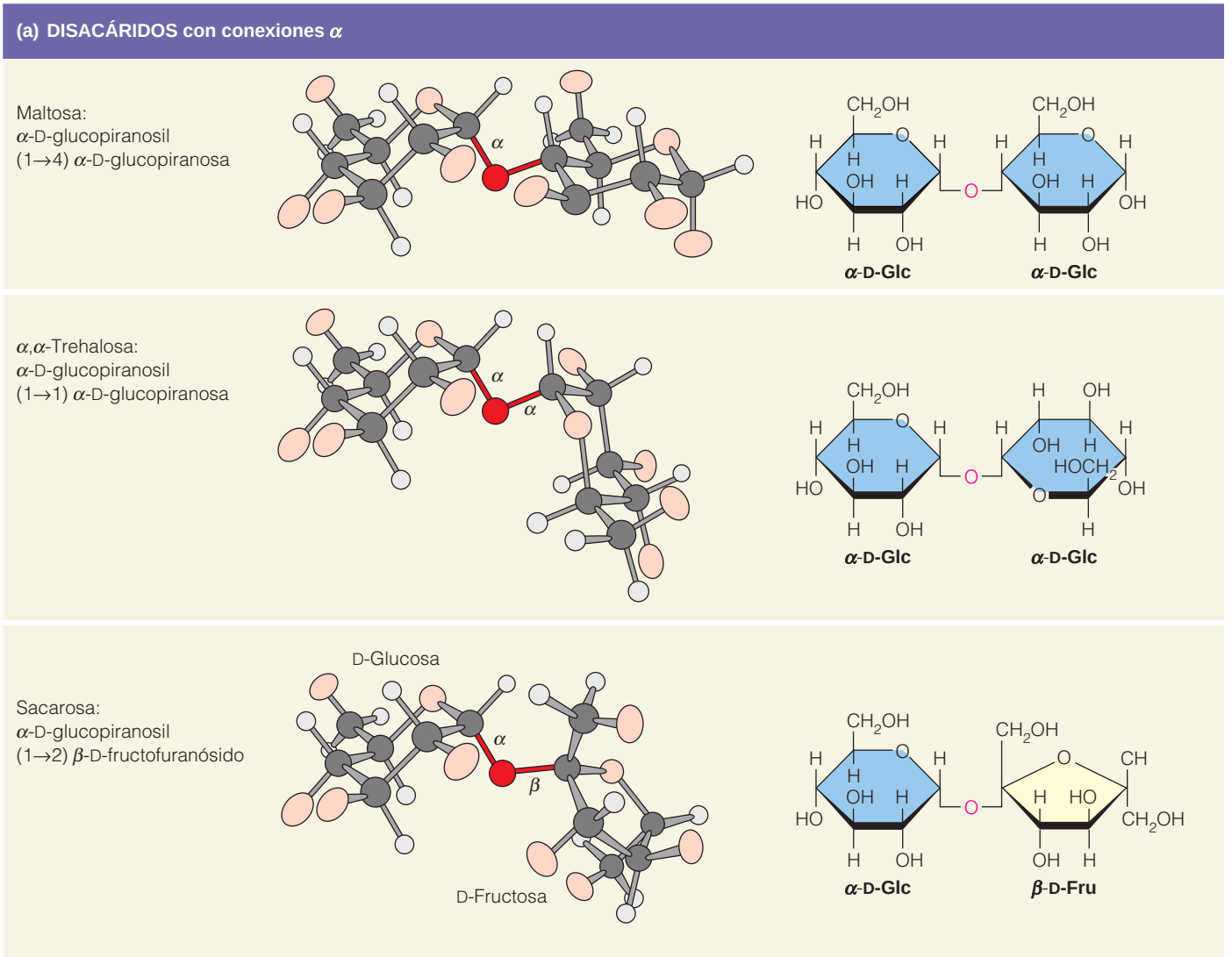


FIGURA **9.16**

Estructuras de algunos disacáridos importantes. Se presentan a la izquierda los modelos de bolas y bastones, con los oxígenos anoméricos en rojo. A la derecha se dibujan las proyecciones de Haworth de las mismas moléculas, con los monómeros codificados mediante colores: azul = glucosa, amarillo = fructosa, azul verdoso = galactosa. **(a)** Disacáridos unidos mediante el C-1 del anómero α: maltosa, trehalosa y sacarosa. **(b)** Disacáridos con enlace β: celobiosa, lactosa y gentiobiosa. Obsérvese el convenio utilizado para representar los enlaces glucosídicos entre los monómeros en los disacáridos. Los "enlaces doblados" permiten representar en paralelo las proyecciones de Haworth de los monómeros. Las "esquinas" *no* implican átomos de carbono extra, como a menudo se hace en las representaciones de estructuras orgánicas.

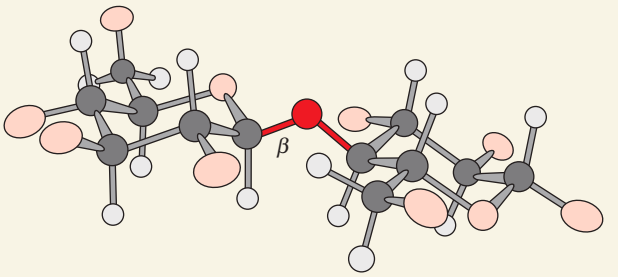
y la amigdalina. La *ouabaína* inhibe la acción de las enzimas que bombean los iones Na^+ y K^+ a través de las membranas celulares para mantener el equilibrio electrolítico necesario. Se obtiene de un arbusto africano y se descubrió cuando se observó que los cazadores somalíes sumergían las puntas de las flechas en un extracto de la planta. La ouabaína se utiliza en la actualidad en el tratamiento de algunos trastornos cardíacos (véase la página 384). La *amigdalina* es tóxica por una razón muy distinta. Este glucósido, que se encuentra en las semillas de las almendras amargas, produce cianuro de hidrógeno (HCN) por hidrólisis. Éste es el motivo de que se afirme que el gas HCN tiene olor de almendras amargas.

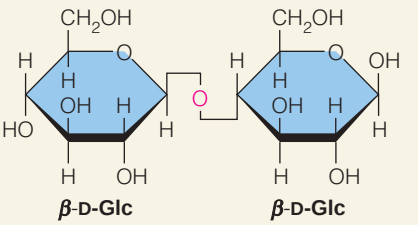
Oligosacáridos

De la misma forma que los monosacáridos pueden formar enlaces glucosídicos con otros tipos de compuestos que contienen hidroxilo, pueden hacerlo también entre sí. Estos enlaces dan lugar a los **oligosacáridos** y los **polisacáridos**.

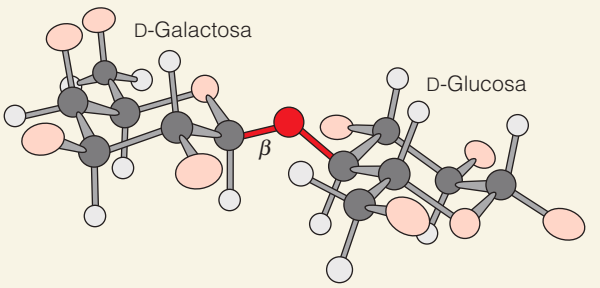
(b) DISACÁRIDOS con conexiones β

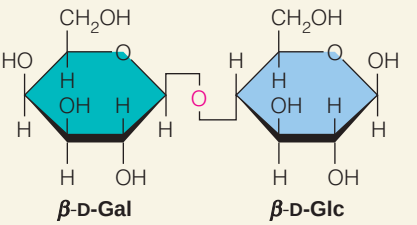
Celobiosa:
β-D-glucopiranosil
(1→4) β-D-glucopiranosa



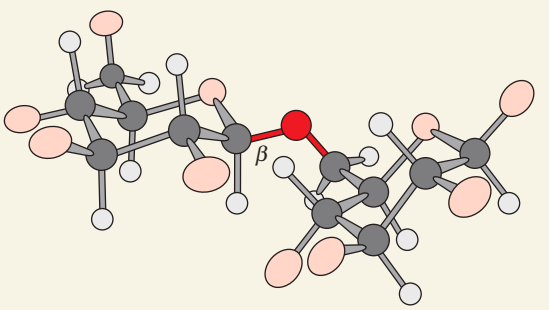


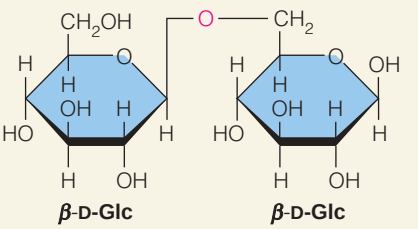
Lactosa:
β-D-galactopiranosil
(1→4) β-D-glucopiranosa





Gentiobiosa:
β-D-glucopiranosil
(1→6) β-D-glucopiranosa





ESTRUCTURAS DE LOS OLIGOSACÁRIDOS

Los oligosacáridos más sencillos y de mayor importancia biológica son los *disacáridos*, formados por dos residuos. Como se indica en la Tabla 9.5, los disacáridos pueden desempeñar múltiples funciones en los organismos vivos. Algunos, como la *sacarosa*, la *lactosa* y la *trehalosa*, constituyen reservas de energía soluble en las plantas y los animales. Otros, como la *maltosa* y la *celobiosa*, pueden considerarse fundamentalmente productos intermediarios de la degradación de otros polisacáridos mucho más largos. Los hay también que, como la *gentiobiosa*, se encuentran principalmente como componentes de sustancias más complejas existentes en la naturaleza. En la Figura 9.16 se muestran las estructuras de estos disacáridos importantes.

Características distintivas de los diferentes disacáridos

Hay cuatro características principales que diferencian a un disacárido de otro:

1. *Los dos monómeros específicos del azúcar que lo forman, y sus configuraciones espaciales.* Los monómeros pueden ser del mismo tipo, como los dos

residuos de D-glucopiranosa en la maltosa, o pueden ser diferentes, como los residuos de D-glucopiranosa y D-fructofuranosa de la sacarosa.

2. *Los carbonos que intervienen en la unión.* Aunque existen muchas posibilidades al respecto, los enlaces más frecuentes son los 1→1 (como en la trehalosa), 1→2 (como en la sacarosa), 1→4 (como en la lactosa, maltosa y celobiosa) y 1→6 (como en la gentiobiosa). Obsérvese que en todos estos disacáridos interviene el hidroxilo anomérico de al menos un azúcar en el enlace.
3. *El orden de las dos unidades monoméricas, en el caso de que sean de tipos distintos.* En el enlace glucosídico interviene el carbono anomérico de un azúcar, pero en la mayor parte de los casos el otro está libre. En consecuencia, los dos extremos de la molécula pueden diferenciarse en función de su reactividad química. Así, por ejemplo, el residuo de glucosa que se encuentra en la lactosa, que tiene un carbono anomérico libre y, por tanto, un posible grupo aldehído libre, podría oxidarse por la solución de Fehling; en cambio, el residuo de galactosa no tendría esta posibilidad. Ello hace que la lactosa sea un azúcar reductor, y el residuo de glucosa se encuentra en su *extremo reductor*. El otro extremo se denomina *extremo no reductor*. En la sacarosa, ninguno de los dos residuos tiene un grupo aldehído libre ya que ambos carbonos anoméricos participan en el enlace glucosídico. En consecuencia, la sacarosa es un azúcar no reductor.
4. *La configuración anomérica del grupo hidroxilo del carbono 1 de cada residuo.* Esta característica es especialmente importante para el carbono o carbonos anoméricos que participan en el enlace glucosídico. La configuración puede ser α (como en los disacáridos de la Figura 9.16a) o β (como en los de la Figura 9.16b). Esta diferencia puede parecer pequeña, pero tiene un efecto importante sobre la forma de la molécula, y la diferencia de forma la identifican fácilmente las enzimas. Así, por ejemplo, son necesarias enzimas diferentes para catalizar la hidrólisis de la maltosa y la celobiosa, a pesar de que ambos sean dímeros de D-glucopiranosa. Además, veremos que en los polisacáridos la orientación anomérica desempeña un papel crucial para determinar las estructuras secundarias que adoptan estos polímeros.

Anotación de la estructura de los disacáridos

Se ha diseñado una forma cómoda para describir las estructuras de estos oligosacáridos y otros más complejos. Las reglas utilizadas son las siguientes:

1. La secuencia se escribe empezando por el extremo no reductor en el lado izquierdo, y utilizando las abreviaturas definidas en la Tabla 9.4.
2. Las formas anoméricas y enantioméricas se designan mediante prefijos (p. ej., α-, D-).
3. La configuración de anillo se indica mediante un sufijo (*p* para piranosa, *f* para furanosa).
4. Los átomos entre los cuales se forman los enlaces glucosídicos se indican mediante números entre paréntesis, entre las designaciones de los residuos (p. ej., (1→4) indica un enlace entre el carbono 1 del residuo de la izquierda y el carbono 4 del residuo de la derecha).

Así, por ejemplo, la estructura de la sacarosa se escribe de la siguiente forma

$$\alpha\text{-D-Glc}p(1\rightarrow2)\text{-}\beta\text{-D-Fru}f$$

En muchos casos, la nomenclatura se abrevia omitiendo las designaciones D y L (excepto en los casos poco comunes en los que se encuentran enantiómeros L)

TABLA 9.5 Presencia y funciones bioquímicas de algunos disacáridos representativos

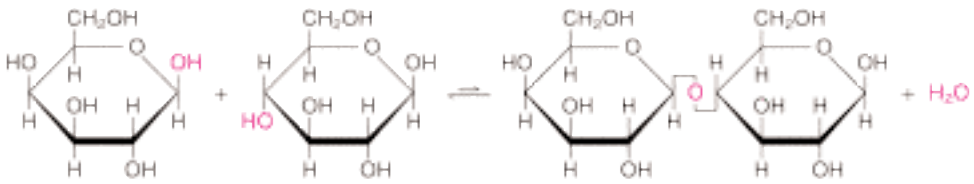
Disacárido	Estructura	Presencia Natural	Función Fisiológica
Sacarosa	Glcα(1→2)Fruβ	Muchos frutos, semillas, raíces, miel	Producto final de la fotosíntesis; se utiliza como fuente principal de energía en muchos organismos
Lactosa	Galβ(1→4)Glc	Leche, algunas fuentes vegetales	Una fuente importante de energía en los animales
α,α-Trehalosa	Glcα(1→1)Glcα	Levaduras, otros hongos, sangre de los insectos	Importante azúcar circulatorio en los insectos; se utiliza para obtener energía
Maltosa	Glcα(1→4)Glc	Plantas (almidón) y animales (glucógeno)	Dímero del almidón y los polímeros de glucógeno
Celobiosa	Glcβ(1→4)Glc	Plantas (celulosa)	Dímero del polímero celulosa
Gentiobiosa	Glcβ(1→6)Glc	Algunas plantas (p. ej. genciana)	Componente de los glucósidos vegetales y de algunos polisacáridos

y omitiendo los sufijos *p* y *f* cuando los monómeros tienen sus formas de anillo habituales. Así pues, la sacarosa se escribe de forma más adecuada tal como se indica en la Tabla 9.5. El sistema puede aplicarse a los oligosacáridos de cualquier longitud y puede incluir estructuras ramificadas, como veremos más adelante en este capítulo al hablar de los almidones. Si tan sólo uno de los carbonos que participan en el enlace entre los dos residuos es anomérico, la representación puede condensarse aún más, ya que la configuración anomérica en el extremo reductor se equilibrará en disolución. Así por ejemplo, la maltosa puede representarse como Glcα(1→4)Glc.

La relación de los oligosacáridos con importancia biológica no se limita en modo alguno a las estructuras diméricas. Se conocen muchos trímeros, tetrámeros o moléculas aún mayores, aunque de estructura específica. Encontraremos ejemplos de estos compuestos más adelante en este mismo capítulo, al examinar los oligosacáridos que se unen a determinadas proteínas y a las superficies celulares. En Herramientas de la Bioquímica 9A se describen las técnicas utilizadas para secuenciar los oligosacáridos.

ESTABILIDAD Y FORMACIÓN DEL ENLACE GLUCOSÍDICO

La formación del enlace glucosídico entre dos monómeros de un oligosacárido comporta la eliminación de una molécula de agua. Así, cabría prever que la síntesis de lactosa se produjera de la siguiente forma:



β-D-Galactosa **β-D-Glucosa** **Lactosa**

Esta reacción es análoga a la eliminación de agua que se produce entre los aminoácidos en la formación de los polipéptidos o entre los nucleótidos en la formación de los ácidos nucleicos. Al igual que en esos casos, la reacción tal como se ha escrito está desfavorecida termodinámicamente. En su lugar, en condiciones fisiológicas está favorecida la hidrólisis de los oligosacáridos y los polisacáridos por un cambio de energía libre de estado estándar de alrededor de −15 kJ/mol, que corresponde a una constante de equilibrio de aproximadamente 800 a favor de los productos de hidrólisis. No obstante, al igual que los péptidos y los oligonucleótidos, los polímeros de sacáridos son lo suficiente-

Al igual que el enlace fosfodiéster en los ácidos nucleicos y el enlace amida en las proteínas, el enlace glucosídico es metaestable. Las enzimas controlan su hidrólisis.

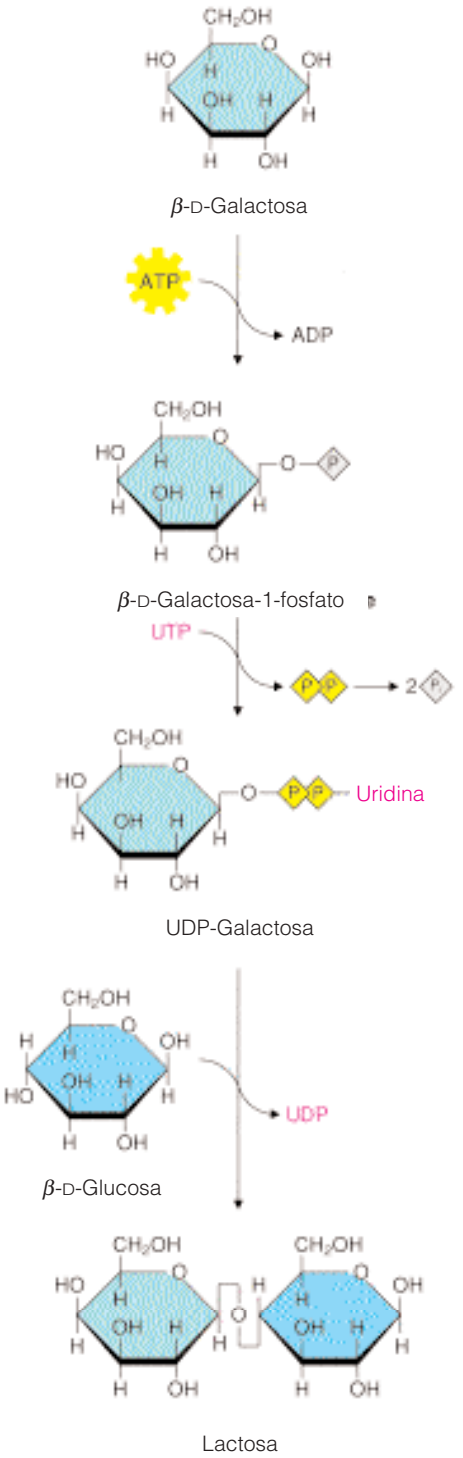


FIGURA **9.17**

Formación de lactosa in vivo. La reacción que se indica se produce en la formación de la leche en el tejido mamario. La galactosa se fosforila mediante el ATP, y luego se transfiere al uridín difosfato (UDP). La UDP-galactosa transfiere la galactosa a la glucosa, con la ruptura asociada de un enlace fosfato. La reacción es catalizada por la enzima lactosa sintasa.

mente metaestables como para persistir durante períodos de tiempo prolongados a no ser que su hidrólisis sea catalizada por enzimas o por ácido. Así pues, la situación es la misma que hemos encontrado con los demás biopolímeros importantes: la degradación de los oligosacáridos y los polisacáridos in vivo se controla por la presencia de enzimas específicas. Además, la síntesis de estos polímeros de azúcar no se produce nunca en los organismos vivos mediante reacciones como las que acabamos de indicar. Al igual que ocurre en la síntesis de las proteínas y de los ácidos nucleicos, son necesarios monómeros activados. Así, por ejemplo, la formación de lactosa en el tejido mamario se produce mediante las reacciones que se indican en la Figura 9.17. Se hidroliza un enlace fosfato entre el UDP y la galactosa para facilitar el acoplamiento. El catalizador es una enzima específica, la *lactosa sintasa*. La reacción se ve favorecida, además, por la hidrólisis del pirofosfato inorgánico producido.

Debido a que los distintos disacáridos (y los oligosacáridos y los polisacáridos) se distinguen por el tipo de monómeros y los enlaces glucosídicos precisos entre ellos, las enzimas necesarias para su síntesis y degradación deben ser muy específicas. Por ejemplo, la hidrólisis de los disacáridos comunes del alimento, maltosa, lactosa y sacarosa, se produce en las células que recubren la pared del intestino delgado y requiere tres enzimas distintas y específicas (véase la página 526). Ninguna puede sustituir a otra.

Asimismo, la síntesis de los disacáridos, según el ejemplo de la Figura 9.17, requiere enzimas que son específicas, no sólo del par de azúcares que van a unirse, sino también del enlace glucosídico específico que se va a formar entre ellos. Obsérvese que cada molécula de galactosa tiene cinco grupos hidroxilo diferentes, cada uno de los cuales puede formar un enlace glucosídico con cada uno de los cinco hidroxilos de la glucosa del par. Aun permitiéndolo las restricciones estéricas, podrían formarse muchos disacáridos diferentes galactosa-glucosa. Sin embargo, las enzimas de las reacciones de la Figura 9.17 son tan específicas que sólo se fabrica un único producto.

Como veremos en apartados posteriores de este capítulo, los oligosacáridos más grandes y los polisacáridos pueden presentar estructuras muy complejas. Hay un punto importante en el que la síntesis de los oligosacáridos y los polisacáridos difiere de la síntesis de los ácidos nucleicos y las proteínas. Estos polímeros de azúcares no se copian nunca a partir de moléculas molde. En su lugar, en la formación de los oligosacáridos o los polisacáridos, se utiliza una enzima diferente para catalizar la adición de cada tipo de unidad monomérica. En el Capítulo 16 se presentará una descripción más detallada del mecanismo de síntesis de los oligosacáridos y los polisacáridos. De manera clara, deben dedicarse a la síntesis y degradación de los polímeros de sacáridos un dispositivo grande de enzimas vegetales y animales.

Polisacáridos

Los polisacáridos realizan una amplia gama de funciones en los organismos vivos. Algunos, como el almidón y el glucógeno (al que a veces se denomina almidón animal), se emplean principalmente como azúcares de reserva energética en las plantas y los animales. Otros, como la **celulosa**, la **quitina** y los polisacáridos de las paredes celulares bacterianas, son materiales estructurales análogos a las proteínas estructurales. Lo más sencillo es considerar estas moléculas en cuanto a sus categorías funcionales.

Como en el caso de los polipéptidos y los polinucleótidos, la secuencia de los residuos monoméricos de un polisacárido define su estructura primaria. Mientras que las proteínas suelen tener secuencias complicadas, los polisacáridos suelen pre-

sentar unas estructuras primarias bastante sencillas. En algunos casos (p. ej., la celulosa), el polímero está formado por un solo tipo de residuo monomérico (la β-D-glucosa para la celulosa) y esta clase de polímeros se denominan **homopolisacáridos**. Cuando participan dos o más tipos de residuos, el polímero se denomina un **heteropolisacárido**. Incluso los polisacáridos de reserva y estructurales, que son heteropolímeros, presentan secuencias que rara vez son complejas; generalmente no incluyen más de dos tipos de residuos. Otra diferencia respecto a las moléculas de proteínas y ácidos nucleicos, que casi siempre tienen una longitud definida, es que las cadenas de polisacáridos crecen hasta longitudes aleatorias.

Las razones funcionales de estas diferencias no son difíciles de encontrar. Una sustancia de almacenamiento, como el almidón, no ha de transmitir información ni ha de adoptar una forma tridimensional complicada. Constituye simplemente un recipiente en el que depositar las moléculas de glucosa para utilizarlas en el futuro. Muchos polisacáridos estructurales (como las proteínas estructurales) forman estructuras secundarias regulares alargadas, muy adecuadas para la formación de fibras o láminas. Con frecuencia, una repetición regular de un monosacárido o disacárido simple servirá para cumplir esta función. (Recuérdense, como comparación, las secuencias de aminoácidos simples y repetitivas del colágeno y de la fibroína de la seda, que se han descrito en el Capítulo 6.) Los únicos polímeros de sacáridos en los que se encuentran secuencias bien definidas y complejas son algunos oligosacáridos unidos a las superficies celulares o los que están unidos a glucoproteínas específicas. Dado que estos oligómeros sirven para identificar a las células o a las moléculas, deben transportar información. Esta función requiere la presencia de unas "palabras" definidas con precisión en el lenguaje de los polisacáridos, de la misma manera que las secuencias de los ácidos nucleicos presentan la información en su propio lenguaje.

POLISACÁRIDOS DE ALMACENAMIENTO

Los principales polisacáridos de almacenamiento son la **amilosa** y la **amilopectina**, que juntos forman el almidón de las plantas, y el **glucógeno**, que se almacena en las células animales y microbianas. Tanto el almidón como el glucógeno se almacenan en gránulos dentro de las células (Figura 9.18). El almidón se encuentra en casi todos los tipos de células vegetales, pero las semillas de los cereales, los tubérculos y las frutas no maduras contienen esta sustancia de manera especialmente abundante. El glucógeno se deposita en el hígado, que actúa como órgano central de almacenamiento de energía en muchos animales. El glucógeno es abundante también en el tejido muscular, en el que está disponible de manera más inmediata para la liberación de energía.

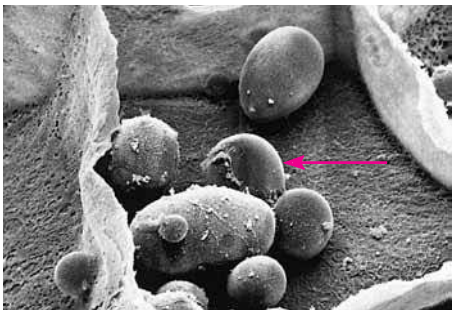
La amilosa, la amilopectina y el glucógeno son todos polímeros de α-D-glucopiranosa. Se trata de homopolisacáridos de la clase denominada **glucanos**, que son los polímeros de glucosa. Los tres polímeros difieren tan sólo en los tipos de enlaces entre los residuos de glucosa. La amilosa es un polímero lineal, que tiene exclusivamente enlaces α(1→4) entre los residuos de glucosa adyacentes. La amilopectina (Figura 9.19) y el glucógeno son ambos polímeros ramificados, puesto que contienen, además de los enlaces α(1→4), algunos enlaces α(1→6). En el glucógeno, las ramificaciones son algo más frecuentes y más cortas que en la amilopectina, y el glucógeno es normalmente de mayor peso molecular, pero en la mayor parte de sus características las estructuras de estos dos polisacáridos son muy semejantes.

Los almidones (amilosa, amilopectina y glucógeno) son polisacáridos de almacenamiento. La amilosa es lineal y la amilopectina y el glucógeno son ramificados.

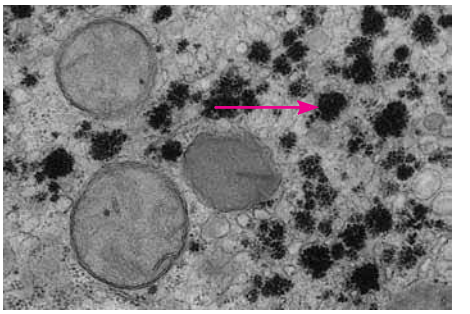
La estructura primaria sencilla y regular de la amilosa permite una estructura secundaria regular de esta molécula. Al igual que con los polinucleótidos y los polipéptidos, los detalles de esta estructura se han obtenido a partir de los es-



(a) Gránulos de cloroplastos



(b) Gránulos de células tuberosas



(c) Gránulos hepáticos

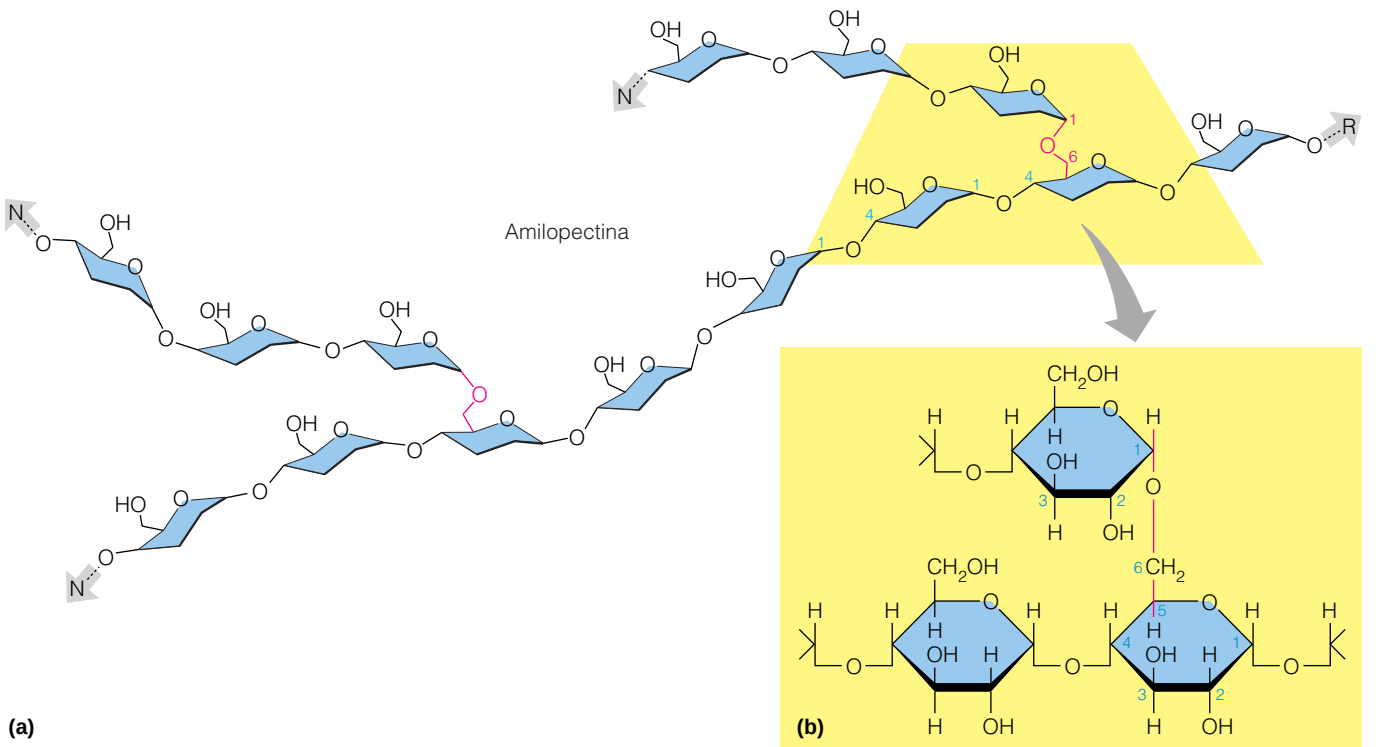
FIGURA **9.18**

Almacenamiento del almidón y del glucógeno en gránulos. En cada caso se indica un granulo representativo mediante una flecha. **(a)** Gránulos de almidón en un cloroplasto de la hoja de una planta. **(b)** Gránulos de almidón de las células tuberosas de la patata. **(c)** Gránulos de glucógeno del hígado.

(a) Tomado de Science Source. © Biophoto Associates/Photo Researchers, Inc.; **(b)** cortesía del Dr. L. M. Beidler; **(c)** fotografía microscópica cortesía de Don Fawcett, M.D.

FIGURA **9.19**

Amilopectina, un glucano ramificado. **(a)** Estructura primaria de la amilopectina. Se indican los extremos no reductores (N) y los reductores (R). **(b)** Estructura detallada de un punto de ramificación.



tudios de difracción de rayos X. De hecho, la amilosa fue el primer biopolímero cuya estructura se determinó mediante este método. Debido al enlace $\alpha(1\rightarrow4)$, cada residuo forma un ángulo respecto al residuo precedente, lo cual favorece una conformación helicoidal (Figura 9.20). La naturaleza ramificada de la amilopectina y del glucógeno inhibe la formación de hélices, puesto que la hélice requiere 6 residuos por cada vuelta, y hay un punto de ramificación cada 10-20 residuos en la amilopectina, y unos 8 en el glucógeno.

Los polisacáridos de almacenamiento tienen un diseño admirablemente adaptado a la función que realizan. La glucosa, e incluso la maltosa, son moléculas pequeñas que difunden rápidamente y son difíciles de almacenar. Si en una célula hubiera una gran cantidad de moléculas pequeñas de este tipo, se produciría un aumento muy importante de la presión osmótica celular, que resultaría nocivo en la mayor parte de los casos. Por consiguiente, la mayoría de las células combinan la glucosa en polímeros largos, de manera que puedan almacenarse grandes cantidades de una forma que impida su difusión y pérdida. Siempre que se necesite glucosa puede obtenerse mediante la degradación selectiva de los polímeros por enzimas específicas. Estos procesos se considerarán con más detalle en el Capítulo 13, pero hay un aspecto que conviene mencionar aquí. La mayor parte de las enzimas utilizadas atacan a las cadenas en sus extremos no reductores, y liberan un residuo de glucosa cada vez. Este "mordisquear en el extremo" (frente a la ruptura interna) impide la fragmentación continua de los polímeros largos, que conduciría a su completa solubilización. La estructura ramificada de la amilopectina y del glucógeno es tal que cada molécula posee *muchos* extremos no reductores que pueden engancharse simultáneamente (véase la Figura 9.19), lo cual permite la rápida movilización de la glucosa cuando sea necesaria. Por otro lado, la cadena lineal de amilosa con su único extremo no reductor, se utiliza principalmente para el almacenamiento de la glucosa a largo plazo.

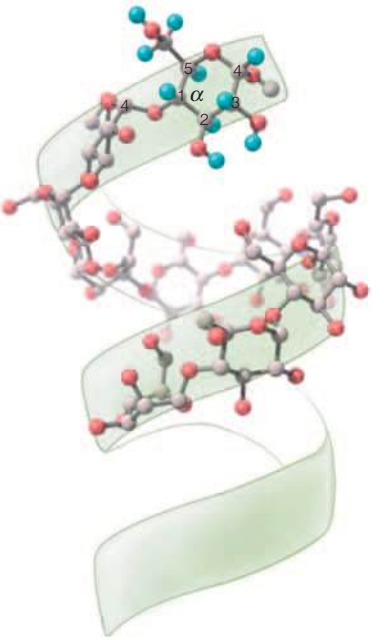


FIGURA **9.20**

Estructura secundaria de la amilosa. La orientación de los residuos sucesivos de glucosa favorece la generación de la hélice. Obsérvese el centro grande. Los enlaces de hidrógeno estabilizan la hélice.

POLISACÁRIDOS ESTRUCTURALES

Las plantas no parecen sintetizar ni utilizar proteínas estructurales fibrosas (como la queratina y el colágeno), y en su lugar cuentan únicamente con polisacáridos especiales. Los animales emplean ambos tipos de sustancias. Dado que cada uso estructural requiere propiedades diferentes, existe una gran variedad de polisacáridos estructurales. Empezaremos considerando los de las plantas.

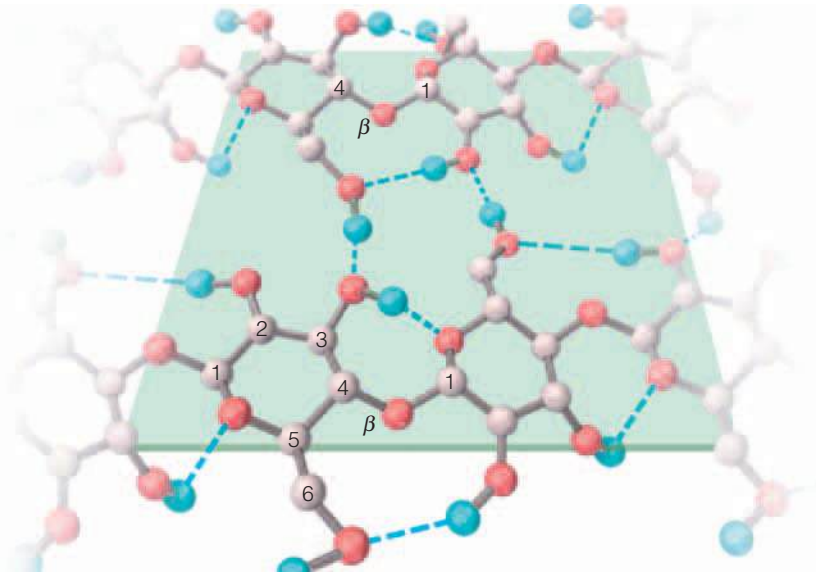
Celulosa

La celulosa, el principal polisacárido de las plantas leñosas y fibrosas (como los árboles y las hierbas), es el polímero más abundante de la biosfera. Al igual que la amilosa, la celulosa es un polímero lineal de D-glucosa (y, por tanto, también un glucano), pero en la celulosa los residuos de azúcar están unidos mediante enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura 9.21). Esta diferencia, aparentemente pequeña, con relación al almidón (p. ej., la amilosa), tiene consecuencias estructurales importantes. La celulosa puede encontrarse en forma de cadenas totalmente extendidas, de tal manera que cada residuo de glucosa presenta un giro de 180° respecto al residuo de al lado en la cadena. En esta forma extendida, las cadenas pueden formar cintas que se empaquetan lado a lado con una red de enlaces de hidrógeno dentro de ellas y entre ellas. Esta disposición recuerda algo la estructura de lámina β de la fibroína de la seda, y como en la fibroína, las fibrillas de celulosa poseen una gran resistencia mecánica aunque tienen una extensibilidad limitada.

La misma pequeña diferencia existente entre la celulosa y el almidón tiene otra consecuencia importante. Las enzimas animales que son capaces de catalizar la ruptura del enlace $\alpha(1\rightarrow4)$ en el almidón no pueden romper la celulosa. Por este motivo, el ser humano, aunque se encuentre en una situación de inanición,

FIGURA **9.21**

Estructura de la celulosa. Los enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ de la celulosa generan una estructura plana. Las cadenas de celulosa paralelas están unidas por una red de enlaces de hidrógeno. Los hidrógenos que intervienen en estos enlaces se indican en azul. Para mayor claridad, se muestran todos los hidrógenos sólo en un residuo de glucosa (con los carbonos numerados).



no es capaz de utilizar las enormes cantidades de glucosa que tiene a su alrededor en forma de celulosa. Los rumiantes como las vacas pueden digerir la celulosa tan sólo porque sus aparatos digestivos contienen bacterias simbióticas que producen las **celulasas** necesarias. Las termitas pueden comer sustancias leñosas de una forma algo más complicada, pues sus intestinos albergan protozoos capaces de digerir la celulosa, aunque sus glándulas salivares también producen una celulasa. Muchos hongos producen también enzimas de este tipo, y éste es el motivo de que muchas setas puedan vivir utilizando la madera como fuente de carbono.

No debe pensarse que las partes fibrosas de las plantas están formadas exclusivamente por celulosa. En las paredes celulares de las plantas existe toda una gama de polisacáridos de otro tipo. Entre ellos se encuentran los **xilanos**, que son polímeros de D-xilopiranosa con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$, a menudo con grupos de sustitución, los **glucomananos**, y otros muchos polímeros. Con frecuencia estos polisacáridos se agrupan juntos bajo el término de **hemicelulosa**.

$$\cdots\beta\text{-D-Xyl}p(1\rightarrow4)[\beta\text{-D-Xyl}p(1\rightarrow4)]_7\text{-}\beta\text{-D-Xyl}p(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-Xyl}p(1\rightarrow4)\cdots$$

Acetilo en C-2 or C-3 — 4-O-Me-α-D-Glc$p$(1→2)

Estructura de un xilano característico

$$\cdots\beta\text{-D-Glc}p(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-Man}p(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-Man}p(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-Man}p(1\rightarrow4)\cdots$$

β-D-Gal$p$(1→6) Acetilo en C-2 or C-3

Estructura de un glucomanano característico

La pared celular de una planta es una estructura compleja, formada por varias capas. Las microfibrillas de celulosa están colocadas con un patrón entrecruzado (Figura 9.22) e impregnado con una matriz del resto de polisacáridos y algunas proteínas. El mismo principio se utiliza cuando las fibras de vidrio se incluyen en una resina dura para producir láminas de fibra de vidrio resistentes y duraderas.

La celulosa no está limitada exclusivamente al reino vegetal. Los invertebrados marinos denominados *tunicados* contienen cantidades considerables de celulosa en su manto externo duro. Se ha descrito incluso la presencia de pequeñas cantidades de celulosa en el tejido conjuntivo humano. Sin embargo, como sus-

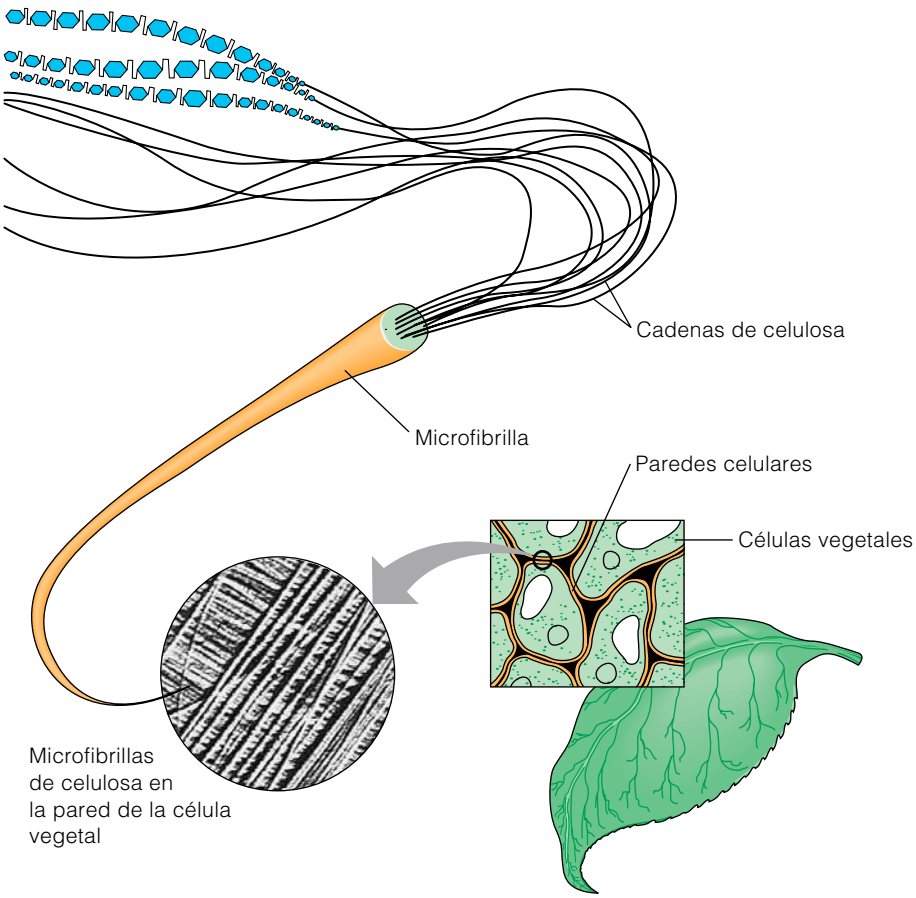


FIGURA **9.22**

Organización de las paredes de las células vegetales. Las microfibrillas de celulosa están inmersas en una matriz de hemicelulosa. Obsérvese que las fibras están dispuestas en un patrón cruzado para proporcionar resistencia en todas las direcciones.

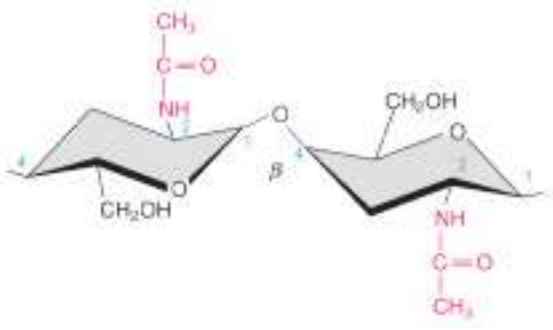
Tomado de W. M. Becker, L. J. Kleinsmith y J. Hardin, *The World of the Cell*, 4ª ed. (San Francisco, CA: Addison Wesley Longman, 2000). © Addison Wesley Longman, Inc.; fotografía cortesía de E. Frei y R. D. Preston.

tancia estructural, la celulosa parece haber sido en gran parte abandonada en la evolución animal. En los hongos, se utilizan mucho otros glucanos, con enlaces $\beta(1\rightarrow3)$ o $\beta(1\rightarrow6)$ entre residuos de glucosa, como polisacáridos estructurales.

Quitina

La quitina, homopolímero de *N*-acetil-β-D-glucosamina, tiene una estructura básicamente similar a la de la celulosa, excepto que el hidroxilo del carbono 2 de cada residuo se ha reemplazado por un grupo amino acetilado.

La celulosa y la quitina son ejemplos de polisacáridos estructurales. A diferencia de los almidones, que tienen enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$, estos polímeros fibrosos tienen enlaces $\beta(1\rightarrow4)$.



Quitina

La quitina está muy repartida en los diversos reinos de los organismos vivos. Constituye un componente menor en la mayoría de los hongos y algunas algas, en los que sustituye con frecuencia a la celulosa u otros glucanos. En las

células de levadura en fase de división, la quitina se encuentra en el tabique que se forma entre las células que se están separando. Sin embargo, la función mejor conocida de la quitina es la que posee en los animales invertebrados, donde constituye una sustancia estructural importante del exoesqueleto de muchos artrópodos y moluscos. En muchos de estos exoesqueletos, la quitina forma una matriz sobre la cual se produce la mineralización, de manera muy parecida a cómo actúa el colágeno como matriz para el depósito de mineral en los huesos de los vertebrados. Las implicaciones evolutivas son interesantes. Cuando los animales evolucionaron hasta alcanzar un tamaño en el que eran esenciales las partes rígidas del cuerpo, se siguieron varios caminos diferentes. Los antepasados de los vertebrados crearon un esqueleto mineral sobre una matriz de colágeno. Los anélidos como los gusanos de tierra, utilizan también colágeno, pero en un exoesqueleto segmentado. Los artrópodos y los moluscos crearon también exoesqueletos, pero en este caso los construyeron sobre la quitina, un hidrato de carbono, en vez de una matriz proteica.

GLUCOSAMINOGLUCANOS

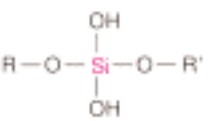
Los glucosaminoglucanos son heteropolisacáridos con carga negativa que desempeñan diversas funciones estructurales en los animales.

Existe un grupo de polisacáridos que tiene una gran importancia estructural en los animales vertebrados, los **glucosaminoglucanos**, anteriormente denominados *mucopolisacáridos*. Como ejemplos importantes cabe citar los *condroitín sulfato* y los *queratán sulfato* del tejido conjuntivo, los *dermatán sulfato* de la piel, y el *ácido hialurónico*. Todos ellos son polímeros de unidades repetidas de disacáridos, en los que uno de los azúcares es la *N*-acetilgalactosamina o la *N*-acetilglucosamina, o uno de sus derivados. Todos ellos son de carácter ácido, por la presencia de grupos sulfato o carboxilato. En la Figura 9.23 se presentan algunas estructuras representativas de los glucosaminoglucanos.

Complejo proteoglucano

Una función importante de los glucosaminoglucanos es la formación de una matriz para mantener juntos los componentes proteicos de la piel y del tejido conjuntivo. En la Figura 9.24 se presenta un ejemplo, que ilustra el complejo proteína-hidrato de carbono, o **proteoglucano**, del cartílago. La estructura filamentosa se construye sobre una única molécula larga de ácido hialurónico, a la que se unen de manera no covalente proteínas centrales extendidas. Las proteínas centrales tienen, a su vez, unidas covalentemente cadenas de condroitín sulfato y queratán sulfato a través de las cadenas laterales de serina. En el cartílago, este tipo de estructura se une al colágeno (véase el Capítulo 6) y ayuda a mantener las fibras de colágeno en una red fuerte y resistente. La unión comporta, al parecer, interacciones electrostáticas entre los grupos sulfato, carboxilato, o ambos, del complejo proteoglucano y las cadenas laterales básicas del colágeno.

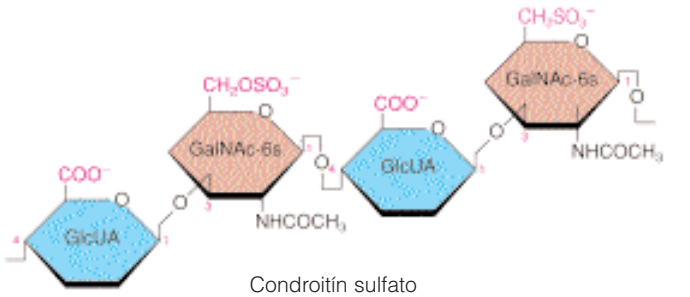
Los complejos proteoglucanos del tejido conjuntivo constituyen uno de los pocos ejemplos en los que interviene en la biología el elemento silicio. Algunas de las cadenas de hidratos de carbono están entrelazadas por puentes del tipo



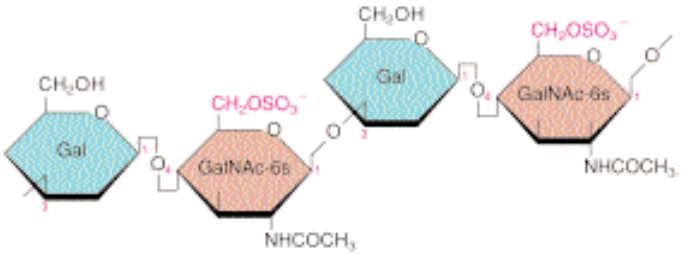
donde R y R′ son monómeros de azúcar de las cadenas adyacentes. Hay aproximadamente un átomo de silicio por cada 100 monómeros de azúcar.

FIGURA **9.23**

Estructuras repetidas de algunos glucosaminoglucanos. En cada caso, la unidad que se repite es un disacárido, del que se muestran dos para cada estructura. Las abreviaturas de los residuos (−6s significa sulfonado en el carbono 6) se indican en la Tabla 9.4. Para simplificar la figura, no se muestran los hidrógenos ni los hidroxilos sin reaccionar.



Condroitín sulfato



Queratán sulfato

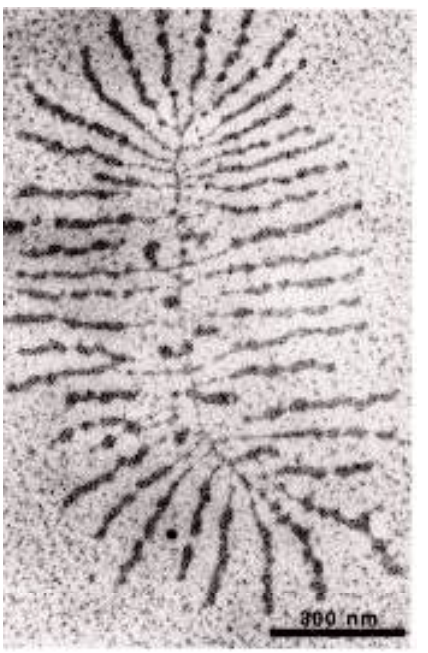


Ácido hialurónico

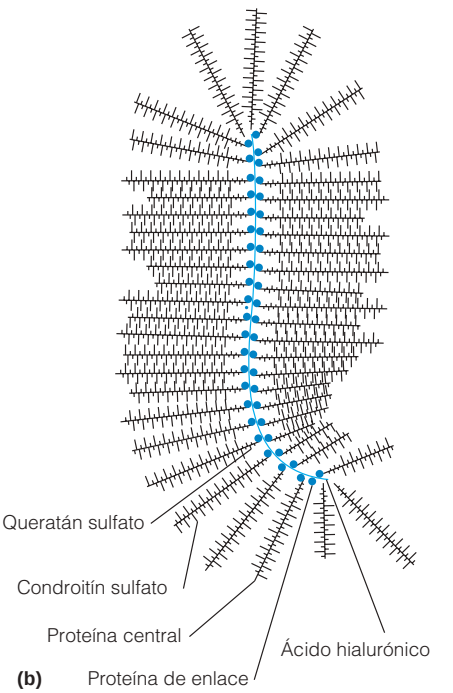
FIGURA **9.24**

Estructura del proteoglucano del cartílago bovino. **(a)** Fotografía de microscopia electrónica de un agregado proteoglucano. **(b)** Representación esquemática de la misma estructura. El queratán sulfato y el condroitín sulfato están unidos de forma covalente a las moléculas proteicas del centro extendidas. Las proteínas del centro están unidas de manera no covalente a una molécula larga de ácido hialurónico con la ayuda de una proteína de enlace.

(a) Cortesía de J. A. Buckwalter y L. Rosenberg de *Collagen Relat. Res.* (1983) 3:489-504, Amsterdam: North Holland, 1975.



(a)

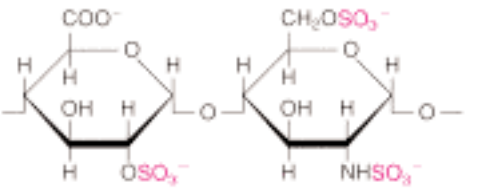


(b)

Funciones no estructurales de los glucosaminoglucanos

El ácido hialurónico además de ser un componente estructural tiene otras funciones en el organismo. El polímero es muy soluble en agua y está presente en el líquido sinovial de las articulaciones y en el humor vítreo del ojo. Parece actuar como agente que incrementa la viscosidad o como agente lubricante en estos líquidos.

Otro glucosaminoglucano muy sulfatado es la **heparina**. Se muestra a continuación un fragmento de su cadena compleja. La heparina parece ser un anticoagulante natural y se encuentra en muchos tejidos corporales. Se une fuertemente a una proteína de la sangre, la antiprotrombina III, y el complejo formado inhibe las enzimas del proceso de coagulación de la sangre (véase el Capítulo 11). En consecuencia, la heparina se utiliza como fármaco para inhibir la coagulación en los vasos sanguíneos.



Heparina

Los glucosaminoglucanos son ejemplos interesantes de la forma en que los residuos de azúcar pueden modificarse para dar polímeros con una amplia gama de propiedades y funciones.

POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR BACTERIANA

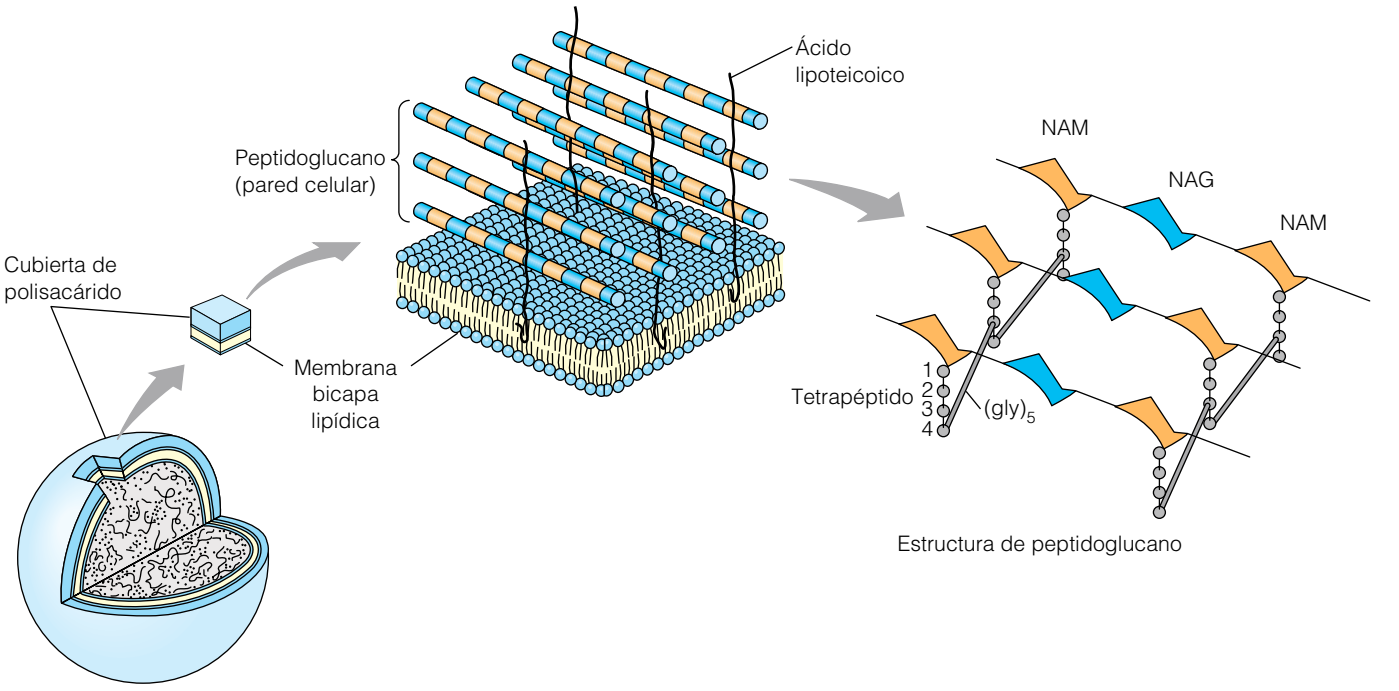
Las paredes celulares de muchas bacterias están formadas por peptidoglucanos, polímeros formados por polisacáridos y oligopéptidos.

En el Capítulo 1 indicamos que las bacterias y la mayoría del resto de los organismos unicelulares poseen una *pared celular*, cuya naturaleza es la base de la clasificación de las bacterias en dos grandes clases: las que retienen el colorante de Gram (un complejo de yodo), que se denominan bacterias *grampositivas*, y las que no lo hacen, a las que se da el nombre de *gramnegativas* (Figura 9.25). Las bacterias grampositivas poseen una pared celular que tiene en su superficie, por fuera de la membrana celular lipídica, un complejo entrelazado péptido-polisacárido de múltiples capas, al que se denomina **peptidoglucano** (Figura 9.25a). Las paredes celulares de las bacterias gramnegativas contienen también peptidoglucano, pero éste forma una sola capa y está cubierto por una capa de membrana lipídica externa (Figura 9.25b). Esta diferencia permite eliminar el colorante de Gram mediante el lavado de las bacterias gramnegativas.

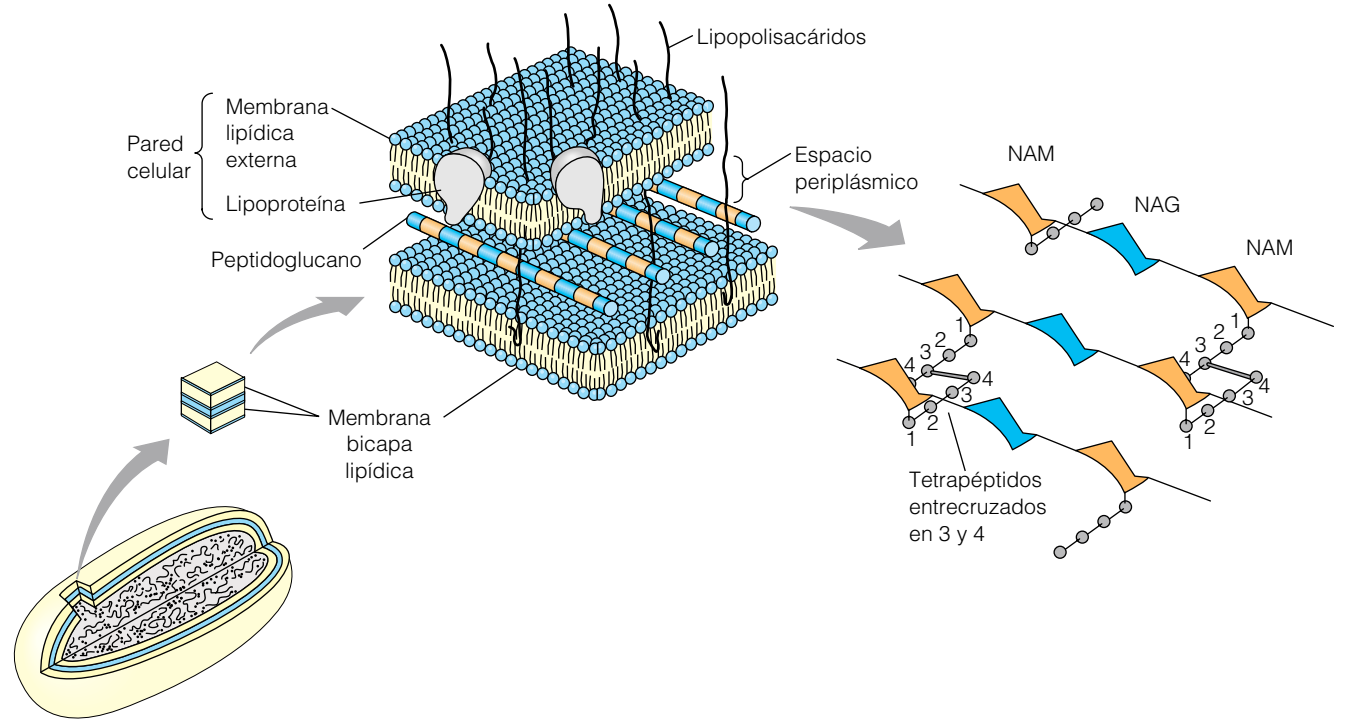
En la Figura 9.26 se muestra la estructura química del peptidoglucano de una bacteria grampositiva. Hay cadenas largas de polisacáridos, que son copolímeros de *N*-acetilglucosamina (NAG) y ácido *N*-acetilmurámico (NAM) con alternancia estricta, que están entrelazadas a través de péptidos cortos (véase la Figura 9.25a). Estos péptidos tienen unas estructuras poco habituales. Unido a la porción de ácido láctico del ácido *N*-acetilmurámico se encuentra un tetrapéptido con la secuencia

(L-Ala)–(D-Glu)–(L-Lys)–(D-Ala)

Este péptido es poco habitual en dos aspectos: contiene algunos aminoácidos D y el residuo de ácido glutámico está unido a la cadena mediante su grupo γ-carboxilo en vez de a través del enlace habitual α-carboxilo. El grupo ε-amino de cada residuo de lisina está unido a un pentapéptido de glicina, que está unido



(a) Grampositivo:
Staphylococcus aureus



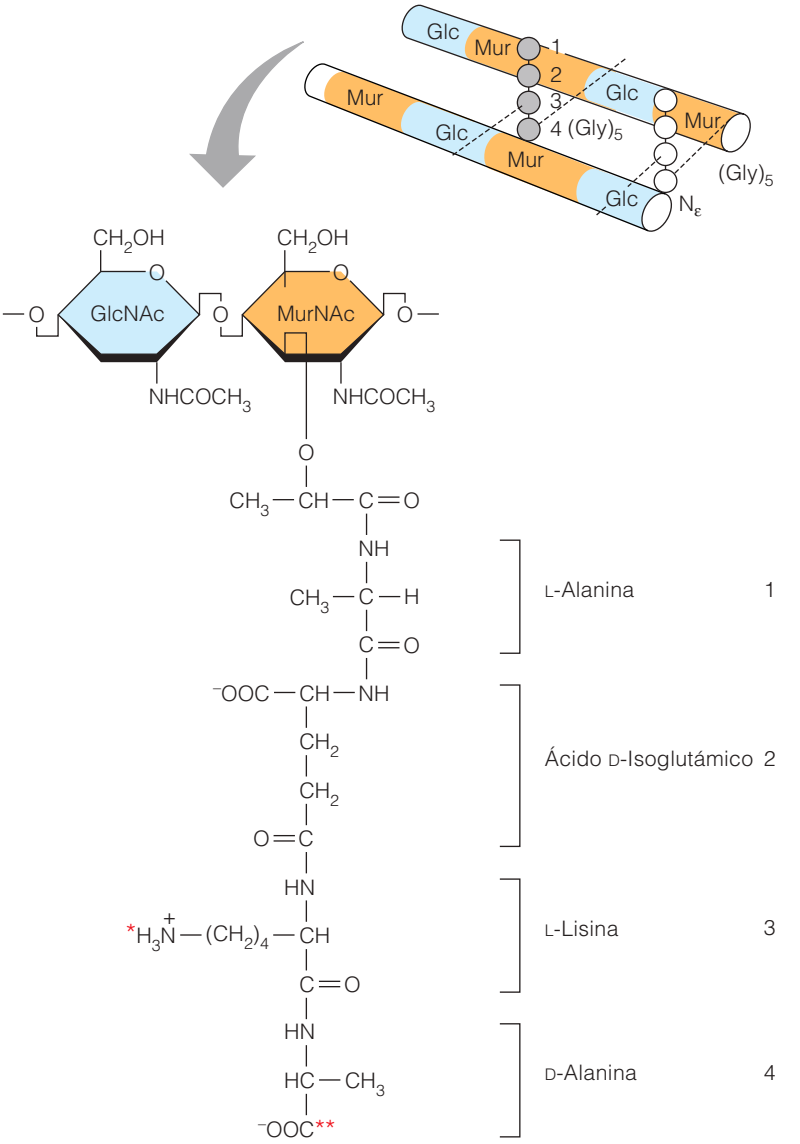
(b) Gramnegativo:
Escherichia coli

FIGURA **9.25**

Paredes celulares bacterianas. En estos esquemas se muestran las estructuras de los dos tipos de pared celular bacteriana. **(a)** La pared celular de una bacteria grampositiva representativa, *Staphylococcus aureus*, consta de una capa de peptidoglucano gruesa formada por cadenas de polisacáridos y péptidos cortos. Los péptidos están unidos mediante pentapéptidos de glicina. **(b)** La pared celular de una bacteria gramnegativa representativa, *Escherichia coli*, tiene una capa de peptidoglucano fina y una membrana lipídica externa. Los enlaces cruzados aquí son entre los tetrapéptidos unidos a los residuos de NAM de las cadenas adyacentes.

FIGURA **9.26**

Capa de peptidoglucano de las bacterias grampositivas. Los enlaces cruzados entre los péptidos se forman mediante cadenas de pentaglicina entre el grupo ε-amino de la lisina (*) de una cadena, y el grupo carboxilo terminal de la alanina (**) de la cadena adyacente.



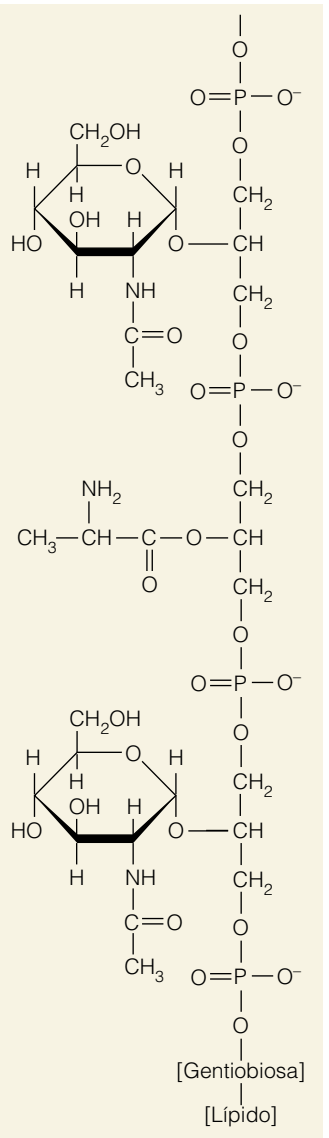


FIGURA **9.27**

Estructura de un ácido lipoteicoico. Los grupos D-alanil y NAG están dispuestos de forma irregular en la cadena, que está anclada en la membrana por el lípido.

por su otro extremo al residuo D-Ala terminal de una cadena adyacente. El resultado es la formación de una estructura con enlaces cruzados covalentes que envuelve a la célula bacteriana. Toda la pared celular puede considerarse como una única molécula enorme formada por múltiples capas de cadenas de peptidoglucano con enlaces cruzados. Además de los componentes mencionados anteriormente, hay unos complejos alargados de lípido-oligosacárido, denominados **ácidos lipoteicoicos** (Figura 9.27), que sobresalen de la membrana a través de la pared de peptidoglucano. La pared celular protege a las bacterias de la lisis cuando se encuentran en la sangre de los animales hospedadores.

En las bacterias gramnegativas, la capa de peptidoglucano es mucho más delgada. Aunque está presente la misma estructura polisacárida básica, las cadenas peptídicas y sus uniones son algo diferentes (véase la Figura 9.25b).

Evidentemente, el ensamblaje de una estructura tan compleja como la pared celular bacteriana requiere una batería de enzimas y reacciones. Diversos antibióticos (por ejemplo, la penicilina) inhiben el crecimiento bacteriano al interferir sobre la formación de la capa de peptidoglucano. Es adecuado retardar el

examen de estos antibióticos hasta que consideremos las rutas de síntesis de los hidratos de carbono en el Capítulo 16. Sin embargo, debemos señalar que una clase de sustancias antibióticas que se encuentran en la naturaleza actúa no sólo interfiriendo sobre la síntesis de la pared celular, sino también atacando a la propia capa de peptidoglucano. Estas sustancias son las **lisozimas**, enzimas muy extendidas, que se encuentran por ejemplo en los bacteriófagos, la clara del huevo y las lágrimas del ser humano. En el huevo y las lágrimas ayudan a mantener la asepsia; en los bacteriófagos ayudan al fago a existir en las bacterias infectadas. Las lisozimas catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos entre los residuos GlcNAc y MurNAc en el polisacárido. Así pues, estas enzimas disuelven la pared celular, dando lugar a la lisis y la muerte bacteriana.

Glucoproteínas

Más de la mitad de todas las proteínas eucariotas tienen cadenas de oligosacáridos o polisacáridos unidas a ellas de forma covalente. Existe una asombrosa variedad de proteínas modificadas de este tipo, a las que se denomina **glucoproteínas**, que pueden tener funciones muy diversas. En la Tabla 9.6 se presentan algunos ejemplos representativos.

GLUCOPROTEÍNAS CON ENLACES N- Y CON ENLACES O-

Las cadenas de sacáridos (**glucanos**) pueden ligarse a las proteínas de dos formas principales (Figura 9.28). Los **glucanos con enlace N-** se unen, generalmente a través de la *N*-acetilglucosamina, o a veces a través de la *N*-acetilgalactosamina, al grupo amino de la cadena lateral de un residuo de asparagina. Una secuencia frecuente alrededor de la asparagina es la de –Asn–X–Ser/Thr–, donde X puede ser cualquier aminoácido. Los **glucanos con enlace O-** suelen unirse mediante un enlace glucosídico O- entre la *N*-acetilgalactosamina y el grupo hidroxilo de un residuo de treonina o serina, aunque en algunos casos, por ejemplo en el colágeno, se utiliza la hidroxilisina o la hidroxiprolina. De los ejemplos de la Tabla 9.6, los dos primeros tienen enlace O- y los restantes, enlace N-.

Los oligosacáridos y las proteínas pueden unirse para formar glucoproteínas de dos maneras: los glucanos con enlaces O- se unen a través de los hidroxilos de treonina o serina, y los glucanos con enlaces N- a través de los grupos amino de la asparagina.

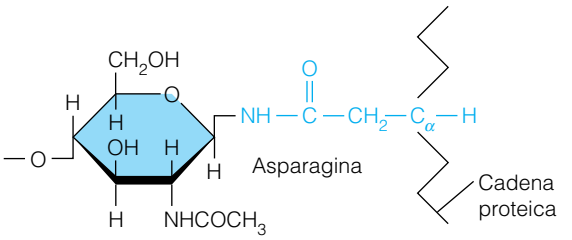
TABLA 9.6 Porciones de hidratos de carbono de algunas glucoproteínas

Glucoproteína	Oligosacárido[a] y Lugar de Unión (en rojo)	Núm. de Cadenas en las Proteínas	Función de la Proteína
Proteína anticongelante de los peces	Gal–GalNAc–Thr	De 4 a 50 en diferentes proteínas	Reducción del punto de congelación de los líquidos corporales
Mucina submaxilar de la oveja	Sia–GalNAc–Ser (or Thr)	Muchas	Lubricación
Ribonucleasa B	$(Man)_6$–GlcNAc–GlcNAc–Asn	1	Enzima
Ovoalbúmina de la gallina	Man–Man \ / Man–GlcNAc–GlcNAc–Asn / \ Man–Man | Man (sólo una de las muchas variantes)	1	Proteína de almacenamiento en la clara de huevo
IgG humana	Sia–Gal–GlcNAc–Man \ Fuc | Man–GlcNAc–GlcNAc–Asn / Sia–Gal–GlcNAc–Man (muchas otras variantes en otros anticuerpos)	2 o más	Molécula de anticuerpo

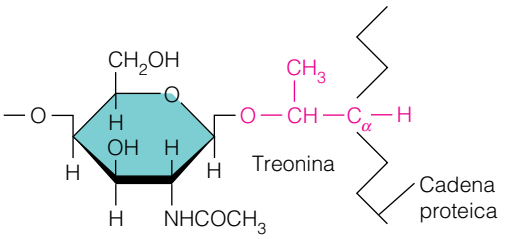
[a]Para mayor brevedad, se han eliminado las formas anoméricas y los enlaces. Para una información más detallada, véase R. C. Hughes, *Glycoproteins* (Londres: Chapman and Hall, 1983).

FIGURA **9.28**

Enlaces de las glucoproteínas. Se muestran dos formas de unión de las cadenas de oligosacáridos (glucanos) con las proteínas para formar glucoproteínas. **(a)** Unión de un glucano con enlace N-. El enlace se establece entre la *N*-acetilglucosamina y la cadena lateral de amida de una asparagina. En las cadenas con enlaces N-, la *N*-acetilglucosamina es casi siempre el primer residuo de azúcar. **(b)** Unión de un glucano con enlace O-. Un enlace glucosídico O- une la *N*-acetilgalactosamina al hidroxilo de la treonina o de la serina.



(a) *N*-Acetilglucosamina

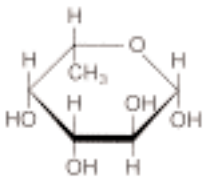


(b) *N*-Acetilgalactosamina

Glucanos con enlace N-

Un estudio cuidadoso de muchas glucoproteínas ha descubierto la existencia de una enorme variedad de cadenas laterales de oligosacáridos con enlaces N-, que a menudo presentan una estructura ramificada compleja. Sin embargo, es frecuente que se observe un motivo común repetido. La siguiente estructura actúa frecuentemente como base para la elaboración posterior:





α-L-Fucosa

Este motivo puede observarse, por ejemplo, en las porciones de glucano de la ovoalbúmina y las inmunoglobulinas. En la Tabla 9.6 se muestra la estructura del oligosacárido que está unido a la inmunoglobulina G (IgG) humana. El residuo que se indica con Fuc es la α-L-fucosa, un residuo unido frecuentemente cerca de la conexión proteica de los glucanos con enlace N-. Las inmunoglobulinas constituyen un ejemplo importante de la función de información que tienen las cadenas de glucanos en las glucoproteínas. Recuérdese del Capítulo 7 que todas las inmunoglobulinas poseen un hidrato de carbono unido al dominio constante de cada cadena pesada. Los distintos tipos de inmunoglobulinas han de ser reconocidos, tanto para su distribución adecuada en los tejidos como para su interacción con las células fagocitarias, que destruirán el complejo antígeno-inmunoglobulina. Como mínimo, una parte de este reconocimiento se basa en las diferencias existentes en las cadenas de oligosacáridos.

Otro uso muy importante de los oligosacáridos con enlaces N- es el marcaje intracelular en los organismos eucariotas. En los Capítulos 16 y 28 veremos cómo se marcan específicamente las proteínas destinadas a determinados orgánulos o a la excreción mediante oligosacáridos durante el procesado posterior a la traducción. Este marcado garantiza que lleguen a sus destinos adecuados.

Glucanos con enlace O-

Muchas proteínas tienen oligosacáridos con enlaces O- que cumplen diversas funciones. Los peces del Antártico contienen una glucoproteína que actúa como "anticongelante", impidiendo la congelación de los líquidos corporales aun en agua extremadamente fría. Las **mucinas**, glucoproteínas que se encuentran en cantidades abundantes en las secreciones salivales, contienen muchos glucanos cortos con enlaces O-. Las mucinas muy extendidas e hidratadas aumentan la viscosidad de los líquidos en los que están disueltas. Algunos glucanos con enlaces O- parecen actuar también en el direccionamiento intracelular y en la identificación celular y molecular. Un ejemplo que nos concierne a todos nosotros son los antígenos de los grupos sanguíneos.

ANTÍGENOS DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS

Un grupo muy importante de oligosacáridos es el de los **antígenos de los grupos sanguíneos**. En algunas células, estos antígenos están unidos a las proteínas de la membrana en forma de glucanos con enlace O-. Otra posibilidad es que el oligosacárido se una a una molécula lipídica para formar un **glucolípido** (véase el Capítulo 10). La porción lipídica de la molécula facilita el anclaje del antígeno en la superficie externa de las membranas de los eritrocitos. Son estos oligosacáridos los que determinan los tipos de grupos sanguíneos en el ser humano. Su presencia en una muestra de sangre se detecta mediante la determinación del grupo sanguíneo, es decir, comprobando si los anticuerpos contra un determinado antígeno hacen que los eritrocitos de esa muestra de sangre se apelotonen o aglutinen. Aunque el sistema constituido por los grupos A, B, AB y O es probablemente el más conocido, es tan sólo uno de los 14 sistemas de grupos sanguíneos que se han caracterizado genéticamente, con más de 100 antígenos de grupos sanguíneos diferentes. Estas sustancias están también presentes en muchas células y tejidos, aparte de la sangre, pero a menudo nos centramos en la sangre a causa del amplio uso de la determinación del grupo sanguíneo para establecer relaciones familiares o para seleccionar sangre para las transfusiones.

En aras de una mayor simplicidad, tomaremos como ejemplo el sistema ABO. En la Figura 9.29 se presentan los oligosacáridos correspondientes a cada uno de estos grupos sanguíneos. Casi todos los seres humanos son capaces de producir el sacárido del grupo O, pero la adición de galactosa (para formar el grupo B) o de *N*-acetilgalactosamina (para formar el grupo A) requiere otra enzima (véase el Capítulo 16 para más detalles sobre esta síntesis). Algunas personas poseen una de estas enzimas, algunas poseen la otra, y unas pocas son heterocigotas y pueden producir ambas. Las personas heterocigotas tienen sangre del grupo AB, y presentan oligosacáridos tanto A como B, en las superficies celulares.

El ser humano es capaz de producir anticuerpos contra los oligosacáridos A y B, pero los del grupo O no son antigénicos. Normalmente, una persona no produce anticuerpos contra sus propios antígenos, pero sí los elabora contra el otro grupo antigénico. Así pues, una persona con sangre del grupo A es portador de anticuerpos dirigidos contra el polisacárido B. Si se le transfunde sangre de un donante del grupo B, estos anticuerpos provocarán una agregación y precipitación de las células sanguíneas recibidas. Una persona del grupo B tampoco puede recibir sin peligro la sangre del grupo A. Las personas con sangre del grupo O tienen normalmente anticuerpos contra el A y contra el B y, por tanto, no pueden recibir sangre de ninguno de estos dos grupos. Las personas con el grupo AB, puesto que son portadores, de por sí, de los antígenos A y B, no tienen anticuerpos contra ninguno de ellos.

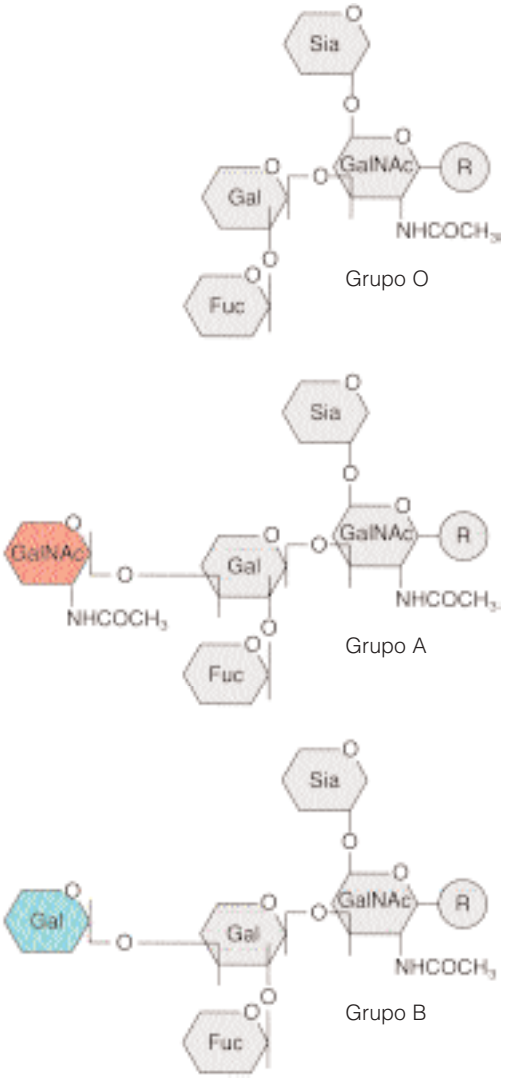


FIGURA **9.29**

Antígenos del grupo sanguíneo ABO. El oligosacárido O (arriba) no desencadena la formación de anticuerpos en la mayor parte de los seres humanos. Los antígenos A y B se forman por la adición de GalNAc o Gal, respectivamente, al oligosacárido O. Tanto el antígeno A como el B pueden desencadenar la formación de un anticuerpo específico. En esta figura, R puede representar una molécula proteica o una molécula lipídica.

Las sustancias de los grupos sanguíneos son un conjunto de oligosacáridos antigénicos unidos a la superficie de los glóbulos rojos.

TABLA 9.7 Relaciones transfusionales entre los distintos grupos sanguíneos ABO

La persona tiene el Grupo Sanguíneo:	Elabora anticuerpos contra:	Pueda recibir sin peligro sangre de:	Puede donar sin peligro sangre a:
O	A, B	O	O, A, B, AB
A	B	O, A	A, AB
B	A	O, B	B, AB
AB	Ninguno	O, A, B, AB[a]	AB

[a]En principio, esta relación es válida. Sin embargo, a las personas AB no se les transfunde nunca sangre de otros grupos, puesto que los anticuerpos del donante podrían reaccionar con los antígenos del receptor.

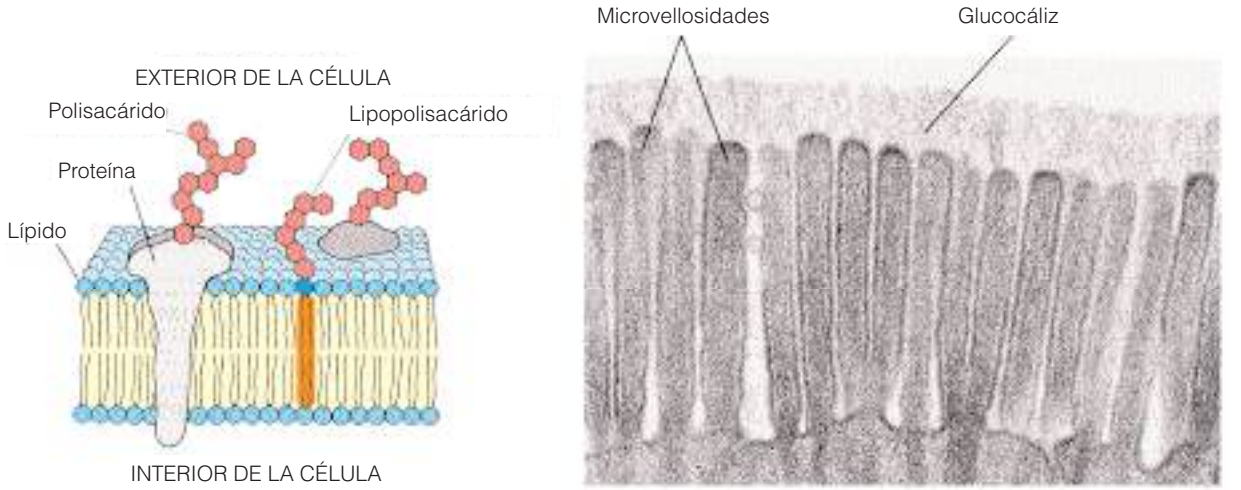
En la donación de sangre, la situación es la inversa. Las personas con sangre del grupo O, que no contienen determinantes antigénicos, pueden donar sangre sin peligro a cualquier otra persona y son los "donantes universales". Las personas del grupo AB *sólo* pueden donar sangre a otras personas AB, y una persona de cualquier otro grupo tendrá anticuerpos contra A, o B, o ambos. Estas relaciones se resumen en la Tabla 9.7.

Los oligosacáridos como marcadores celulares

Muchas células llevan en su superficie una capa compleja de polisacáridos, el glucocáliz.

Los biólogos están empezando a darse cuenta de que las moléculas como los antígenos de los grupos sanguíneos constituyen tan sólo un caso especial dentro de un fenómeno mucho más general, el del marcaje celular por los oligosacáridos. En un organismo multicelular, es esencial que los distintos tipos de células estén marcadas en sus superficies de forma que puedan interactuar de la forma adecuada con otras células y moléculas, y que hagan posible que un organismo pueda reconocer sus propias células como inmunológicamente distintas de las células extrañas. En consonancia con este punto de vista, cada vez está más claro que las superficies de muchas células están cubiertas casi por completo por polisacáridos, que están unidos a proteínas o a lípidos de la membrana celular (Figura 9.30a). Algunas células animales poseen una cubierta de polisacáridos muy gruesa, denominada **glucocáliz** (literalmente "capa de azúcar"). En la Figura 9.30b se muestra el glucocáliz de una célula intestinal. Los oligosacáridos del glucocáliz interactúan con otras sustancias: con las bacterias en el intestino y con el colágeno de la matriz intercelular en algunos otros tejidos.

Para que los oligosacáridos o los polisacáridos actúen como señales de reconocimiento, debe haber proteínas que se unan a ellos de manera específica. Una clase de proteínas de este tipo es la de las inmunoglobulinas. Otro grupo muy distinto de proteínas que unen sacáridos es el de las **lectinas**. Éstas se identificaron por primera vez en los tejidos vegetales, donde parecen desempeñar funciones defensivas y ayudar en la adhesión de las bacterias fijadoras de nitrógeno a las raíces. Actualmente se sabe que las lectinas se encuentran muy extendidas y que desempeñan una gran variedad de funciones también en los animales. Así, por ejemplo, las lectinas parecen intervenir en las interacciones que se producen entre las células y las proteínas de la matriz intercelular, como el colágeno, y ayudan a mantener la estructura tisular y orgánica. Las lectinas de las paredes de las bacterias intestinales facilitan la fijación de las bacterias al glucocáliz del epitelio intestinal. El hecho de que los polisacáridos de la superficie celular sean importantes en la determinación de



(a) Oligosacáridos de la superficie celular **(b)** Glucocáliz de polisacáridos

FIGURA **9.30**

Factores de reconocimiento de la superficie celular. **(a)** Representación esquemática de una membrana lipídica. Los oligosacáridos están unidos a la superficie externa, mediante proteínas embebidas en la membrana o mediante moléculas de lípidos especiales. **(b)** Fotografía de microscopia electrónica de la superficie de una célula epitelial intestinal. Las proyecciones, denominadas microvellosidades, están cubiertas en su superficie externa por una capa de cadenas de polisacáridos ramificadas, unidas a proteínas de la membrana celular. Esta capa de hidratos de carbono, denominada glucocáliz, se encuentra en la superficie de muchas células animales.

(b) Cortesía del Dr. Susumu Ito.

las interacciones célula-célula (incluyendo la adhesión y el impedimento) tiene un gran significado médico. Por ejemplo, se sabe que los polisacáridos de las superficies de muchas células cancerosas son anormales, lo cual puede explicar en parte la pérdida de especificidad tisular que este tipo de células presenta normalmente.

¿Por qué desempeñan los oligosacáridos con tanta frecuencia el papel de marcadores celulares? No lo sabemos, pero se plantean varias posibilidades. En primer lugar, los oligosacáridos pueden presentar una notable variedad de estructuras en cadenas relativamente cortas. Las múltiples posibilidades de elección de monómeros (entre ellos, azúcares modificados), enlaces y patrones de ramificación permiten utilizar un vocabulario amplio, pero específico. En segundo lugar, los oligosacáridos son antígenos especialmente potentes, lo cual implica que pueden desencadenar rápidamente anticuerpos específicos contra ellos (véase el Capítulo 7). No está claro si esta interacción es el resultado de una propiedad intrínseca de las moléculas de azúcar o de las moléculas de anticuerpos. Es posible que los anticuerpos evolucionaran como una defensa frente a las bacterias, que tienen unas paredes con abundantes polisacáridos, y que ello favoreciera el uso de los sacáridos como dianas.

Parece probable que la bioquímica de los hidratos de carbono, que durante mucho tiempo se ha considerado una parte más bien prosaica de este campo, esté a punto de entrar en una nueva fase muy atractiva. Al ir centrando los bioquímicos cada vez más su atención en las relaciones entre las células y los tejidos que forman un organismo integrado, observan que muchas de estas relaciones se dan a través de los hidratos de carbono.

RESUMEN

Los hidratos de carbono (o sacáridos) son compuestos que tienen la fórmula estequiométrica $(CH_2O)_n$ o derivados de los mismos. Son un producto importante de la fotosíntesis, y su oxidación proporciona una fuente de energía principal para las plantas y los animales. Dado que la mayor parte de los monosacáridos tienen múltiples centros quirales, estos sacáridos se encuentran en pares enantioméricos (imágenes especulares D y L) de diastereómeros múltiples. Los monosacáridos pueden ser aldosas o cetosas. La mayor parte de los importantes son aldosas D. Los que contienen cinco carbonos o más se encuentran principalmente en forma de anillos de cinco (furanosa) o seis (piranosa) átomos, que proceden de la formación de un hemiacetal interno. Estos anillos existen en forma de anómeros α o β, y presentan también múltiples conformaciones (p. ej., bote y silla).

Los derivados importantes de los monosacáridos comprenden los ésteres fosfato, los ácidos y lactonas, los alditoles, los aminoazúcares y los glucósidos. Los ésteres fosfato son importantes como intermediarios metabólicos; los glucósidos constituyen una clase amplia de compuestos formados por la eliminación de agua entre un azúcar y otro compuesto hidroxilo. Los oligosacáridos y los polisacáridos están formados mediante enlaces glucosídicos entre los monosacáridos; el enlace glucosídico es metaestable y, por tanto, las enzimas controlan su hidrólisis in vivo. Los polisacáridos tienen múltiples tipos de funciones, como el almacenamiento de azúcar (almidón y glucógeno), funciones estructurales (celulosa, xilanos, quitina, glucosaminoglucanos, polisacáridos de la pared celular) y marcadores de identificación (oligosacáridos y polisacáridos de las glucoproteínas y las superficies celulares). Los antígenos de los grupos sanguíneos son ejemplos importantes de la función de identificación.

BIBLIOGRAFÍA

General

Binkley, R. W. (1988) *Modern Carbohydrate Chemistry.* Marcel Dekker, Nueva York. Una revisión exhaustiva moderna.

Pigman, W. y D. Horton, eds. (1972) *The Carbohydrates*, 2ª ed. Academic Press, Nueva York. Una referencia útil para una información detallada sobre la estructura y la química de los hidratos de carbono.

Conformaciones de los azúcares

Barker, R. y A. S. Serianni (1986) Carbohydrates in solution: Studies with stable isotopes. *Acc. Chem. Res.* 19:307-313. Una breve revisión de los trabajos recientes con resonancia magnética nuclear de ^{13}C.

Carver, J. P. (1991) Experimental structural determination of oligosaccharides. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1:716-720.

Sacáridos de almacenamiento

Goodwin, T. W. y E. I. Mercer (1983) *Introduction to Plant Biochemistry.* Pergamon, Oxford.

Meléndez-Hevia, E., T. G. Waddell y E. D. Shelton (1993) Organization of molecular design in the evolution of metabolism: The glycogen molecule. *Biochem. J.* 295:477-483.

Paredes celulares de bacterias y plantas

Albersheim, P. (1975) The walls of growing plants. *Sci. Am.* 232(4):80-95.

Kjellen, L. y U. Lindahl (1991) Proteoglycans: Structure and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* 60:443-475.

Loomis, W. D. y R. W. Durst (1991) Boron and cell walls. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* 10:149-178. Una interacción poco habitual del boro con los polisacáridos, que participa en el crecimiento de la célula vegetal.

Schockman, G. D. y J. F. Barnett (1983) Structure, function, and assembly of cell walls of Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 37:501-527.

Glucoproteínas

Hughes, R. C. (1983) *Glycoproteins.* Chapman and Hall, Londres. Un libro pequeño, repleto de información sobre la estructura y la biosíntesis de las glucoproteínas.

Rudd, P. M. y R. A. Dwek (1997) Glycosylation: Heterogeneity and the 3D structure of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32:1-100.

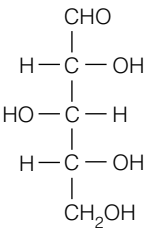
van den Steen, P., P. M. Rudd, R. A. Dwek y G. Opdenakker (1998) Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33:151-208.

Oligosacáridos e identificación celular

Barondes, S. H. (1984) Soluble lectins: A new class of extracellular proteins. *Science* 223:1259-1264.

Labat-Robert, J., R. Timpl y R. Ladiglas, eds. (1986) *Structural Glycoproteins in Cell-Matrix Interaction.* Karger, Nueva York.

PROBLEMAS

1. Dibuje las proyecciones de Haworth de lo siguiente:
   (a)  en forma de α-furanosa. Indique el nombre del azúcar.
   (b) El isómero L de (a)
   (c) α-D-GlcNAc
   (d) α-D-Fructofuranosa

2. La α-D-galactopiranosa rota el plano de la luz polarizada, pero el producto de su reducción con borohidruro sódico (galactitol) no lo hace. Explique la diferencia.

3. Dé una explicación al hecho de que la α-D-manosa sea más estable que la β-D-manosa, mientras que con la glucosa ocurre lo contrario.

*4. Utilizando los datos de la Tabla 9.2, calcule el cambio de energía libre del estado estándar para la conversión de la D-glucosa del anómero α en el β a 40°C. ¿Puede dar una explicación cualitativa de ello? ¿Cree que el ΔG se debe principalmente a la contribución de la entalpía o de la entropía?

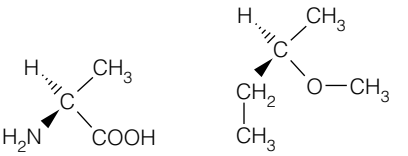
5. El disacárido α,β-trehalosa difiere de la estructura α,α de la Figura 9.16a por tener un enlace ($\alpha 1 \rightarrow \beta 1$). Dibuje su estructura.

6. Un azúcar *reductor* experimentará la reacción de Fehling (véase la página 325), que requiere un grupo aldehído libre (potencial). ¿Cuáles de los disacáridos de la Figura 9.16 son reductores y cuáles no lo son?

7. Los dextranos son polisacáridos producidos por determinadas especies de bacterias. Se trata de glucanos que tienen fundamentalmente enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ y con ramificaciones frecuentes $\alpha(1\rightarrow3)$. Dibuje una proyección de Haworth de una parte de un dextrano, incluyendo un punto de ramificación $(1\rightarrow3)$.

8. ¿Cuál es el polisacárido natural cuya estructura repetida puede simbolizarse mediante GlcUA$\beta(1\rightarrow3)$GlcNAc, con estas unidades conectadas mediante enlaces $\beta(1\rightarrow4)$?

*9. Indique cuáles de las estructuras siguientes son *R* o *S* en el sistema absoluto.

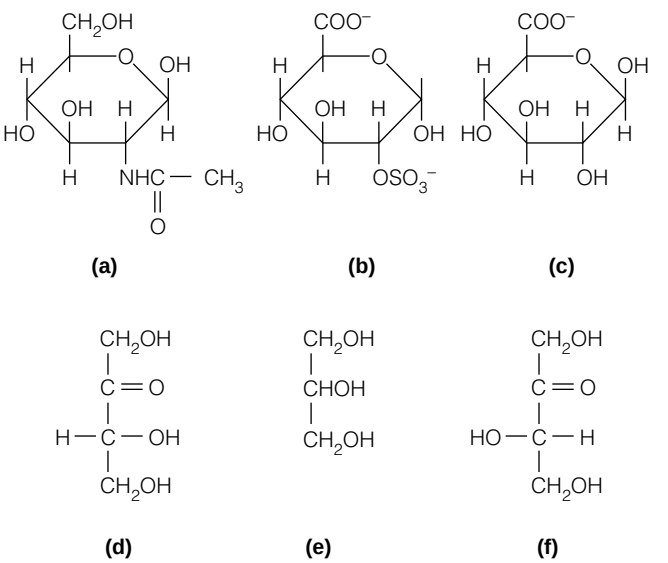


*10. El reactivo peryodato (IO_4^-) rompe de forma oxidativa los enlaces carbono-carbono entre dos carbonos portadores de grupos hidroxilo. Explique de qué forma podría utilizarse la oxidación con peryodato para diferenciar los metilglucósidos de glucosa en las formas piranosa y furanosa.

11. Dibuje (utilizando las proyecciones de Haworth) los fragmentos de estructura de xilano y glucomanano que se muestran en la página 337.

12. Una estudiante de investigación está intentando secuenciar un oligosacárido unido a un orosomucoide (véase la Figura 9A.1) procedente de una línea celular mutante. Encuentra en el análisis la presencia de Sia, Gal y GlcNAc. La rotura con neuraminidasa da resultado, pero la β-galactosidasa carece de efecto. Sugiera una explicación.

13. Uno o más de uno de los compuestos que se presentan más abajo satisface cada una de las siguientes afirmaciones. No hay que utilizar todos los compuestos; algunos pueden utilizarse dos veces. Poner la letra o las letras en la parte rayada.
   (a) Se encuentra en la quitina._____
   (b) Es un L-sacárido._____
   (c) El primer residuo unido a asparagina en los glucanos ligados por N-._____
   (d) Un ácido urónico._____
   (e) Una cetosa._____



HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 9A

Secuenciación de oligosacáridos

La determinación de las secuencias de los oligosacáridos plantea problemas similares a los que se dan en la secuenciación de las proteínas, aunque de mayor dificultad. Dados los muchos tipos de monómeros que pueden hallarse y la diversidad de enlaces entre ellos, no ha podido diseñarse un método único, como la degradación de Edman de los polipéptidos.

El primer paso en cualquier análisis de secuencia consiste, como en el análisis de los polipéptidos, en la determinación de la composición. El oligómero se hidroliza en una solución ácida, que produce una mezcla de monosacáridos. En la actualidad, estos monosacáridos casi siempre se separan, identifican y cuantifican mediante cromatografía gas-líquido.

La determinación de la secuencia en sí resulta mucho más difícil. En el pasado se utilizaron mucho los métodos químicos, pero en la actualidad éstos se han sustituido, en gran parte, por la rotura enzimática del oligómero, seguida del empleo de métodos sofisticados para la identificación de los fragmentos. Los investigadores están familiarizados en la actualidad con un gran número de enzimas (**glucosidasas**) que catalizan la ruptura de los enlaces glucosídicos entre los restos de azúcares. Algunas de estas enzimas tienen una acción muy específica. Pueden dividirse en dos grupos: *exoglucosidasas*, que eliminan el residuo terminal de una cadena de oligosacárido, y *endoglucosidasas*, que catalizan la rotura dentro de la cadena. En la Tabla 9A.1 se indican algunos ejemplos de estas enzimas.

Un ejemplo sencillo de la aplicación de glucosidasas específicas para la determinación de la secuencia es el que se presenta en la Figura 9A.1. El oligosacárido que se presenta es una parte de uno de los diversos oligosacáridos unidos a la proteína sérica *orosomucoide*. El residuo del extremo no reductor de la cadena puede eliminarse mediante la neuraminidasa. Según se indica en la Tabla 9A.1, el residuo terminal debe ser ácido siálico, unido a Gal o a GlcNAc. Se encuentra el ácido siálico,

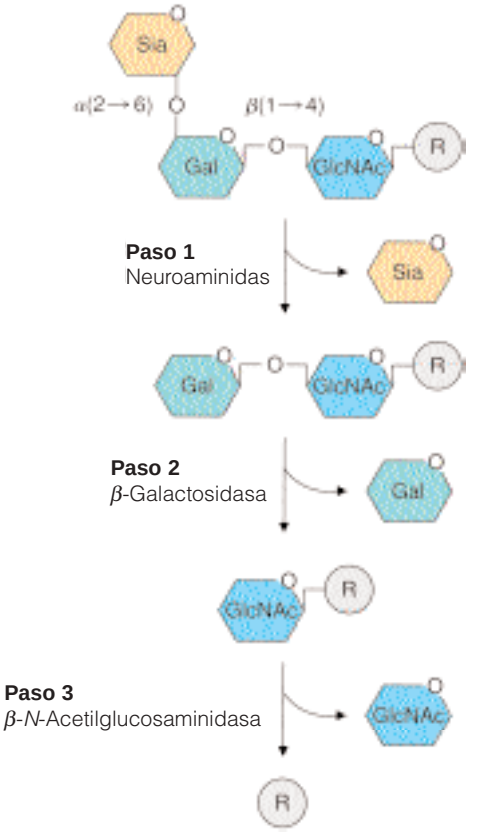


FIGURA **9.A1**

Ruptura de un oligosacárido mediante glucosidasas. El oligosacárido está unido a la proteína orosomucoide (R).

y la posterior liberación de Gal por la β-galactosidasa de *Streptococcus* indica que el residuo siguiente corresponde a Gal, unida a GlcNAc mediante un enlace 1→4. Este último residuo se confirma mediante su liberación por la β-*N*-acetilglucosaminidasa. Con el empleo de técnicas modernas de aná-

TABLE **9A.1**

ALGUNAS GLUCOSIDASAS ESPECÍFICAS UTILIZADAS PARA LA SECUENCIACIÓN DE LOS OLIGOSACÁRIDOS

Nombre de la enzima	Origen	Especificidad
Exoglucosidadas		
Neuraminidasa	*Streptococcus pneumoniae*	Siaα(2→3 or 6)Gal or Siaα(2→6)GlcNAc
β-Galactosidasa	*Streptococcus pneumoniae*	Galβ(1→4)GlcNAc
α-Fucosidasa	*Clostridium perfringens*	Fucα(1→2)Gal
Endoglucosidasas		
Endo-β-galactosidasa	*Escherichia freundii*	··· GlcNAcβ(1→3)Galβ(1→4)Glc(GlcNAc) ···
Emulsión de almendras	Almendras amargas	Rompe el enlace con Asn en muchos oligosacáridos con enlaces N-

lisis, pueden determinarse de esta forma las secuencias al nivel de picomol.

Aunque estos métodos pueden proporcionar con frecuencia una información definitiva, son laboriosos y no siempre resultan eficaces. En los últimos años se ha impulsado considerablemente la RMN de alta resolución y la espectrometría de masas como técnicas para la identificación de los oligosacáridos complejos. El empleo de estos métodos se describe en las revisiones de Jones y Wait (véase la Bibliografía), pero son demasiado técnicos para describirlos aquí.

Bibliografía

Jones, C. (1991) Nuclear magnetic resonance spectroscopy methods for the analysis of polysaccharides and glycoprotein carbohydrate chains. *Adv. Carbohydr. Anal.* 1:145-184. Incluye una revisión de las técnicas más recientes.

McCleary, B. V. y N. K. Matheson (1986) Enzymatic analysis of polysaccharide structures. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 44:147-276.

Wait, R. (1991) Structural analysis of carbohydrates by mass spectrometry. *Adv. Carbohydr. Anal.* 1:335-440.

CAPÍTULO 10

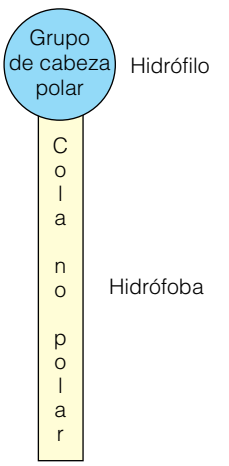
Lípidos, membranas y transporte celular

LAS MOLÉCULAS QUE ENCONTRAREMOS EN ESTE CAPÍTULO, LOS **LÍPIDOS,** LLEVAN a cabo múltiples funciones. Alguna de ellas, las grasas, se utilizan para el almacenamiento de energía y el aislamiento térmico. Sin embargo, la porción más grande de los lípidos, en la mayor parte de las células, se emplea para formar **membranas**, los tabiques que dividen los compartimientos y separan a la célula de sus alrededores. Las membranas son mucho más que unas paredes pasivas, puesto que contienen unas puertas muy selectivas que facilitan el paso de determinadas sustancias en determinadas direcciones, al tiempo que impiden por completo el paso de otras. Esta propiedad de *permeabilidad selectiva de la membrana* permite que las distintas partes de la célula realicen sus operaciones específicas.

Los lípidos constituyen un grupo extraordinariamente diverso de moléculas y no los consideraremos todos en este capítulo. Además de los lípidos que realizan las funciones ya descritas, los hay que actúan como vitaminas (por ejemplo, la vitamina E) y otros que forman las grandes clases de hormonas esteroideas y de prostaglandinas. Describimos aquí algunas de ellas, pero dejaremos el estudio de los lípidos con funciones más especializadas y su química para los Capítulos 18 y 19. En esos capítulos analizamos también el transporte lipídico y los complejos lípido-proteína o *lipoproteínas* que intervienen en ese proceso.

Estructura molecular y comportamiento de los lípidos

A diferencia de las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos, los lípidos no son polímeros, sino que son moléculas bastante pequeñas que presentan una fuerte tendencia a asociarse mediante fuerzas no covalentes. Generalmente, los lípidos se caracterizan por el tipo de estructura que se indica en el margen: una "cabeza" hidrófila polar, conectada a una "cola" hidrocarbonada hidrófoba apolar. Las moléculas lipídicas en un medio acuoso tienden a agruparse formando una asociación no covalente por dos razones fundamentales. Al igual que los grupos apolares de las proteínas se asocian mediante un efecto hidrófobo que estimula la entropía, las colas apolares de los lípidos también lo hacen.



Estructura general de los lípidos

Las moléculas lipídicas son anfipáticas. Tienden a formar monocapas superficiales, bicapas, micelas o vesículas cuando entran en contacto con el agua.

Una segunda fuerza de estabilización es la que procede de la interacción de van der Waals entre las zonas hidrocarbonadas de las moléculas.

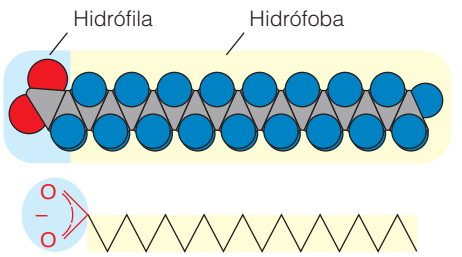
Por otro lado, los grupos de cabeza hidrófilos polares de las moléculas lipídicas tienden a asociarse con el agua. En consecuencia, los lípidos son ejemplos claros del tipo de sustancia anfipática que se ha descrito en el Capítulo 2. Esta "esquizofrenia molecular" tiene varias consecuencias posibles, como la formación de monocapas de superficie, bicapas, micelas y vesículas, por los lípidos en contacto con el agua (véase la Figura 2.15). Desde un punto de vista biológico, la más importante de estas consecuencias es la tendencia de los lípidos a formar micelas y bicapas de membrana. El tipo de estructura exacta que se forma cuando un lípido entra en contacto con el agua depende de la estructura molecular específica de las partes hidrófila e hidrófoba de esa molécula lipídica. Así pues, conviene analizar en este momento la estructura de algunos de los tipos principales de lípidos.

ÁCIDOS GRASOS

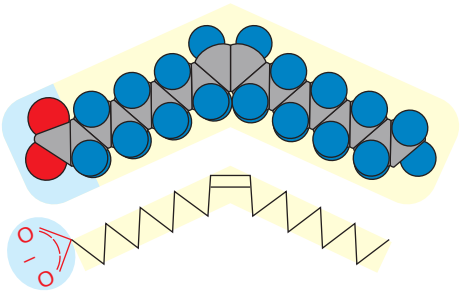
Los lípidos más sencillos son los **ácidos grasos**, que son también componentes de muchos lípidos más complejos. Su estructura básica ilustra el modelo general de lípido que se ha descrito antes: un grupo carboxilato hidrófilo unido a un extremo de una cadena hidrocarbonada (a menudo larga). Un ejemplo es el *ácido esteárico*, que tiene una amplia distribución en los organismos. En la Figura 10.1a y c se presenta su forma ionizada, el ion *estearato*. El ácido esteárico es un ejemplo de un ácido graso **saturado**, en el que todos los carbonos de la cola están saturados con átomos de hidrógeno. En la Tabla 10.1 se indican algunos de los ácidos grasos saturados con mayor importancia biológica. Obsérvese que cada uno de ellos tiene un nombre común (como ácido esteárico) y un nombre sistemático (en este caso, ácido *n*-octadecanoico).

La mayoría de los ácidos grasos que existen en la naturaleza contienen un número par de átomos de carbono. Si hay dobles enlaces (insaturación), generalmente son de tipo *cis*.

Muchos de los ácidos grasos importantes que existen en la naturaleza están **insaturados**, es decir, contienen uno o más dobles enlaces (véase la Tabla 10.1). El *ácido oleico*, que se encuentra en muchas grasas animales, da lugar al ion *oleato* (Figura 10.1b y c). En la mayor parte de los ácidos grasos insaturados presentes en la naturaleza, la orientación de los dobles enlaces es *cis* en vez de *trans*. Esta orientación



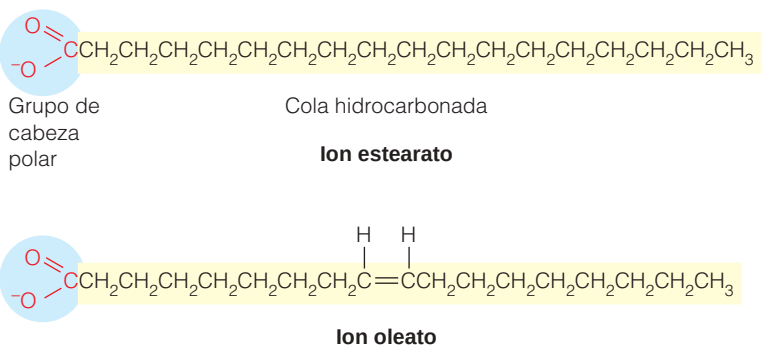
(a) Ion estearato



(b) Ion oleato

FIGURA **10.1**

Estructuras de las formas ionizadas de algunos ácidos grasos representativos. Las partes hidrófilas (grupos de cabeza) de las moléculas se indican mediante un fondo azul pálido en los modelos; las partes hidrófobas (colas) se indican en amarillo. **(a)** Anión del ácido esteárico, un ácido graso saturado. **(b)** Anión del ácido oleico, un ácido graso insaturado con un doble enlace *cis*. **(c)** Fórmulas de (a) y (b).



(c) Fórmulas

TABLA 10.1 Algunos ácidos grasos de importancia biológica

Nombre Común	Nombre Sistemático	Abreviatura	Estructura	Punto de Fusión (°C)
Ácidos Grasos Saturados				
Cáprico	*n*-Decanoico	10:0	$CH_3(CH_2)_8COOH$	31.6
Láurico	*n*-Dodecanoico	12:0	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	44.2
Mirístico	*n*-Tetradecanoico	14:0	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	53.9
Palmítico	*n*-Hexadecanoico	16:0	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	63.1
Esteárico	*n*-Octadecanoico	18:0	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	69.6
Araquídico	*n*-Eicosanoico	20:0	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	76.5
Behénico	*n*-Docosanoico	22:0	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$	81.5
Lignocérico	*n*-Tetracosanoico	24:0	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	86.0
Cerótico	*n*-Hexacosanoico	26:0	$CH_3(CH_2)_{24}COOH$	88.5
Ácidos Grasos Insaturados				
Palmitoleico	*cis*-9-Hexadecenoico	16:1cΔ9	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	0
Oleico	*cis*-9-Octadecenoico	18:1cΔ9	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	16
Linoleico	*cis,cis*-9,12-Octadecadienoico	18:2cΔ9,12	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	5
Linolénico	all-*cis*-9,12,15-Octadecatrienoico	18:3cΔ9,12,15	$CH_3CH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	−11
Araquidónico	all-*cis*-5,8,11,14-Eicosatetraenoico	20:4cΔ5,8,11,14	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_3COOH$	−50
Ácidos Ramificados y Cíclicos				
Tuberculoesteárico	*l*-D-10-Metiloctadecanoico		$CH_3(CH_2)_7\underset{\displaystyle CH_2}{\overset{\displaystyle CH_3}{\underset{\vert}{\overset{\vert}{CH}}}}(CH_2)_8COOH$	13.2
Lactobacílico	ω-(2-*n*-Octilciclopropil)-octadecanoico		$CH_3(CH_2)_5CH{-}CH(CH_2)_9COOH$	29

tiene un efecto importante sobre la estructura molecular, puesto que cada doble enlace *cis* introduce una flexión en la cadena hidrocarbonada. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, aunque en la Figura 10.1 se presentan las moléculas en forma de estructuras rígidas, existe libertad de rotación alrededor de cada enlace sencillo de la cadena hidrocarbonada. Son posibles, pues, múltiples conformaciones.

La mayor parte de los ácidos grasos presentes en la naturaleza tiene un número par de átomos de carbono. Aunque las cadenas hidrocarbonadas son lineales en la mayor parte de los ácidos grasos, algunos de ellos (que se encuentran fundamentalmente en las bacterias) contienen ramificaciones o incluso estructuras cíclicas (véase la Tabla 10.1).

Para tener una forma más cómoda y clara de denominar a los ácidos grasos, se ha ideado el sistema de abreviaturas que se presenta en la Tabla 10.1. Las reglas son sencillas: el número antes de los dos puntos da el número total de carbonos, y el número tras los dos puntos da el total de dobles enlaces. Las configuraciones y posiciones de los dobles enlaces se indican mediante c (*cis*) o t (*trans*), seguido por Δ y uno o varios números. Estos números corresponden al átomo de carbono (contando a partir del carboxilo) en el que se inicia cada doble enlace. Así, por ejemplo, el ácido oleico se designa por 18:1cΔ9, y el linolénico por 18:3cΔ9,12,15.

Los ácidos grasos son ácidos débiles, con valores de pK_a que son, en promedio, de alrededor de 4.5:

$$RCOOH \underset{pK_a \cong 4.5}{\rightleftharpoons} RCOO^- + H^+$$

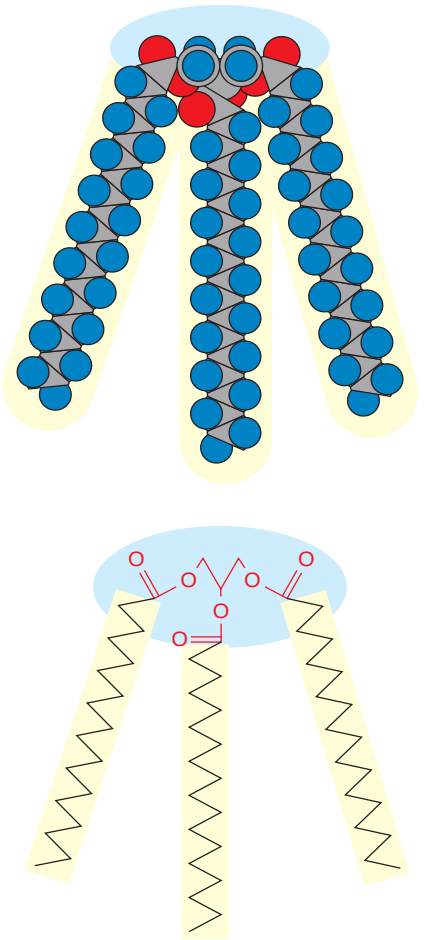


FIGURA **10.2**

Estructura de la triestearina, una grasa. La triestearina es un triacilglicerol (grasa) formado por glicerol y tres moléculas de estearato. La parte hidrófila de la triestearina la forman el glicerol y los grupos de cabeza de los estearatos; la parte hidrófoba la forman las colas hidrocarbonadas de los estearatos.

TABLE 10.2 Composición de algunas grasas naturales en porcentaje de ácidos grasos totales

Número de Átomos de C en la cadena	Porcentaje presente en: Aceite de oliva	Mantequilla[a]	Grasa bovina
Saturados			
4-12	2	11	2
14	2	10	2
16	13	26	29
18	3	11	21
Insaturados			
16-18	80	40	46

[a] Las cifras no suman un total del 100% ya que la sustancia contiene pequeñas cantidades de otros ácidos grasos.

Así pues, estos ácidos se encuentran a pH fisiológico en forma aniónica ($RCOO^-$) y, en estas condiciones, sería más correcto hablar de estearato y oleato, en vez de ácido esteárico u oleico. La carga del grupo carboxilo hace que éste sea extremadamente hidrófilo, mientras que las colas hidrocarbonadas largas son muy hidrófobas. Como consecuencia de ello, los ácidos grasos se comportan como sustancias anfipáticas características cuando intentamos disolverlos en agua. Como se indica en la Figura 2.15, tienden a formar **monocapas** en la separación aire-agua, con los grupos carboxilo hidrófilos sumergidos en el agua y las colas hidrocarbonadas fuera del agua.

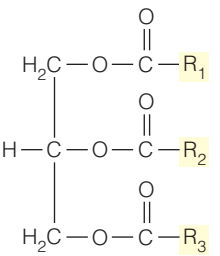
Si se agitan los ácidos grasos con agua, formarán **micelas**, en las que las colas hidrocarbonadas se agrupan juntas dentro de la estructura y las cabezas de carboxilato están en contacto con el agua circundante. Si los ácidos grasos se mezclan con agua *y* una sustancia oleosa o grasienta (por ejemplo, un hidrocarburo), las micelas se formarán sobre las gotitas del aceite, emulsificándolo. Este comportamiento es la base de la acción de los jabones y los detergentes sintéticos.

Aunque los ácidos grasos desempeñan funciones importantes en el metabolismo, nunca se encuentran en las células vivas grandes cantidades de los ácidos libres ni de sus aniones. En lugar de ello, estos compuestos se encuentran casi siempre como componentes de lípidos más complejos. Pasemos ahora a considerar algunas de estas clases de moléculas lipídicas con importancia biológica.

TRIACILGLICEROLES: GRASAS

Las cadenas hidrocarbonadas largas de los ácidos grasos son extraordinariamente eficaces para el almacenamiento de energía, ya que contienen carbono en una forma totalmente reducida y, por lo tanto, proporcionan una cantidad máxima de energía con la oxidación. De hecho, constituyen reservas de energía mucho más eficaces que los hidratos de carbono. (En el Capítulo 18 se realizará un análisis explícito de esta diferencia.) Por este motivo, los lípidos los utilizan muchos organismos, incluyendo el ser humano, para el almacenamiento de energía.

El almacenamiento de los ácidos grasos en el organismo se realiza en gran parte en forma de **triacilgliceroles** o **grasas**. Estas sustancias son *triésteres* de ácidos grasos y **glicerol**; su fórmula general es la siguiente:



Triacilglicerol

en donde R_1, R_2 y R_3 corresponden a las colas hidrocarbonadas de diversos ácidos grasos. Hemos dibujado la estructura con las cadenas hidrófobas hacia la derecha, según nuestro convenio. Dicho convenio no indica una configuración estereoquímica. (La configuración estereoquímica correcta está dibujada en la Figura 10.6a.) Como ejemplo concreto, si $R_1 = R_2 = R_3 = (CH_2)_{16}CH_3$, la cola hidrocarbonada del ácido esteárico, la molécula es la *triestearina* (Figura 10.2). Sin embargo, la mayor parte de los triacilgliceroles contienen una mezcla de ácidos grasos, entre ellos algunos insaturados. En la Tabla 10.2 se indica la composición de ácidos grasos de algunas grasas naturales. La comparación de la experiencia co-

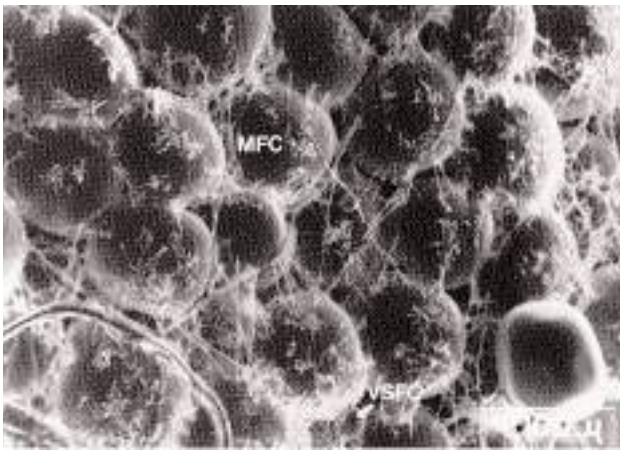


FIGURA **10.3**

Adipocitos. Los adipocitos o células de almacenamiento de grasa de los animales forman una gran parte del tejido adiposo. Las siglas MFC y VSFC corresponden a "célula grasa madura" y "célula grasa muy pequeña" respectivamente.

Tomado de P. Julien, J.-P. Despres y A. Angel, *J. Lipid Res.* (1989) 30:293-299. Utilizado con permiso.

mún con estas grasas y los datos de la tabla descubren una correlación interesante. Las grasas con abundantes ácidos grasos insaturados (como el aceite de oliva) son líquidas a temperatura ambiente, mientras que las que tienen un contenido más elevado de ácidos grasos saturados (como la mantequilla) son más sólidas. De hecho, una grasa totalmente saturada es un sólido bastante duro, en especial si las cadenas hidrocarbonadas son largas, lo que queda claro observando los datos de los puntos de fusión de la Tabla 10.1. La razón es sencilla: las cadenas saturadas largas pueden colocarse muy juntas para formar estructuras semicristalinas regulares. En cambio, la flexión que imponen uno o más dobles enlaces *cis* (véase la Figura 10.1b y c) hace que sea más difícil la compactación molecular. De hecho, la **hidrogenación** parcial de los aceites grasos insaturados (como el aceite de maíz) se utiliza comercialmente para convertirlos en grasas más sólidas, que pueden utilizarse como sustitutos de la mantequilla, como la margarina.

Las grasas o triacilgliceroles son triésteres de ácidos grasos y glicerol. Constituyen la principal forma de almacenamiento de energía de muchos organismos.

La esterificación con glicerol reduce en gran medida el carácter hidrófilo de los grupos de cabeza de los ácidos grasos. Como consecuencia de ello, los triacilgliceroles no sólo son insolubles en agua, sino que no forman siquiera micelas de manera eficaz. Las grasas acumuladas en las células vegetales y animales forman, pues, tan sólo pequeñas gotas oleosas en el citoplasma. En los **adipocitos**, que son las células animales especializadas en el almacenamiento de las grasas, casi todo el volumen de cada célula está ocupado por una gota de grasa (Figura 10.3). Estas células constituyen la mayor parte del tejido adiposo (graso) de los animales.

El almacenamiento de grasas en los animales tiene tres funciones distintas:

1. *Producción de energía.* La mayor parte de la grasa de la mayoría de los animales se oxida para generar ATP e impulsar los procesos metabólicos.
2. *Producción de calor.* Algunas células especializadas (por ejemplo las de la "grasa parda" de los animales homeotermos) oxidan los triacilgliceroles para producir calor, en lugar de para formar ATP.
3. *Aislamiento.* En los animales que viven en un entorno frío, las capas de células adiposas situadas debajo de la piel actúan como un aislante térmico. Un ejemplo obvio es la grasa de las ballenas.

JABONES Y DETERGENTES

Si las grasas se hidrolizan con álcalis como NaOH o KOH (antiguamente se utilizaba madera de fresno), se obtiene un *jabón*. Este proceso se denomina **saponificación**. Los ácidos grasos se liberan en forma de sales sódicas o potásicas, que

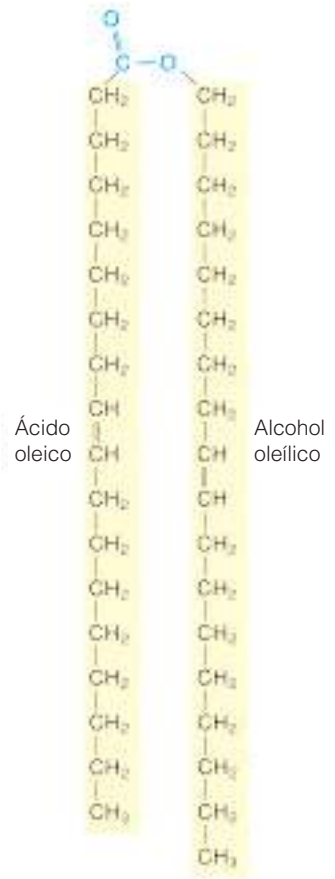
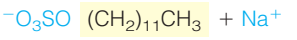


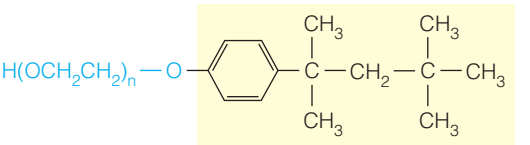
FIGURA **10.4**

Estructura de una cera característica. Las ceras se forman por esterificación de ácidos grasos y alcoholes de cadena larga. El grupo de cabeza pequeño puede contribuir en escasa medida a la hidrofilia a diferencia de la contribución hidrófoba importante de las dos colas largas.

están totalmente ionizadas. Sin embargo, como limpiadores, los jabones tienen el inconveniente de que los ácidos grasos precipitan con los iones calcio o magnesio presentes en el agua "dura", formando espuma y destruyendo la acción emulsificante. Se han diseñado detergentes sintéticos que no tienen este defecto. Un tipo de ellos es el *dodecil sulfato sódico* (*SDS*):



Las sales de dodecil sulfato con los cationes divalentes (p. ej., Ca^{2+} y Mg^{2+}) son más solubles. Hemos encontrado ya al SDS que se utiliza mucho para formar micelas alrededor de las proteínas en la electroforesis en gel. También existen detergentes sintéticos no iónicos, como el *Triton X-100*:



El grupo hidrófilo es en este caso el grupo de cabeza de polioxietileno (que se indica en azul), que en el producto comercial tiene unos 9.5 residuos de longitud.

CERAS

En las **ceras** naturales, un ácido graso de cadena larga se esterifica con un alcohol de cadena larga (Figura 10.4), para dar un grupo de cabeza que tan sólo es débilmente hidrófilo, unido a dos cadenas hidrocarbonadas. Como consecuencia de ello, las ceras son completamente insolubles en agua. De hecho, son tan hidrófobas que frecuentemente actúan como sustancias repelentes del agua, como ocurre en las plumas de algunas aves y en las hojas de algunas plantas. En determinados microorganismos marinos, las ceras se utilizan para el almacenamiento de energía en lugar de otros lípidos. En las abejas, las ceras tienen una función estructural. Al igual que ocurre con los triacilgliceroles, la dureza de las ceras viene dada por la longitud de la cadena y su grado de saturación.

Componentes lipídicos de las membranas biológicas

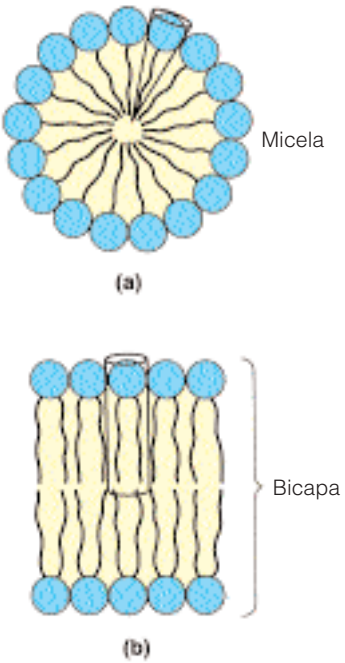
Los principales componentes lipídicos de las membranas biológicas son los glicerofosfolípidos, los esfingolípidos, los glucoesfingolípidos y los glucoglicerolípidos.

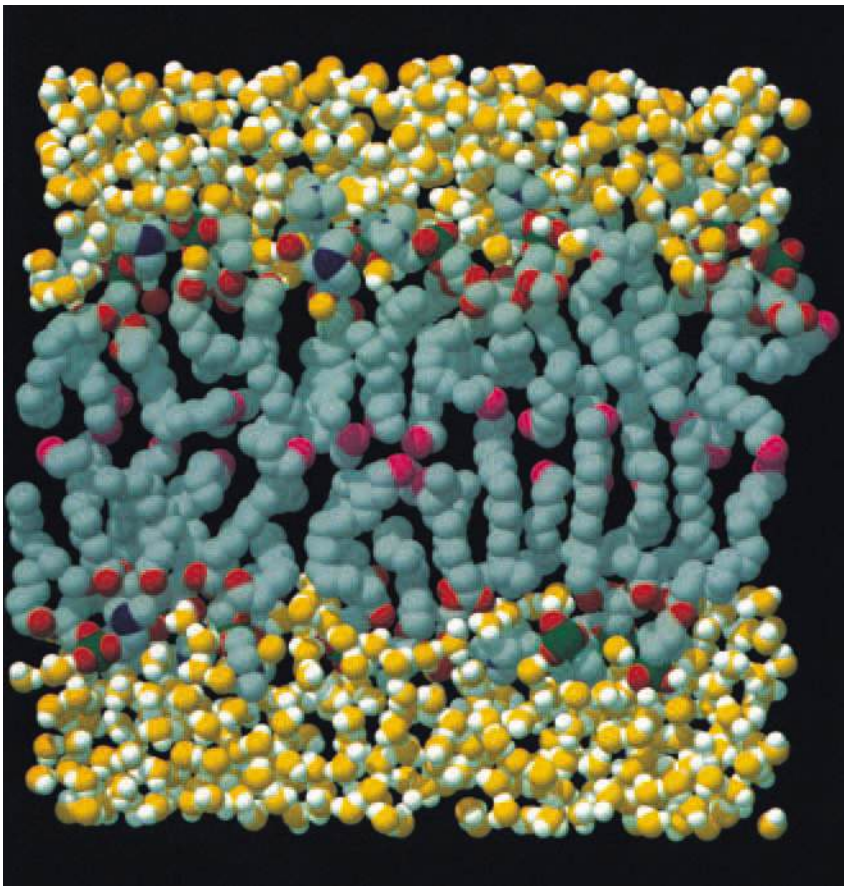
Todas las membranas biológicas contienen lípidos como componentes principales. Las moléculas que desempeñan las funciones dominantes en la formación de la membrana tienen todas unos grupos de cabeza muy polares y, en la mayor parte de los casos, dos colas hidrocarbonadas. Esta composición tiene sentido desde el punto de vista molecular: si un grupo de cabeza grande está unido a una cadena hidrocarbonada sencilla, la molécula tiene una disposición cuneiforme y tenderá a formar micelas esféricas (Figura 10.5a). Una doble cola produce una molécula aproximadamente cilíndrica (Figura 10.5b) y estas moléculas cilíndricas pueden compactarse con facilidad en paralelo, para formar láminas extendidas de membranas **bicapa** con los grupos de cabeza hidrófilos hacia fuera, en las regiones acuosas de ambos lados (Figura 10.5c). Las cuatro clases principales de lípidos que forman las membranas, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, glucoesfingolípidos y glucoglicerolípidos, comparten este tipo de estructura molecular cilíndrica. Se diferencian principalmente en la naturaleza del grupo de cabeza. Describiremos algunos ejemplos de cada clase.

FIGURA **10.5**

Fosfolípidos y estructura de la membrana. Mientras que los ácidos grasos **(a)** son cuneiformes y tienden a formar micelas esféricas, los fosfolípidos **(b)** son más cilíndricos y quedan densamente compactados en el tipo de estructura de bicapa lipídica que se muestra en **(c)**, en una simulación de ordenador de una bicapa de fosfolípido.

(c) Tomado de R. M. Venable, Y. Zhang, B. J. Hardy y R. W. Pastor, *Science* (1993) 262:223-228. © 1993 AAAS.

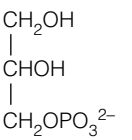




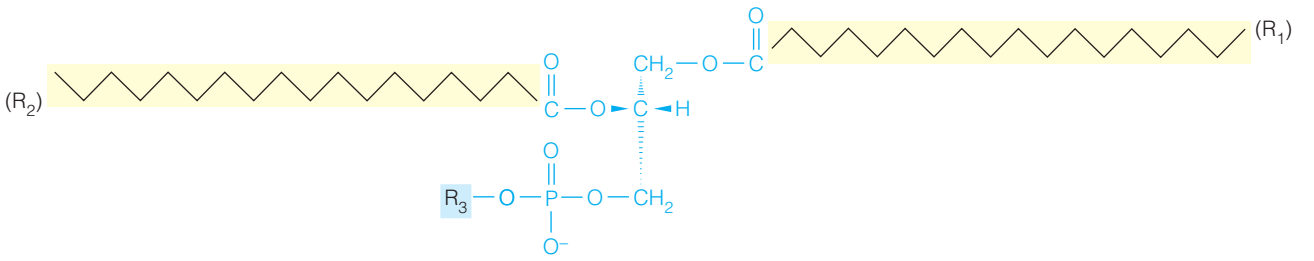
(c)

GLICEROFOSFOLÍPIDOS

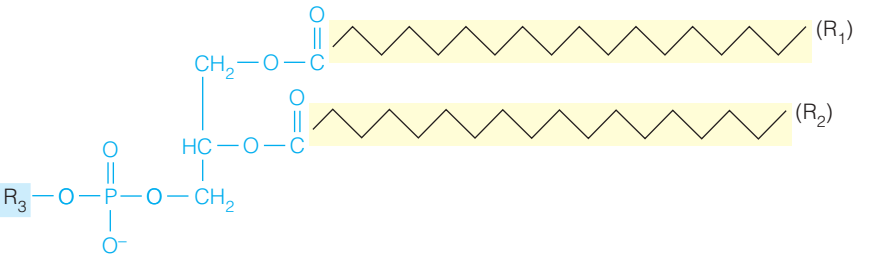
Los **glicerofosfolípidos** (también denominados *fosfoglicéridos*) son la principal clase de **fosfolípidos** presentes en la naturaleza, lípidos con grupos de cabeza que contienen fosfato. Estos compuestos constituyen una parte importante de los lípidos de la membrana en los reinos bacteriano, vegetal y animal. Todos los glicerofosfolípidos pueden considerarse derivados del glicerol-3-fosfato. El carbono 2 del glicerol-3-fosfato es un centro quiral, y los glicerofosfolípidos presentes en la naturaleza son derivados del enantiómero L. La configuración estereoquímica de la estructura general de los glicerofosfolípidos se muestra en la Figura 10.6a. En la Figura 10.6b se presenta la molécula de la forma que utilizaremos generalmente para representar los lípidos de membrana, con las colas hidrófobas dibujadas hacia la derecha y el grupo de cabeza hidrófilo hacia la izquierda. Generalmente, los grupos R_1 y R_2 son cadenas laterales de acilo, derivadas de los ácidos grasos; es frecuente que uno sea saturado y el otro insaturado. El grupo hidrófilo R_3 es muy variable, y ello es lo que confiere la máxima variación en cuanto a las propiedades de los diversos glicerofosfolípidos. En la Figura 10.7 se presenta una muestra de los glicerofosfolípidos más frecuentes, y en la Tabla 10.3 se indica su abundancia relativa en algunas membranas. El miembro más sencillo del grupo, el **ácido fosfatídico**, es tan sólo un componente menor de la membrana que actúa principalmente como intermediario en la síntesis de otros glicerofosfolípidos (que se describirá en el Capítulo 19). Los nombres de los gli-



Glicerol-3-fosfato



(a)



(b)

FIGURA **10.6**

Estructura de los glicerofosfolípidos. **(a)** Presentación estereoquímica del enantiómero L de un glicerofosfolípido general. **(b)** La misma estructura representada según nuestro convenio, con los grupos hidrófobos hacia la derecha y la parte hidrófila hacia la izquierda. R_3 es un grupo hidrófilo. (Véase la Figura 10.7.)

cerofosfolípidos derivan del ácido fosfatídico: *fosfatidilcolina*, *fosfatidiletanolamina*, etcétera. Como se indica en la Figura 10.7, los glicerofosfolípidos tienen unos grupos de cabeza muy polares, que siempre llevan alguna carga. Dado que las colas hidrocarbonadas proceden de los ácidos grasos presentes en la naturaleza en diversas combinaciones, existe una enorme variedad de glicerofosfolípidos. Así, por ejemplo, la membrana de los eritrocitos contiene moléculas con cadenas hidrocarbonadas de 16 a 24 carbonos, con 0 a 6 dobles enlaces. Esta variación de la composición de la membrana permite un "ajuste fino" de las propiedades de la membrana para las diversas funciones que deben realizar las diferentes membranas.

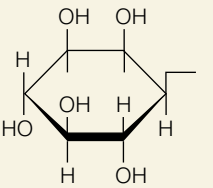
Nombre del glicerofosfolípido	R_3 (en la Figura 10.6)
Ácido fosfatídico	H— (ionizado a pH neutro)
Fosfatidiletanolamina	$H_3\overset{+}{N}—CH_2—CH_2—$
Fosfatidilcolina	$(CH_3)_3\overset{+}{N}—CH_2—CH_2—$
Fosfatidilserina	$H_3\overset{+}{N}—CH(COO^-)—CH_2—$
Fosfatidilinositol	

FIGURA **10.7**

Grupos hidrófilos (R_3 en la Figura 10.6) que diferencian a los glicerofosfolípidos comunes. Además de esta variación, existe una gran cantidad de variación en las colas hidrocarbonadas (R_1, R_2) en las estructuras que se presentan en la Figura 10.6.

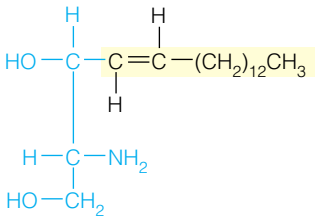
TABLA 10.3 Composición lipídica de algunas membranas biológicas

Lípido	Porcentaje de la composición total en: Membrana plasmática del eirtrocito humano	Mielina humana	Mitocondrias de corazón de buey	Membrana celular de *E. coli*
Ácido fosfatídico	1.5	0.5	0	0
Fosfatidilcolina	19	10	39	0
Fosfatidiletanolamina	18	20	27	65
Fosfatidilglicerol	0	0	0	18
Fosfatidilinositol	1	1	7	0
Fosfatidilserina	8.0	8.0	0.5	0
Esfingomielina	17.5	8.5	0	0
Glocolípidos	10	26	0	0
Colesterol	25	26	3	0
Otros	0	0	23.5	17

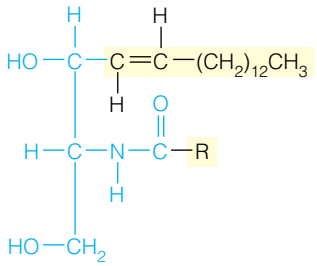
Fuente: Datos tomados de C. Tanford, *The Hydrophobic Effect* (Nueva York: Wiley, 1973).

ESFINGOLÍPIDOS Y GLUCOESFINGOLÍPIDOS

Una segunda clase importante de componentes de la membrana es la de las sustancias formadas con el aminoalcohol de cadena larga **esfingosina** en vez de con glicerol. Si un ácido graso está unido mediante un enlace amida al grupo (NH_2, se obtiene la clase de **esfingolípidos** denominados **ceramidas**:

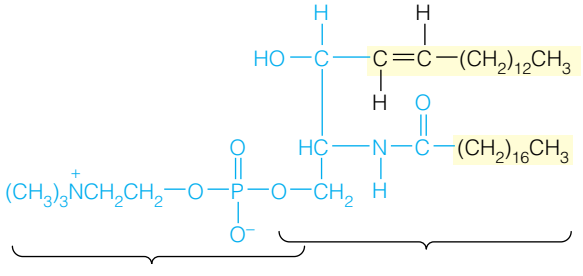


Esfingosina = D-4-esfinganina



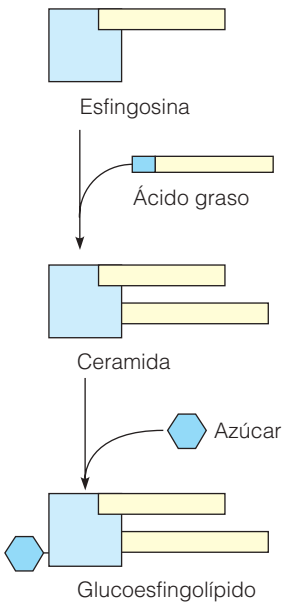
Estructura general de una ceramida (R = hidrocarburo)

Las ceramidas están formadas *sólo* por esfingosina y un ácido graso. La posterior modificación, mediante la adición de grupos al hidroxilo del C-1 de la esfingosina, da lugar a otros esfingolípidos. Un ejemplo especialmente importante es la *esfingomielina*, en la que un grupo *fosfocolina* está unido al hidroxilo del C-3.



Esfingomielina

Una amplia clase de esfingolípidos está formada sobre un núcleo de esfingosina.



Composición de un glucoesfingolípido generalizado

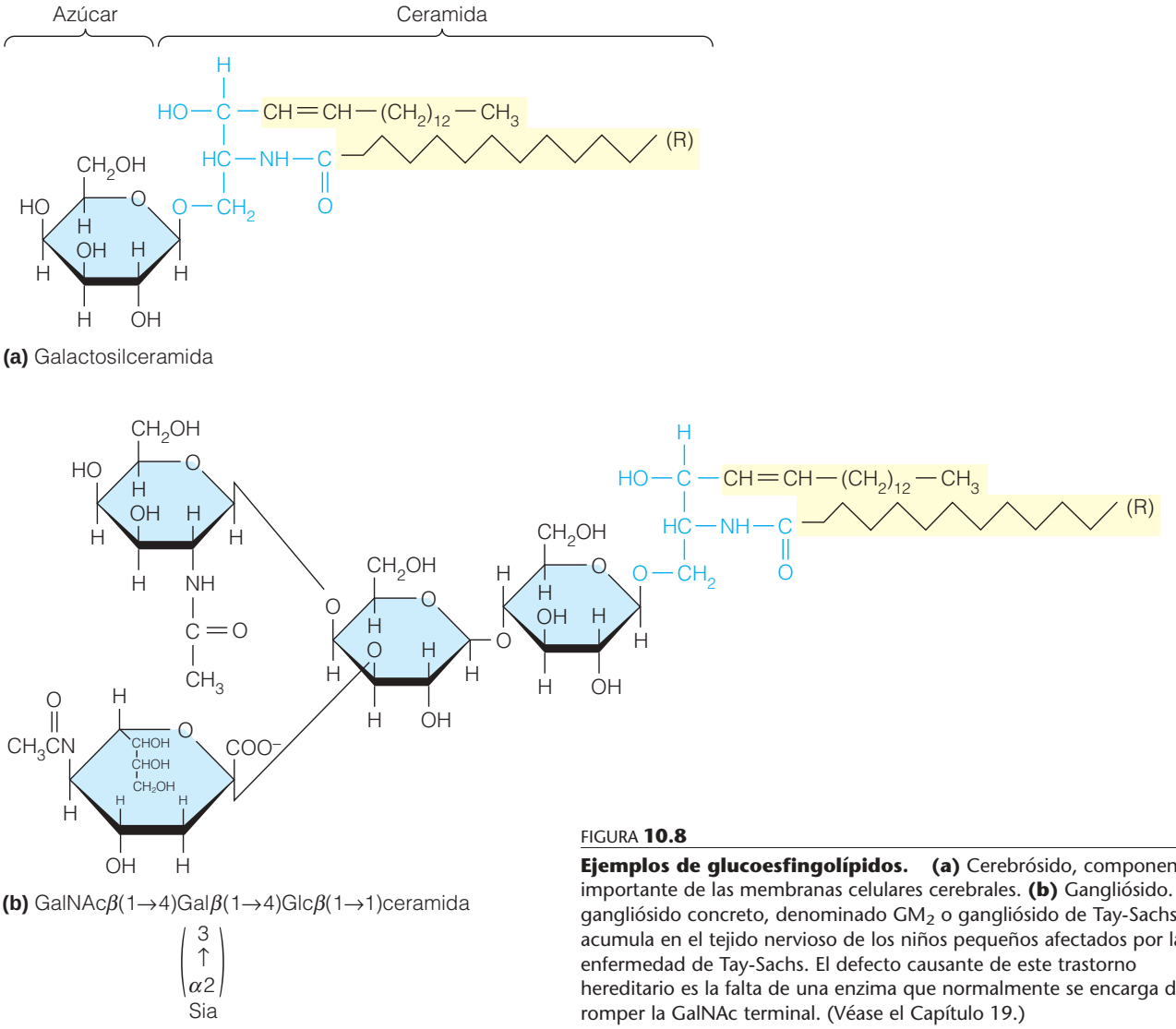


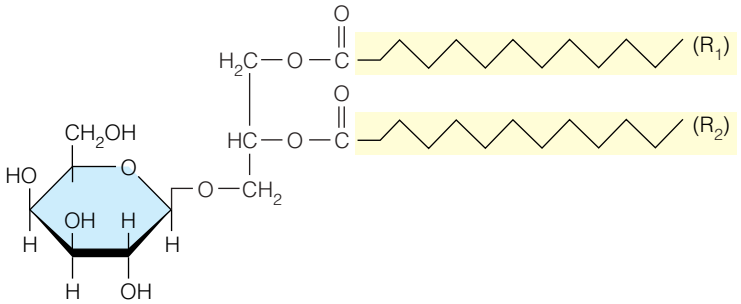
FIGURA **10.8**

Ejemplos de glucoesfingolípidos. **(a)** Cerebrósido, componente importante de las membranas celulares cerebrales. **(b)** Gangliósido. Este gangliósido concreto, denominado GM_2 o gangliósido de Tay-Sachs, se acumula en el tejido nervioso de los niños pequeños afectados por la enfermedad de Tay-Sachs. El defecto causante de este trastorno hereditario es la falta de una enzima que normalmente se encarga de romper la GalNAc terminal. (Véase el Capítulo 19.)

En algunos de los lípidos de membrana formados sobre la esfingosina, el grupo de cabeza contiene sacáridos. Los lípidos que contienen grupos sacáridos reciben el nombre general de **glucolípidos**. Los **glucoesfingolípidos** constituyen la tercera clase principal de los lípidos de membrana. Su estructura general es la que se indica al margen de la página anterior. Abarcan moléculas como los **cerebrósidos** (monoglucosil ceramidas) y los **gangliósidos**, glucoesfingolípidos aniónicos que contienen uno o más residuos de ácido siálico, de los que se presentan ejemplos en la Figura 10.8. Como sugieren los nombres de estos compuestos, son especialmente frecuentes en las membranas del cerebro y de las células nerviosas.

GLUCOGLICEROLÍPIDOS

Otra clase de lípidos menos comunes en las membranas animales, pero muy extendidos en las membranas vegetales y bacterianas, son los **glucoglicerolípidos**, cuyo ejemplo es el **diglicérido de monogalactosa**:



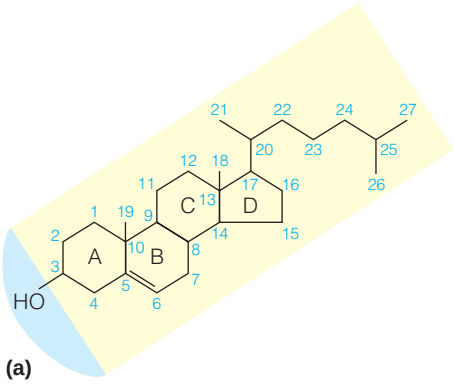
Este compuesto puede en realidad ser el lípido polar más abundante, ya que constituye alrededor de la mitad de los lípidos de las membranas de los cloroplastos (véase el Capítulo 17). Estos lípidos también son abundantes en las arqueobacterias, donde son los componentes principales de la membrana.

COLESTEROL

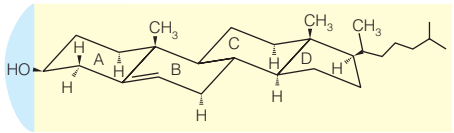
Un componente lipídico importante de muchas membranas tiene un pequeño parecido superficial con los compuestos que hemos estudiado hasta ahora. Esta sustancia es el **colesterol**, cuya estructura aparece en la Figura 10.9. El colesterol pertenece a un amplio grupo de sustancias denominadas **esteroides**, que incluye diversas hormonas importantes, entre las que se encuentran las hormonas sexuales de los animales superiores. De hecho, el colesterol es el precursor para la síntesis de muchas de estas sustancias. Su función en estos procesos de síntesis se comentará en el Capítulo 19, junto con una descripción detallada de otros esteroides y de sus funciones. También se encuentran otros esteroides en las membranas, como, por ejemplo, el *lanosterol* (página 771) con predominio en las membranas celulares vegetales.

El colesterol es una sustancia débilmente anfipática, debido al grupo hidroxilo de un extremo de la molécula. Sin embargo, parte del colesterol presente en las membranas ha adquirido un carácter más hidrófobo a causa de la esterificación del grupo hidroxilo con un ácido graso. Como muestra la estructura conformacional de la Figura 10.9b, los anillos de ciclohexano fusionados del colesterol tienen todos ellos la conformación de "silla", lo cual hace que el colesterol sea una estructura voluminosa y rígida, en comparación con otros componentes hidrófobos de la membrana, como las colas de los ácidos grasos. La molécula de colesterol se ajusta mal en los lípidos de la membrana y tiende a alterar la regularidad de la estructura de la membrana. Esta propiedad puede tener un efecto importante, puesto que el colesterol constituye un 25% o más del contenido lipídico de algunas membranas (véase la Tabla 10.3). Como veremos, las alteraciones de la regularidad de la membrana pueden tener profundos efectos sobre algunas propiedades de la membrana como la rigidez y la permeabilidad.

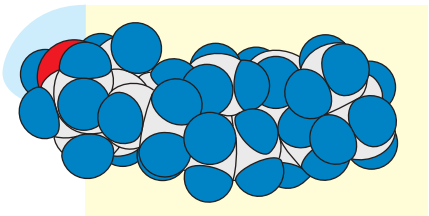
Las moléculas que se han descrito hasta aquí constituyen la parte principal de los lípidos de la membrana de la mayoría de los organismos. Sin embargo, uno de los "tres reinos" de los organismos, las arqueobacterias se diferencia de los demás por tener glucoglicerolípidos como sus principales lípidos de membrana.



(a)



(b)



(c)

FIGURA **10.9**

Colesterol. **(a)** Fórmula estructural. **(b)** Modelo esquelético. **(c)** Modelo de relleno espacial.

El colesterol, un componente de muchas membranas animales, influye sobre la fluidez de la membrana a causa de su estructura voluminosa.

Estructura y propiedades de las membranas y de las proteínas de la membrana

Las membranas de las células vivas son pedazos muy notables de arquitectura molecular, con funciones múltiples y variadas. La afirmación de que una mem-

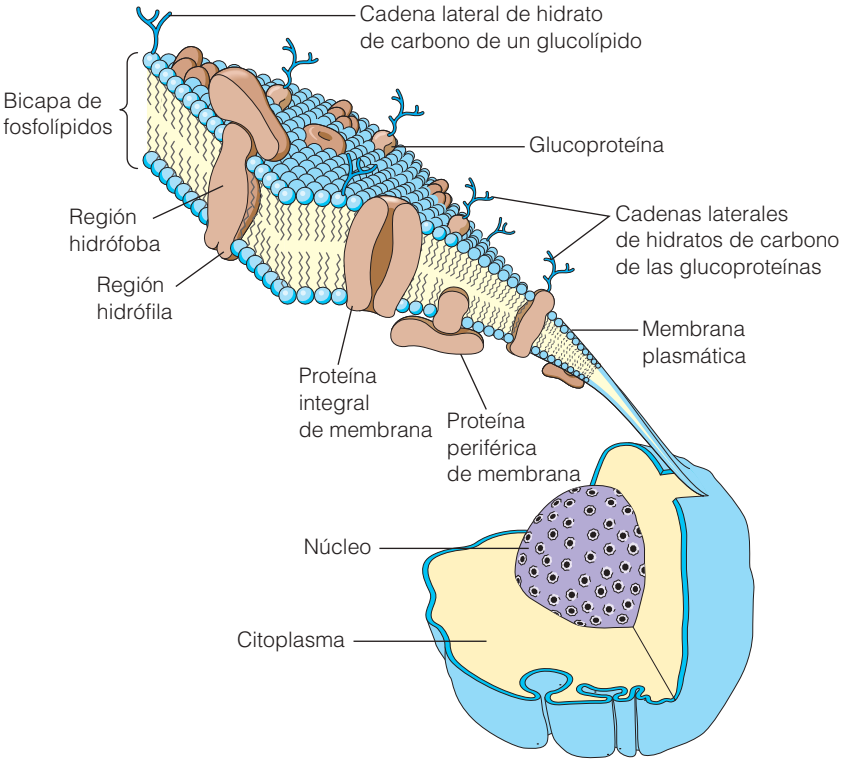


FIGURA **10.10**

Estructura de una membrana celular característica. En esta representación esquemática, se ha levantado una tira de la membrana plasmática de una célula eucariota. Las proteínas están incluidas en el interior y situadas sobre la bicapa de fosfolípidos; algunas de ellas son glucoproteínas que llevan cadenas de oligosacáridos. La membrana tiene un grosor de aproximadamente 6 nm.

Según el modelo de mosaico fluido, una membrana es una mezcla fluida de lípidos y proteínas.

brana es esencialmente una bicapa de fosfolípidos constituye una simplificación excesiva. Ciertamente, la bicapa de fosfolípidos, como se indica en la Figura 10.5b y c, constituye la estructura básica, pero en las membranas plasmáticas de las células hay mucho más. En la Figura 10.10 se muestra una representación más realista de la membrana de una célula eucariota característica. Hay una amplia gama de proteínas específicas que están contenidas en la membrana o unidas a su superficie. Muchas de estas proteínas llevan grupos de oligosacáridos que se proyectan hacia el medio acuoso circundante. Otros oligosacáridos son transportados por los glucolípidos, con la porción lipídica insertada en la membrana. Los dos lados de la bicapa suelen ser diferentes, tanto en su composición lipídica como en la colocación y orientación de las proteínas y los oligosacáridos.

La mayor parte del conocimiento actual sobre las membranas biológicas se basa en el **modelo del mosaico fluido** propuesto por S. J. Singer y G. L. Nicholson en 1972. Este modelo es el que se presenta en la Figura 10.10. La bicapa lipídica, fluida y asimétrica, tiene en su interior un gran número de proteínas. Algunas de ellas, denominadas **proteínas periféricas de membrana**, están expuestas tan sólo en una u otra cara de la membrana y están sujetas a la membrana mediante su interacción con las cabezas lipídicas o con las proteínas integrales de membrana. Las **proteínas integrales de membrana**, están muy enterradas dentro de la membrana, aunque expuestas en ambas caras de la misma. Las proteínas integrales intervienen con frecuencia en la transmisión de sustancias específicas o señales químicas a través de la membrana. Toda la membrana es un mosaico de lípidos y proteínas.

Algunas proteínas de membrana son periféricas y están limitadas a una de las dos caras. Otras, las proteínas integrales, se extienden de lado a lado de la membrana.

MOVIMIENTO EN LAS MEMBRANAS

Una membrana biológica en funcionamiento no es una estructura rígida y congelada. De hecho, muchos de los componentes lipídicos y proteicos están en

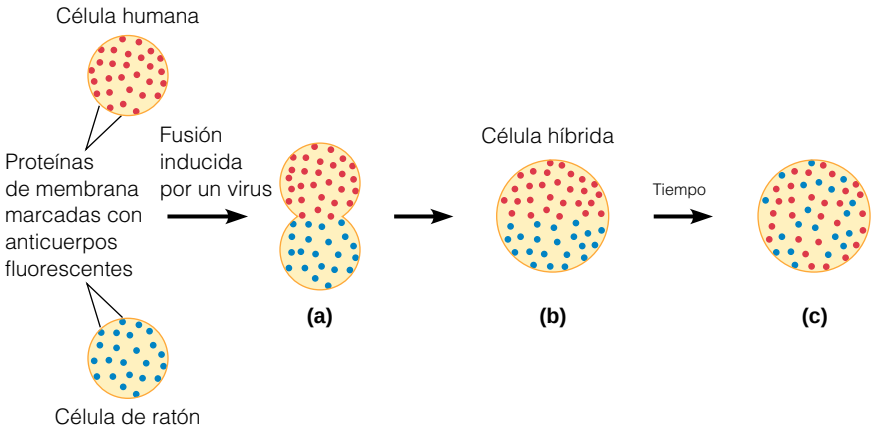


FIGURA **10.11**

Demostración experimental de la fluidez de la membrana. Cuando se induce una fusión de células con proteínas de membrana marcadas con elementos fluorescentes, las proteínas se mezclan gradualmente en la superficie fusionada.

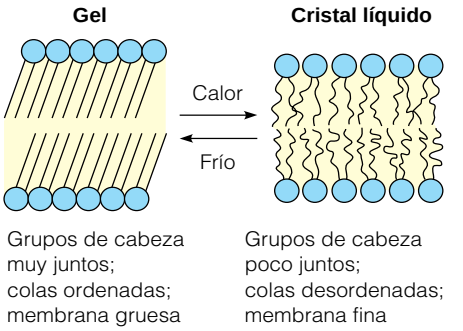
Tomado de W. M. Becker, L. J. Kleinsmith y J. Hardin, *The World of the Cell*, 4ª ed. (San Francisco, CA: Addison Wesley Longman, 2000). © Addison Wesley Longman, Inc.

constante movimiento. Este movimiento puede demostrarse de una forma directa y clara. Si se fusionan juntas células humanas y de ratón, cada una de ellas con un marcador fluorescente distintivo en su membrana plasmática, los dos tipos de marcadores gradualmente llegan a estar completamente entremezclados (Figura 10.11). Esto demuestra que puede producirse en la membrana una *difusión lateral* (paralela a la superficie de la membrana). La rapidez con la que se puede producir esta difusión bidimensional depende de la fluidez de la membrana, la cual depende a su vez de la temperatura y la composición lipídica. En condiciones fisiológicas, el tiempo medio necesario para que una molécula de fosfolípido se desplace alrededor de toda la célula es del orden de segundos a minutos. Las proteínas de la membrana también se mueven, aunque más lentamente.

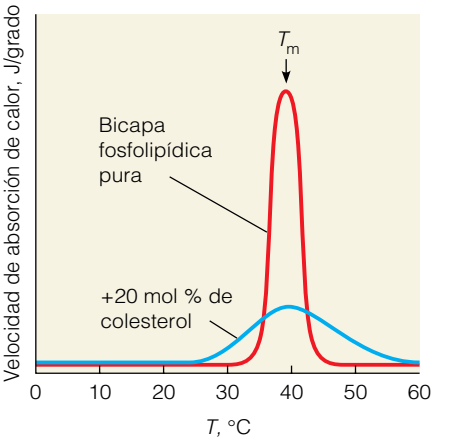
Movimiento en las membranas sintéticas

Los efectos de la temperatura y la composición sobre la fluidez pueden estudiarse de una manera más sencilla con el empleo de membranas artificiales que contienen tan sólo uno o unos pocos tipos de lípidos y que no incluyen proteínas (véase Herramientas de la Bioquímica 10A). En la Figura 10.12a se dibuja el comportamiento de una membrana formada totalmente por fosfatidilcolina con cadenas saturadas de 16 carbonos (de manera abreviada, PC-16:0/16:0). A temperaturas bajas, las colas hidrocarbonadas se compactan juntas muy cerca para formar un estado de *gel* casi sólido. Si la temperatura aumenta por encima de 41°C, se pierde este orden regular, y las colas hidrocarbonadas pasan a tener un movimiento libre. La membrana se "funde" para adoptar un estado *cristalino líquido* semifluido. La temperatura a la que se produce esto se denomina *temperatura de transición*. Este cambio brusco de las propiedades de la membrana sintética puede detectarse mediante diversas técnicas descritas en Herramientas de la Bioquímica 10A. En la Figura 10.12b se muestra la transición tal como se detecta mediante calorimetría.

La temperatura de transición es muy sensible a la naturaleza de las colas hidrocarbonadas. Si se utiliza una membrana de PC-14:0/14:0 (con colas que tienen tan sólo dos carbonos menos que las descritas anteriormente), la temperatura de transición se reduce a 23°C. Si se incorpora un solo doble enlace *cis* a cada cola de 16 carbonos (PC-16:1/16:1), la fusión se produce a –36°C. Como se ha indicado antes, estos dobles enlaces causan flexiones en las cadenas, lo cual impide su compactación. Así pues, estas cadenas deben enfriarse a una temperatura inferior para producir el gel rígido. El cambio del grupo de cabeza puede producir también una diferencia importante. Si se sustituye la fosfatidileta-



(a) Transición



(b) Transición con y sin colesterol

FIGURA **10.12**

Transición cristalina gel-líquido en una bicapa lipídica sintética. **(a)** Imagen esquemática del cambio que se produce en la temperatura de transición. Por debajo de esta temperatura, las colas hidrocarbonadas están densamente compactadas en un estado de gel casi cristalino y casi rígido (izquierda). Por encima de esta temperatura, las cadenas quedan libres para moverse, y el interior de la membrana se parece a un hidrocarburo líquido (derecha). **(b)** Detección de la transición mediante calorimetría. La medida del calor absorbido por una membrana al aumentar cada grado de temperatura muestra un pico brusco en la temperatura de transición (T_m) para una bicapa pura de dipalmitoilfosfatidilcolina. Esta transición bien definida del gel al líquido se denomina fusión de la membrana. Cuando se mezclan 20 mol % de colesterol en la bicapa, no se modifica la temperatura de transición pero la transición pasa a ser más amplia.

nolamina por fosfatidilcolina en la PC-16:0/16:0, la transición térmica aumenta hasta 63°C. La sensibilidad de la transición a la composición lipídica se pone de manifiesto de manera espectacular por el hecho de que los pequeños cambios descritos anteriormente pueden modificar la temperatura de transición en un margen de 100°C.

Movimiento en las membranas biológicas

Las membranas biológicas, que contienen mezclas complejas de componentes lipídicos y proteínas, presentan unas transiciones de fase mucho más amplias y más complejas que las observadas en las bicapas sintéticas del tipo descrito anteriormente. De hecho, actualmente hay pruebas de la existencia de "dominios" bastante estables de diferente composición en distintas partes de una membrana celular, lo cual explica la amplia transición que se observa. Dado que es esencial que las membranas de las células vivas sean fluidas, la composición de la membrana está regulada de manera que se mantenga la temperatura de transición por debajo de la temperatura corporal del organismo. Un ejemplo se encuentra en las bacterias, que modifican la proporción de ácidos grasos saturados/insaturados de sus membranas en respuesta a un cambio de la temperatura a la que crecen. Un caso notable en el reino animal es el de la pata del reno. Sus membranas celulares presentan un aumento de la cantidad relativa de ácidos grasos insaturados cerca de la pezuña, que normalmente está más fría que el resto del cuerpo.

En condiciones fisiológicas, las membranas biológicas se encuentran en un estado cristalino semilíquido.

El colesterol tiene un efecto específico y complejo sobre la fluidez de la membrana. Como se muestra en la Figura 10.12b para una membrana sintética, el colesterol no influye de manera notable sobre la temperatura de transición, pero sí amplía la transición. Se ha planteado la hipótesis de que esta ampliación se produce debido a que el colesterol puede endurecer la membrana por encima de la temperatura de transición e inhibir la regularidad de la formación de la estructura por debajo de la temperatura de transición. Ello hace que se difumine la distinción entre el estado de gel y el estado fluido. Existen datos que indican que las variaciones del contenido de colesterol se utilizan para regular el comportamiento de la membrana en algunos organismos.

Los efectos del colesterol sobre la estructura de la membrana dependen en gran medida de su concentración en la membrana. Los estudios recientes de difracción de rayos X han demostrado que a concentraciones moderadas el colesterol encaja en la bicapa pero la ensancha (Figura 10.13), mientras que a concentraciones elevadas se forman "islas" de bicapas de colesterol. Se especula que éstas pueden proporcionar núcleos para la formación de placas de colesterol en el sistema circulatorio. Se ha demostrado que la formación de estas estructuras es un efecto in vivo mediante experimentos en los que se alimentó a ratas con niveles elevados de colesterol durante muchas semanas.

En contraste con la facilidad del movimiento lateral, el "salto" de las moléculas lipídicas *a través* de las bicapas lipídicas sintéticas, de un lado a otro, es mucho más lento. El motivo no es difícil de apreciar: cuando una molécula de fos-

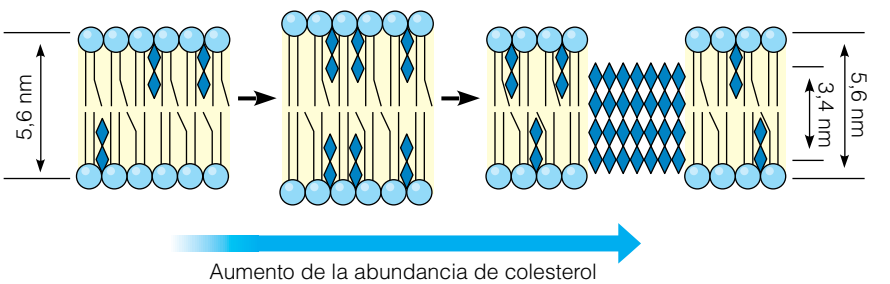


FIGURA **10.13**

Modelo esquemático de los efectos del colesterol sobre la estructura de la membrana plasmática. Los datos señalan un efecto inicial del cociente colesterol/fosfolípidos, C:PL, sobre la anchura de la membrana. Con cocientes molares C:PL de 0.8:1 o menores, la anchura de la bicapa aumenta al aumentar C:PL. Con cocientes molares C:PL por encima de 0.9:1, se forman dos fases lamelares separadas, una que representa una bicapa lipídica cristalina líquida y otra que representa una fase de colesterol inmiscible. La fase de colesterol inmiscible se forma mediante separación de fase al "saturarse" la membrana con colesterol.

Adaptado de T. Tulenko, M. Chen, P. E. Mason y R. P. Mason, *J. Lipid Res.* (1998) 29:947-956.

folípido pasa de una cara a la otra, debe introducir su cabeza muy hidrófila en el medio inhóspito de las colas hidrocarbonadas y atravesar esa región. Este proceso es muy poco favorable desde un punto de vista energético, y por tanto, el proceso es lento. Existe una clase de enzimas (*translocasas*) que catalizan el intercambio. En contraste con los fosfolípidos, el transporte de los ácidos grasos a través de las membranas es mucho más rápido por una simple razón, y es que de manera distinta a los grupos fosfatos de los fosfolípidos, los carboxilatos de los ácidos grasos están protonados y, por tanto, sin carga en el ambiente muy apolar de la bicapa lipídica. De esta forma, pueden acomodarse mejor en la membrana que una molécula ionizada y pueden saltar en menos de un segundo.

ASIMETRÍA DE LAS MEMBRANAS

Cualquier membrana biológica tiene dos caras distintas, que están en contacto con medios diferentes. Pueden observarse ejemplos de ello en las ilustraciones de la ultraestructura celular presentadas en el Capítulo 1. La membrana plasmática de una célula está en contacto con el medio externo por fuera y con el citoplasma por dentro, mientras que la membrana que envuelve a un cloroplasto tiene en la parte interna el aparato fotosintético y en la parte externa el citoplasma. Dado que las dos caras de una membrana deben relacionarse con entornos diferentes, generalmente tienen una composición y una estructura muy diferentes.

Las dos láminas de una membrana suelen diferir en su composición lipídica.

Esta diferencia se extiende incluso al nivel de la composición de fosfolípidos. Recuérdese que todas las membranas fosfolipídicas son bicapas y a cada capa individual frecuentemente se la denomina *lámina*. En la Figura 10.14 se presentan las composiciones de las dos láminas de las membranas plasmáticas de varios tipos ce-

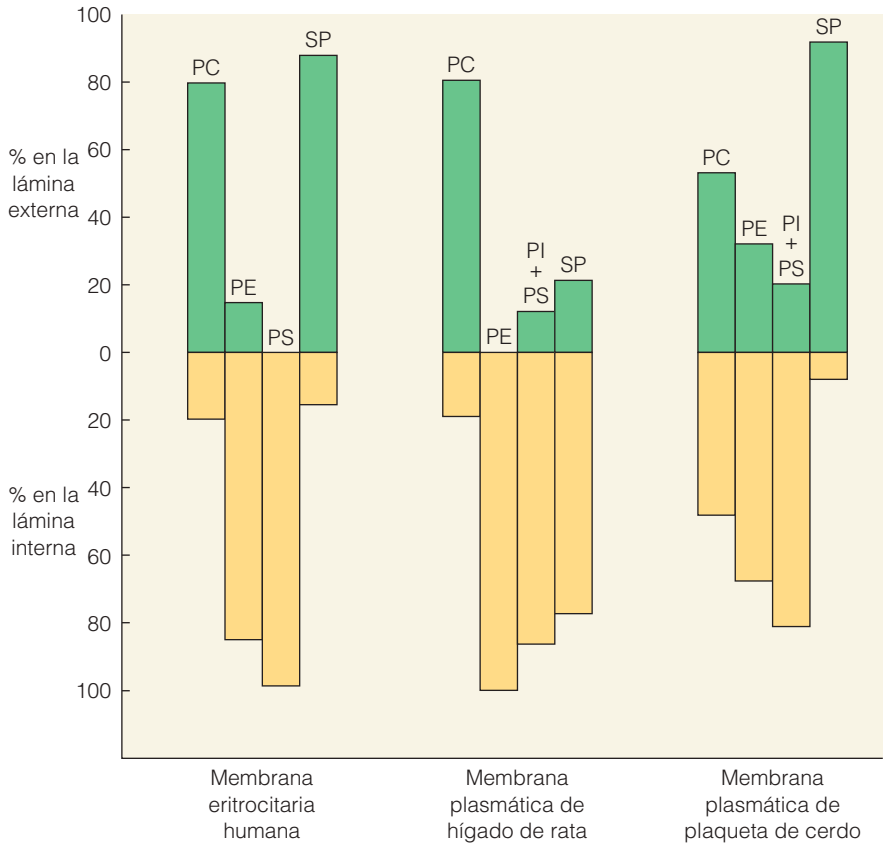


FIGURA **10.14**

Asimetría fosfolipídica en las membranas plasmáticas. Se representa gráficamente la composición lipídica de la lámina externa (verde) y de la lámina interna (dorada) de la membrana plasmática de tres tipos de células. PC = fosfatidilcolina; PE = fosfatidiletanolamina; PS = fosfatidilserina; PI = fosfatidilinositol; SP = esfingomielina.

lulares. No sólo existe una distribución muy asimétrica de los diversos lípidos, sino que la distribución varía también considerablemente en los distintos tipos celulares.

Las consecuencias de estas diferencias de la composición de fosfolípidos son numerosas. La fluidez puede ser diferente en un lado de la membrana o en el otro. La diferencia de los grupos cargados en las dos superficies contribuye al potencial de membrana (que se considera más adelante en este capítulo). Las glucoproteínas y los glucolípidos que porta la lámina externa de una membrana plasmática contribuyen a la identificación de las células a través de sus cadenas de oligosacáridos (véase el Capítulo 9).

Gran parte de nuestro conocimiento sobre la asimetría de la membrana procede de los estudios de las **vesículas**, fragmentos de membrana que se han vuelto a unir para formar conchas huecas, con un interior y un exterior. Los reactivos pueden capturarse en el interior de la vesícula o añadirse sólo a la solución circundante, con lo que pueden reaccionar específicamente con las proteínas o los lípidos con la cara hacia fuera o hacia dentro. Una proteína de membrana de una vesícula puede hacerse reaccionar covalentemente con un reactivo marcado radiactivamente, y aislarse y fragmentarse en péptidos mediante proteasas. La identificación de los péptidos marcados por los reactantes "interno" o "externo" puede revelar las partes de la proteína que se encontraban en la cara interna y las que estaban en la cara externa. De una forma similar, pueden analizarse los lípidos, utilizando enzimas u otros reactivos que fragmenten o modifiquen de algún modo los grupos de cabeza. Los experimentos de este tipo, llevados a cabo dentro o fuera de las vesículas han aportado gran parte de la información que se presenta en la Figura 10.14.

Las membranas biológicas son estructuras muy dinámicas. No sólo deben expandirse continuamente a medida que las células crecen y se dividen, sino que también, incluso en las células en reposo, se produce al parecer un recambio y renovación continuos de los componentes de las membranas. De hecho, este estado dinámico, fuera del equilibrio, es una necesidad si se pretende mantener la asimetría. De acuerdo con la segunda ley de la termodinámica (véase el Capítulo 3) sabemos que el estado de equilibrio de una membrana de dos capas requiere una distribución igual de todos los componentes en ambos lados. Al igual que otros muchos sistemas biológicos, las membranas existen en la forma en que se dan porque *no* se encuentran en equilibro, sino que constituyen más bien estructuras dinámicas en estado estacionario.

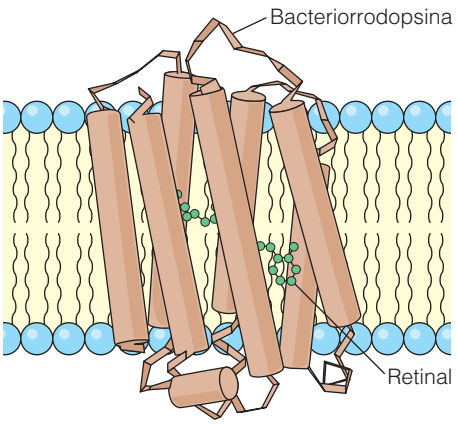


FIGURA **10.15**

Proteína integral de membrana. La proteína que se presenta es la bacteriorrodopsina, que se utiliza como bomba de protones impulsada por la luz en determinadas bacterias. Tiene siete hélices que van de un lado a otro de la membrana y contienen una molécula del pigmento retinal.

Adaptado de R. Henderson, J. M. Baldwin, J. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckman y K. H. Downing, *J. Mol. Biol.* (1990) 213:899-929. © 1990 Academic Press.

CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA

Las proteínas de la membrana poseen unas características especiales que las diferencian de otras proteínas globulares. Suelen contener una proporción elevada de aminoácidos hidrófobos, en especial en las zonas de las moléculas proteicas que están embebidas en la membrana. Los segmentos de proteínas que atraviesan las membranas tienen con frecuencia hélices α. En la Figura 10.15 se representa la bacteriorrodopsina, una proteína integral de membrana, cuya estructura se ha desentrañado con una resolución elevada. Como muchas proteínas de este tipo, contienen un haz de siete segmentos de hélice α que atraviesan la membrana de lado a lado. La presencia de estos segmentos transmembrana a veces puede inferirse a partir del tipo de **representación de hidrofobicidad** que se muestra en la Figura 10.16. Esta representación se ha calculado según la escala de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle dada en la Tabla 6.4. Representa máximos en regiones de la secuencia que corresponden a las hélices transmembrana.

El contenido proteico varía enormemente entre los distintos tipos de membranas (véase la Tabla 10.4) y parece estar directamente relacionado con las

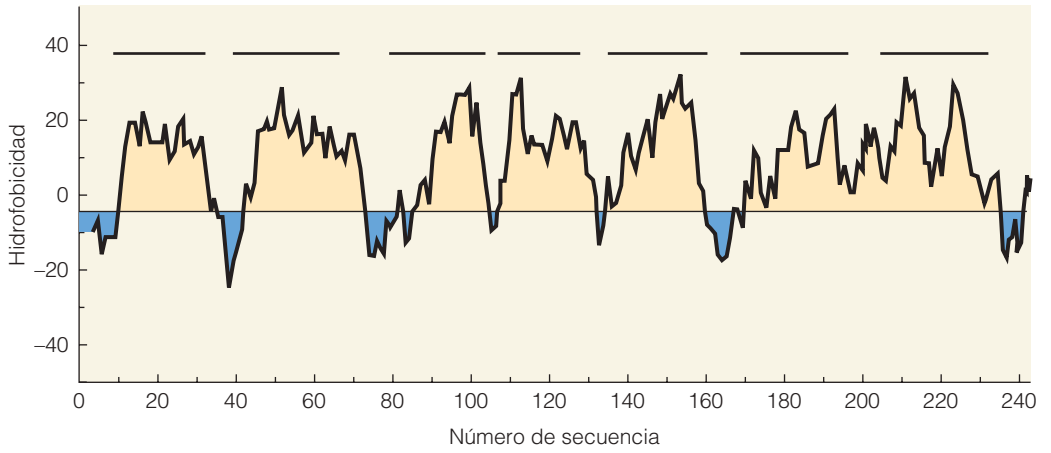


FIGURA **10.16**

Representación de la hidrofobicidad de la molécula de bacteriorrodopsina mostrada en la Figura 10.15. Se ha calculado el índice de hidrofobicidad para cada residuo por el método de Kyte y Doolittle. Las barras negras indican las posiciones aproximadas de las hélices transmembrana que se muestran en la Figura 10.15.

Adaptado de J. Kyte y R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* (1982) 157:105-132.

TABLA **10.4 Contenido de proteínas, lípidos e hidratos de carbono de algunas membranas**

	Porcentaje en peso		
Membrana	Proteína	Lípido	Hidratos de carbono
Mielina	18	79	3
Eritrocito humano (membrana plasmática)	49	43	8
Bastón de retina bovino	51	49	0
Mitocondria (membrana externa)	52	48	0
Ameba (membrana plasmática)	54	42	4
Retículo sarcoplásmico (células musculares)	67	33	0
Lamelas de cloroplasto	70	30	0
Bacteria grampositiva	75	25	0
Mitocondria (membrana interna)	76	24	0

Fuente: Adaptado de G. Guidotti, *Annu. Rev. Biochem.* (1972) 41:731.

funciones que ha de llevar a cabo cada tipo de membrana. Las membranas internas de las mitocondrias y las membranas de la pared celular bacteriana, que realizan muchas funciones, poseen alrededor de un 75% de proteínas. La mielina de las fibras nerviosas, que actúa fundamentalmente como un aislante eléctrico, tiene un bajo contenido proteico.

De todos estos estudios parece deducirse que las membranas son estructuras complejas, con una composición específica para cada una de las láminas. Para concretar más la situación, consideremos con cierto detalle la estructura de un ejemplo, la membrana plasmática del eritrocito (glóbulo rojo).

MEMBRANA DEL ERITROCITO: UN EJEMPLO DE ESTRUCTURA DE MEMBRANA

Los eritrocitos de los mamíferos se encuentran entre las células más sencillas. En su estado maduro en la sangre circulante, han perdido el núcleo, las mitocondrias y las membranas internas y son esencialmente bolsas de hemoglobina. Pueden lisarse con facilidad y liberar su contenido, produciendo *fantasmas* de membrana, grandes vesículas que corresponden a un preparado casi puro de la membrana plasmática de las células. Los fantasmas eritrocitarios tienen la composición lipídica que se indica en la Tabla 10.3, distribuida entre las láminas in-

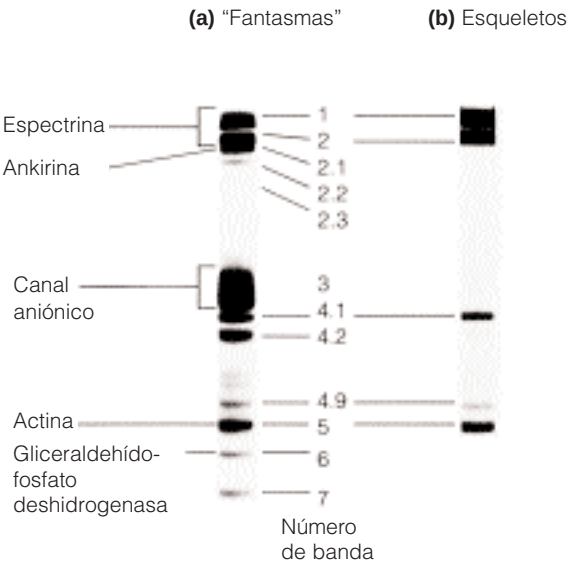


FIGURA **10.17**

Análisis por electroforesis en gel de las proteínas de la membrana del eritrocito. **(a)** Proteínas del "fantasma" eritrocitario completo. En la Tabla 10.5 se presenta la información detallada relativa a estas proteínas. La glucoforina y la proteína de la banda 4.5 no aparecen aquí ya que no se tiñen con el colorante utilizado. **(b)** Proteínas del esqueleto eritrocitario. El esqueleto está formado por las proteínas de membrana periféricas que quedan tras la extracción de las proteínas integrales mediante el detergente Triton X-100.

Tomado de D. Branton et al., *Cell* (1981) 24:24-32. © Cell Press.

terna y externa como se muestra en la Figura 10.14. Si se extrae con detergente el contenido proteico total del fantasma eritrocitario y se analiza mediante electroforesis en gel con SDS, se obtiene el patrón que se muestra en la Figura 10.17a.

Separación de las proteínas periféricas e integrales

La membrana plasmática de los eritrocitos contiene muchas menos proteínas que las que se encuentran en la mayor parte de las demás membranas celulares, lo cual concuerda con el metabolismo sencillo de estas células. ¿Cuáles son estas proteínas y qué hacen? Para poder responder a esta pregunta, debemos diferenciar primero las proteínas periféricas de las integrales. Las proteínas periféricas pueden solubilizarse de los fantasmas eritrocitarios mediante cambios simples de la fuerza iónica o del pH. De este modo encontramos que las proteínas indicadas en la parte superior de la Tabla 10.5 son periféricas. Además, todas estas proteínas están unidas a la parte interna (cara citoplasmática) de la membrana eritrocitaria. La microscopia electrónica tras congelación (véase Herramientas de la Bioquímica 10A) muestra una superficie externa casi lisa con sólo proteínas integrales de membrana e hidratos de carbono unidos decorando la superficie, mientras que el interior de la membrana y la superficie interna contienen abundantes partículas proteicas.

Las principales proteínas integrales de esta membrana son el resto de las proteínas que se indican en la Tabla 10.5: el canal aniónico (banda 3), la banda 4.5 y las glucoforinas. (Identificaremos estas proteínas posteriormente. Obsérvese que la glucoforina y la banda 4.5 no aparecen en la Figura 10.17 a causa del colorante concreto utilizado en el análisis y algunas otras no se ven debido a su cantidad baja.) Las proteínas integrales, junto con gran parte del material lipídico, pueden extraerse de las membranas intactas mediante el empleo del detergente no iónico Triton X-100.

El esqueleto proteico

Sorprendentemente, el tratamiento con Triton X-100 deja intacto un **esqueleto** proteico, que conserva la forma del fantasma de membrana. Las proteínas de este esqueleto de la membrana se identifican en la Figura 10.17b, y en la

TABLA 10.5 Principales proteínas de la membrana del eritrocito humano

N.º de banda[a]	Nombre de la proteína	Peso molecular de la subunidad	Probable estado de ensamblaje	Número de copias por célula	Función
Proteínas periféricas					
1	α-Espectrina	260 000	Tetrámeros $\alpha_2\beta_2$	10^5 tetrámeros	Esqueleto de la membrana
2	β-Espectrina	225 000			
2.1	Ankirina	215 000	Monómero	10^5	Une el esqueleto a la banda 3
*	Aducina	105 000 100 000	Heterodímero	3×10^4	
4.1	—	78 000	Monómero	2×10^5	Interviene en las uniones de espectrina
4.2	Paladina	72 000	?	2×10^5	?
4.9	Demantina	48 000	¿Trímero?	5×10^4	Interviene en la interacción espectrina-actina
5	Actina	43 000	Oligomeros de 12-17 unids.	5×10^5	Interviene en las uniones de espectrina
*	Proteína de unión a la tropomiosina	43 000	Monómero	3×10^4	Se une a la tropomiosina
6	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	35 000	Tetrámero	5×10^5	Enzima glucolítica
*	Tropomiosina	29 000 27 000	Heterodímero	7×10^4	Se une a la actina
7	—	29 000	?	5×10^5	?
8	—	23 000	?	10^5	?
Proteínas integrales					
3	—	89 000	Dímero + tetrámeros	10^6 dímeros	Canal aniónico
4.5		55 000	?	1.5×10^6	Transporte de glucosa
	Glucoforina A	31 000	Dímero	4×10^5	Reconocimiento celular
	Glucoforina B	23 000	?	$\sim 10^5$	Reconocimiento celular
	Glucoforina C	29 000	?	$\sim 10^5$	¿Unión a 4.1?

Fuente: Parte de los datos proceden de V. Bennett, *Annu. Rev. Biochem.* (1985) 54:273-304.

[a] Los números de banda corresponden a los de la Figura 10.17. Las glucoforinas no se tiñen bien con colorantes de proteínas, pero pueden detectarse con colorantes específicos de hidratos de carbono.

* Componentes que no constituyen bandas principales en el gel pero que tienen una función demostrable en la membrana.

Figura 10.18 se muestra una imagen esquemática del mismo. El esqueleto es una red bidimensional de algunas de las proteínas periféricas, cuyos principales componentes son las **espectrinas**, la actina y la banda 4.1. Las fibras de 200 nm de longitud de esta red están formadas por tetrámeros $\alpha_2\beta_2$ de moléculas de espectrina. Estas moléculas muy alargadas contienen una fracción grande de hélice α y parecen estar ligadas a sus extremos mediante cadenas cortas de moléculas de actina, junto con la proteína de la banda 4.1 y la aducina (véase la Tabla 10.5). La actina forma también complejos con una tropomiosina eritrocitaria específica (véase el Capítulo 8). El esqueleto está anclado a la propia membrana por la proteína **ankirina**, que se une tanto a la espectrina como a la proteína integral de la banda 3. La banda 4.1 se suma a la estructura pero también rodeando a la glucoforina, otra proteína integral.

El eritrocito, como otras muchas células, posee un "esqueleto" complejo de proteínas subyacentes que está unido a su membrana plasmática.

¿Qué finalidad tiene este elaborado andamiaje para la membrana eritrocitaria? Una posibilidad obvia es que ayude a mantener la forma del eritrocito, a pesar de las acciones de exprimido y los zarandeos que sufre la célula durante su

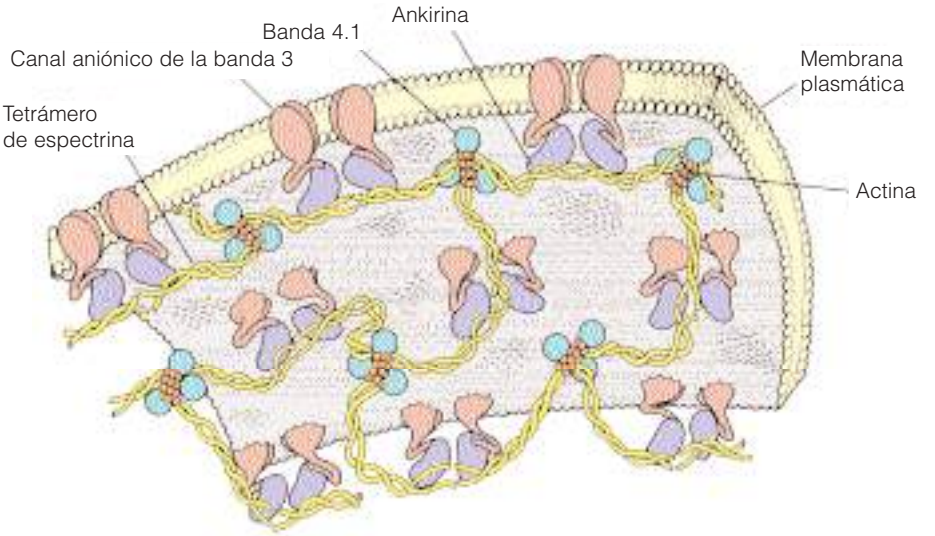


FIGURA **10.18**

Modelo de la estructura propuesta para el esqueleto de la membrana del eritrocito. Las proteínas se identifican en la Figura 10.17 y en la Tabla 10.5. Obsérvese que la ankirina ancla la membrana al esqueleto mediante la interacción con la espectrina y con la proteína integral de la banda 3 (canal aniónico).

paso por el sistema circulatorio. El eritrocito sobrevive durante bastante tiempo, generalmente unos 120 días, es decir 10 millones de latidos cardíacos. La forma discoide de la célula permite el intercambio eficaz de O_2 y CO_2 a la hemoglobina de su interior, y aunque esa forma sufra una deformación momentánea, el esqueleto le ayuda a recuperarla. De hecho, algunas formas de anemia, en las que los síntomas son una lisis fácil de los eritrocitos, pueden atribuirse a deficiencias de las proteínas del esqueleto. El tipo de estructura que se describe aquí no se limita a los eritrocitos. Otros muchos tipos celulares contienen esqueletos de membrana similares aunque diferentes. Parece probable que existan conexiones entre el esqueleto de la membrana y el citoesqueleto (véase el Capítulo 8), de manera que la membrana esté ligada a la estructura intracelular.

Principales proteínas integrales de membrana

La proteína más abundante de la membrana del eritrocito es la proteína de la banda 3, que es un transportador aniónico, que facilita el intercambio de HCO_3^- por Cl^- a través de la membrana del eritrocito. (Recuérdese del Capítulo 7 la importancia que tiene el llevar HCO_3^- al interior del eritrocito para realizar el transporte de CO_2; el intercambio por Cl^- mantiene el equilibrio iónico.) La proteína de la banda 3 funciona como un complejo de 2 ó 4 subunidades. Cada cadena de la subunidad cruza y vuelve a cruzar la membrana varias veces, para crear el canal a través del cual pueden intercambiarse los iones. La porción N-terminal de la proteína se extiende dentro del citosol donde realiza diversas interacciones interesantes. Como se ha mencionado previamente, contacta con la proteína del esqueleto ankirina, proporcionando una unión principal entre el esqueleto y la membrana. No obstante, además, la proteína de la banda 3 contacta con varias proteínas citosólicas, entre las que se encuentran algunas enzimas glucolíticas (por ejemplo, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y la aldolasa; véase el Capítulo 13) y la hemoglobina. No está totalmente claro el significado de estas interacciones, pero es sugerente el hecho de que estas enzimas participen en la producción de bisfosfoglicerato (BPG) y que el contacto entre la banda 3 y la hemoglobina sea en el lugar de unión del BPG (Capítulo 7).

Las demás proteínas integrales principales de la membrana eritrocitaria son las **glucoforinas**, que parecen tener diversas funciones. Cada una de estas proteínas tiene un dominio externo portador de hidratos de carbono, una única hélice transmembrana y un dominio C-terminal citosólico (véase la Figura 10.19).

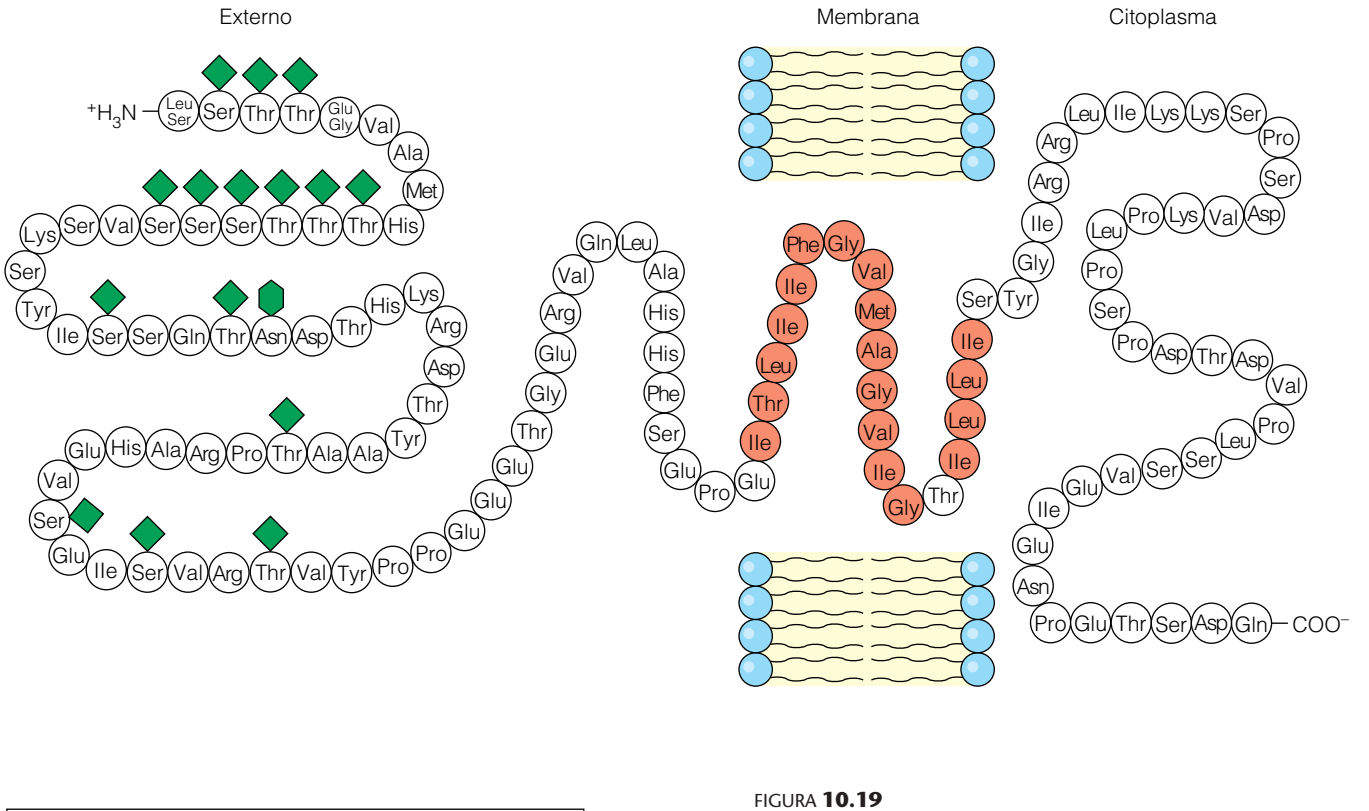


FIGURA **10.19**

Secuencia y estructura propuesta para la glucoforina A. Esta proteína fue la primera proteína integral de membrana que se secuenció. El dominio externo (N-terminal) lleva 15 oligosacáridos ligados por O- y uno ligado por N-; juntos constituyen aproximadamente el 60% de la masa proteica total. La única hélice transmembrana es muy hidrófoba, mientras que el dominio C-terminal citosólico es bastante hidrófilo.

Adaptado de V. T. Marchesi, *Semin. Hemat.* (1979) 16:8.

Los grupos de hidratos de carbono ligados por O- en el dominio N-terminal externo llevan residuos de ácido siálico, dando una carga negativa al exterior del eritrocito, lo cual puede hacer mínimas las probabilidades de estas células de adherirse a las paredes de los capilares durante la circulación. La función del dominio citosólico es menos clara, pero en algunas glucoforinas parece interactuar con la proteína de la banda 4.1 y estabilizar la adhesión esqueleto-membrana.

Debe resaltarse la asimetría de la orientación de las proteínas integrales. De la misma manera que la membrana eritrocitaria es asimétrica en su distribución de los componentes lipídicos, también lo es en su distribución de las proteínas, ya que cada tipo de proteína está orientado en una dirección determinada. Tan sólo se está empezando a comprender la forma en que se ensamblan estas notables estructuras de la membrana. Como veremos en el Capítulo 27, parecen existir modos especiales de síntesis proteica que dirigen la colocación de las proteínas en las membranas y aseguran su orientación asimétrica.

Transporte a través de membranas

Una célula o un orgánulo no pueden estar totalmente abiertos ni totalmente cerrados a su entorno. Su interior debe estar protegido frente a determinados

compuestos tóxicos y, sin embargo, es preciso que se capten metabolitos y se eliminen productos de desecho. Dado que la célula debe manejar miles de sustancias, no es de extrañar que gran parte de la compleja estructura de las membranas esté dedicada a la regulación del transporte.

En esta sección consideramos las diversas formas en las que las moléculas se transportan a través de las membranas. Las tres categorías de transporte, pasivo, facilitado y activo, son muy diferentes y en general sirven a propósitos distintos en la célula.

TERMODINÁMICA DEL TRANSPORTE

Antes de considerar los mecanismos específicos de transporte, resulta útil revisar algunas de las ideas que se presentaron en el Capítulo 3. En él se trataron los principios generales de la termodinámica que gobiernan la transferencia de sustancias a través de las membranas o las superficies. Se demostró que el cambio de energía libre, ΔG, para el transporte de 1 mol de una sustancia desde una región en la que la concentración es C_1 a un lugar en el que la concentración es C_2, viene dado por

$$\Delta G = RT \ln \frac{C_2}{C_1} \tag{10.1}$$

El estado normal de equilibrio de una sustancia que puede atravesar una membrana es igualar las concentraciones a ambos lados de la misma.

Según esta ecuación, si C_2 es menor que C_1, ΔG es negativo, y el proceso es termodinámicamente favorable. A medida que se va transfiriendo cada vez mayor cantidad de sustancia (entre dos compartimientos finitos), C_1 disminuye y C_2 aumenta, hasta que $C_2 = C_1$. En este punto, $\Delta G = 0$, y el sistema está en equilibrio. *Salvo que intervengan otros factores*, este equilibrio es la fase final a la que se aproxima el transporte a través de cualquier membrana. Así, una sustancia que pueda atravesar la membrana alcanzará finalmente la misma concentración a ambos lados de la misma. Podemos describir el mismo proceso en términos cinéticos. Si las moléculas alcanzan la membrana de manera aleatoria, el número de las que entran en ella desde cada lado será proporcional a la concentración en ese lado. Cuando las concentraciones se igualan, las velocidades de transporte en las dos direcciones serán las mismas y no se producirá un transporte neto.

Hay tres circunstancias en las que puede evitarse esta igualdad, y todas ellas son importantes en el comportamiento de las membranas reales:

1. Las macromoléculas de un lado de la membrana pueden unir de manera preferente una sustancia o ésta puede modificarse químicamente una vez que ha cruzado. Podemos encontrar que el compuesto A está más concentrado en el interior de la célula (en términos de moles totales de A por unidad de volumen) que en el exterior. Pero gran parte de A puede estar ligado a algunas macromoléculas celulares o puede haberse modificado de forma que esta parte no cuenta en la ecuación (10.1), que indica simplemente que las concentraciones de A *libre* a ambos lados deben ser iguales en el equilibrio. Un ejemplo adecuado es el del oxígeno en los eritrocitos. Si medimos la concentración de oxígeno *total* en un eritrocito, encontraremos que es más alta que la concentración de O_2 en el plasma sanguíneo circundante. Pero la concentración total en el interior de la célula incluye el oxígeno unido a la hemoglobina. La concentración de oxígeno *libre* en los fluidos del interior y del exterior de un eritrocito es la misma en el equilibrio.
2. Puede mantenerse un **potencial eléctrico de membrana** a través de una membrana que influya en la distribución de los iones. Esta tendencia puede expresarse cuantitativamente de la forma siguiente. Para un ion de carga Z,

el cambio de energía libre para el transporte a través de una membrana de una célula o un orgánulo tiene ahora dos aportaciones: el término de concentración normal, tal como se expresa en la ecuación (10.1), más un segundo término que describe el cambio de energía (o trabajo implicado) al moverse un mol de iones a través de la diferencia de potencial. Consideramos un proceso en el que se transportan iones desde el *exterior* al interior.

$$\Delta G = RT \ln \frac{C_{\text{dentro}}}{C_{\text{fuera}}} + ZF\Delta\psi \qquad (10.2)$$

En esta ecuación, F es la constante de Faraday (96.5 kJ $mol^{-1}V^{-1}$), y $\Delta\psi$ es el potencial de membrana en voltios. Definimos la dirección de $\Delta\psi$ como hicimos para el transporte (fuera→dentro). Si $\Delta\psi$ es negativo (por ejemplo, al ir desde fuera hacia dentro) y Z es positivo, el término $ZF\Delta\psi$ de la ecuación (10.2) contribuye de forma negativa al valor de ΔG. Es decir, se favorece el transporte de cationes *hacia el interior* de la célula. Naturalmente, en el caso de los aniones ocurre lo contrario; serán expulsados hacia el exterior. Si la diferencia de potencial se mantiene de alguna forma, el estado de equilibrio ($\Delta G = 0$) *no* corresponderá a la misma concentración de iones en los dos lados de la membrana. Sin embargo, debe gastarse energía continuamente para mantener la diferencia de potencial o de otra forma se neutralizaría la migración de los iones. Y a la inversa, puede interpretarse la ecuación (10.2) como indicativa de que si se mantiene una diferencia de concentración iónica, se producirá un potencial a través de las membranas (véase el Problema 9).

3. Si se *acopla* un proceso termodinámicamente favorecido al transporte, el valor de ΔG de este proceso debe incluirse en la ecuación de energía libre. Ésta es la situación que suele darse en el *transporte activo*, para el que podemos escribir

$$\Delta G = RT \ln \frac{C_{\text{dentro}}}{C_{\text{fuera}}} + \Delta G' \qquad (10.3)$$

La cantidad $\Delta G'$ corresponde a una reacción favorecida termodinámicamente (como la hidrólisis del ATP) que está acoplada de alguna forma al proceso de transporte. Esta ecuación constituye una generalización de la ecuación (10.2), que ahora permite la intervención en el transporte de diversos procesos, no sólo los que mantienen una diferencia de potencial eléctrico.

Con esta información básica, volvamos ahora a los mecanismos por medio de los cuales las sustancias pasan a través de las membranas. Podemos presentar el problema planteando dos preguntas: (1) ¿se produce el transporte en contra de unos gradientes de concentración desfavorables, o se ve limitado finalmente por la ecuación (10.1)? Es decir, ¿se aproximan a la igualdad las concentraciones libres en ambos lados? (2) ¿Con qué velocidad se produce el transporte? Algunas moléculas que no se transportan de forma activa en contra de un gradiente de concentración pueden atravesar aún algunas membranas de manera muy rápida, mientras que otras se transportan con tanta lentitud que pueden excluirse eficazmente.

Puede impedirse la igualación a través de una membrana mediante la unión de la sustancia a macromoléculas, manteniendo un potencial de membrana o acoplando el transporte a un proceso exergónico.

TRANSPORTE PASIVO: DIFUSIÓN

El **transporte pasivo**, o **difusión pasiva**, se realiza mediante el movimiento aleatorio de las moléculas a través de las membranas. El proceso es el mismo que el del movimiento browniano de las moléculas de cualquier líquido, al que se

La tasa de transporte pasivo, medida por la permeabilidad de la membrana, es proporcional a los coeficientes de difusión y de reparto e inversamente proporcional al grosor de la membrana.

denomina **difusión molecular**. El transporte pasivo conduce en última instancia a que la concentración libre de la sustancia que difunde sea la misma a ambos lados de la membrana. La tasa neta de transporte, J (expresada en moles por centímetro cuadrado por segundo) es, como cabría prever, proporcional a la diferencia de concentración $(C_2 - C_1)$ a través de la membrana:

$$J = -\frac{KD_1(C_2 - C_1)}{l} \tag{10.4}$$

en donde l es el grosor de la membrana, D_1 es el **coeficiente de difusión** de la sustancia que difunde en la membrana y K es el **coeficiente de reparto** entre el lípido de la membrana y el agua (la relación de solubilidades de la sustancia en el lípido de la membrana y en el agua) para la sustancia que difunde. Para los iones y otras sustancias hidrófilas, K es una cifra muy pequeña, con lo que la difusión de estas sustancias a través de las membranas lipídicas es extraordinariamente lenta. Simplemente no hay la cantidad suficiente de una sustancia hidrófila disuelta en la bicapa que proporcione un transporte rápido. De acuerdo con la ecuación (10.1), la ecuación (10.4) indica que el transporte neto se detendrá cuando $C_2 = C_1$. Si C_1 y C_2 se expresan en mol/cm^3 y l en cm, las unidades de D_1 son cm^2/s. D_1 no es lo mismo que el coeficiente de difusión (D) que tendría la misma molécula en una solución acuosa, ya que depende no sólo del tamaño y la forma de la molécula, sino también de la viscosidad de los lípidos de la membrana.

Generalmente no conocemos K, D_1 o el grosor exacto de las membranas involucradas, por lo que con frecuencia describimos el transporte pasivo mediante un **coeficiente de permeabilidad**, ***P***, que puede medirse con un experimento directo:

$$J = -P(C_2 - C_1) \tag{10.5}$$

Comparando las ecuaciones (10.5) y (10.4) podemos ver que P viene dado por

$$P = \frac{KD_1}{l} \tag{10.6}$$

con unas unidades de cm/s.

En la Tabla 10.6 se indican los coeficientes de permeabilidad de diversos iones y moléculas pequeñas en las membranas. Los valores de P bajos de los iones son los que cabría prever, puesto que los iones, como ya se ha mencionado, tienen unos valores de K bajos. Sin embargo, el valor relativamente elevado de la permeabilidad para el agua resulta sorprendente. A pesar de su hidrofobicidad, las membra-

TABLA 10.6 Coeficientes de permeabilidad de algunos iones y moléculas a través de las membranas

Coeficiente de permeabilidad (cm/s) para	Membrana sintética (Fosfatidilserina)	Membrana biológica (Eritrocito humano)
K^+	$<9 \times 10^{-13}$	2.4×10^{-10}
Na^+	$<1.6 \times 10^{-13}$	10^{-10}
Cl^-	1.5×10^{-11}	1.4×10^{-4}*
Glucosa	4×10^{-10}	2×10^{-5}*
Agua	5×10^{-3}	5×10^{-3}

Fuente: Datos tomados de M. K. Jain y R. C. Wagner, *Introduction to Biological Membranes* (Nueva York: Wiley, 1980).

* Transporte facilitado. Obsérvese que siempre que se encuentra un transporte facilitado, el coeficiente de permeabilidad aumenta de manera muy notable.

nas biológicas no son, de hecho, barreras muy eficaces para el agua. Aunque no están del todo claras las razones de este hecho, es probable que sea ventajoso para la vida, puesto que permite a las células intercambiar el agua fácilmente con su entorno. Cuando es preciso evitar a toda costa la pérdida de agua, como ocurre en las hojas de las plantas del desierto, las sustancias céreas, con sus estructuras mucho más hidrófobas proporcionan una barrera casi impermeable. Parece probable que la flexibilidad conformacional de los lípidos de la membrana por encima de la transición cristalina gel-líquido cree "agujeros" o "bolsillos" que permitan la difusión de moléculas pequeñas neutras como el H_2O o el O_2.

TRANSPORTE FACILITADO: DIFUSIÓN ACELERADA

Para muchas sustancias, el transporte lento que proporciona la difusión pasiva es simplemente insuficiente para las necesidades funcionales y metabólicas de las células, y es preciso encontrar medios para aumentar las tasas de transporte. Así, por ejemplo, el intercambio de Cl^- por HCO_3^- es esencial para la función de los eritrocitos. Si analizamos la permeabilidad de las membranas eritrocitarias a los iones cloruro y bicarbonato, encontramos unos coeficientes de permeabilidad de aproximadamente 10^{-4} cm/s. Esta cifra es aproximadamente 10 millones de veces mayor que el coeficiente de permeabilidad para estos iones en las bicapas lipídicas puras como la membrana artificial de fosfatidilserina descrita en la Tabla 10.6. Evidentemente es necesario algún mecanismo especial que explique esta diferencia. Se conoce la existencia de dos tipos generales de **transporte facilitado** o **difusión facilitada**. Un tipo utiliza poros formados por proteínas transmembrana (Figura 10.20a). El otro tipo se produce a través de moléculas portadoras transmembrana (Figura 10.20b).

El transporte facilitado, a través de poros o transportadores, puede aumentar la tasa de la difusión a través de una membrana en muchos órdenes de magnitud.

Transporte facilitado por poros

Hemos descrito ya el aparato responsable del transporte facilitado de Cl^- y HCO_3^- en las membranas eritrocitarias: se trata de la proteína transmembrana denominada proteína de la banda 3 o canal aniónico (véase la página 372). La proteína de la banda 3 atraviesa la membrana, formando un canal o *poro iónico* a través del cual puede pasar el Cl^- y el HCO_3^-. Como se ha explicado

$$CO_2 + H_2O \underset{}{\overset{\text{Anhidrasa carbónica}}{\rightleftharpoons}} HCO_3^- + H^+$$

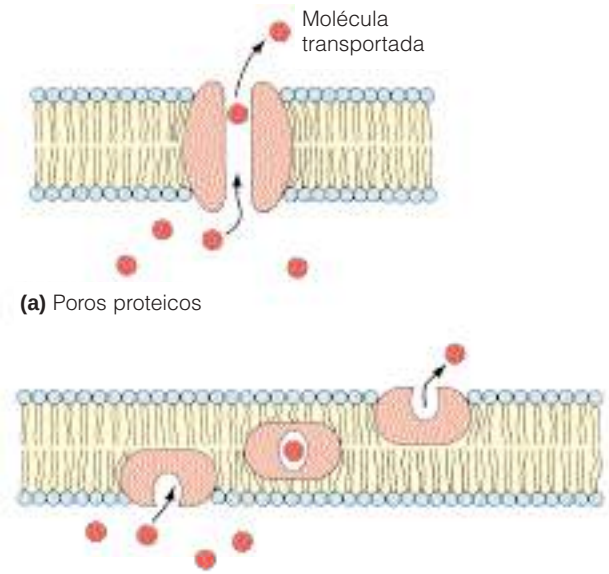


FIGURA **10.20**

Los dos mecanismos principales de transporte facilitado. **(a)** Poros proteicos. **(b)** Moléculas transportadoras.

en el Capítulo 7, gran parte del CO_2 generado en los tejidos se transporta como HCO_3^-, que se forma en los eritrocitos por la acción de la anhidrasa carbónica sobre el CO_2. La salida de HCO_3^- se compensa por la entrada de Cl^-; ambos mantienen el equilibrio de carga y facilitan la liberación de O_2 (véase el Capítulo 7). La proteína de la banda 3 no sólo forma un orificio en la membrana para el paso de los iones, sino que es un canal muy selectivo, que intercambia HCO_3^- por Cl^- en una proporción 1:1. Por el contrario, este transporte facilitado no es necesario para el O_2. Estas moléculas pequeñas apolares pueden desplazarse con rapidez a través de la membrana por difusión pasiva.

Otro proceso de difusión facilitada de la membrana eritrocitaria es esencial para la supervivencia de la célula. Las demandas energéticas bajas de un eritrocito se satisfacen con la glucosa, que puede obtenerse con facilidad del plasma sanguíneo circundante. Sin embargo, como se observa en la Tabla 10.6, el transporte pasivo de la glucosa a través de membranas fosfolipídicas artificiales es exasperantemente lento: $P = 4 \times 10^{-10}$ cm/s. Por tanto, los eritrocitos y otras células necesitan un mecanismo para la difusión facilitada de la glucosa. Esta facilitación, al igual que el intercambio iónico facilitado, parece conseguirse mediante una proteína transmembrana que actúa como un poro, aumentando la tasa de difusión unas 50 000 veces. Esta *proteína transportadora de glucosa* (banda 4.5; véase la Tabla 10.5) es una molécula de 492 aminoácidos con 12 hélices que van de lado a lado de la membrana. La proteína transportadora tiene una capacidad de discriminación elevada y, por ejemplo, la D-glucosa se transporta con una tasa varios órdenes de magnitud superior a la de la L-glucosa. El transporte facilitado de metabolitos como la glucosa parece ser una característica frecuente en las células.

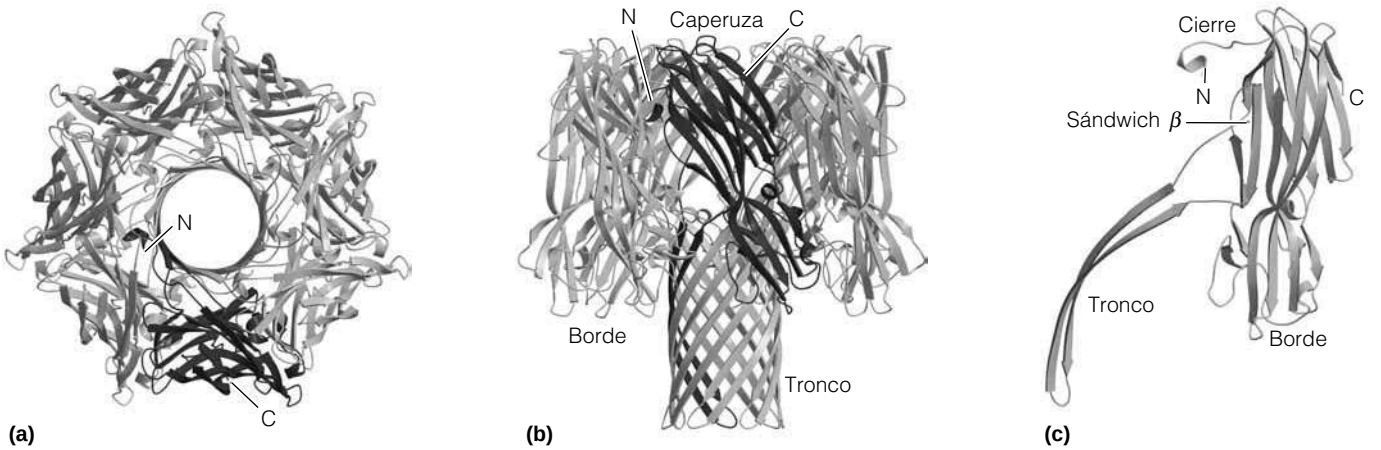
Los canales iónicos pueden ser armas y también necesidades. Muchas bacterias patógenas sintetizan y excretan toxinas proteicas que actúan formando agujeros en las membranas plasmáticas de las células del organismo hospedador. Estos canales (denominados **ionóforos**) permiten la entrada y salida indiscriminadas de iones, destruyendo el equilibrio iónico preciso que deben mantener las células para vivir. Un ejemplo, que se presenta en la Figura 10.21, es la α-toxina (α-hemolisina) de *Staphylococcus aureus.* Esta proteína está formada por siete subunidades que se combinan cuando encuentra un receptor superficial celular adecuado para producir la estructura cilíndrica que se muestra. El vástago de tonel-β es muy hidrófobo y forma un tubo hueco que pasa a través de la membrana celular.

Como defensa contra las bacterias, muchos organismos han formado sustancias *antibióticas.* Un número considerable de estas sustancias son también io-

FIGURA **10.21**

El canal que forma la hemolisina de *Staphylococcus aureus*. Dibujos de cintas del heptámero de α-hemolisina, visto **(a)** desde el eje heptamérico y **(b)** perpendicular al eje heptamérico. **(c)** Un promotor extraído de la estructura heptamérica. Se señalan las características estructurales. El heptámero tiene un diámetro de 10 nm y una longitud de 10 nm, medidas a lo largo del eje heptamérico. El vástago, que penetra en la membrana, tiene una longitud de unos 6 nm.

Estructura determinada por M. Hobaugh, L. Song y E. Gouaux. Reproducido de E. Gouaux, *Curr. Opin. Struct. Biol.* (1997) 7:556.



nóforos, dirigidos específicamente contra las membranas bacterianas. Alteran las diferencias cuidadosamente mantenidas de las concentraciones iónicas a través de las membranas bacterianas, con lo que causan la muerte de los microorganismos. Así, por ejemplo, la *gramicidina A*, producida por la bacteria *Bacillus brevis*, actúa como poro iónico específico para los cationes, y permite que se produzca una alteración de la proporción desigual de K^+ y Na^+ que normalmente se mantiene entre el interior y el exterior de las células vivas (véase más adelante). La gramicidina A es un polipéptido de 15 residuos, que contiene tanto aminoácidos del tipo L como del tipo D (Figura 10.22). La gramicidina adopta una conformación helicoidal abierta cuando se disuelve en la membrana, pero una molécula del antibiótico tiene la longitud suficiente para atravesar solamente la mitad del grosor de la membrana. Se forma un poro abierto únicamente cuando dos moléculas de gramicidina se alinean para formar un dímero término-terminal (Figura 10.22). Los iones potasio (y en menor medida, los iones sodio) pueden atravesar entonces el canal. Cuando estudiamos la conductancia iónica de las membranas a concentraciones muy bajas de gramicidina, observamos un fenómeno notable: la conductancia aumenta o disminuye de manera escalonada. Cada paso corresponde a la apertura o el cierre de un canal individual, probablemente por la difusión junta o separada de dos moléculas de gramicidina, una en cada lámina de la membrana. Se ha encontrado que, con determinadas circunstancias ambientales, la gramicidina puede adoptar estructuras de doble hélice diferentes. Sin embargo, la que se muestra en la Figura 10.22 es la que se cree predomina en las bicapas.

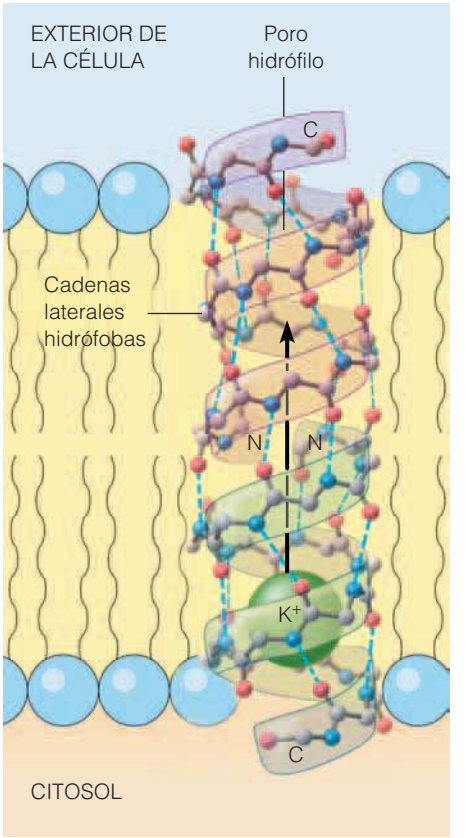


FIGURA **10.22**

Gramicidina A, un antibiótico que actúa como poro iónico. Dos moléculas de gramicidina A forman un poro a través de la membrana al adoptar una conformación helicoidal, con sus cadenas laterales hidrófobas en contacto con el lípido. La parte interna de la hélice forma el poro hidrófilo. Los enlaces de hidrógeno, en esta estructura helicoidal abierta, se asemejan a los de los polipéptidos con láminas β, lo cual es posible por los residuos alternos D y L.

Transporte facilitado por transportadores

Los ionóforos antibióticos constituyen también los ejemplos mejor conocidos de **transporte facilitado por transportadores** (véase la Figura 10.20b). Así, por ejemplo, la *valinomicina*, producida por un *Streptomyces*, tiene la estructura que se muestra en la Figura 10.23. Cuando se acompleja con K^+ es semejante a un polipéptido cíclico, que tiene tres repeticiones de la secuencia (D-valina)-(L-lactato)-(L-valina)-(D-hidroxiisovalerato). Su conformación plegada presenta una superficie externa con abundantes grupos $—CH_3$ y una agrupación interior de nitrógenos y oxígenos que es muy adecuada para quelar cationes. Las dimensiones de la cavidad interior se ajustan exactamente a las del ion K^+ y no encajan tan bien otros cationes. Esta estructura es exactamente la necesaria para un transportador catiónico: la superficie externa es hidrófoba, lo cual hace que la molécula sea soluble en la bicapa lipídica, mientras que el interior imita en ciertos aspectos a la concha de hidratación que el catión tendría en una disolución acuosa. Una molécula como la valinomicina puede difundir hasta una superficie de una membrana, captar un ion y difundir luego hasta la otra su-

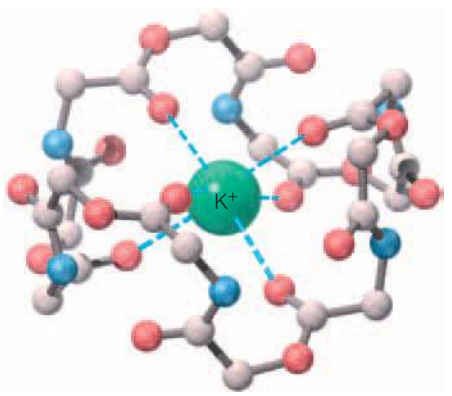


FIGURA **10.23**

Valinomicina, un antibiótico que actúa como transportador iónico. La parte externa de este polímero cíclico aproximadamente esférico es hidrófoba. La cavidad central rodeada de átomos de oxígeno (rojo) forma complejo con un ion K^+. Los átomos de nitrógeno se indican en azul, los de oxígeno del esqueleto polipeptídico se indican en rosa y los átomos de carbono en gris. La superficie está cubierta por grupos CH_3 (que no se muestran).

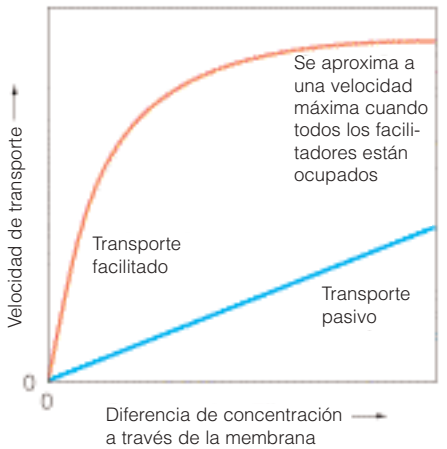


FIGURA **10.24**

Transporte facilitado y transporte pasivo. Si se representa la tasa del transporte frente a la diferencia de concentración que motiva dicho transporte, los gráficos indican que la tasa del transporte facilitado alcanza un límite a una diferencia de concentración elevada, mientras que la tasa del transporte pasivo aumenta de manera lineal.

perficie y liberarlo. No existe un flujo *dirigido*, pero el transportador aumenta de hecho la solubilidad del ion en la membrana. Podríamos decir que aumenta el factor K de la ecuación (10.6).

Otros antibióticos transportadores de iones tienen el mismo tipo de estructura. Estas moléculas son o bien moléculas cíclicas o bien cadenas lineales que pueden plegarse para formar estructuras cíclicas. Sus afinidades relativas por distintos iones son muy diversas. Así, por ejemplo, la valinomicina tiene una preferencia de casi 20 000 veces por el K^+ sobre el Na^+, mientras que el antibiótico *monensina* tiene una preferencia de 10 veces por el Na^+.

Distinción de los diferentes tipos de difusión

¿Cómo puede distinguirse la difusión facilitada de la difusión pasiva? Aparte de la velocidad del transporte que, en general, es mucho mayor, una prueba sencilla es que los sistemas de transporte facilitado son *saturables*. Cualquier membrana tiene un número limitado de transportadores o poros. Cada transportador puede llevar una sola molécula o ion a la vez, y cada poro puede acomodar tan sólo uno o unos pocos iones o moléculas en un determinado momento. En consecuencia, si medimos la velocidad de transporte con diferencias de concentración cada vez más altas de la sustancia transportada a través de la membrana, se alcanza una velocidad límite cuando todos los poros o transportadores están ocupados (Figura 10.24). En cambio, la velocidad del transporte pasivo aumenta de manera lineal con la diferencia de concentración, tal como se expresa en las ecuaciones (10.4) o (10.5) y en la Figura 10.24. En el transporte pasivo no hay lugares que saturar, al menos a las concentraciones habitualmente estudiadas de las moléculas transportadas.

También existe una forma fácil de diferenciar la difusión facilitada por poros de la facilitada por transportadores. Esta última debe ser muy sensible a la fluidez de la membrana, puesto que el transportador debe desplazarse en ella. Si se reduce la temperatura de una membrana por debajo de su temperatura de transición fluido-gel, prácticamente cesa el transporte por un transportador como la valinomicina. En cambio, el transporte mediante una estructura de poro, como el de la gramicidina A, se ve poco influido por los cambios de temperatura. Una analogía sencilla es la de un transbordador y un puente: si el río se hiela, el transbordador se detiene, pero el puente puede continuar con el transporte.

Como conclusión, debemos resaltar que, a pesar de que el transporte facilitado es a veces muy rápido y muy selectivo, se trata tan sólo de una forma especial de difusión. Los poros transportan más rápido porque proporcionan puertas abiertas y los transportadores aumentan de manera eficaz la solubilidad de la sustancia en la membrana. El estado de equilibrio para un sistema que presente un transporte facilitado es el mismo que cuando existe un transporte pasivo: la sustancia transportada acabará alcanzando unas concentraciones libres iguales a ambos lados de la membrana.

TRANSPORTE ACTIVO: TRANSPORTE EN CONTRA DE UN GRADIENTE DE CONCENTRACIÓN

En el transporte activo, las sustancias atraviesan la membrana en contra de un gradiente de concentración. El acoplamiento de la hidrólisis del ATP al transporte proporciona generalmente la energía libre necesaria.

La difusión facilitada resulta útil en muchos procesos bioquímicos, pero en algunas situaciones es imprescindible que las células o los compartimientos celulares sean capaces de transportar sustancias *en contra* de gradientes de concentración, incluso de gradientes muy desfavorables. Por considerar un ejemplo extremo, en determinadas circunstancias debe establecerse una relación de iones calcio de 30 000 a través de las membranas del retículo sarcoplásmico en las fibras musculares (véase el Capítulo 8). Según la ecuación (10.1), esta proporción corresponde a un $\Delta G = +26.6$ kJ/mol, lo cual constituye una barrera

realmente formidable. Sin embargo, esta proporción se crea y se mantiene en las células vivas. Este transporte en contra de un gradiente de concentración se denomina **transporte activo**. Evidentemente, para bombear iones en contra de un gradiente es necesaria una fuente de energía libre de algún tipo. Como cabría prever, esta energía suele proceder de la hidrólisis del ATP. Globalmente, se calcula que la mayor parte de las células gastan aproximadamente el 25% de su ATP tan sólo en el transporte activo. Sin embargo, la hidrólisis del ATP puede acoplarse con el transporte de varias maneras diferentes, algunas de las cuales son bastante indirectas. Para dar una idea de la gama de este tipo de mecanismos, consideraremos algunos ejemplos concretos.

Bombas iónicas: acoplamiento directo de la hidrólisis de ATP con el transporte

El ejemplo fisiológico mejor conocido de transporte activo es el mantenimiento de los gradientes de sodio y potasio a través de las membranas plasmáticas de las células. El líquido que rodea a las células de la mayoría de los animales es aproximadamente 140 mM en Na^+ y 5 mM en K^+. Sin embargo, las células animales mantienen en su citosol una concentración de Na^+ de aproximadamente 10 mM y una concentración de K^+ de alrededor de 100 mM.

A pesar de que el Na^+ y el K^+ pasan muy lentamente a través de las membranas mediante difusión pasiva, estas desigualdades acabarían por desvanecerse sin un mecanismo que mantuviera la entrada de K^+ y la salida de Na^+. Este movimiento se realiza mediante la acción de la **bomba de sodio-potasio** (Figura 10.25). Esta máquina molecular está formada por cadenas grandes (α) de 113 kilodalton cada una, y subunidades más pequeñas (β) de 55 kilodalton cada una. La subunidad α interviene directamente en el proceso de transporte y es una enzima que hidroliza ATP. El cambio de energía libre que se produce en esa reacción se emplea para impulsar el transporte. La subunidad α atraviesa la membrana 10 veces, formando un canal de múltiples hélices. El lugar de unión y fosforilación del ATP se encuentra en el lado citoplásmico (véase la Figura 10.25). Mirando al exterior hay múltiples lugares de unión de **esteroides cardiotónicos**, entre ellos la ouabaína y la **digitoxina** (digital), cuya importancia médica se considera más abajo. La subunidad β tiene una única hélice que

La bomba de Na^+–K^+ actúa en todas las células manteniendo unas concentraciones más altas de K^+ en el interior y de Na^+ en el exterior.

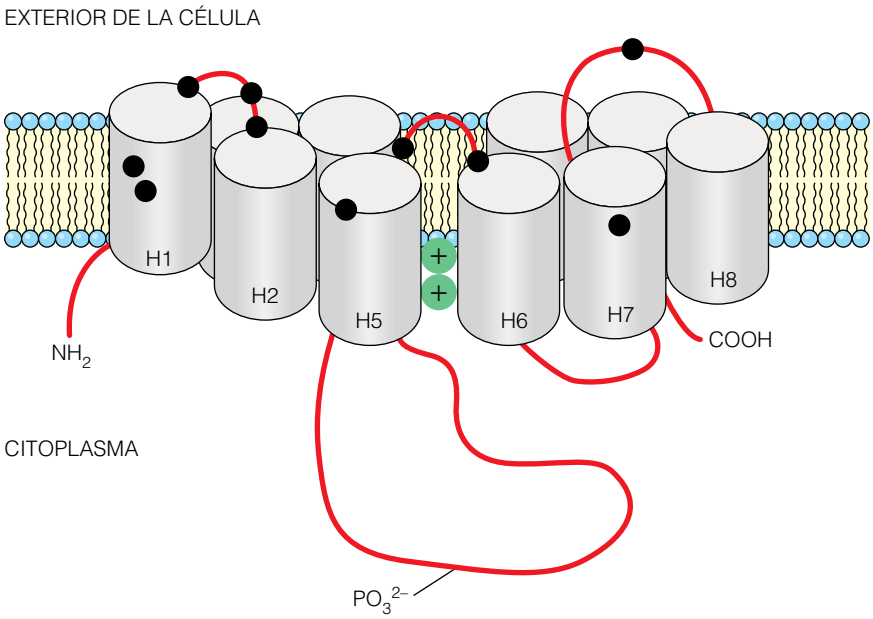


FIGURA **10.25**

Modelo de la subunidad α de la Na^+, K^+-ATPasa. La molécula se presenta en la conformación abierta hacia el citoplasma, con dos K^+ (verde) unidos en el canal. Se indica el lugar de fosforilación, así como los múltiples lugares de la ouabaína (puntos negros). Los lugares de las hélices transmembrana y la conformación completa son hipotéticos. No se muestra la subunidad β, que pasa a través de la membrana junto a la subunidad α.

Adaptado de J. B. Lingrel, J. Argüello, J. von Huysse y J. A. Kuntzweiler, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1997) 834:196-206.

atraviesa la membrana y transporta un gran polisacárido (20 kDa) en la superficie exterior. Se desconoce la función del polisacárido y de la proteína β. Aunque el único par $\alpha\beta$ funciona en sistemas reconstruidos, no está clara la estructura cuaternaria real en las membranas celulares. Muchos piensan que predominan los dímeros $(\alpha\beta)_2$. La bomba de sodio-potasio es sólo un miembro de una gran clase de ATPasas que participan en el transporte activo.

Antes de examinar cómo actúa la bomba, consideremos lo que debe hacer. Las estimaciones actuales indican que se bombean al interior de la célula aproximadamente dos iones K^+ y se bombean al exterior tres iones Na^+ por cada ATP hidrolizado. ¿Es razonable este cálculo desde el punto de vista termodinámico? Para responder a esta pregunta, calcularemos la energía libre necesaria para tomar 3 moles de Na^+ del lugar en que está a 10 mM y llevarlos a donde está a 140 mM, y 2 moles de K^+ de 5 mM a 100 mM, a 37°C. En primer lugar, aplicamos la ecuación (10.2) para calcular la energía libre necesaria para transportar 3 moles de Na^+ del interior de la célula al exterior de la misma. Debemos tener en cuenta el potencial de membrana que es de aproximadamente 0.07 voltios. El interior de la membrana es más negativo que el exterior, por lo que este potencial se opone al flujo. Por cada mol de Na^+, tenemos

$$\begin{aligned}\Delta G &= RT \ln \frac{C_{Na^+}\,(\text{fuera})}{C_{Na^+}\,(\text{dentro})} + Z_{Na^+} F\, \Delta\psi_{\text{dentro}\rightarrow\text{fuera}} \\ &= 8.314\ \text{J/K} \cdot \text{mol} \times 310\ \text{K} \times \ln \frac{140}{10} + 1 \times 96{,}480\ \text{J/volt} \cdot \text{mol} \times 0.07\ \text{volt} \qquad (10.7) \\ &= 6800\ \text{J/mol} + 6750\ \text{J/mol} = 13{,}550\ \text{J/mol} = 13.55\ \text{kJ/mol}\end{aligned}$$

Así pues, para 3 moles, tendremos $\Delta G = 3 \times 13.55$ kJ = 40.65 kJ.

Cuando se transporta K^+ hacia el interior de la célula, el potencial de membrana actúa en favor del flujo. Por cada mol de K^+ tenemos

$$\begin{aligned}\Delta G &= 8.314\ \text{J/K} \cdot \text{mol} \times 310\ \text{K} \times \ln \frac{100}{5} + 1 \times 96{,}480\ \text{J/volt} \cdot \text{mol} \times (-0.07\ \text{volt}) \\ &= 7720\ \text{J/mol} - 6750\ \text{J/mol} = 970\ \text{J/mol} = 0.97\ \text{kJ/mol}\end{aligned}$$

es decir, para 2 moles, $\Delta G = 1.94$ kJ. Obsérvese que el potencial de membrana es casi suficiente para mantener por sí mismo el gradiente de K^+. El requerimiento de energía libre total para el transporte al exterior de 3 moles de Na^+ y el transporte al interior de 2 moles de K^+ es pues

$$\Delta G_{\text{total}} = 40.65\ \text{kJ} + 1.94\ \text{kJ} = 42.59\ \text{kJ}$$

A primera vista, puede parecer que la hidrólisis de 1 mol de ATP no proporcionaría la energía necesaria, puesto que hemos indicado que $\Delta G°'$, el cambio de energía libre de estado estándar para la hidrólisis del ATP en condiciones fisiológicas, es de aproximadamente -30 kJ/mol. Sin embargo, en la mayoría de las células, el ATP tiene una concentración mucho más alta que el ADP o el P_i, por lo que el cambio de energía libre real por mol se aproxima más a -45 o -50 kJ/mol. Así pues, la hidrólisis de ATP basta para mantener estos gradientes de concentración en la estequiometría del transporte observada, pero no podría transportar más de 3 Na^+ y 2 K^+ por cada ATP. Además, si es correcto el cálculo 3 + 2, significa que la bomba es muy eficaz.

A pesar del transporte en contra de gradientes fuertes, la bomba de sodio-potasio no comporta transgresión alguna de los principios de la termodinámica. La

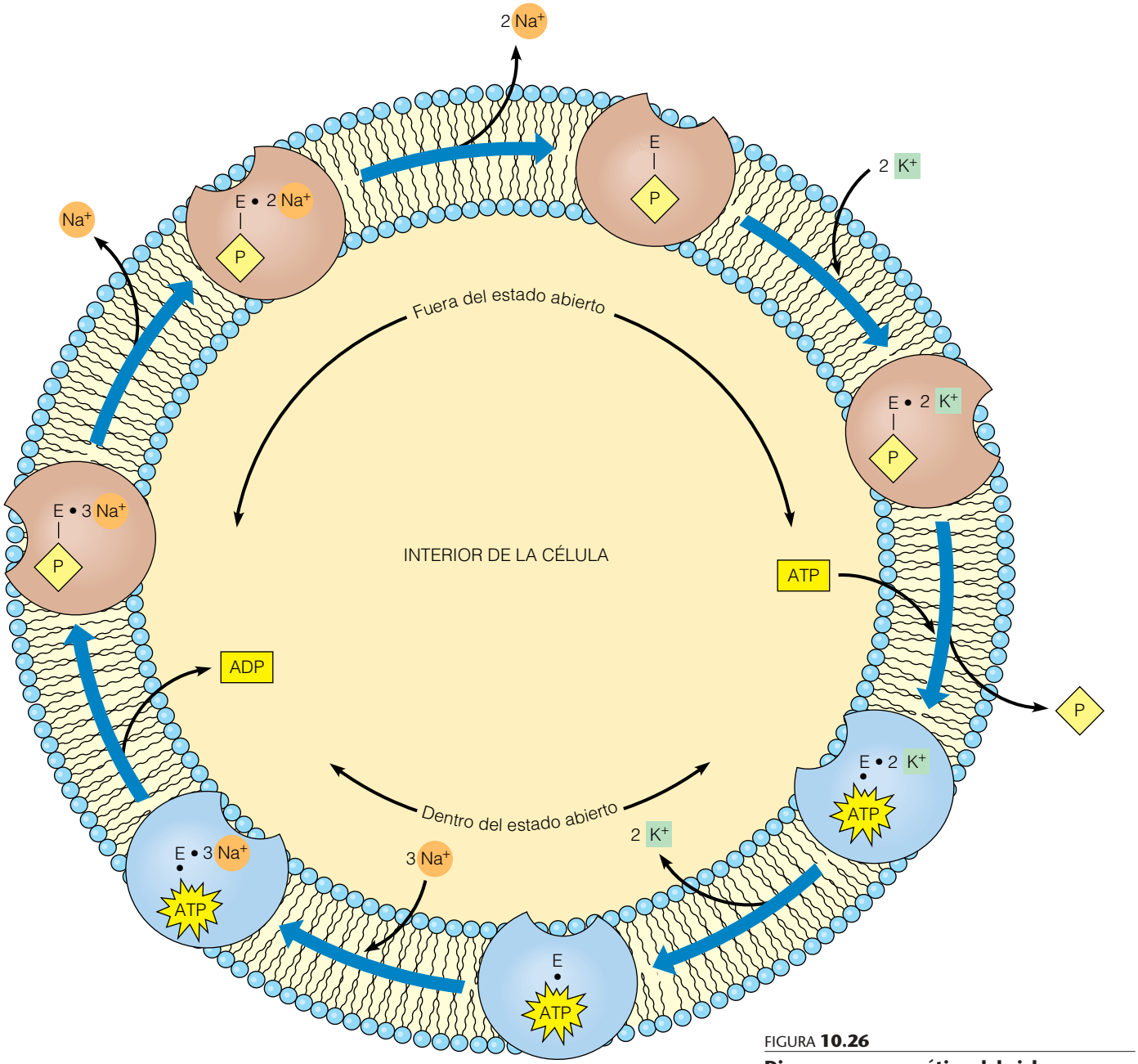


FIGURA **10.26**

Diagrama esquemático del ciclo funcional de la bomba de Na^+-K^+. Se supone que la subunidad α tiene dos estados, uno abierto hacia fuera (marrón oscuro) y el otro hacia dentro (azul). Un punto (·) entre los dos símbolos indica una unión no covalente, una línea (|) indica una unión covalente (como en la fosforilación).

única exigencia es que la hidrólisis del ATP y el transporte estén *acoplados*. Este acoplamiento se produce al parecer en un proceso de múltiples etapas. En la Figura 10.26 se presenta un modelo actual de todo el proceso, representado mediante un ciclo. Los estudios más completos han llevado a un modelo para el mecanismo de la bomba de Na^+–K^+ (y otras semejantes). Se ha propuesto que la bomba puede existir en dos tipos de conformaciones, uno abierto hacia el citosol y el otro abierto hacia el entorno celular. (Véase la Figura 10.26.) La transición a la conformación abierta al citosol, que permite la liberación de K^+ y la captura de Na^+, se desencadena por la unión de ATP y la liberación de fosfato. La transición al estado abierto al exterior, que permite la liberación de Na^+ y la captura de K^+, se produce tras la fosforilación de la subunidad α y la liberación de ADP.

El estado abierto al exterior, denominado E-P en la Figura 10.26, tiene una afinidad especialmente elevada por los esteroides cardiotónicos, como la digitoxina y la ouabaína. Estos agentes inhiben la bomba de Na^+–K^+ bloqueándola en esta conformación. Esta inhibición tiene efectos importantes en los músculos, especialmente en el corazón. La acumulación de Na^+ en las células conduce a medidas para reducirlo, incluyendo los procesos de intercambio Ca^{2+}–Na^+ catalizados por otra bomba. El aumento de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico de las células del músculo cardíaco conduce a contracciones mucho más fuertes (véase la página 295). Ésta es la razón por la que se utilizan como estimulantes cardíacos las sustancias del tipo de la digitoxina y la ouabaína.

Debe señalarse una cuestión importante para futuras referencias a la misma: *una bomba que impulse en sentido inverso puede actuar como generador de energía.* De hecho, el mismo tipo de mecanismo molecular que se ha descrito más arriba, si se permite el paso de una sustancia a favor de gradiente, puede utilizarse a veces para *generar* ATP. Es de destacar que este mecanismo constituye probablemente la principal vía de producción de ATP en los organismos vivos (véase el Capítulo 15).

Sistemas de cotransporte

En el cotransporte, el movimiento de una sustancia a través de la membrana se acopla con el transporte espontáneo de otra sustancia.

Existen otros tipos de transporte activo que no dependen directamente del ATP como fuente de energía, pero que utilizan la hidrólisis del ATP de una forma indirecta. Cabe imaginar ya cómo podría producirse este hecho si se considera que el tipo de bombas iónicas impulsadas por el ATP que se han descrito antes puede generar desigualdades importantes de concentraciones iónicas a ambos lados de las membranas. Estos gradientes iónicos están lejos del equilibrio y constituyen, por tanto, de por sí una posible fuente de energía libre. El **sistema de cotransporte sodio-glucosa** del intestino delgado (Figura 10.27) es un ejemplo de la forma en que se utiliza un gradiente iónico para impulsar un transporte. El

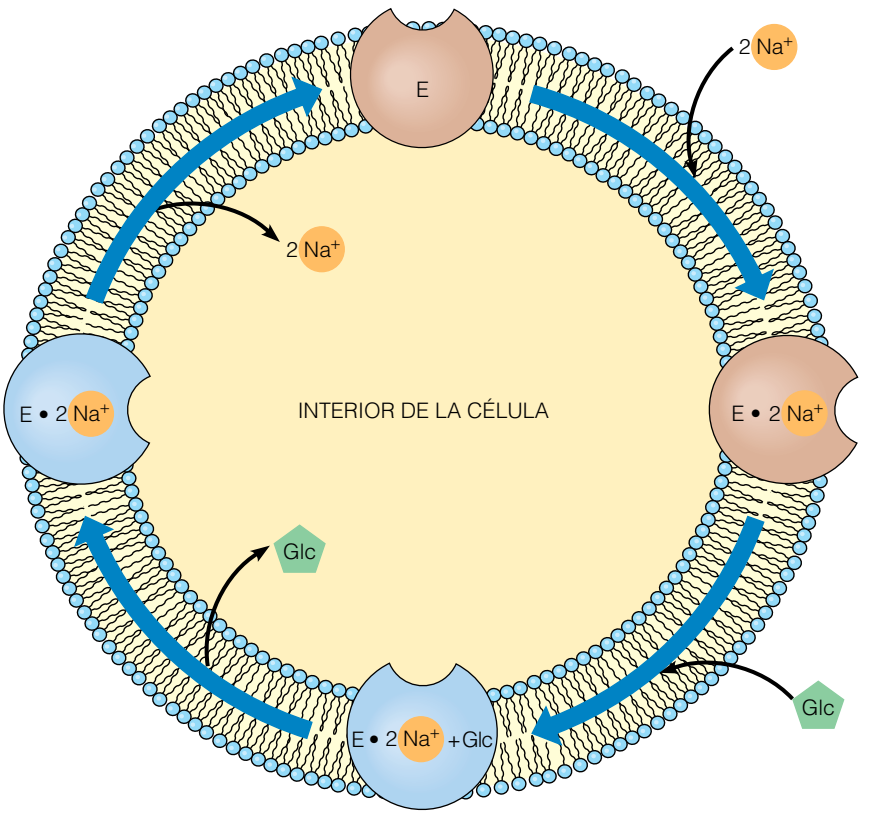


FIGURA **10.27**

Modelo esquemático del sistema de cotransporte (simporte) de sodio-glucosa. Como en el caso de la bomba de sodio-potasio, el canal de cotransporte sodio-glucosa se piensa tiene dos estados posibles, uno abierto hacia fuera y el otro hacia dentro de la célula. La unión de la glucosa a $E \cdot Na^+$ estimula la transición al estado abierto hacia dentro. La vuelta al estado abierto hacia fuera se produce tras la liberación de Na^+ al interior de la célula. El gradiente de sodio del interior al exterior proporciona la fuerza impulsora para este proceso, de otra forma, desfavorable. Ese gradiente debe mantenerse mediante la bomba de sodio-potasio.

TABLA 10.7 Algunos sistemas de cotransporte

Molécula transportada	Gradiente iónico utilizado	Organismo o tejido
Glucosa	Na^+	Intestino, riñón de muchos animales
Aminoácidos	Na^+	Células tumorales de ratón
Glicina	Na^+	Eritrocitos de paloma
Alanina	Na^+	Intestino de ratón
Lactosa	H^+	*E. coli*

transporte de cada molécula de glucosa desde el interior del intestino dentro de las células de la pared intestinal se acompaña de un movimiento simultáneo de un ion Na^+ en la misma dirección. Dado que el gradiente de Na^+ favorable se mantiene gracias a la bomba Na^+–K^+ dependiente de ATP de estas células, la glucosa puede transportarse en contra de un gradiente desfavorable de concentración de glucosa. La glucosa "va a cuestas" del transporte de Na^+ favorecido termodinámicamente. Cuando el transporte de las dos moléculas se produce en la misma dirección, como ocurre en este caso, se denomina **simporte** y cuando se produce en direcciones opuestas, se denomina **antiporte**.

Se conoce un elevado número de estos sistemas de cotransporte, muchos de los cuales se utilizan para trasladar nutrientes dentro de las células. En la Tabla 10.7 se dan algunos ejemplos. Muchos de ellos utilizan el gradiente de Na^+ como fuerza impulsora, pero algunos, como el *sistema de lactosa permeasa* de *E. coli*, dependen de un gradiente de H^+. Como veremos en capítulos posteriores, la generación de gradientes de H^+ es un paso central en la producción de energía por la mayoría de las células.

Transporte mediante modificación

Otro método del que disponen las células para realizar un transporte en contra de un gradiente utiliza el siguiente truco. Supongamos una molécula que al desplazarse hacia el interior de una célula por difusión pasiva o facilitada sufre una modificación química que hace que no pueda volver a pasar a través de la membrana en dirección contraria. El resultado neto es que se acumulan de manera constante cantidades de la molécula modificada en el interior de la célula. Este método es el que utilizan muchas bacterias para la captación de azúcares. Los azúcares se fosforilan, bien durante su difusión a través de la membrana, o tan pronto como emergen en el citosol. Las membranas son impermeables a los monosacáridos fosforilados cargados y, por tanto, estos productos permanecen en la célula. En el ejemplo mejor estudiado, el **sistema fosfotransferasa** de *E. coli*, el transporte se facilita por una proteína transmembrana, y la molécula de azúcar parece que se fosforila por el ATP mientras se encuentra en el poro. El proceso tiene la ventaja añadida de que la fosforilación de los monosacáridos es, como se expondrá en el Capítulo 13, el primer paso de su utilización metabólica. Así pues, los azúcares captados por *E. coli* están ya preparados para el metabolismo. Aunque este mecanismo de transporte parece muy diferente del acoplamiento directo de las bombas iónicas, es básicamente el mismo. En ambos casos se ha hidrolizado un compuesto fosfato de energía elevada (ATP) para conseguir el transporte dirigido de una molécula a través de la membrana.

En el transporte por modificación, una sustancia que ha difundido a través de una membrana se modifica de tal manera que no puede regresar.

En este apartado hemos descrito tan sólo algunos ejemplos de transporte específico de membrana. En los capítulos posteriores sobre el metabolismo continuaremos encontrando este fenómeno. Para dar una idea de la importancia que tiene el transporte específico, en la Figura 10.28 se muestran algunos de los

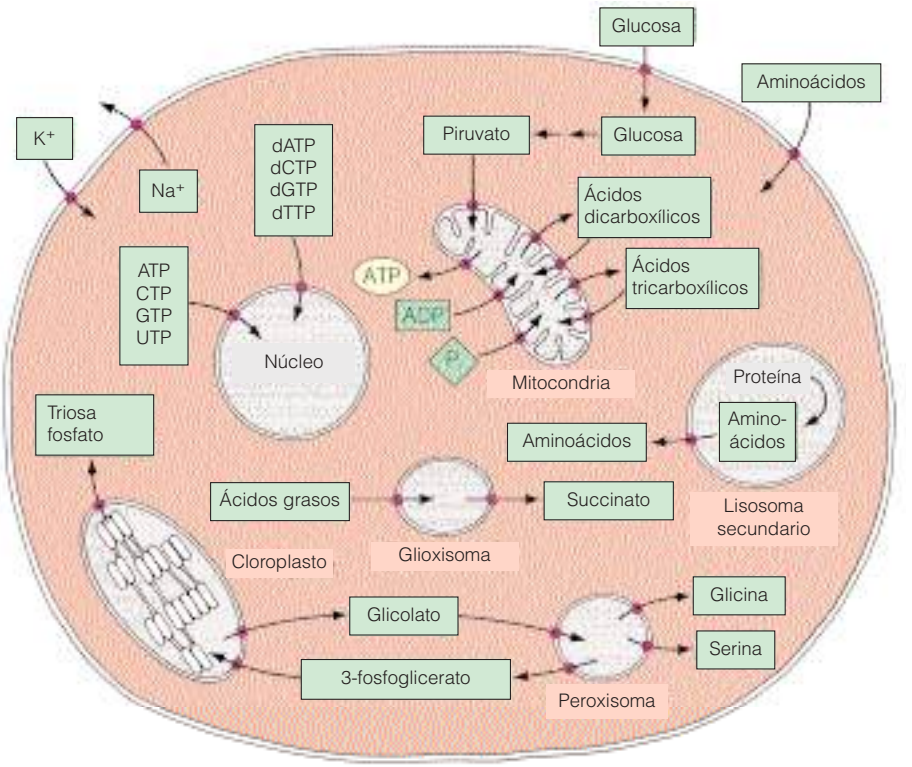


FIGURA **10.28**

Procesos de transporte específicos. Esta célula hipotética con características celulares de los vegetales y de los animales ilustra algunos de los procesos de transporte específicos más importantes. Todas las sustancias que se indican aquí, y otras muchas, se transportan en direcciones específicas a través de las membranas celulares. Los puntos rojos indican proteínas de transporte conocidas.

ejemplos conocidos, utilizando una célula hipotética que presenta algunas características de las células vegetales y otras de las células animales.

Membranas excitables, potenciales de acción y neurotransmisión

Terminaremos con un ejemplo que pone de relieve la enorme variedad de propiedades que pueden presentar las membranas, mediante su capacidad de regular el transporte iónico. La conducción de impulsos nerviosos en los animales es un proceso notable, pero depende de principios físicos muy sencillos.

Las **neuronas**, las células nerviosas responsables de la conducción de los impulsos, tienen unas extensiones filamentosas denominadas dendritas y axones, que actúan como "cables" del sistema nervioso (Figura 10.29). Son células realmente notables, que deben satisfacer unas necesidades poco habituales. Han de ser capaces de conducir impulsos sin una pérdida significativa de la señal, pero con la rapidez suficiente para permitir a un animal correr con agilidad. La conducción nerviosa se realiza no por un flujo de electrones, como en los cables, sino mediante ondas de potencial eléctrico de membrana en la superficie del axón. Cuando una onda de este tipo pasa por un punto de un axón o una dendrita, el **potencial de reposo** de la membrana se modifica momentáneamente a un **potencial de acción** en movimiento que constituye el impulso. Para comprender la forma en que esto ocurre, debemos examinar cómo se generan los potenciales de membrana y cómo pueden modificarse. En el espacio limitado que tenemos, sólo podemos dar una muy breve introducción a este campo amplio y complejo.

En la conducción nerviosa, se produce un desplazamiento de una onda de despolarización del potencial de membrana a lo largo de la fibra. Esto se denomina potencial de acción.

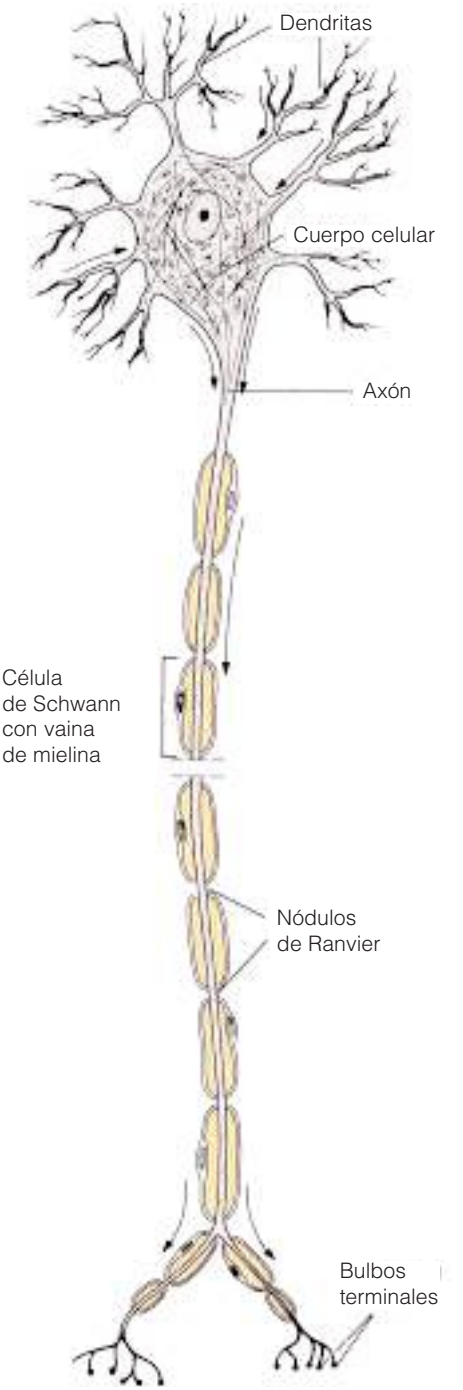


FIGURA **10.29**

Estructura de una motoneurona característica de mamífero. Una motoneurona transmite los impulsos nerviosos a los músculos o a otras células nerviosas. El cuerpo celular contiene el núcleo y la mayoría de los demás orgánulos. Las dendritas reciben señales de los axones de otras neuronas; los axones transmiten señales a otras células a través de las dilataciones terminales, que conectan con las dendritas de otras neuronas o con las células musculares. A lo largo del axón se disponen las células de Schwann, que envuelven el axón en capas de una membrana de mielina aislante. Las células de Schwann están separadas por zonas no mielinizadas denominadas nódulos de Ranvier.

POTENCIAL DE REPOSO

En primer lugar, debemos comprender el origen y la naturaleza del potencial de reposo. Empezaremos con un modelo muy simplificado, que parte de nuestra consideración anterior sobre la diferencia de potencial electroquímico a través de una membrana semipermeable (véase la ecuación (10.2)). Supongamos que tenemos un ion (M^Z) de carga Z que se encuentra fuera de la membrana a una concentración $[M^Z]_{fuera}$ y dentro de ella a una concentración $[M^Z]_{dentro}$.

Si el sistema está en equilibrio, ΔG para el transporte será cero. En consecuencia, a partir de la ecuación (10.2) obtenemos

$$\frac{RT}{ZF} \ln \frac{[M^Z]_{fuera}}{[M^Z]_{dentro}} = \Delta\psi \tag{10.8}$$

donde $\Delta\psi$ está, como antes, definido como fuera→dentro. La ecuación (10.8) se denomina **ecuación de Nernst**. Para los iones monovalentes ($Z = \pm 1$) a 20°C, la ecuación de Nernst se reduce a

$$\Delta\psi = \pm 59 \log_{10} \frac{[M]_{fuera}}{[M]_{dentro}} \tag{10.9}$$

cuando $\Delta\psi$ se expresa en milivoltios (mV).

Según la ecuación (10.9), si mantenemos de alguna manera una diferencia de concentración iónica a través de una membrana, se producirá una diferencia de potencial eléctrico. Así, por ejemplo, si se mantuviera un ion como el K^+ ($Z = +1$) con una concentración interior 10 veces mayor que la exterior, $\Delta\psi$ sería de -59 mV. La membrana estaría polarizada, con un potencial 59 mV menor en el interior. Si el único ion que presentara una distribución desigual de este tipo fuera el cloruro, el potencial sería $+59$ mV.

Los principales mecanismos que crean desequilibrios iónicos a través de las membranas celulares son las bombas iónicas específicas que actúan de manera continuada para concentrar determinados iones en uno u otro lado. Este desequilibrio da lugar al potencial de reposo a través de la membrana de un axón nervioso. Un ejemplo muy estudiado es el axón gigante del calamar. Se trata de un modelo experimental muy utilizado, ya que los calamares tienen la peculiaridad de tener axones de hasta 1 mm de diámetro. Como se indica en la Figura 10.30, es posible introducir electrodos de registro en un axón de este tipo y medir la diferencia de potencial a través de la membrana. (La figura muestra también electrodos de estimulación, que se utilizan en un experimento que describiremos más adelante.)

En el axón del calamar tenemos una situación más compleja de la que puede describirse mediante la ecuación de Nernst. Intervienen en ella varios iones, cada uno de los cuales puede atravesar la membrana, al menos en cierto grado, y que se mantienen en unas concentraciones desiguales a ambos lados de la

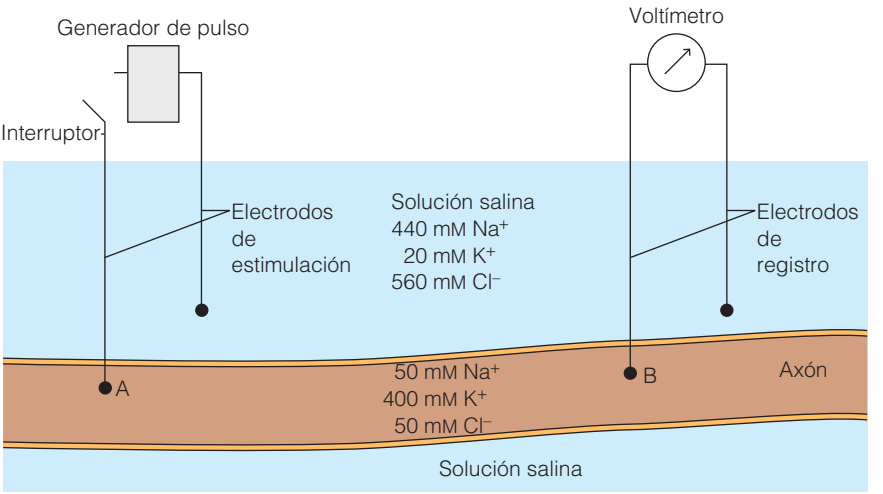


FIGURA **10.30**

Uso de los axones gigantes de calamar para los estudios de la transmisión nerviosa. Los electrodos conectados a un voltímetro registran el potencial a través de la membrana del axón. A las concentraciones iónicas del axón en reposo que se indican aquí, la lectura del voltímetro sería de aproximadamente −60 mV. Si el axón se estimula en el punto A por un pulso de despolarización, el potencial de acción en movimiento pasará rápidamente por el punto B, en el que puede registrarse.

misma. Si utilizáramos la ecuación de Nernst para calcular el potencial a partir de la distribución del K^+ solamente, predeciríamos un valor de −75 mV (al que denominaremos $\Delta\psi_{K^+}$). En cambio, utilizando la ecuación de Nernst con la concentración de Na^+ de dentro y de fuera de la célula, obtendríamos un $\Delta\psi_{Na^+} = +55$. Pero cuando medimos el potencial existente a través de una membrana del axón del calamar en reposo, obtenemos un valor de alrededor de −60 mV. ¿Qué es lo que determina el potencial real en este caso?

El potencial de reposo de una fibra nerviosa viene dado por las permeabilidades de la membrana a los diferentes iones y la concentración de estos iones en los dos lados.

La clave es que, cuando varias clases de iones pueden atravesar la membrana, la *permeabilidad* de la membrana para los diferentes iones es fundamental en la determinación de $\Delta\psi$. Los iones no están realmente en equilibrio a través de la membrana del axón, sino que se encuentran en un estado estacionario, cuya posición viene dada en parte por las permeabilidades individuales. Este estado estacionario puede describirse cuantitativamente mediante la **ecuación de Goldman**. Para el potencial de membrana determinado para varios aniones y cationes monovalentes, la ecuación de Goldman da

$$\Delta\psi = \frac{RT}{F} \ln\left(\frac{\Sigma_+ P_i[M_i^+]_{\text{fuera}} + \Sigma_- P_j[X_j^-]_{\text{dentro}}}{\Sigma_+ P_i[M_i^+]_{\text{dentro}} + \Sigma_- P_j[X_j^-]_{\text{fuera}}}\right) \qquad (10.10)$$

En este caso, los sumatorios (indicados mediante Σ) se realizan para todos los cationes (Σ_+) y aniones (Σ_-) con una permeabilidad significativa, y los valores de P son las permeabilidades de membrana relativas para estos iones. Obsérvese que si un determinado ion tuviera una permeabilidad muy superior a la de los demás, dominaría en la ecuación de Goldman, y la ecuación (10.10) se reduciría a la ecuación de Nernst para ese ion.

Apliquemos ahora la ecuación de Goldman al cálculo del potencial de reposo en el axón gigante del calamar. Los únicos iones que realizan una contribución apreciable al potencial de membrana en este caso son K^+, Na^+, y Cl^-, y sus permeabilidades relativas son: $P_{K^+} = 1.0$, $P_{Na^+} = 0.04$, y $P_{Cl^-} = 0.45$. Si se introducen estos valores en la ecuación (10.10), junto con las concentraciones iónicas dadas en la Figura 10.30, obtenemos $\Delta\psi = -61$ mV, lo cual concuerda con la observación experimental.

POTENCIAL DE ACCIÓN

El valor del potencial de reposo de −61 mV tiene una importancia crucial. Dado que −61 mV se aproxima mucho más a −75 mV que a +55 mV, ello sig-

nifica que con el potencial existente a través de la membrana del axón del calamar, el K^+ está mucho más próximo a su distribución de equilibrio que el Na^+. Si la membrana se hiciera permeable a los iones, el fenómeno principal sería una entrada masiva de iones sodio, con un desplazamiento consiguiente de los potenciales de membrana hacia ψ_{Na^+}.

Esto es exactamente lo que ocurre cuando un potencial de acción se transmite a lo largo de un nervio (Figura 10.31). Las fibras axonales tienen unos **canales de paso** específicos, sensibles al voltaje, para el transporte facilitado de Na^+ y K^+ a través de la membrana. Estos canales de paso son ionóforos proteicos que están abiertos o cerrados, según el potencial de membrana. En el estado de reposo están cerrados (Figura 10.31a). Supongamos que realizamos un experimento con el empleo de electrodos colocados en un axón gigante de calamar como se indica en la Figura 10.30. A una cierta distancia de los electrodos de registro, colocamos electrodos de estimulación conectados a una fuente de voltaje. Si aplicamos a este electrodo un pulso suficiente para despolarizar la membrana localmente en alrededor de 20 mV, es decir, a un potencial de −40 mV (el umbral para la apertura de los canales de Na^+), se abren los **pasos de activación** del canal de Na^+ (Figura 10.31b). La permeabilidad para el Na^+ aumenta unas 100 veces y se produce una inundación de iones sodio que pasan al interior, lle-

El potencial de acción se genera y se propaga porque una pequeña despolarización de la membrana de la célula nerviosa abre los canales de paso, permitiendo que los iones fluyan a través de los mismos.

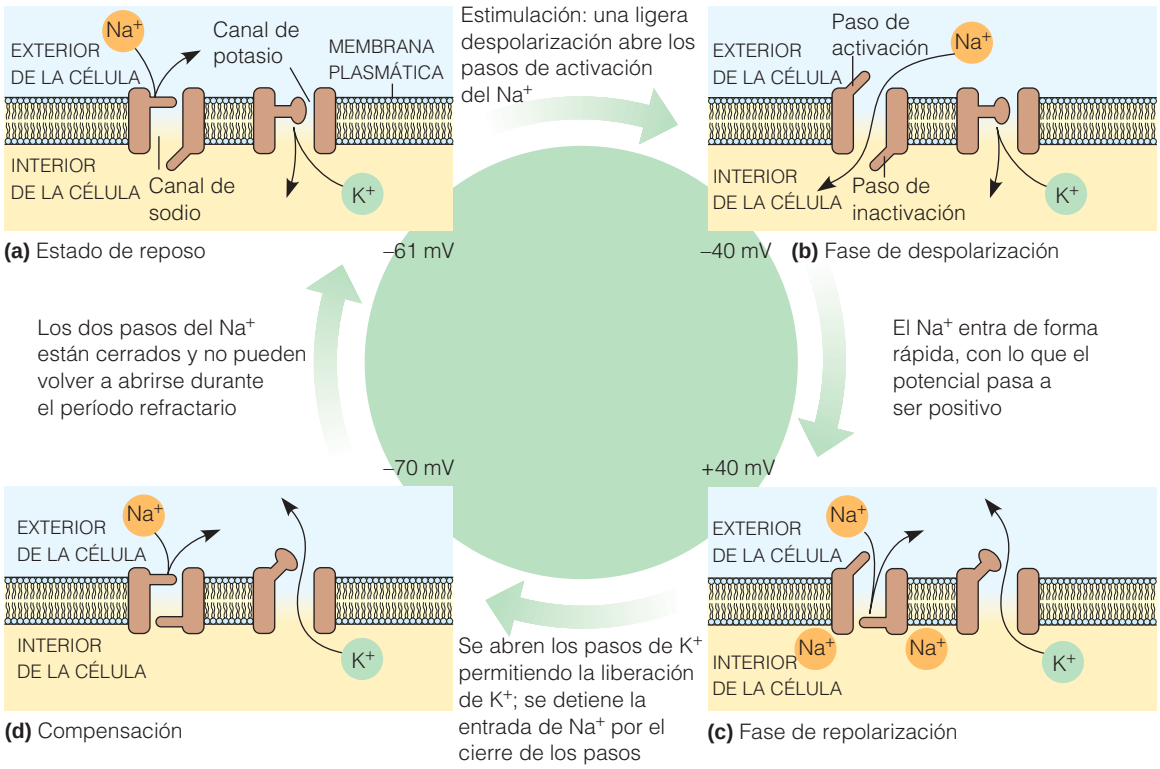
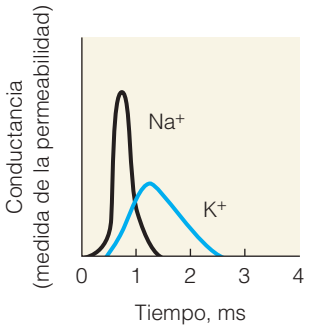


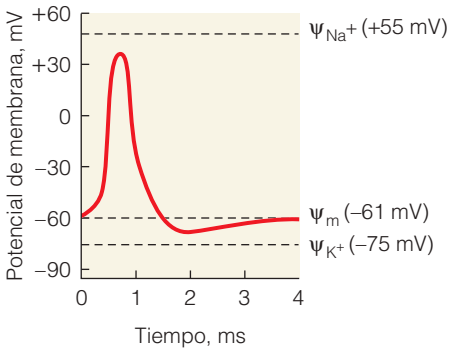
FIGURA **10.31**

Potencial de acción. **(a)** En el estado de reposo, se concentra K^+ en el interior de la membrana del axón y Na^+ en el exterior. **(b)** Un estímulo eléctrico produce una despolarización parcial local de la membrana, que da lugar a su vez a una apertura de los pasos de activación del canal de sodio, lo que permite una rápida e importante entrada de Na^+. La entrada rápida de Na^+ hace que el potencial de membrana pase a ser positivo. **(c)** Cuando el Na^+ se aproxima al equilibrio, la entrada se hace más lenta y el Na^+ difunde a lo largo del axón. Mientras tanto, se abren los pasos del K^+ y éste fluye hacia el exterior. **(d)** El flujo de salida de K^+ produce una disminución extrema del potencial de membrana, que pasa a ser temporalmente más negativo que el potencial de reposo. Este potencial muy negativo hace que los pasos de Na^+ se cierren y pasen a ser resistentes a la apertura. En consecuencia, se restablece el potencial de reposo, pero la región de la membrana queda inactivada de manera transitoria (refractaria).

Tomado de Neil Campbell, Jane Reece y Larry Mitchell, *Biology*, 5ª ed. (Menlo Park, CA: Addison Wesley Longman, 1999). © Addison Wesley Longman, Inc.



(a)



(b)

FIGURA **10.32**

Potencial de acción. **(a)** Cambios que se producen en la conductancia de la membrana en un punto de un axón cuando pasa por él un impulso nervioso. La membrana primero se hace permeable a los iones sodio, lo cual permite una entrada rápida e importante de Na^+. A continuación, se produce una disminución de la permeabilidad al Na^+, que va seguida de un flujo de salida de K^+. **(b)** Cambios del potencial de membrana que acompañan a los cambios de permeabilidad que se muestran en (a). Cuando se produce la entrada rápida de Na^+, el potencial aumenta y pasa a ser positivo. Cuando aumenta el flujo de K^+, el potencial disminuye hasta más allá del potencial de reposo, ψ_m, antes de volver a equilibrarse. Los potenciales ψ_{Na^+} y ψ_{K^+} son los valores teóricos de un potencial de membrana únicamente determinado por el Na^+ o por el K^+, respectivamente.

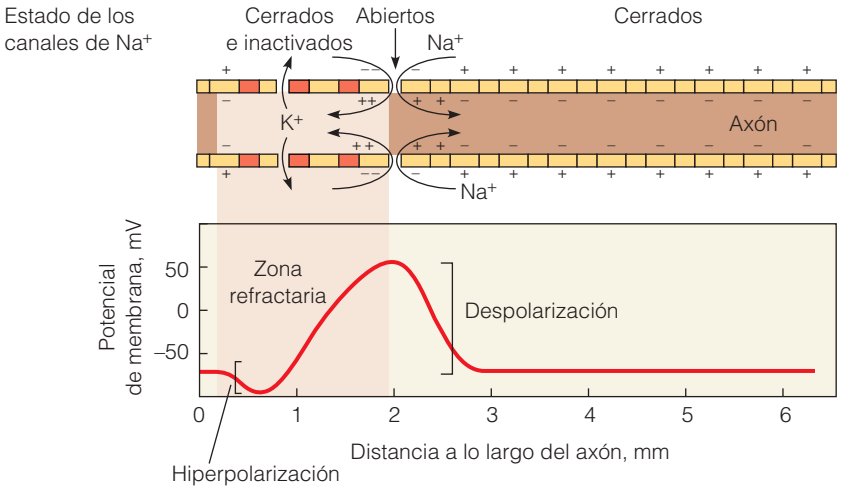
vando el potencial de membrana hasta aproximadamente +40 mV en menos de un milisegundo (Figura 10.31c). Si se expresa según la ecuación de Goldman (10.10), la permeabilidad de los iones Na^+ súbitamente elevada hace que éstos dominen, y el potencial de membrana *se aproxima* a $\Delta\psi_{Na^+}$ (+55 mV). Sin embargo, no llega a alcanzar este valor, ya que se producen entonces nuevas modificaciones. Como se observa en la Figura 10.31b, el estímulo provoca también una apertura de los pasos del canal de K^+, aunque de manera más lenta, y éstos sacan iones K^+ al medio externo. Este fenómeno invierte de nuevo el potencial, disparándolo hasta alrededor de −70 V. Este cambio cierra los **pasos de inactivación** del canal de Na^+ (que están separados de los pasos de activación), con lo que hace que los canales de Na^+ sean temporalmente resistentes a la apertura (período refractario, Figura 10.31d). Los cambios de potencial y de permeabilidad que se muestran en la Figura 10.31b-d, se producen en unos pocos milisegundos. En la Figura 10.32 se representan gráficamente estos mismos cambios.

Toda esta actividad tendría un efecto extraordinario pero localizado si no fuera por el fenómeno que se muestra en la Figura 10.31c y d. Cuando los iones Na^+ fluyen dentro, difunden alejándose de la región del estímulo, y desencadenan el mismo ciclo de despolarización en la zona adyacente de la fibra. De esta forma, se produce una onda de despolarización que desciende por el axón. Tras el frente de la onda se produce la polarización inversa debido a la salida de K^+, la zona refractaria en la que los canales de K^+ están abiertos y los canales de Na^+ están inactivados, y la vuelta final al estado de reposo (Figuras 10.31a y 10.33). Así pues, el electrodo de registro de la Figura 10.30 observará el paso a través del mismo, cierto tiempo después del pulso de estimulación, de exactamente el mismo patrón de despolarización e inversión que se indica en la Figura 10.31b-d y la Figura 10.32. Este pulso que se desplaza se denomina *potencial de acción*. El movimiento se ilustra en la Figura 10.33. El tiempo necesario para que el impulso pase desde el electrodo de estimulación al electrodo de registro es proporcional a la distancia que existe entre los dos electrodos e inversamente proporcional a la velocidad de propagación del pulso. Los valores característicos de propagación del potencial de acción oscilan entre 1 y 100 metros por segundo.

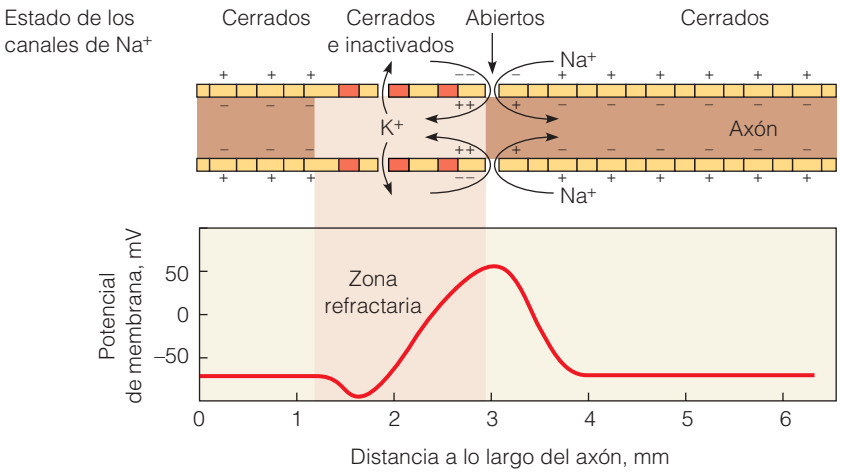
Hay varias características del potencial de acción derivadas directamente del hecho de que constituya una onda de despolarización de la membrana. Estas características permiten diferenciarlo claramente de la conducción mediante flujo de electrones que se observa en los circuitos eléctricos habituales.

1. El potencial de acción no disminuye de manera apreciable con la distancia a la que se transmite, ya que se renueva de manera continua en cada punto a lo largo del axón.
2. El potencial de acción es un fenómeno todo o nada. Si el estímulo es suficiente para activarlo, se produce, y su magnitud es independiente del voltaje del estímulo, en tanto en cuanto el estímulo sea superior al valor umbral que es necesario para la activación.
3. Una vez ha pasado un impulso, la región del axón situada inmediatamente detrás del mismo no es capaz de transmitir otro impulso durante un período de algunos milisegundos, debido al período refractario.

Estas tres características explican algunas de las propiedades peculiares de los sistemas nerviosos de los animales. Como consecuencia de la característica 2, las redes neuronales se parecen mucho más a circuitos digitales que a circuitos analógicos. Una neurona realiza una descarga o no la realiza. Además, los estí-



(a) Tiempo = 0



(b) Tiempo = 1 ms

FIGURA **10.33**

Transmisión del potencial de acción. Se muestran dos "instantáneas", obtenidas con una separación de 1 ms, del potencial a lo largo del axón. El color rojo indica los canales inactivados. Las flechas muestran la entrada de Na^+. **(a)** A tiempo = 0, se está produciendo un potencial de acción en la posición 2 mm. La despolarización se extiende por el axón, desencadenando la aparición del potencial de acción a lo largo del mismo. **(b)** A tiempo = 1 ms, el pico del potencial de acción se ha desplazado a la posición 3 mm. El potencial sólo puede moverse en una dirección, ya que después que ha pasado, la zona que queda por detrás del potencial se hace refractaria durante unos milisegundos.

Adaptado de J. Darnell et al., *Molecular Cell Biology*. © 1986, 1990, 1996 Scientific American Books, Inc. Utilizado con permiso de W. H. Freeman and Company.

mulos más intensos no dan lugar a potenciales de acción mayores: simplemente producen impulsos más frecuentes. Pero dado el período refractario (característica 3), un sistema nervioso puede "saturarse" y tan sólo puede manejar un determinado número de impulsos por segundo.

VELOCIDAD DE LA TRANSMISIÓN NERVIOSA

La velocidad de la transmisión nerviosa aumenta con el incremento del tamaño del axón o con el grado de aislamiento de éste producido por la mielina.

Las propiedades del axón tienen un efecto importante sobre la velocidad con la que puede transmitirse un pulso a lo largo del mismo. Básicamente, la velocidad depende de la rapidez con la que la región del axón situada por delante del pulso puede despolarizarse hasta el valor umbral necesario para abrir los pasos de los canales de Na^+. Si los iones Na^+ pueden difundir rápidamente alejándose de su punto de entrada, el pulso se desplazará con rapidez. La resistencia al movimiento del Na^+ puede reducirse con el empleo de un axón grande. Esta forma de abordar el problema se ve en los axones del calamar de los que hemos hablado antes. La mayoría de los invertebrados, y en especial los moluscos, son animales de movimientos lentos, pero el calamar es una excepción. Para producir un estallido de velocidad, debe ser capaz de expulsar agua de manera rápida me-

diante la contracción de su cavidad del manto. Los axones que controlan los músculos necesarios para ello son muy grandes, lo que le permite una respuesta rápida.

Los vertebrados adoptan un enfoque muy diferente. La mayor parte de los axones de los vertebrados, y en especial los del sistema nervioso periférico, están cubiertos en gran parte de su longitud por una vaina discontinua de **mielina**, producida por las membranas plasmáticas de unas células especiales denominadas *células de Schwann* (véase la Figura 10.29). La vaina de mielina es una envoltura de muchas capas de membrana alrededor del axón, que lo aísla e impide la conducción a través de la membrana (Figura 10.34). El aislamiento se interrumpe periódicamente en los *nódulos de Ranvier* (véase la Figura 10.29). Estos nódulos son los únicos puntos de un axón mielinizado en los que puede producirse el intercambio de iones con el entorno y los canales de Na^+ y de K^+ están todos concentrados aquí. En un axón de este tipo, el potencial de acción salta rápidamente de un nódulo a otro, en un proceso denominado conducción *saltatoria*. La eficacia de la mielinización puede apreciarse por el hecho de que un axón mielinizado de 12 μm de diámetro conduce con una rapidez equivalente a la de un axón de calamar no mielinizado de 600 μm de diámetro.

Algunas enfermedades neurológicas se asocian a una pérdida de la mielina y la más conocida de ellas es la *esclerosis múltiple*. En este trastorno se produce una destrucción gradual de la mielina en ciertas áreas del cerebro y la médula espinal. La conducción de los potenciales de acción se hace más lenta, y ello se acompaña de una pérdida de coordinación motora.

TOXINAS Y NEUROTRANSMISIÓN

Las neurotoxinas actúan bloqueando los pasos de la membrana del axón en estado cerrado o abierto.

Muchas sustancias extremadamente tóxicas ejercen su efecto impidiendo la acción de los pasos iónicos específicos que son necesarios para el establecimiento de un potencial de acción. Estas sustancias se denominan **neurotoxinas**. La *tetrodotoxina* se encuentra en algunos órganos del pez burbuja. Este pez se considera un manjar exquisito en el Japón, en donde hay "chefs" con una formación y diplomas especiales relativos a su capacidad de eliminar los órganos que contienen la toxina. La tetrodotoxina se fija de manera específica al canal del Na^+ e impide todo movimiento iónico. El mismo efecto lo produce la *saxitoxina*, que contienen los dinoflagelados marinos responsables de la "marea roja". Estas algas microscópicas, junto con su toxina, son ingeridas por el marisco y pueden a su vez ser consumidas por el ser humano. Estas dos toxinas, que atacan un proceso fundamental del sistema nervioso, son unas de las sustancias más venenosas que se conocen, y su ingestión accidental causa muchas muertes cada año. Una tercera sustancia muy venenosa, la *veratridina*, se encuentra en las

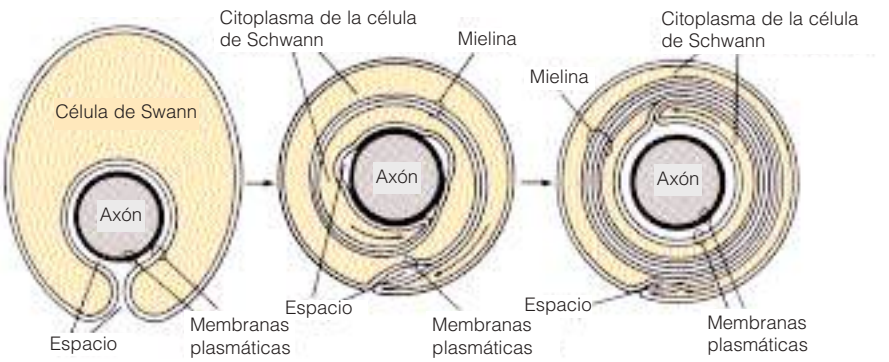
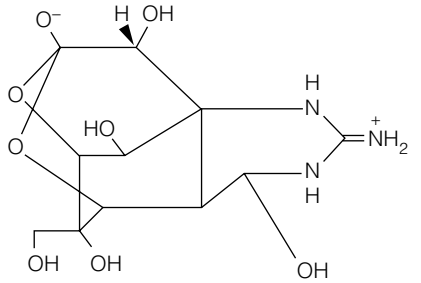


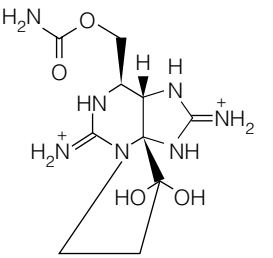
FIGURA **10.34**

Forma de mielinización del axón. Durante el desarrollo nervioso, las células de Schwann envuelven el axón y crecen en espiral alrededor del mismo formando múltiples capas de la membrana de mielina sobre el axón. Estas membranas tienen un contenido de proteínas especialmente bajo y consecuentemente un alto contenido lipídico. Constituyen, pues, excelentes aislantes. Las células de Schwann están espaciadas de manera regular a lo largo del axón, separadas por los nódulos de Ranvier, como se indica en la Figura 10.29.

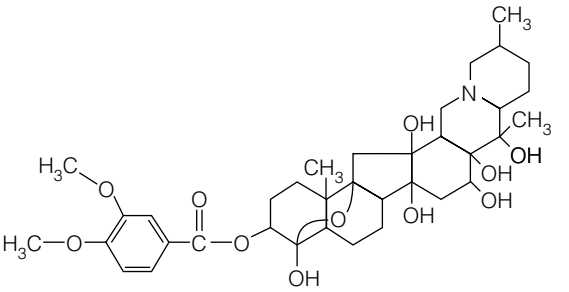
semillas de una planta de la familia de la azucena, *Schoenocaulon officinale*. Esta toxina se une también a los canales de Na^+, pero los bloquea en la configuración "abierta".



Tetrodotoxina



Saxitoxina



Veratridina

Estas toxinas han resultado útiles en los estudios de la estructura y la conducción del axón, puesto que su unión intensa las convierte en excelentes marcadores de afinidad para el canal de Na^+. Su empleo ha permitido a los investigadores determinar que los axones no mielinizados contienen unos 100 canales por micrómetro cuadrado, mientras que los nódulos de Ranvier de las fibras mielinizadas tienen una densidad de canales unas 200 veces superior.

Estos estudios han descubierto que los canales de Na^+ están formados de manera característica por una subunidad grande (α) de aproximadamente 260 a 300 kilodalton y una o varias subunidades más pequeñas (β), de 30 a 40 kilodalton cada una. En algunos casos faltan las subunidades β, y es evidente que la mayor parte de las propiedades funcionales del canal se asocian a la subunidad α. Ya se ha determinado la secuencia de aminoácidos de la subunidad α. La proteína contiene cuatro dominios hidrófobos, que probablemente forman paredes que van de lado a lado de la membrana alrededor de un poro central. Algunos segmentos de estos dominios contienen una secuencia repetida poco habitual en la que cada tercer aminoácido es una lisina o una arginina, separadas por dos aminoácidos hidrófobos. Se sospecha que estas secuencias forman parte del mecanismo de los pasos y pueden experimentar cambios de conformación cuando se altera el potencial de membrana.

Hemos descrito aquí tan sólo una parte del fenómeno completo de la transmisión de los impulsos nerviosos, la conducción a lo largo de una única fibra nerviosa. El otro problema igualmente importante de cómo estos impulsos se transmiten de una célula a otra se tratará en el Capítulo 21, en donde se describen las sustancias *neurotransmisoras*.

RESUMEN

Muchas de las propiedades importantes de los lípidos derivan del hecho de que estas sustancias son anfipáticas, esto es, contienen regiones hidrófobas y regiones hidrófilas. La mayor parte de los ácidos grasos que se encuentran en la naturaleza contienen un número par de átomos de carbono. Cuando están insaturados, los dobles enlaces suelen ser *cis*. Los ácidos grasos están presentes en las grasas (triacilgliceroles), en donde constituyen reservas de energía y elementos de aislamiento, y en las membranas, en donde son componentes de los fosfolípidos, los esfingolípidos, los glucoesfingolípidos y los glucoglicerolípidos. Las membranas son estructuras bicapa, que contienen proteínas y lípidos en un mosaico fluido. Las dos láminas difieren a menudo en su composición de proteínas y lípidos. Las proteínas periféricas están limitadas a una u otra cara de la membrana, mientras que las proteínas integrales se extienden de un lado a otro de la misma, con la presencia frecuente de hélices α hidrófobas en la región transmembrana.

El transporte a través de las membranas puede realizarse mediante difusión pasiva, puede ser facilitado por poros o transportadores, o puede ser impulsado de forma activa por reacciones exergónicas. Tan sólo en este último caso puede producirse un transporte en contra de un gradiente de concentración. Un ejemplo de ello es la bomba de Na^+–K^+, que mantiene la diferencia iónica y el potencial de membrana que se observa entre las células y su entorno. El transporte activo puede ser indirecto, como en el caso del cotransporte o el transporte mediante modificación.

La conducción de impulsos nerviosos se basa en el desplazamiento de una onda de despolarización (un potencial de acción) del potencial de membrana de una célula nerviosa. Esta despolarización se produce por el flujo de iones a través de los canales de paso que existen en la membrana. La velocidad de la transmisión nerviosa depende de las dimensiones de los axones y de si están o no mielinizados.

BIBLIOGRAFÍA

General

Gennis, R. B. (1989) *Biomembranes.* Springer-Verlag, Nueva York. Un tratado exhaustivo y de fácil lectura.

Gurr, A. I. y J. L. Harwood (1991) *Lipid Biochemistry: An Introduction*, 4ª ed. Chapman & Hall, Nueva York. Una fuente de información valiosa de datos generales relativos a los lípidos.

Lipowsky, R. y E. Sackmann (1995) *The Structure and Dynamics of Membranes.* Elsevier Science, Amsterdam. Una serie de trabajos actualizados.

Science (1992) 258:917-969. Este número de la revista *Science* (6 de Noviembre de 1992) contiene una serie de ocho artículos de revisión sobre diversos aspectos de la química de las membranas.

Vance, D. E. y J. E. Vance, eds. (1996) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes.* Elsevier Science, Amsterdam. Una serie de capítulos, cada uno de ellos escrito por un experto en la materia, que aportan información sobre una amplia gama de temas.

Asimetría y ensamblaje de las membranas

On den Kamp, J. A. F. (1979) Lipid asymmetry in membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 48:47-71.

Voelker, D. R. (1996) Lipid assembly into cell membranes. En: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*, D. E. Vance y J. E. Vance, eds. Elsevier Science, Amsterdam.

Proteínas de membrana

Branden, C. y J. Tooze (1991) *Introduction to Protein Structure*, Capítulo 13. Garland, Nueva York. Incluye una revisión breve y actualizada de las proteínas de membrana.

Lemmon, M. A. y D. Engelman (1992) Helix-helix interactions inside lipid bilayers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:511-518.

Singer, S. J. y G. L. Nicholson (1972) The fluid mosaic model of the structure of membranes. *Science* 175:720-731. Es el artículo clásico en el que se presentó este modelo.

Unwin, N. y R. Henderson (1984) The structure of proteins in biological membranes. *Sci. Am.* 250(2):78-94. Describe un estudio estructural pionero.

Esqueleto de la membrana

Bennett, V. (1985) The membrane skeleton of human erythrocytes and its implication for more complex cells. *Annu. Rev. Biochem.* 54:273-304.

Coleman, T. R., D. J. Fishkind, M. E. Mooseker y J. S. Morrow (1989) Functional diversity among spectrin isoforms. *Cell Motility Cytoskeleton* 12:225-247.

Liu, S.-C. y L. H. Derick (1992) Molecular anatomy of the red blood cell membrane skeleton: Structure-function relationships. *Semin. Hematol.* 29:231-243.

Transporte

Gouaux, E. (1997) Channel-forming toxins: Tales of transformation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:566-573. Un sumario claro de algunos formadores de canales interesantes.

Graves, J. S., ed. (1985) *Regulation and Development of Membrane Transport Processes.* Wiley, Nueva York. Una recopilación de buenos artículos.

Kühlbrandt, W., M. Auer y G. A. Scarborough (1998) Structure of the P-type ATPases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:510-516. Estructuras con una resolución de 8 Å de dos miembros de esta clase de bombas iónicas.

Lingrel, J. B. y T. Kuntzweiler (1994) Na^+, K^+-ATPase. *J. Biol. Chem.* 269:19659-19662. Una pequeña revisión clara e informativa.

Reithmeier, R. A. F. (1993) The erythrocyte anion transporter (band 3). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:515-523.

Taniguchi, K., K. Suzuki, D. Kai, I. Matsuoka, K. Tomita y S. Iida (1984) Conformational change of sodium and potassium-dependent adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 259:15228-15233.

Transmisión nerviosa

Bradford, H. F. (1986) *Chemical Neurobiology.* Freeman, San Francisco.

Hille, B. (1994) *Ionic Channels of Excitable Membranes.* Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

PROBLEMAS

1. Proporcione las estructuras de las siguientes sustancias, basándose en los datos de la Tabla 10.1.
   (a) ácido *cis*-9-Dodecanoico
   (b) 18:1cΔ11
   (c) Un ácido graso saturado que debe fundir por debajo de 30°C

2. Considerando estos componentes moleculares: glicerol, ácido graso, fosfato, alcohol de cadena larga e hidrato de carbono, responda a lo siguiente:
   (a) ¿Qué dos de ellos están presentes en las ceras y en la esfingomielina?
   (b) ¿Qué dos de ellos están presentes en las grasas y en la fosfatidilcolina?
   (c) ¿Cuál de ellos está presente en un ganglíosido pero no en una grasa?

3. La demostración clásica de que las membranas de las células plasmáticas están formadas por bicapas se basa en los siguientes tipos de datos:
   - Los lípidos de membrana de 4.74×10^9 eritrocitos formarán una monocapa con una superficie de 0.89 m^2 cuando se extienden en una superficie acuosa.
   - La superficie de un eritrocito es de aproximadamente 100 $(\mu m)^2$.

   Explique por qué estos datos sólo pueden explicarse si la membrana del eritrocito es una bicapa.

4. La porción lipídica de una bicapa característica es de unos 3 nm de grosor.
   (a) Calcule el número de residuos en una hélice α que se extienda exactamente en esta distancia.
   (b) El receptor del factor de crecimiento epidérmico tiene una sola hélice transmembrana. Identifíquela en esta secuencia parcial:

   ···RGPKIPSIATGMVGALLLLVVALGIGILFMRRRH···

5. En las situaciones descritas más adelante, ¿cuál es el cambio de energía libre si 1 mol de Na^+ se transporta a través de una membrana desde una región en la que la concentración es 1 μM hasta otra en la que es 100 μM? (Suponga que $T = 37$°C.)
   (a) En ausencia de potencial de membrana.
   (b) Cuando al transporte se opone un potencial de membrana de 70 mV.

   En ambos casos, ¿será suficiente la hidrólisis de 1 mol de ATP para impulsar el transporte de 1 mol del ion? (Suponga que el ΔG para la hidrólisis del ATP es de aproximadamente -50 kJ/mol en estas condiciones.)

*6. Considere la difusión pasiva de iones a través de la membrana eritrocitaria medida con los coeficientes de permeabilidad de la Tabla 10.6. Calcule el número de moles de K^+ que difundirían a través de una sola membrana eritrocitaria en 1 minuto partiendo de los siguientes datos:

$$C_{K^+}\text{ (dentro)} = 100\text{ mM}$$
$$C_{K^+}\text{ (fuera)} = 15\text{ mM}$$

   La superficie de un eritrocito es = 100 μm^2. [Nota: Tenga cuidado con las unidades.]

7. Si el volumen del eritrocito del Problema 6 es de aproximadamente 100 μm^3, ¿qué porcentaje de los iones K^+ escaparía mediante difusión pasiva en 1 minuto?

*8. Suponiendo que el flujo, J, en un transporte facilitado por un transportador sea proporcional a la fracción de transportadores ocupados, deduzca una ecuación para el cálculo de J en función de la concentración [A] de la sustancia transportada.

9. Suponga que el ion calcio se mantiene dentro de un orgánulo a una concentración 1000 veces superior a la existente fuera de la misma ($T = 37$°C). ¿Cuál es la contribución del Ca^{2+} al potencial de membrana? ¿Qué lado de la membrana del orgánulo es positivo y cuál es negativo?

10. Calcule los potenciales de membrana de equilibrio que cabe prever a través de una membrana a 37°C, con una concentración de NaCl de 0.10 M en el lado derecho y de 0.01 M en el

izquierdo, teniendo en cuenta las siguientes condiciones. Indique en cada caso qué lado es + y cuál es −.
(a) Membrana permeable tan sólo para el Na^+.
(b) Membrana permeable tan sólo para el Cl^-.
(c) Membrana igualmente permeable para ambos iones.

11. En cada uno de los apartados a, b y c del Problema 10, ¿se producirá un transporte apreciable de la sustancia para establecer el potencial de membrana?

*12. Los bastones de la retina contienen membranas que se despolarizan cuando se absorbe un fotón de luz. Suponga que existen las siguientes concentraciones dentro y fuera de un bastón de la retina:

	Concentración (mM)	
	Dentro	Fuera
K^+	100	5
Na^+	10	140
Cl^-	10	100

(a) Si las permeabilidades relativas de K^+ y de Cl^- son de 1.0 y de 0.45, respectivamente, ¿cuál debe ser la permeabilidad relativa del Na^+ para obtener un potencial de −30 mV, que es el valor que se observa a través de la membrana del bastón en reposo? Suponga $T = 37°C$. [Pista: Debe reordenar y despejar en la ecuación de Goldman.]
(b) Si los pasos de Na^+ se cerraran por completo tras la estimulación por un fotón, ¿qué valor del potencial de membrana se alcanzaría?

13. Muchas proteínas transmembrana son oligoméricas con varias subunidades idénticas. Los oligómeros parecen tener normalmente alguna forma de simetría C_n, en lugar de D_n o cualquier orden superior. Sugiera alguna razón para esta selectividad.

14. Un ser humano promedio genera aproximadamente su peso en ATP cada día. Una persona en reposo utiliza aproximadamente el 25% de este ATP en el transporte iónico, la mayoría por medio de la Na^+, K^+-ATPasa. Aproximadamente, ¿cuántos gramos de Na^+ y K^+ bombeará diariamente una persona sedentaria de 70 Kg a través de las membranas?

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 10A

Técnicas para el estudio de las membranas

Existe toda una batería de técnicas especiales para el estudio de la estructura y la función de las membranas. Sin ellas, nuestro nivel actual de conocimientos sobre las membranas no hubiera podido alcanzarse.

Métodos de microscopia electrónica

El examen de la estructura de la membrana tal como se da en el interior de las células se basa en gran parte en la microscopia electrónica, y se han utilizado prácticamente todas las variantes de este método que se han citado en Herramientas de la Bioquímica 1A en uno u otro momento. Así, por ejemplo, la ME de transmisión en cortes finos de células incluidas en una matriz de material plástico muestra las membranas celulares en un corte transversal (como ejemplos véanse las Figuras 1.11 y 1.12), mientras que la ME de barrido puede mostrar detalles de la superficie. Una variante especialmente útil de este método es la técnica de **fractura por congelación**. Si una membrana se congela rápidamente y luego se rompe mediante un golpe brusco de la cuchilla de un microtomo, es frecuente que se parta siguiendo el plano existente entre las láminas de la bicapa (Figura 10A.1). De esta forma se separa una capa de la otra, mostrando la estructura interna. A continuación, la muestra puede sombrearse con un metal y estudiarse por ME de barrido. En una variante de esta técnica denominada **grabado por congelación**, parte del hielo se sublima antes del sombreado, con lo que se aprecia la superficie y los detalles situados por debajo de ella.

Aunque la microscopia electrónica ha descubierto gran parte de la compleja arquitectura de las membranas naturales, los investigadores han de utilizar con frecuencia sistemas simplificados para el estudio de las propiedades específicas de las membranas. Para este fin, se emplean con frecuencia bicapas y vesículas sintéticas.

Preparación de bicapas y de vesículas

Generalmente pueden obtenerse las membranas de determinados tipos de células o de orgánulos purificados mediante la lisis de la célula o el orgánulo, seguida de una centrifugación diferencial.

Si, como se muestra en la Figura 10A.2, se extrae una membrana con disolventes orgánicos (por ejemplo, una mezcla de cloroformo-etanol), los componentes lipídicos solubles pueden separarse de las proteínas y los oligosacáridos insolubles. La mezcla lipídica puede fraccionarse posteriormente mediante métodos como la cromatografía líquida de alta presión para obtener los componentes lipídicos puros, y un análisis del contenido lipídico. Otra posibilidad es que el investi-

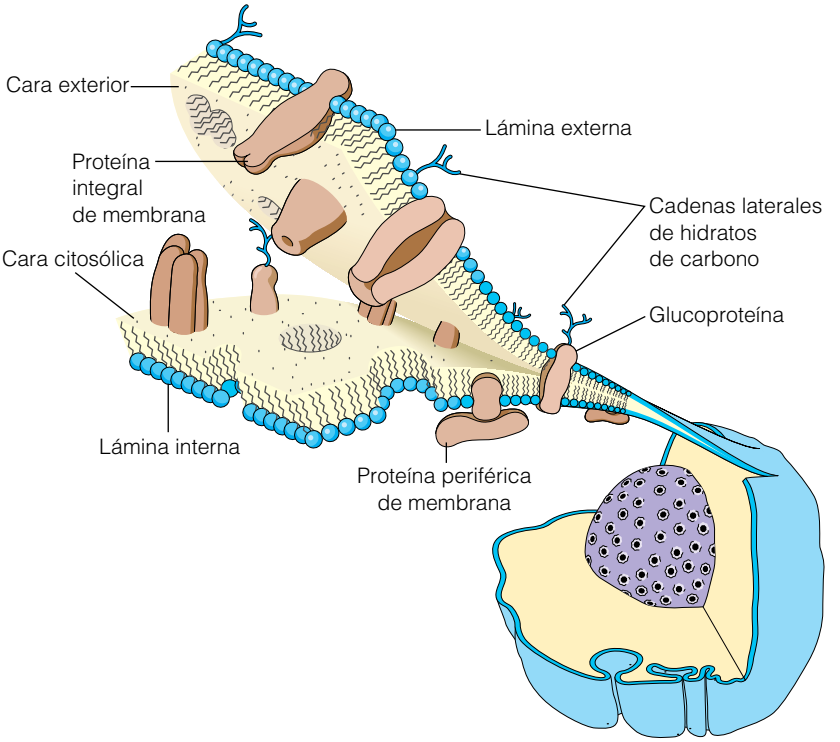


FIGURA **10A.1**
Fractura por congelación. Representación esquemática de una membrana fracturada por congelación.

gador quiera utilizar toda la mezcla lipídica procedente de una membrana.

Si el disolvente orgánico de una preparación de este tipo se elimina mediante evaporación, y se dispersan los lípidos de la membrana en una solución acuosa, éstos formarán vesículas (también llamadas *liposomas*): pequeñas estructuras esféricas bicapa. Otra posibilidad es la de extender una bicapa a través de un pequeño orificio para establecer un reparto entre dos compartimientos. Estas preparaciones se suelen utilizar para el estudio de la permeabilidad a través de las membranas.

Las vesículas pueden utilizarse para muchos tipos de estudios. Así, por ejemplo, es posible reconstituir sistemas de transporte específicos mediante el aislamiento de las proteínas de transporte a través de la solubilización con detergente y la adición posterior de las mismas a un sistema de formación de vesículas. En presencia de ATP, los sistemas reconstituidos de forma adecuada presentarán transporte activo. En la Figura 10A.3 se muestra la reconstitución de la bomba de Ca^{2+} de las células musculares. Las vesículas formadas con mezclas específicas de lípidos y otros componentes son también excelentes objetos para el estudio de procesos como la transición de fase o la difusión en las membranas.

En otros tipos de experimentos, conviene mantener todos los componentes naturales de la membrana, lo cual puede realizarse a menudo mediante la lisis cuidadosa de las células o los orgánulos, el aislamiento de las membranas intactas y la dispersión posterior en una disolución en la que volverán a unirse para formar vesículas. En algunos casos, como ocurre con el eritrocito de la Figura 10A.4, es posible ajustar las condiciones de tal manera que la formación de nuevas vesículas se produzca de manera preferente de cara a fuera o de cara a dentro. Estas preparaciones han aportado gran parte de la información de que disponemos respecto a la asimetría de la membrana.

Técnicas físicas

Gran parte de la información de que disponemos respecto a las transiciones estructurales en las membranas procede de la **calorimetría de barrido**. En la Figura 10A.5 se muestra un esquema simplificado de un calorímetro de barrido. Las muestras de una suspensión de vesículas lipídicas y un amortiguador de control se calientan en paralelo, y se registra cuidadosamente la diferencia de aporte de energía que es necesaria para mantenerlas a la misma temperatura. Cuando se pasa la temperatura de transición (T_m), hay que aplicar más calor a la muestra lipídica para que se funda la estructura de membrana. Esta transición muestra un pico del tipo del que se ilustra en la Figura 10.12. El experimento indica la temperatura de transición, la brusquedad de la misma y la energía total requerida. La calorimetría de barrido tiene otras muchas aplicaciones en bioquímica. Puede utilizarse, por ejemplo, para el estudio de la desnaturalización térmica de las proteínas (Capítulo 6) o de los ácidos nucleicos (Capítulo 4).

Para estudiar más directamente la fluidez de la membrana y para examinar el movimiento de los distintos tipos de moléculas en ella, se utilizan otras muchas técnicas. La **resonancia de espín electrónico** (ESR) ha tenido una gran importan-

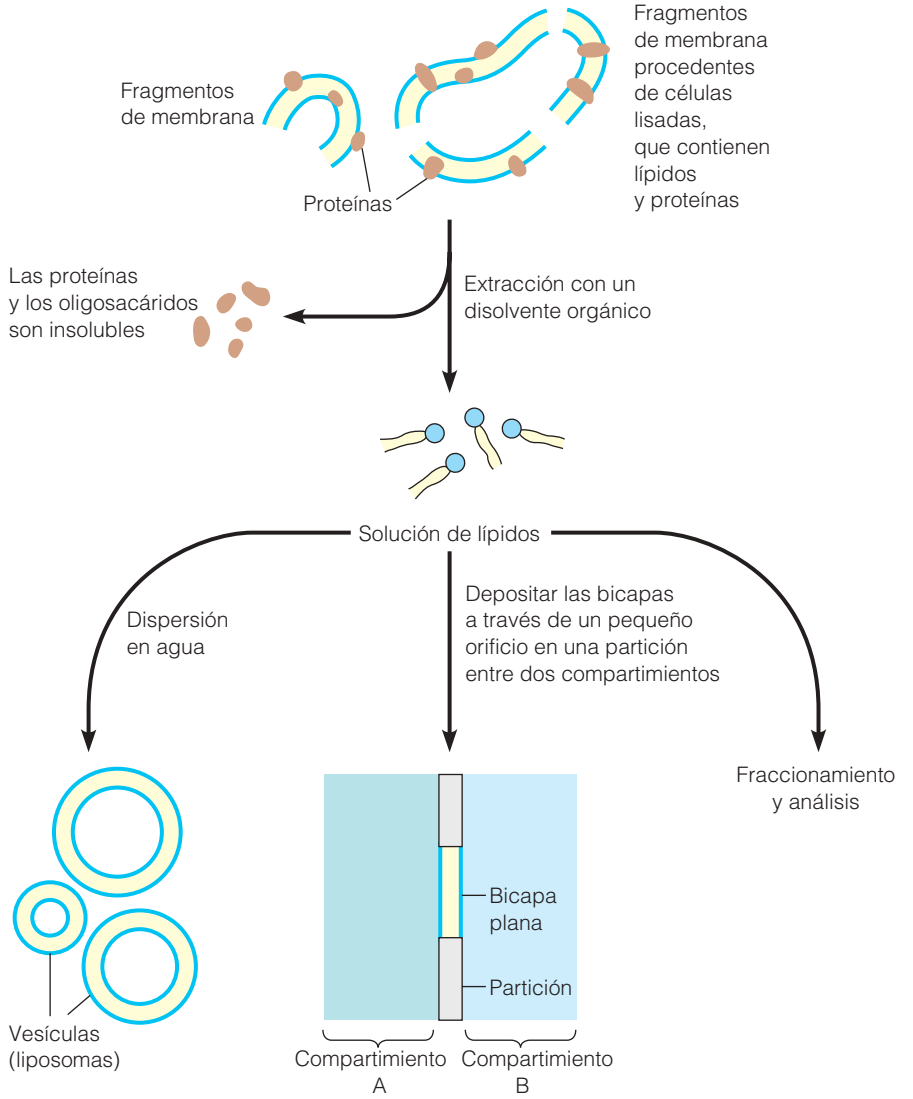


FIGURA **10A.2**
Preparación de vesículas y bicapas.

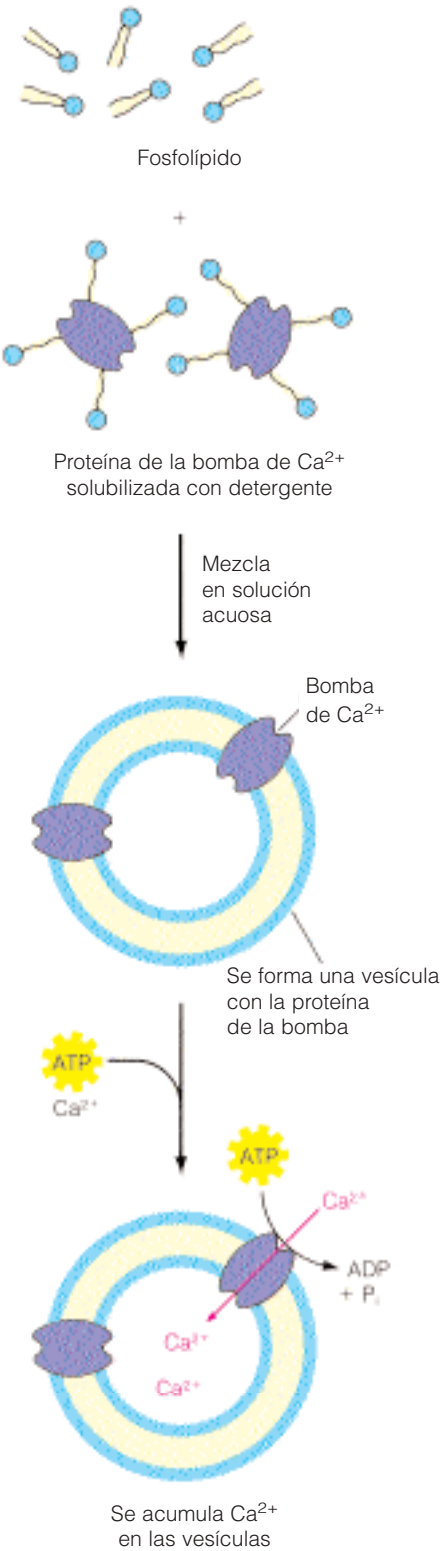
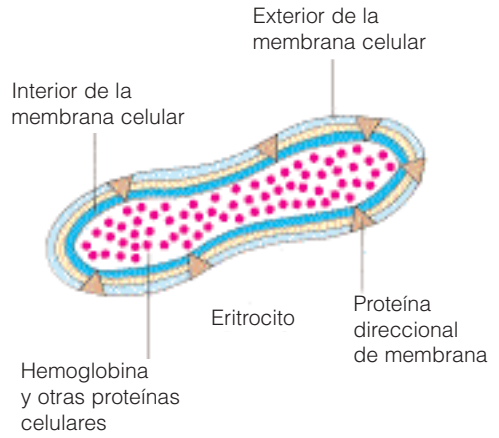


FIGURA **10A.3**
Reconstitución de la bomba de Ca^{2+}.

cia. Esta técnica tiene semejanzas con la resonancia magnética nuclear, pero se basa en los cambios de espín de los electrones desapareados en lugar de los núcleos. El espectro de resonancia es sensible, tanto en el espaciamiento de las líneas de absorción como en la claridad de las mismas, al entorno de los electrones desapareados. Al igual que en la RMN, las líneas espectrales estrechas son características de un ambiente fluido con un movimiento molecular rápido, y las líneas ensanchadas se observan cuando el movimiento molecular es perezoso.

La mayor parte de los compuestos no tienen electrones desapareados, pero algunos compuestos de nitróxido, como la *tempocolina*, contiene un electrón desapareado en un enlace N—O. La tempocolina se ha sustituido por la colina en la fosfatidilcolina, con objeto de que actúe como "grupo infor-



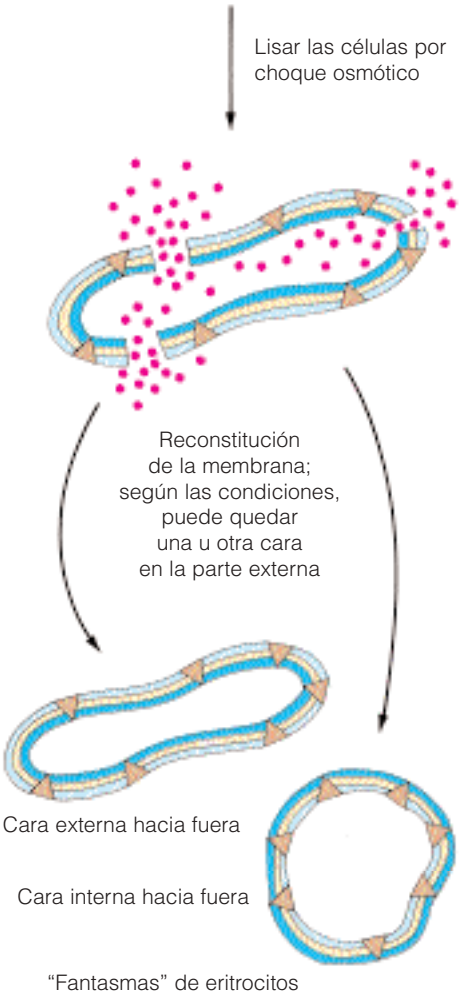


FIGURA **10A.4**
Preparación y reconstitución de los "fantasmas" eritrocitarios.

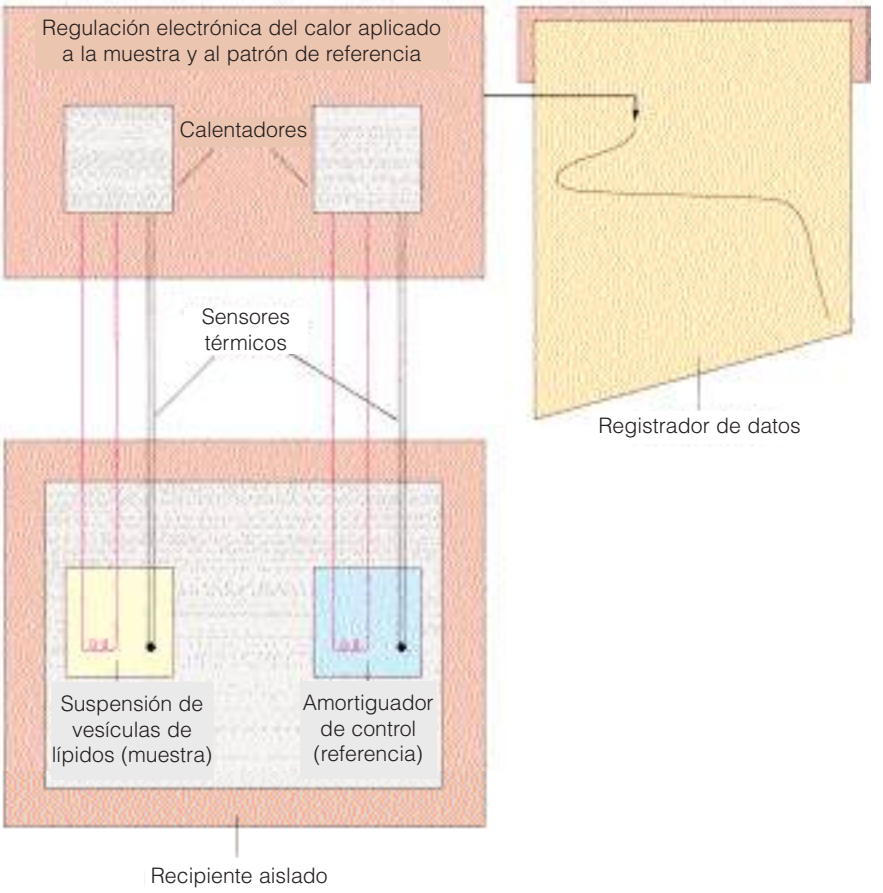
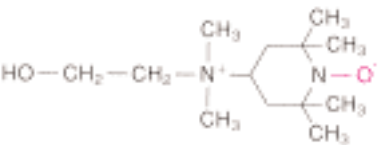


FIGURA **10A.5**
Calorimetría de barrido diferencial.

mador" sensible a la libertad de movimiento de los grupos de cabeza de las membranas. Otros grupos o moléculas informadoras pueden percibir la fluidez del interior de las membranas o la movilidad de las proteínas de la membrana.



Tempocolina

Una técnica nueva y potente es la denominada **recuperación de fotodesaparición de fluorescencia** (Figura 10A.6). Se introduce un marcaje fluorescente en determinadas moléculas seleccionadas de las membranas celulares. A continuación, una pequeña zona de la superficie de la membrana se expone a un láser de alta intensidad. Esto hace desaparecer la marca fluorescente, formando una mancha no fluorescente sobre la superficie celular. Se observa a continuación la célula en un microscopio de fluorescencia. Cuando las moléculas desaparecidas difunden hacia fuera de la mancha y las moléculas sin

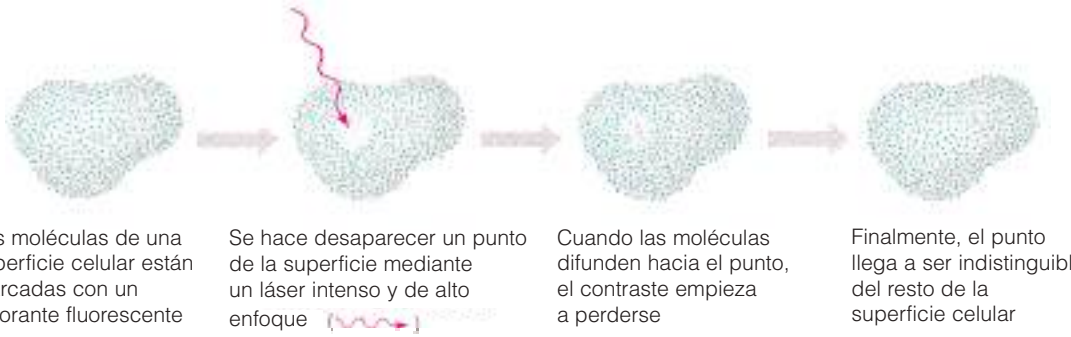


FIGURA **10A.6**
Recuperación de fotodesaparición de fluorescencia.

desaparecer difunden hacia ella, la mancha recupera gradualmente su intensidad de fluorescencia original. Este método proporciona una forma directa de medir el movimiento lateral de determinadas moléculas en las membranas.

Bibliografía

Elson, E. L. (1986) Membrane dynamics studied by fluorescence correlation spectroscopy and photobleaching recovery. *Soc. Gen. Phys. Ser.* 40:367-383.

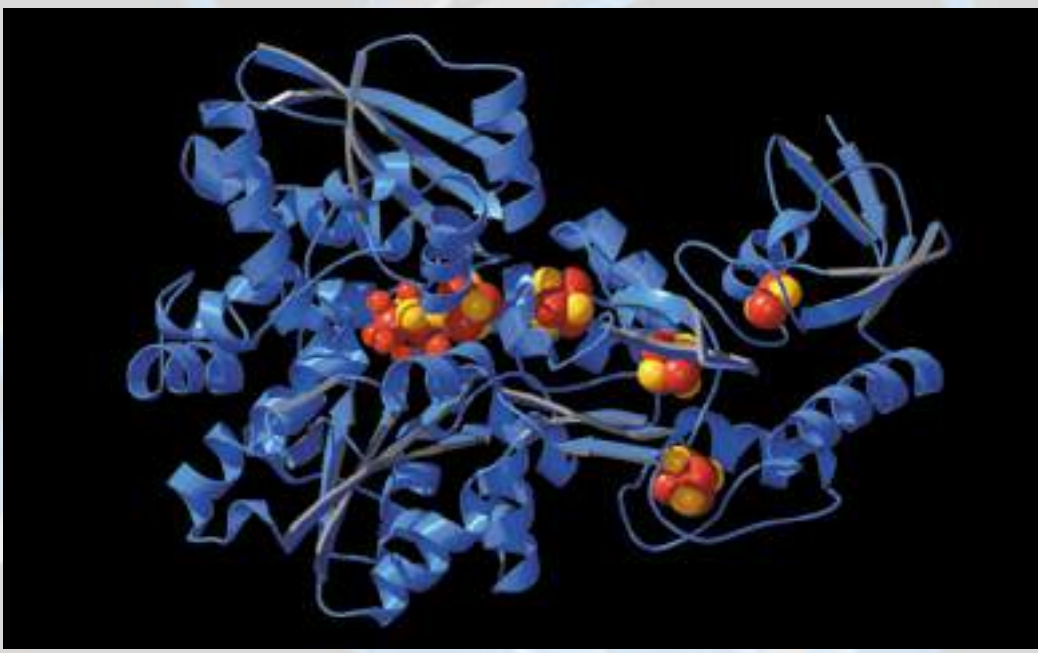
Kornberg, R. D. y H. M. McConnell (1971) Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochemistry* 10:1111-1120. Describe el uso de los métodos de ESR para medir el movimiento a través de las membranas.

Madden, T. D. (1986) Current concepts in membrane protein reconstitution. *Chem. Phys. Lipids* 40:207-222.

Prasad, R., ed. (1996) *Manual on Membrane Lipids.* Springer-Verlag, Nueva York. Este pequeño manual contiene abundantes técnicas detalladas y actualizadas para una amplia variedad de problemas de lípidos y membranas.

PARTE III

Dinámica de la vida: catálisis y control de las reacciones bioquímicas



CAPÍTULO 11

Enzimas: catalizadores biológicos

HEMOS HECHO ALUSIÓN UNA Y OTRA VEZ A LA IMPORTANCIA DE LOS CATALIZADORES específicos, denominados **enzimas**, en la regulación de la química de las células y los organismos. La catálisis es esencial para hacer que muchas reacciones bioquímicas de importancia crucial se produzcan en condiciones fisiológicas a velocidades útiles. Una reacción que requiere muchas horas para completarse no puede ser útil, desde el punto de vista metabólico, para una bacteria que ha de reproducirse en 20 minutos, o para una célula nerviosa humana que debe responder a un estímulo de forma instantánea.

De hecho, la vida aprovecha hábilmente el hecho de que la mayoría de las reacciones deban estar catalizadas. En el complejo medio de la célula, hay innumerables reacciones *posibles* entre las moléculas. La célula se aprovecha de la catálisis específica para canalizar las sustancias hacia rutas que sean *útiles* en vez de hacia reacciones colaterales despilfarradoras. Además, las enzimas que la célula utiliza son catalizadores poco habituales, ya que en la mayor parte de los casos, la eficacia de su acción puede controlarse, de manera que se module la producción de distintas sustancias en respuesta a las necesidades de la célula y del organismo.

El resto de este libro está dedicado a este tema. Cada una de los centenares de reacciones que encontraremos está catalizada por una enzima específica, que la evolución ha ido ajustando para realizar exactamente la tarea requerida. ¿Cuáles son las propiedades especiales de las enzimas que las hacen catalizadores tan eficaces? Esto es lo que analizaremos en este capítulo.

Función de las enzimas

Un **catalizador** es una sustancia que aumenta la rapidez o velocidad de una reacción química, sin verse alterada ella misma en el proceso global. La mayor parte de los catalizadores biológicos, aunque no todos ellos, son proteínas que denominamos enzimas. Hemos hablado ya de las enzimas. Así, por ejemplo, la proteína tripsina cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas y los polipéptidos. La sustancia sobre la que actúa una enzima se denomina **sustrato** de esa enzima. Así pues, los polipéptidos son sustratos adecuados de la tripsina.

Los catalizadores aumentan la velocidad de las reacciones químicas. Las enzimas son catalizadores biológicos.

Podemos apreciar el poder de la catálisis enzimática con un ejemplo que nos resulta familiar a todos: la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno:

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

Esta reacción, aunque muy favorecida termodinámicamente, es muy lenta, a menos que esté catalizada. Se puede comprar una botella de una solución de H_2O_2 y guardarla en un armario durante muchos meses antes de que se degrade. Sin embargo, si añadiera un trocito de ion férrico (por ejemplo, como $FeCl_3$), observaría que la velocidad de la reacción aumenta unas 1000 veces. La proteína hemoglobina, que contiene hierro, es aún más eficaz para incrementar la velocidad de esta reacción. Si uno aplica la solución de peróxido de hidrógeno a un corte de un dedo, observa un burbujeo inmediato del O_2 liberado: la reacción se está produciendo ahora aproximadamente un millón de veces más rápidamente que el proceso sin catalizar. Pero pueden alcanzarse velocidades aún más altas. La *catalasa*, una enzima presente en muchas células, aumenta la velocidad de la descomposición del H_2O_2 sin catalizar aproximadamente 1000 millones de veces. Algunas reacciones celulares producen peróxido de hidrógeno que es un oxidante peligroso (véase el Capítulo 15), por lo que la catalasa se ha perfeccionado para defenderse de él. Este ejemplo muestra que la velocidad de una reacción favorable depende, en gran medida, de que exista o no un catalizador y de la naturaleza del mismo. Los catalizadores biológicos, entre ellos las enzimas, se encuentran entre los más eficaces y específicos que se conocen.

Hay dos hechos importantes que conviene resaltar. En primer lugar, un catalizador verdadero, aunque participa en el proceso de reacción, no se modifica por ésta. Así, por ejemplo, tras catalizar la descomposición de una molécula de H_2O_2, la catalasa vuelve a encontrarse exactamente en el mismo estado que antes, preparada para un nuevo ciclo. En segundo lugar, los catalizadores modifican la *velocidad* de los procesos, pero no afectan la posición de equilibrio de una reacción. Un proceso termodinámicamente favorable no pasa a ser más favorable por la presencia de un catalizador, ni éste hace tampoco que un proceso desfavorable pase a ser favorable. Simplemente se alcanza más rápidamente el estado de equilibrio.

Velocidades de las reacciones químicas y efectos de los catalizadores

Antes de analizar detalladamente el comportamiento de las enzimas, debemos revisar brevemente la cinética química básica, con objeto de establecer unas definiciones precisas de las velocidades de reacción y un conocimiento claro de la acción de los catalizadores.

VELOCIDADES DE REACCIÓN Y ORDEN DE REACCIÓN

Reacciones de primer orden: constante de velocidad

Para comprender el significado de la velocidad de reacción y cómo podría medirse, consideraremos primero la reacción más sencilla posible, la conversión *irreversible* de la sustancia A en la sustancia B:

$$A \longrightarrow B$$

La flecha unidireccional significa aquí que la reacción inversa ($B \longrightarrow A$) tiene lugar tan sólo en un grado infinitesimal; esto es, el estado de equilibrio está muy desplazado hacia la derecha.

Podemos definir la **velocidad de reacción** (V), en un momento dado, como la velocidad de formación del producto, en este caso B:

$$V = \frac{d[\mathrm{B}]}{dt} \tag{11.1}$$

Las unidades de V son moles por litro por segundo $(\mathrm{mol/L})\mathrm{s}^{-1}$, si [B] indica la concentración molar de B. Si observamos que por cada molécula de B que se forma debe desaparecer una molécula de A, es evidente que V puede escribirse también de la siguiente forma

$$V = -\frac{d[\mathrm{A}]}{dt} \tag{11.2}$$

La transformación de cada molécula de A en B es un fenómeno independiente. Así pues, a medida que se consumen las moléculas de A, se reduce el número de moléculas que quedan para transformarse, y la velocidad disminuye a medida que la reacción se va produciendo (véase la Figura 11.1a). Matemáticamente, expresamos este hecho afirmando que la velocidad de reacción es proporcional a [A]:

$$V = \frac{d[\mathrm{B}]}{dt} = -\frac{d[\mathrm{A}]}{dt} = k_1[\mathrm{A}] \tag{11.3}$$

La constante k_1, se denomina **constante de velocidad** y para esta reacción tiene unidades de $(\text{segundos})^{-1}$. La constante de velocidad proporciona una medida directa de la rapidez con la que se produce la reacción. Una k_1 grande indica que la reacción es rápida, y una k_1 pequeña indica una reacción lenta. Esta reacción se denomina **reacción de primer orden**, ya que su velocidad depende de la primera potencia de la concentración del reactante.

Una reacción de primer orden es aquella cuya velocidad es directamente proporcional a la primera potencia de la concentración del reactante.

Si queremos demostrar que una reacción es de primer orden o deseamos medir la constante de velocidad, resulta más cómodo disponer de una ecuación que describa la manera en la que se modifica la concentración de A con el tiempo durante la reacción. Esta descripción puede obtenerse mediante la integración de la ecuación (11.3):

$$\int_{[\mathrm{A}]_0}^{[\mathrm{A}]} d\ln[\mathrm{A}] = -k_1 \int_0^t dt \tag{11.4a}$$

$$\ln \frac{[\mathrm{A}]}{[\mathrm{A}]_0} = -k_1 t \tag{11.4b}$$

es decir

$$\frac{[\mathrm{A}]}{[\mathrm{A}]_0} = e^{-k_1 t} \tag{11.4c}$$

en donde $[\mathrm{A}]_0$ es la concentración de partida, cuando $t = 0$. La ecuación (11.4c) nos indica que la concentración de A disminuye de manera exponencial con el tiempo, como se observa en la Figura 11.1a. Una característica de este descenso exponencial es la **semivida** ($t_{1/2}$), el tiempo necesario para que se pierda la mitad de cualquier cantidad que quede (Figura 11.1a). La semivida es inversamente proporcional a k_1 (véase el Problema 1). Para comprobar si una reacción es realmente de primer orden, basta con realizar un gráfico de ln[A] frente a t, como se muestra en la Figura 11.1b. Una línea recta confirma la ecuación (11.4b); la pendiente da $(-k_1)$. Otro procedimiento es el que se muestra en la Figura 11.1c y d. Se mide la *velocidad inicial* de la reacción para distintos valo-

Una reacción de primer orden se caracteriza por la descomposición exponencial del reactante.

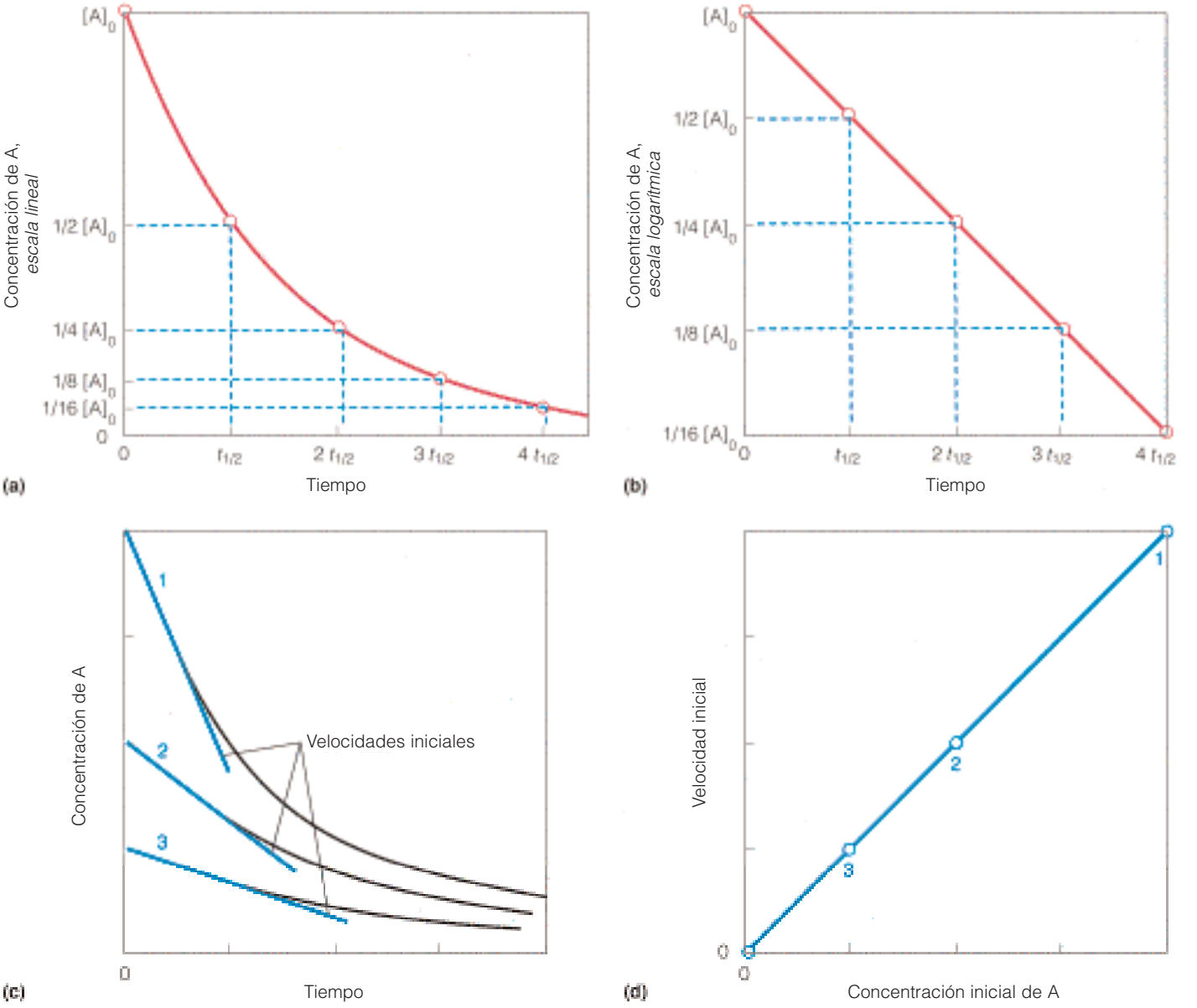


FIGURA **11.1**

Determinación del orden y de la constante de velocidad de una reacción irreversible de primer orden. Los gráficos (a) y (b) analizan la velocidad de una sola reacción en todo su curso, expresando el tiempo como múltiplos de la semivida ($t_{1/2}$) del reactante. Obsérvese que para cada intervalo de $t_{1/2}$, la concentración del reactante se reduce a la mitad. Los gráficos (c) y (d) analizan las velocidades *iniciales* de la reacción a distintas concentraciones de partida. **(a)** Un gráfico de [A] frente a *t* muestra que la velocidad, definida como la pendiente de la línea, disminuye a medida que progresa la reacción. **(b)** Un gráfico de ln[A] frente a *t*, cuando es lineal, indica que la reacción sigue la ecuación (11.4b) y, por tanto, es de primer orden. La pendiente de esta línea ($d\ln[A]/dt$) es igual a $-k_1$. **(c)** La velocidad de reacción inicial se determina para tres valores de $[A]_0$. **(d)** Las tres velocidades iniciales determinadas en (c) se representan gráficamente en función de $[A]_0$. Si las velocidades iniciales son proporcionales a $[A]_0$, y se obtiene una línea recta, la reacción es de primer orden. La pendiente de la recta es k_1.

res de la concentración inicial, $[A]_0$, y se representan estas velocidades iniciales frente a $[A]_0$. Si la velocidad inicial es proporcional a $[A]_0$, la reacción es de primer orden. La constante de velocidad k_1 puede determinarse a partir de la pendiente de una gráfica de la velocidad inicial frente a $[A]_0$. El ejemplo más común de una reacción de primer orden es la desintegración de los elementos radiactivos.

La mayoría de los procesos bioquímicos no pueden describirse en todo su curso mediante ecuaciones tan sencillas como la (11.4). Una de las razones es

que muchas de las reacciones y procesos que encontramos son *reversibles*, es decir, el equilibrio no está muy desplazado hacia un lado, y al ir acumulándose el producto, la reacción inversa pasa a ser importante. Así, por ejemplo, podemos tener una reacción como la siguiente:

$$[A] \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [B]$$

Dado que A se consume en la reacción que se produce hacia la derecha y se forma en la reacción que va hacia la izquierda, la correspondiente ecuación de velocidad es

$$-V = \frac{d[A]}{dt} = -k_1[A] + k_{-1}[B] \tag{11.5}$$

En este caso, k_1 y k_{-1} son las constantes de velocidad para las reacciones de primer orden hacia delante y a la inversa. Una reacción de este tipo se dirige hacia un estado de equilibrio, en el cual las velocidades de las reacciones hacia delante y a la inversa se hacen iguales, con lo que la velocidad global es cero. Entonces,

$$0 = -k_1[A]_{eq} + k_{-1}[B]_{eq} \tag{11.6a}$$

es decir

$$\frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}} = \frac{k_1}{k_{-1}} = K \tag{11.6b}$$

en donde K es la constante de equilibrio. Para una reacción reversible que sea de primer orden en ambas direcciones, la constante de equilibro es siempre la relación de las constantes de equilibrio hacia delante y a la inversa.

Reacciones de segundo orden

Las reacciones que hemos descrito hasta ahora son de primer orden, es decir, implican cambios que ocurren en las moléculas individuales. Pero muchas reacciones bioquímicas son más complejas, e intervienen en ellas los encuentros entre moléculas. Una **reacción de segundo orden** se da siempre que dos moléculas han de entrar en contacto para formar productos. Un ejemplo sencillo es

$$2A \xrightarrow{k_2} A_2$$

La velocidad de esta reacción es proporcional a la *segunda* potencia de la concentración del reactante, ya que la reacción sólo puede producirse cuando colisionan dos moléculas:

La velocidad de una reacción de segundo orden es proporcional a la segunda potencia de la concentración del reactante.

$$V = \frac{-d[A]}{dt} = -k_2[A]^2 \tag{11.7}$$

en donde k_2 es la **constante de velocidad de segundo orden**. Tiene dimensiones de $(mol/L)^{-1}s^{-1}$. La obtención de una expresión integrada para la concentración en función del tiempo, a partir de la ecuación (11.7), no es difícil; la dejaremos como ejemplo para el Problema 7.

Se producen otros tipos de reacciones mucho más complicadas, como los procesos complejos con múltiples pasos. No entraremos en su cinética en este momento aunque veremos que las reacciones catalizadas por enzimas, cuando se analizan con detalle son generalmente más complicadas que las que se han

descrito anteriormente. No obstante, a menudo el análisis de los esquemas de reacciones complejas puede simplificarse mediante la identificación de un **paso limitante de la velocidad**. Este concepto debe resultar familiar a todo aquel que se haya encontrado con obras de reparación en la autopista o trata de embarcar por la puerta de un aeropuerto en un vuelo concurrido: el paso más lento de un proceso de múltiples pasos puede determinar cuánto dura todo el proceso en conjunto.

ESTADOS DE TRANSICIÓN Y VELOCIDADES DE REACCIÓN

Nuestra principal pregunta es: ¿qué determina la velocidad de una reacción química? Es decir, ¿qué hace que una constante de velocidad sea alta o baja? La termodinámica no aporta información acerca de las velocidades. Si dibujamos un diagrama de energía libre para una reacción favorable basándonos en la termodinámica solamente, obtendremos una imagen como la de la Figura 11.2a. Representamos aquí la energía libre del sistema frente a la **coordenada de reacción**, una medida generalizada del progreso de la reacción a través de los estados intermedios. Su significado físico diferirá de una reacción a otra (como comentaremos más adelante). Podemos ver que la energía libre del estado estándar de los productos de esta reacción es inferior a la de los reactantes. Sin embargo, lo que puede ser más importante para determinar la velocidad de reacción es lo que ocurre en la *transición* desde los reactantes a los productos. Las medidas de equilibrio, que corresponden a los estados final e inicial, no descubren ninguna información acerca de la transición o de la barrera que presenta la transición.

Las barreras de las reacciones químicas se producen debido a que una molécula de reactante debe pasar por un estado de transición de energía elevada para formar los productos. Esta barrera de energía libre se denomina energía de activación.

Una molécula que interviene en una reacción de primer orden sólo alcanza ocasionalmente un estado energético en el que puede producirse el proceso; de lo contrario, todas las moléculas habrían reaccionado ya. Esta observación sugiere que tan sólo una fracción de las moléculas, que están suficientemente *activadas*, puede sufrir la reacción. De forma análoga, en una reacción de segundo orden no todos los encuentros entre los reactantes pueden ser productivos, puesto que algunas colisiones pueden no ser lo suficientemente energéticas, o las moléculas que colisionan pueden no estar adecuadamente orientadas unas respecto a otras para reaccionar. Estas consideraciones han dado origen a la idea de una **barrera de energía libre** para la reacción, y al concepto de un **estado activado** o **estado de transición** (simbolizado con ‡). Se cree que el estado de transición es una fase a través de la cual deben pasar la molécula o las moléculas que reaccionan, a menudo, de una forma en que la molécula está tensionada o distorsionada o tiene una estructura electrónica determinada, o en que las moléculas colisionan adecuadamente. Para concretar la idea del estado de transición, en el diagrama de la Figura 11.2b, se presenta la energía libre en función de la coordenada de reacción. Este concepto es algo abstracto, pero en la Figura 11.2c presentamos un ejemplo sencillo y concreto, la conversión bote $\longrightarrow$ silla de un anillo de piranosa (véase el Capítulo 9, páginas 321-323). La coordenada de reacción en este caso es simplemente el ángulo θ. Tanto el estado inicial (bote) como el estado final (silla) son estados con una energía menor que la del estado más tensionado y aplanado (estado de transición). El anillo debe pasar a través del estado de semi-silla, que es un estado de transición de energía elevada para realizar la conversión.

La **energía libre estándar de activación**, $\Delta G^{\circ\ddagger}$, corresponde a la energía libre adicional (por encima de la energía libre promedio de las moléculas de reactantes) que han de alcanzar las moléculas para llegar al estado de transición. Sabemos que en cualquier muestra o disolución, no todas las moléculas tienen

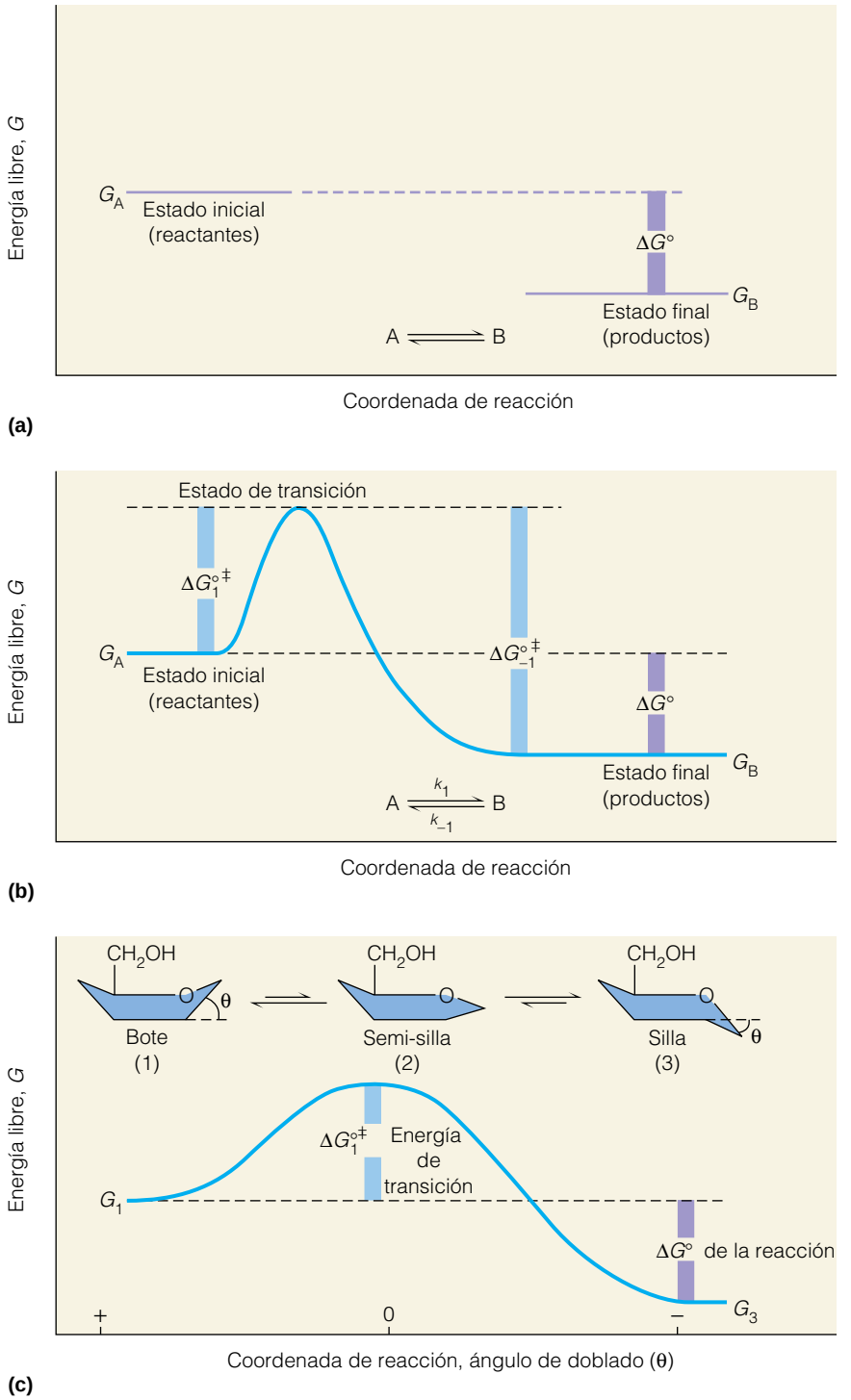


FIGURA **11.2**

Diagramas de energía libre para la reacción simple A ⇌ B. **(a)** Información proporcionada por los estudios termodinámicos del equilibrio: tan sólo aparece la diferencia de energía libre entre el estado inicial y el final. G_A y G_B representan las energías libres *promedio* por mol de moléculas de A y B. $\Delta G°$ es el cambio de energía libre de estado estándar para la reacción. **(b)** Diagrama de energía libre completado para incluir el estado de transición (‡) a través del cual debe pasar la molécula para ir de A a B, o viceversa. $\Delta G_1^{\circ\ddagger}$ indica la energía de activación de la transición A ⟶ B. $\Delta G_{-1}^{\circ\ddagger}$ es para la transición B ⟶ A. **(c)** Vía razonable para la transición de una piranosa (como la glucosa) de la conformación de bote (1) a la de silla (3). El estado de máxima energía, estado de transición, tendrá un aspecto similar al de (2).

la misma energía en todo momento. Si la barrera para la reacción es alta, sólo una pequeña fracción de las moléculas tendrá la energía suficiente para superarla, o sólo una pequeña fracción de las colisiones será suficientemente energética. Si suponemos que las moléculas del reactante A están en equilibrio entre el estado inicial y el estado activado, la concentración de las moléculas activadas en cualquier momento vendrá dada por la ecuación (3.25) que se ha presentado en la página 81 para un equilibrio químico ($K = e^{-\Delta G°/RT}$). Si $[A]^{\ddagger}$ representa la concentración de moléculas que tiene la energía de activación y

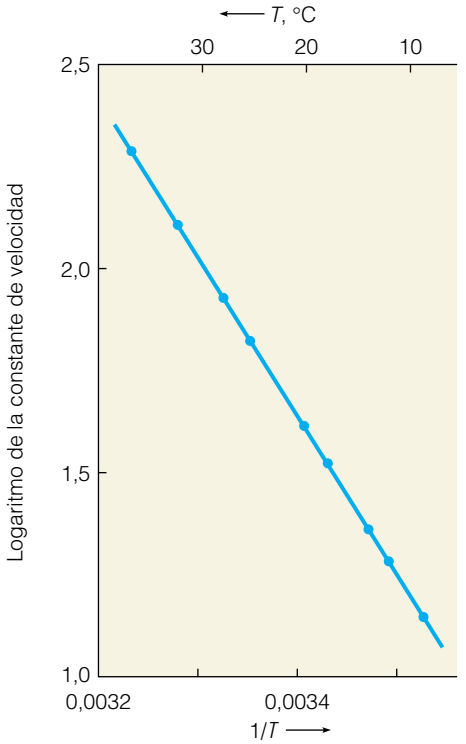


FIGURA **11.3**

Prueba de la ecuación de Arrhenius. Se representa el logaritmo de la constante de velocidad de la reacción L-malato ⟶ fumarato + H_2O frente a la inversa de la temperatura absoluta (en kelvin). Se obtiene una línea recta, tal como predice la ecuación (11.11). Se muestra la temperatura en grados centígrados en la escala de la parte superior. Obsérvese la fuerte dependencia de la velocidad respecto a la temperatura: el aumento de la temperatura en 10 grados produce un incremento de la velocidad de casi 3 veces.

$[A]_o$ la concentración total, podemos escribir la constante de equilibrio $[A]^{\ddagger}/[A]_o$ de la forma habitual como función de la energía de activación $\Delta G^{\circ\ddagger}$:

$$[A]^{\ddagger} = [A]_o e^{-\Delta G^{\circ\ddagger}/RT} \tag{11.8}$$

Una vez que una molécula ha sido activada al estado de transición, puede pasar a cualquiera de los lados de la barrera, volviendo al lado del reactante o avanzando al lado del producto. Tan sólo las moléculas que alcanzan el estado de transición disponen de esta posibilidad por lo que la constante de velocidad para una reacción química debe ser proporcional a la población del estado de transición, como se expresa en la ecuación (11.8):

$$k = Qe^{-\Delta G^{\circ\ddagger}/RT} \tag{11.9}$$

El factor Q, que tiene unidades de s^{-1}, representa la frecuencia del paso hacia el lado del producto. A veces es más útil razonar en términos de entalpía de estado estándar y entropía de activación ($\Delta H^{\circ\ddagger}$, $\Delta S^{\circ\ddagger}$). Dado que $\Delta G^{\circ\ddagger} = \Delta H^{\circ\ddagger} - T\Delta S^{\circ\ddagger}$, la ecuación (11.9) puede escribirse también de la siguiente forma:

$$k = Qe^{\Delta S^{\circ\ddagger}/R} \cdot e^{-\Delta H^{\circ\ddagger}/RT} = Q'e^{-\Delta H^{\circ\ddagger}/RT} \tag{11.10}$$

en donde Q' es una constante igual a $Qe^{\Delta S^{\circ\ddagger}/R}$ denominada *término preexponencial*. Es de prever que $\Delta H^{\circ\ddagger}$ sea siempre positivo, por lo que la ecuación (11.10) (denominada ecuación de *Arrhenius*) nos indica que las reacciones deben producirse con mayor velocidad a temperaturas más altas. La ecuación (11.10) puede escribirse también de la siguiente forma, tomando logaritmos neperianos a ambos lados de la expresión,

$$\ln k = \ln Q' - \Delta H^{\circ\ddagger}/RT \tag{11.11}$$

En consecuencia, un gráfico de ln k frente a $1/T$ debe ser una línea recta, y su pendiente debe permitir la determinación experimental de $\Delta H^{\circ\ddagger}$. La Figura 11.3 es característica de los resultados obtenidos en muchas reacciones y es una prueba de que la ecuación (11.10) es correcta, al menos en la forma.

Resulta especialmente importante observar que la barrera de energía se opone a la reacción en *ambas* direcciones. Obsérvese que en la Figura 11.2b hemos incluido las barreras $\Delta G_1^{\circ\ddagger}$ y $\Delta G_{-1}^{\circ\ddagger}$ para la dirección hacia delante y a la inversa, respectivamente. Como establecimos en la ecuación (11.6b), la constante de equilibrio para una reacción de primer orden reversible viene dada por $K = k_1/k_{-1}$. Ello concuerda por completo con la ecuación (11.9), puesto que según esta ecuación:

$$K = \frac{Qe^{-\Delta G_1^{\circ\ddagger}/RT}}{Qe^{-\Delta G_{-1}^{\circ\ddagger}/RT}} = e^{-(\Delta G_1^{\circ\ddagger} - \Delta G_{-1}^{\circ\ddagger})/RT} \tag{11.12}$$

La diferencia ($\Delta G_1^{\circ\ddagger} - \Delta G_{-1}^{\circ\ddagger}$) puede observarse en la Figura 11.2b que es igual a ΔG°, el cambio de energía libre global para el proceso tal como se ha escrito. Así pues, la ecuación (11.12) proporciona la relación existente entre K y ΔG° que se da en la ecuación (3.25) (página 81):

$$K = e^{-\Delta G^{\circ}/RT} \tag{11.13}$$

Estos resultados indican directamente por qué la propia constante de equilibrio K no nos informa acerca de las velocidades de los procesos, ya que depende tan sólo de la *diferencia* de energía libre entre los estados final e inicial y no proporciona información acerca de la altura de la barrera entre estos estados.

LO QUE HACE UN CATALIZADOR

Los catalizadores actúan disminuyendo la energía de activación.

La presencia de un catalizador aumenta las velocidades directa e inversa, pero no afecta el equilibrio que se alcanza.

Un catalizador reduce la barrera de energía para una reacción, con lo que aumenta la fracción de moléculas que tienen la energía suficiente para alcanzar el estado de transición y hacer que la reacción vaya más rápida en ambas direcciones. Sin embargo, la presencia de un catalizador no tiene efecto alguno sobre la posición de equilibrio, puesto que la *diferencia* en las magnitudes de la barrera en las dos direcciones es exactamente la misma en presencia o no del catalizador (Figura 11.4). Así pues, ΔG° no se modifica por un catalizador, como tampoco K, que es igual a k_1/k_{-1}, a pesar de que tanto k_1 como k_{-1} pueden ser miles o millones de veces superiores a lo que eran para el proceso sin catalizar.

Nos preguntamos ahora *cómo* reduce el catalizador la barrera de energía libre. Para responder a esta pregunta, examinemos $\Delta G^{\circ\ddagger}$ con algo más de detalle. Dado que $\Delta G^{\circ\ddagger} = \Delta H^{\circ\ddagger} - T\Delta S^{\circ\ddagger}$, la necesidad de una mayor cantidad de energía (un valor de $\Delta H^{\circ\ddagger}$ muy positivo) o una conformación muy improbable del estado de transición (un $\Delta S^{\circ\ddagger}$ muy negativo) harán que $\Delta G^{\circ\ddagger}$ sea grande y positivo, y, por tanto, que la reacción sea lenta. La contribución de la energía es fácil de ver. Con mucha frecuencia, la molécula o moléculas reactivas deben pasar por estados de tensión o distorsión que requieren energía para que la reacción se produzca (para un ejemplo, véase la Figura 11.2c). A veces el catalizador puede reducir esta necesidad de energía forzando a la molécula de reactante a un estado **intermediario** que se parece al estado de transición pero que es de menor energía debido a la energética favorable de la unión al catalizador (Figura 11.5). El resultado es que dos barreras de energía de transición muy ba-

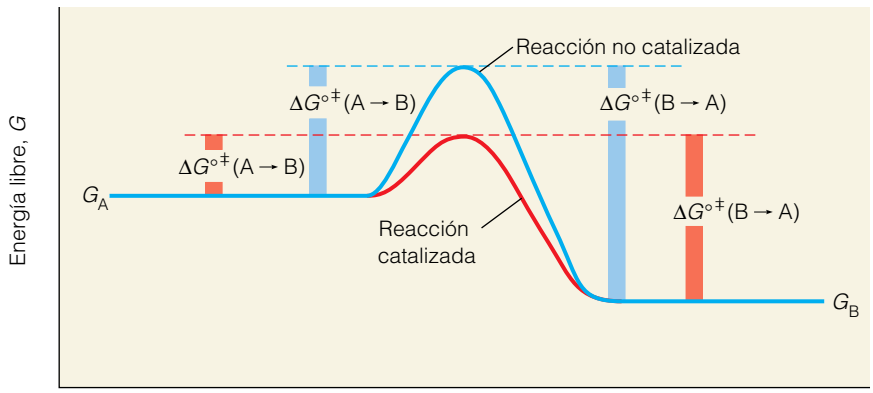


FIGURA **11.4**

Efecto de un catalizador sobre la energía de activación. Hemos representado aquí el mismo diagrama de energía libre que en la Figura 11.2b, pero indicando una vía alternativa *catalizada* (en rojo) para la reacción. El catalizador reduce la energía libre estándar de activación, $\Delta G^{\circ\ddagger}$, con lo que hay más moléculas de reactante que poseen la energía necesaria para alcanzar el estado de transición disminuido.

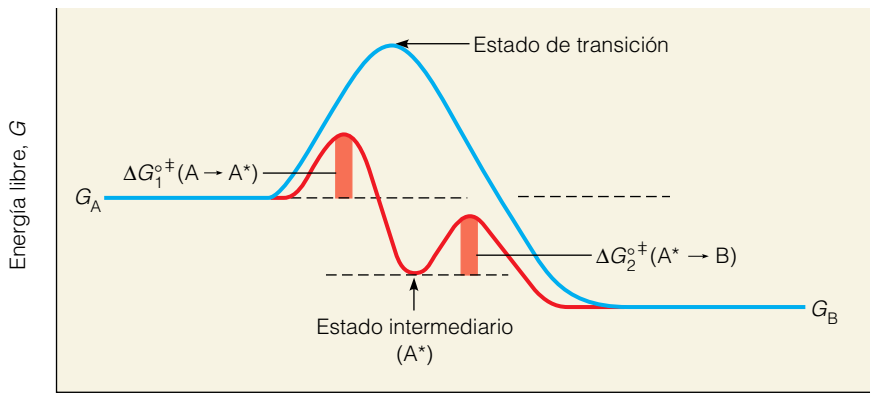


FIGURA **11.5**

Importancia de los estados intermediarios. Es frecuente que un catalizador (como una enzima) una el sustrato en una conformación intermediaria que se asemeja al estado de transición pero que tiene una energía inferior. Las energías de activación de la formación del estado intermediario y de la conversión del intermediario en el producto ($\Delta G_1^{\circ\ddagger}$ y $\Delta G_2^{\circ\ddagger}$, respectivamente) son menores que la energía de activación de la reacción no catalizada (véase la Figura 11.2). En esta figura tan sólo se indican las energías de activación para la reacción directa (A ⟶ B).

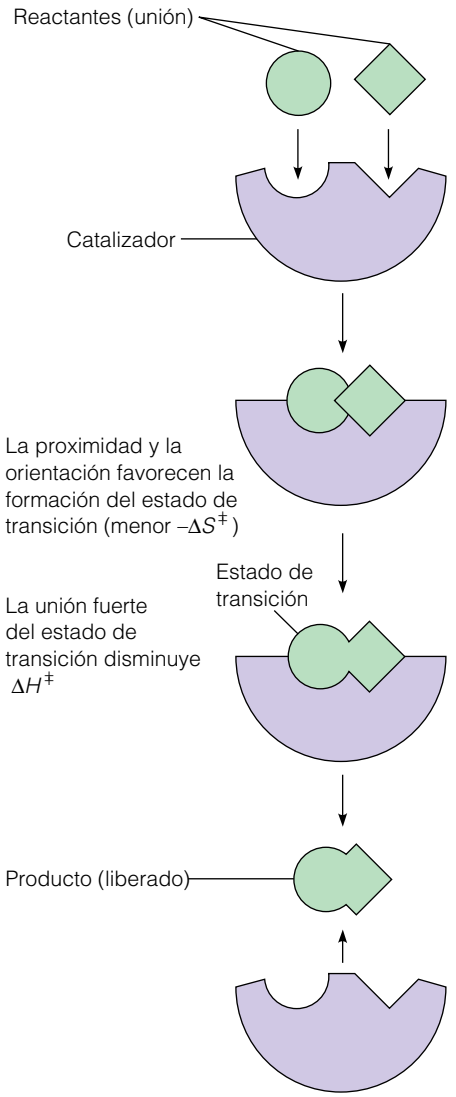


FIGURA **11.6**

Factores entrópicos y entálpicos en la catálisis. En este ejemplo, dos reactantes se unen a una enzima, que asegura su orientación mutua correcta y su proximidad, y los une de manera muy fuerte cuando están forzados en el estado de transición.

La hipótesis del ajuste inducido establece que una enzima induce a una molécula de sustrato unida a adoptar una conformación parecida al estado de transición.

jas sustituyen a la única barrera más alta. Distinguimos este estado intermediario del estado de transición por el hecho de que el primero corresponde a un mínimo de energía libre, y el segundo a un máximo de energía libre. Un estado intermediario es un estado metaestable de la molécula.

El término de entropía en la energía libre de transición refleja el hecho de que puede ser necesaria una determinada *orientación* entre los reactantes o partes de una molécula para que se pase al estado de transición. Así, por ejemplo, cuando se producen colisiones entre moléculas (como en una reacción de segundo orden), la mayoría de los encuentros no son productivos, ya que las moléculas están orientadas de una forma inadecuada cuando colisionan. Un catalizador que pueda unir dos moléculas reactantes en la orientación mutua adecuada aumentará su reactividad haciendo que la entropía de la activación sea menos negativa (Figura 11.6). En una reacción de primer orden, que implica que sucede algo *en el interior* de una única molécula, partes de la molécula deben orientarse de la forma adecuada para permitir que se alcance el estado de transición. Esta orientación forma parte de lo que consigue un catalizador. Como una matriz externa, puede forzar a las moléculas o a partes de las moléculas a la conformación que favorece la reacción. Examinaremos ahora la forma en que los catalizadores biológicos, o enzimas, llevan a cabo estas funciones.

Cómo actúan las enzimas como catalizadores: principios y ejemplos

PRINCIPIOS GENERALES: EL MODELO DEL AJUSTE INDUCIDO

Hemos visto que el papel de un catalizador consiste en reducir el valor de $\Delta G^{o\ddagger}$ al facilitar la formación del estado de transición o un estado similar a éste. Una enzima une una molécula de sustrato (o, en algunos casos, varios sustratos) en una región de la enzima denominada **lugar activo**, como se muestra esquemáticamente en la Figura 11.7. El lugar activo es con frecuencia un bolsillo o una hendidura rodeada por cadenas laterales de aminoácidos que facilitan la unión del sustrato y por otras cadenas laterales que intervienen en la catálisis. La compleja estructura terciaria de las enzimas hace posible que en este bolsillo se ajuste el sustrato de manera muy estrecha, lo cual explica la extraordinaria especificidad de la catálisis enzimática. Esta posibilidad fue reconocida ya en 1894 por el gran bioquímico alemán Emil Fischer, que propuso la *hipótesis de la cerradura y la llave* para explicar la acción enzimática. Según este modelo, la enzima acomoda el sustrato específico de la misma manera que la cerradura lo hace con su llave específica (Figura 11.7a). Aunque el modelo de la cerradura y la llave explicaba la especificidad enzimática, no permitía aumentar nuestra comprensión de la catálisis en sí, ya que una cerradura no hace nada a su llave. Este entendimiento vino a partir de un perfeccionamiento de la idea de Fischer: lo que se ajusta mejor al lugar activo de la enzima es una molécula de sustrato a la que se induce a adoptar una configuración que se aproxima al estado de transición. En otras palabras, la enzima no acepta simplemente al sustrato, sino que también exige que el sustrato se distorsione a algo cercano al estado de transición. Esta *hipótesis del ajuste inducido* propuesta por Daniel Koshland en 1958, continúa siendo el modelo más aceptado para la catálisis enzimática.

Tal como se contempla en la actualidad, el ajuste inducido implica la distorsión de la enzima, así como la del sustrato (Figura 11.7b). Esta distorsión puede ser local o puede comportar un cambio importante de la conformación de la enzima. Una visión gráfica de esta distorsión puede observarse con la enzima *hexoquinasa*, que cataliza la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfa-

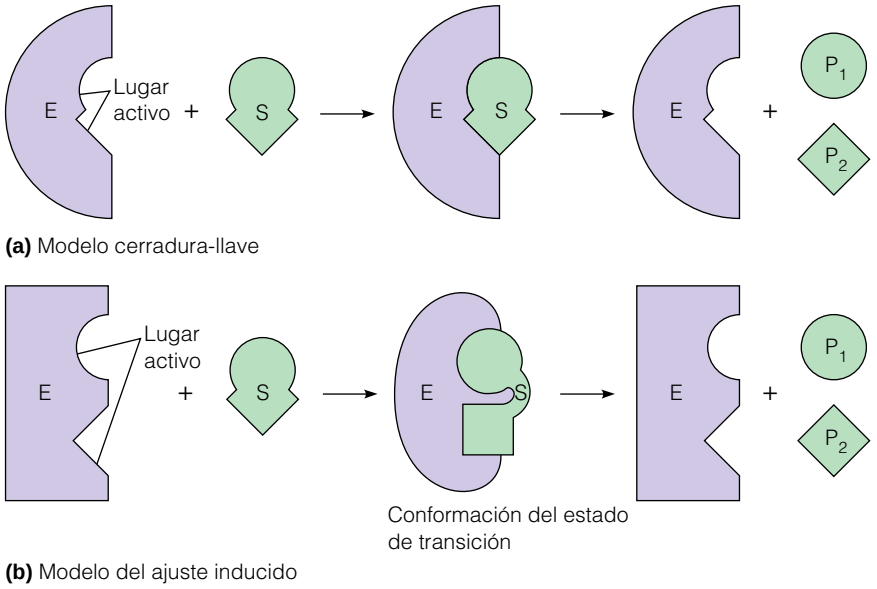


FIGURA **11.7**

Dos modelos de la interacción enzima-sustrato. En este ejemplo, la enzima cataliza una reacción de fragmentación. **(a)** Modelo de cerradura-llave. En este primer modelo, el lugar activo de la enzima ajusta el sustrato de la misma manera que una cerradura a una llave. **(b)** Modelo del ajuste inducido. En este perfeccionamiento del modelo de cerradura-llave, tanto la enzima como el sustrato sufren una distorsión al unirse. Se fuerza al sustrato a adoptar una conformación que se aproxima al estado de transición; la enzima mantiene el sustrato en tensión.

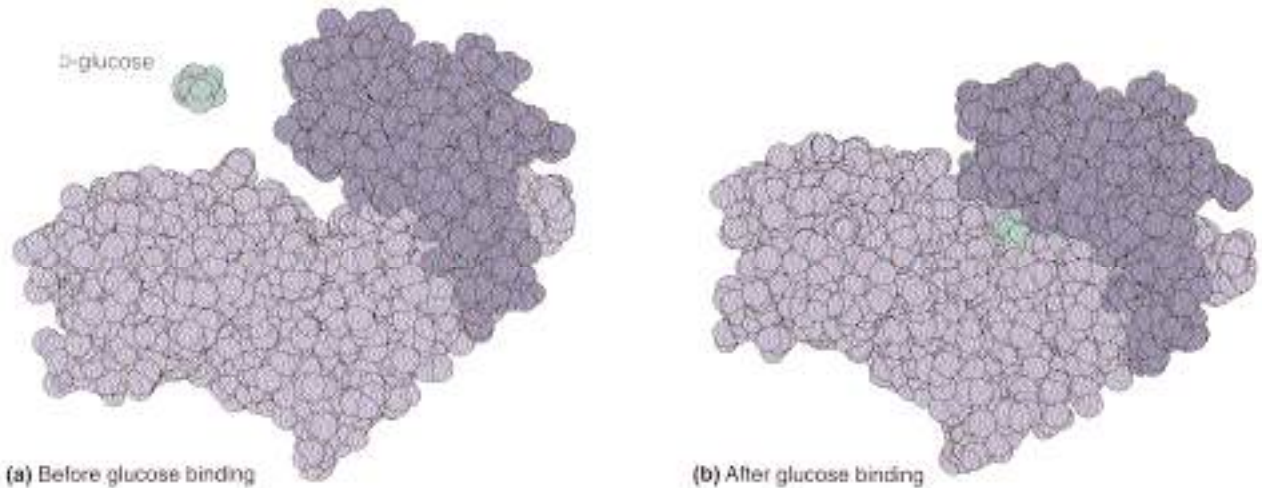


FIGURA **11.8**

Cambio conformacional inducido en la hexoquinasa. La unión de la glucosa a la hexoquinasa induce un cambio conformacional importante en la enzima. Ésta es una única cadena polipeptídica, pero sus dos dominios principales se han sombreado de manera diferente para diferenciarlos. Obsérvese cómo se cierra la hendidura existente entre los dominios alrededor de la molécula de glucosa.

to en el primer paso de la ruta metabólica denominada glucólisis (véase el Capítulo 13). La estructura de esta enzima se ha determinado mediante difracción de rayos X en ausencia de glucosa, y cuando está ligada la glucosa. Como indica la Figura 11.8, la unión de la glucosa hace que dos dominios de la enzima se plieguen uno hacia el otro, con lo que se cierra la hendidura del lugar de unión alrededor del sustrato.

Pero las enzimas hacen algo más que distorsionar o colocar simplemente sus sustratos. A menudo, encontramos cadenas laterales de aminoácidos específicos colocados en los lugares adecuados para facilitar el propio proceso catalítico. En muchos casos estas cadenas laterales son grupos ácidos o básicos que pueden impulsar la adición o eliminación de protones. En otros casos, la enzima contiene un ion metálico en la posición exacta para participar en la catálisis. Así, una enzima (1) une el sustrato o sustratos, (2) reduce la energía del estado de transición, y (3) impulsa directamente el acontecimiento catalítico. Cuando el proceso catalítico se ha completado, la enzima debe ser capaz de liberar el producto o productos y volver a su estado original, para estar preparada para un nuevo ciclo de catálisis. Para una enzima (E) que cataliza la conversión de un

Una enzima une el sustrato o los sustratos, promueve la reacción y libera el producto o los productos.

único sustrato (S) en un único producto (P), la forma más sencilla de escribir la reacción global es en dos pasos:

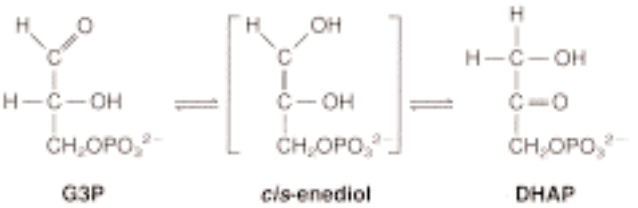
$$S + E \rightleftharpoons ES$$
$$ES \longrightarrow E + P$$

en donde ES corresponde el **complejo enzima-sustrato**, en el que consideramos el sustrato unido a la enzima y en el estado de transición o próximo a él. Para mayor simplicidad hemos supuesto que, aunque la primera reacción (el paso de unión) es reversible, la segunda (o paso catalítico), es irreversible. Veremos más adelante que son posibles representaciones mucho más complejas, con uno o más estados intermediarios, pero las ecuaciones que se han indicado muestran la esencia del proceso y resaltan el papel catalítico de la enzima.

Para ilustrar estos principios generales de una forma más concreta, pasaremos a dos reacciones específicas catalizadas por enzimas, en las que se comprenden bien los detalles de la catálisis. Son también reacciones que hemos encontrado ya y que encontraremos de nuevo más adelante.

TRIOSA FOSFATO ISOMERASA

La enzima, muy estudiada, triosa fosfato isomerasa cataliza la interconversión del gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), una reacción que se produce a través de un intermediario enediol:



Hemos considerado ya esta reacción en el Capítulo 9, y en el Capítulo 13 veremos que constituye un paso importante de la glucólisis. Tal como hemos escrito la reacción, el G3P se considera el sustrato, y la DHAP el producto. Pero también podríamos haber escrito la reacción en el sentido contrario, con la DHAP como sustrato. El intermediario enediol es inestable, por cuanto normalmente tiene una energía libre mucho más positiva que el G3P o la DHAP. Así pues, para catalizar la reacción, la enzima debe impulsar el intercambio de protones que forma el enediol y estabilizar este intermediario.

La catálisis por la triosa fosfato isomerasa comporta el fomento y la estabilización de un intermediario enediol.

El nombre que se da a esta enzima, *triosa fosfato isomerasa* (TPI, o TIM en las publicaciones más antiguas), ilustra un principio general utilizado en la denominación de las enzimas. Aunque se indicarán más tarde unas reglas más complejas y específicas, obsérvese que el nombre nos indica lo que hace la enzima: isomeriza las triosas fosfato. El sufijo *-asa* se utiliza mucho para designar a las enzimas. Las estructuras de la triosa fosfato isomerasa y de su complejo con la DHAP se han determinado con detalle mediante el empleo de los métodos de difracción de rayos X. La enzima activa es un dímero de dos subunidades idénticas. Cada una de ellas tiene la conformación que se indica en la Figura 11.9a: un cilindro β paralelo con hélices α en los bucles de interconexión. El lugar activo se encuentra cerca de la parte superior del cilindro y puede acomodar el G3P o la DHAP (Figura 11.9b).

El lugar activo de la triosa fosfato isomerasa incluye un residuo de glutamato (Glu 165) y uno de histidina (His 95) que son esenciales para la función de esta enzima. A pH fisiológico, el glutamato está cargado negativamente (por tanto,

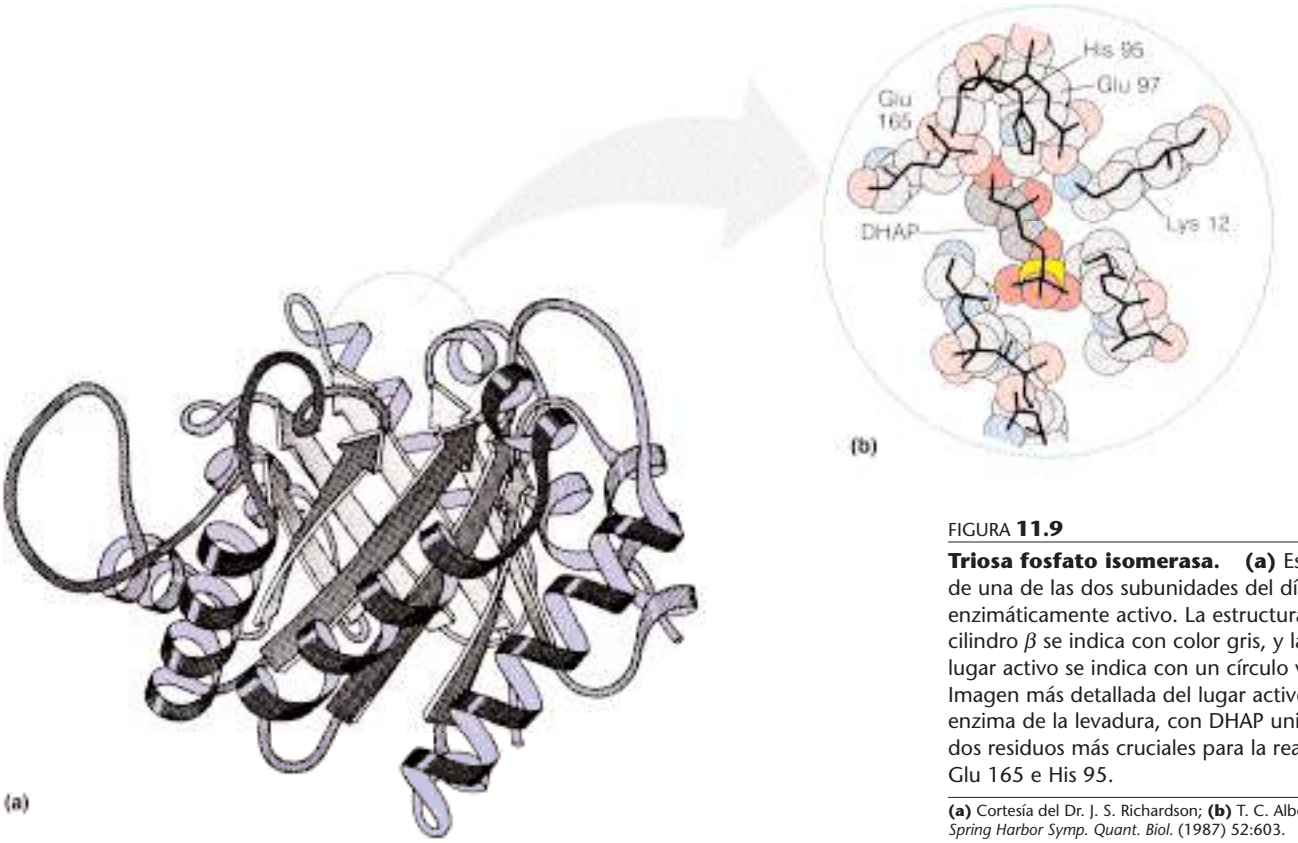
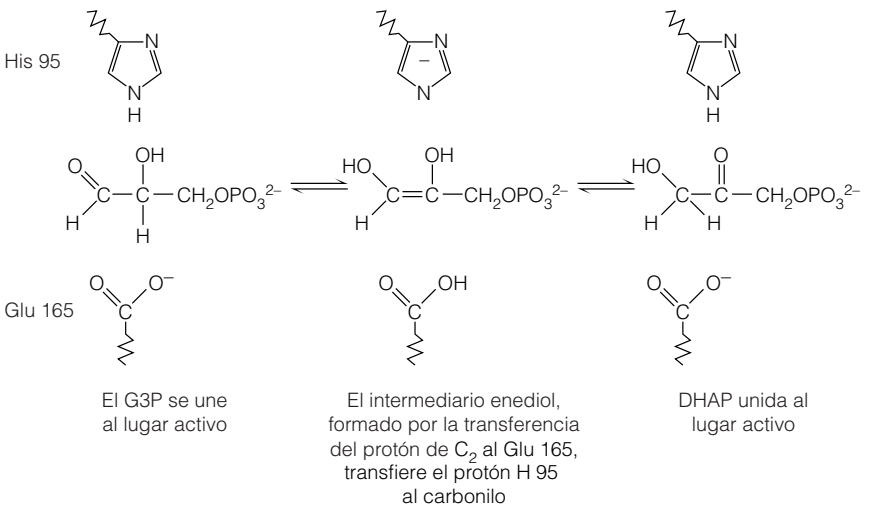


FIGURA **11.9**

Triosa fosfato isomerasa. **(a)** Estructura de una de las dos subunidades del dímero enzimáticamente activo. La estructura de cilindro β se indica con color gris, y la zona del lugar activo se indica con un círculo verde. **(b)** Imagen más detallada del lugar activo de la enzima de la levadura, con DHAP unido. Los dos residuos más cruciales para la reacción son Glu 165 e His 95.

(a) Cortesía del Dr. J. S. Richardson; **(b)** T. C. Alber et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* (1987) 52:603.

es básico) y ayuda a extraer el protón del carbono 2 del G3P. Al mismo tiempo, la histidina actúa como un grupo ácido donador de protones (HA) para trasladar protones entre el grupo carbonilo del sustrato y el —OH de C-2. Así pues, la reacción parece que se produce de la siguiente forma:



Obsérvese lo que ocurre. En primer lugar, la enzima proporciona una "jaula" o lugar de unión, en el que se mantiene el sustrato. De hecho, un bucle de 11 aminoácidos (166 a 176) forma un "párpado" que se cierra sobre el sustrato atra-

pándolo y protegiendo al intermediario enediol. Si se elimina este bucle por una mutación, la enzima mutante tiende a perder el enediol, que posteriormente se desfosforila para dar el metilglioxal muy tóxico. De esta manera, el bucle es fundamental para el funcionamiento seguro de la enzima en el organismo. La eficacia catalítica de esta enzima mutante se reduce por un factor de 10^5. En segundo lugar, la presencia de Glu 165 e His 95 en las posiciones exactamente correctas favorece el intercambio de protones, que es esencial para la formación del estado intermediario. La importancia de una colocación correcta se ha demostrado también mediante mutagénesis de lugar dirigida. Se ha sustituido el Glu 165 por Asp, que aporta el carboxilo tan sólo 0.1 nm más allá del sustrato. Este cambio reduce la velocidad catalítica por un factor de 1000. Tanto los factores de entropía (posicionamiento) como de entalpía (estabilización) intervienen en la reducción de la barrera de energía libre de la reacción. Así pues, podemos comprobar que la catálisis de la conversión de G3P en DHAP es algo más complicada que el sencillo esquema de catálisis enzimática que se presentó antes. Una descripción mínima de esta reacción requiere que escribamos:

$E + G3P \rightleftharpoons E \cdot G3P$	Unión de G3P
$E \cdot G3P \rightleftharpoons E \cdot ed$	Conversión en enediol
$E \cdot ed \rightleftharpoons E \cdot DHAP$	Conversión en DHAP
$E \cdot DHAP \rightleftharpoons E + DHAP$	Liberación de DHAP

La reacción se ha estudiado con bastante detalle, y se han determinado las barreras de energía libre de los pasos individuales. Como se muestra en la Figura 11.10, la presencia de la enzima da lugar a varias barreras de baja energía en vez de la barrera mucho más alta que existiría sin la enzima.

SERINA PROTEASAS

Como segundo ejemplo, consideremos la catálisis de la hidrólisis del enlace peptídico por una de las **serina proteasas**. Esta importante clase de enzimas incluye la tripsina y la quimotripsina, que hemos visto ya en el Capítulo 5. Estas

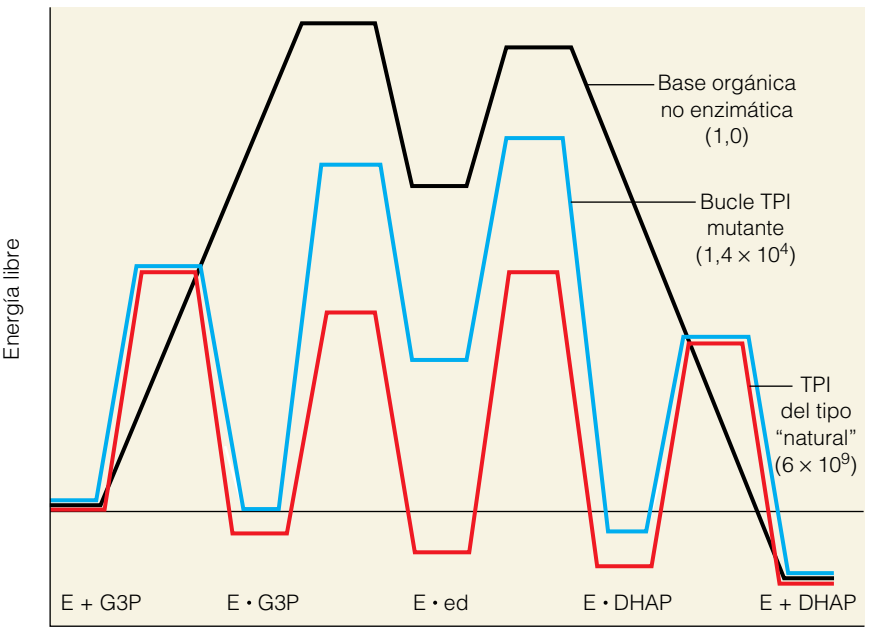


FIGURA **11.10**

Barreras de energía libre para la reacción G3P ⟶ DHAP. El diagrama compara las barreras de energía libre que existen para la conversión del G3P en DHAP con tres catalizadores diferentes. Las barreras se han dibujado esquemáticamente, ya que no conocemos sus formas exactas. Los valores relativos de la constante de velocidad se indican entre paréntesis. Línea negra: reacción catalizada a pH 7 por una base orgánica simple. Línea roja: la reacción está catalizada por la triosa fosfato isomerasa (TPI) de tipo "natural" (normal). Línea azul: reacción catalizada por una triosa fosfato isomerasa mutante en la que se ha eliminado en parte el "párpado". Obsérvese la disminución de la estabilización del complejo enzima enediol en el caso de la enzima mutante.

Adaptado de J. Knowles, *Nature* (1991) 350:121-124. © 1991 Macmillan Magazines, Ltd.

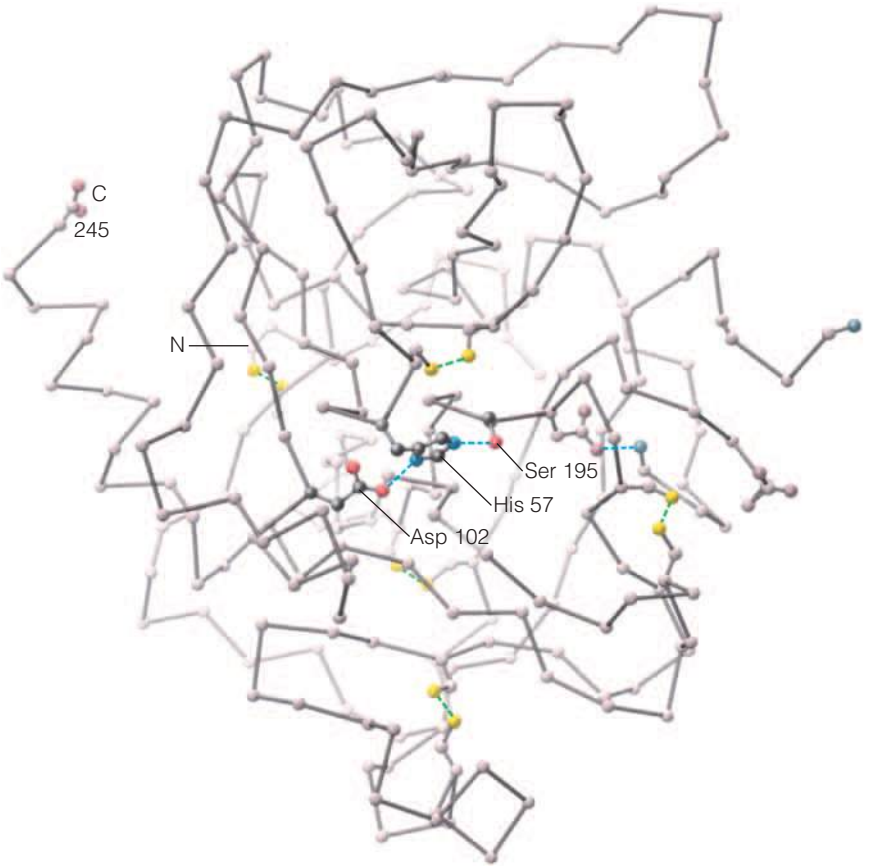


FIGURA **11.11**

Estructura de la quimotripsina. Los aminoácidos cruciales del lugar activo se indican en rojo y azul. El bolsillo del lugar activo se encuentra situado inmediatamente por debajo y a la derecha de la Ser 195.

enzimas se denominan proteasas porque catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos en los polipéptidos y las proteínas. Existen muchos tipos de proteasas, que presentan una amplia gama de especificidades de sustrato y utilizan diversos mecanismos catalíticos. Las *serina* proteasas se distinguen porque todas ellas tienen un residuo de serina que desempeña un papel crucial en el proceso catalítico.

Cada una de las serina proteasas corta preferentemente una cadena polipeptídica en el lado carboxilo de aminoácidos específicos. En la Tabla 5.4 (véase la página 155) se muestran algunos ejemplos de lugares de corte preferentes. Así, por ejemplo, la tripsina corta preferentemente en el lado carboxilato de los residuos de aminoácidos básicos como la lisina o la arginina, mientras que la quimotripsina actúa más frecuentemente si un residuo hidrófobo (como la fenilalanina) se encuentra en esta posición. Las serina proteasas hidrolizan también una amplia gama de ésteres, hecho este que tiene poca importancia fisiológica, pero que los bioquímicos utilizan en los estudios cinéticos.

La mayoría de las serina proteasas tienen unas estructuras tridimensionales semejantes y una relación evolutiva evidente. Las regiones del lugar activo de todas las serina proteasas tienen diversos factores comunes. En concreto, siempre existe un residuo de aspartato, un residuo de histidina y un residuo de serina agrupados alrededor de la depresión del lugar activo. Estos residuos son Asp 102, His 57 y Ser 195 en la estructura de la quimotripsina que se muestra en la Figura 11.11. Una cuarta característica del lugar activo difiere de una serina proteasa a otra. Se trata de un "bolsillo" que está situado siempre cerca de la serina del lugar activo (Figura 11.12). En la tripsina, este bolsillo es profundo y estrecho, con un carboxilato cargado negativamente en su parte inferior, lo cual permi-

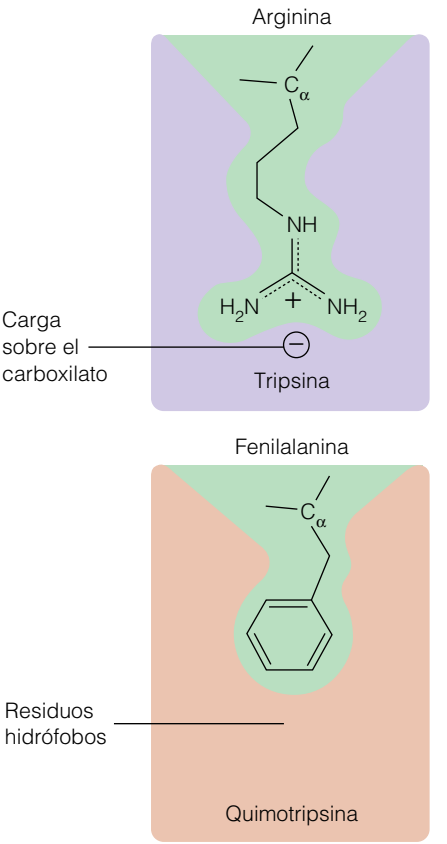


FIGURA **11.12**

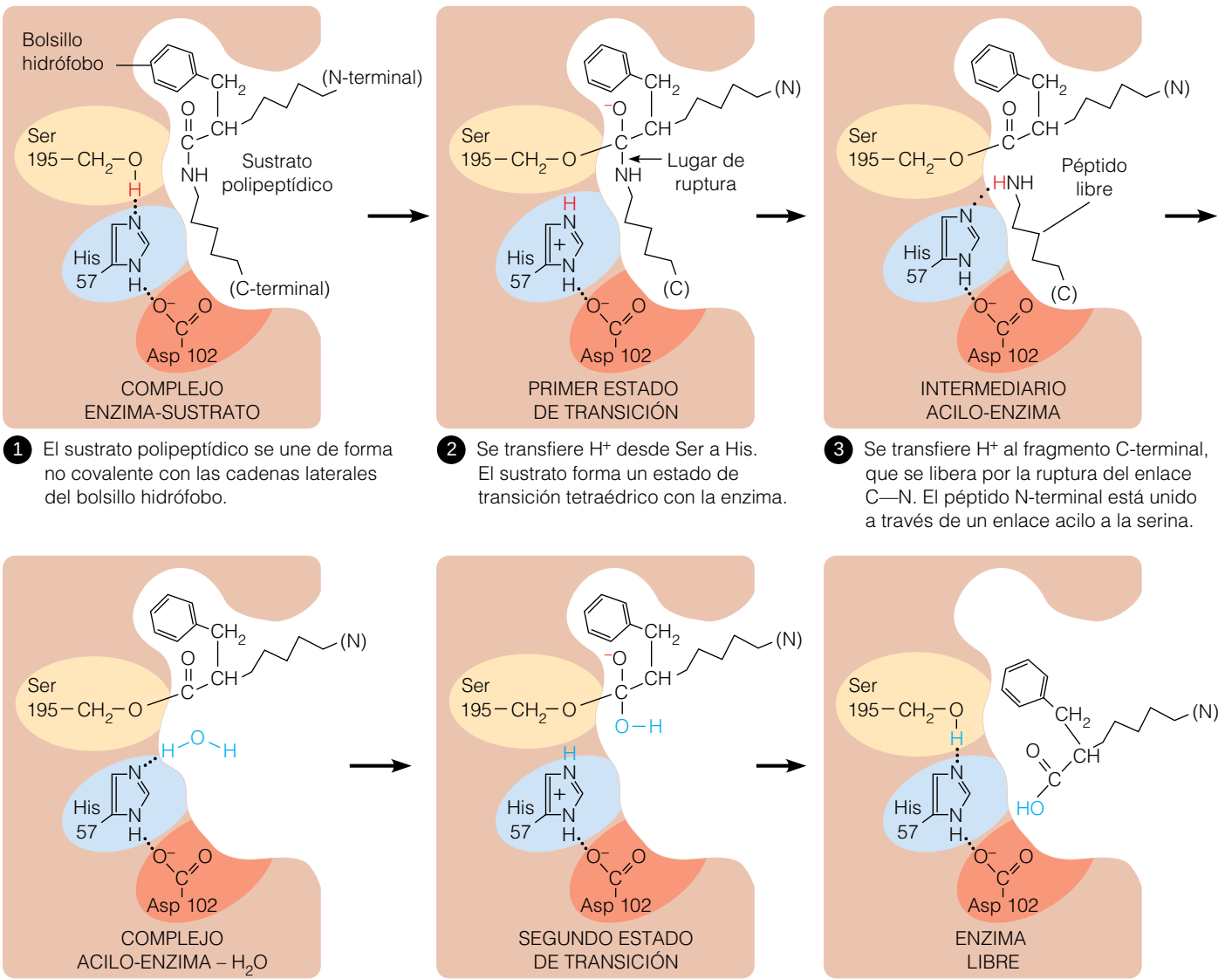
Bolsillos de los lugares activos de dos serina proteasas. Las características diferentes de los bolsillos de los lugares activos explican la distinta especificidad de las serina proteasas como la tripsina y la quimotripsina.

te captar y mantener una cadena lateral larga y de carga positiva como la de la lisina o la arginina. En la quimotripsina, el bolsillo es más ancho y está recubierto de residuos hidrófobos para acomodar una cadena lateral hidrófoba, como la de la fenilalanina. Es la naturaleza de este bolsillo lo que da a cada serina proteasa su especificidad.

La catálisis de la hidrólisis del enlace peptídico por una serina proteasa (quimotripsina, en este ejemplo), se produce como se indica en la Figura 11.13. En primer lugar, la cadena polipeptídica que se rompe se une a la superficie enzimática (paso 1). La mayoría de los polipéptidos se unen de manera inespecífica, pero la cadena lateral del residuo del lado N-terminal del enlace peptídico que se va a romper debe ajustarse al bolsillo del lugar activo. Este bolsillo define no sólo la posición del corte, sino también la *estereoespecificidad* de las serina proteasas. Si hubiera un aminoácido D en esta posición, la cadena lateral se

FIGURA **11.13**

Catálisis de la hidrólisis del enlace peptídico por la quimotripsina. En esta figura se muestran los pasos que se siguen en la ruptura de una cadena polipeptídica catalizada por la quimotripsina. La zona indicada en marrón corresponde a la enzima. La figura es muy esquemática y no representa la disposición espacial real de los átomos.



1. El sustrato polipeptídico se une de forma no covalente con las cadenas laterales del bolsillo hidrófobo.
2. Se transfiere H^+ desde Ser a His. El sustrato forma un estado de transición tetraédrico con la enzima.
3. Se transfiere H^+ al fragmento C-terminal, que se libera por la ruptura del enlace C—N. El péptido N-terminal está unido a través de un enlace acilo a la serina.
4. Una molécula de agua se une a la enzima en lugar del polipéptido separado.
5. La molécula de agua transfiere su protón a His 57 y su —OH al fragmento de sustrato restante. De nuevo se forma un estado de transición tetraédrico.
6. Se libera el segundo fragmento peptídico: se rompe el enlace acilo, el protón se transfiere de nuevo desde His a Ser, y la enzima vuelve a su estado inicial.

proyectaría en la dirección incorrecta, *alejándose* del receptáculo. Las serina proteasas no cortarán, pues, cerca de los aminoácidos D.

Esta unión muy específica de un tipo concreto de aminoácido sitúa a la serina del lugar activo próxima al grupo carbonilo del enlace a romper. Los residuos de serina no suelen ser reactivos, pero éste se encuentra en un entorno poco habitual, ya que está muy próximo a His 57. El protón de la serina se transfiere al anillo de histidina (paso 2), dejando en la serina una carga negativa. Normalmente, esta transferencia sería improbable debido a los pK_a elevados de los grupos alcohol —OH, pero parece facilitarse por Asp 102, que, por su carga negativa, estabiliza la protonación del anillo de histidina adyacente. La serina activada es un fuerte nucleófilo y puede atacar al carbonilo del sustrato, formando el *estado de transición tetraédrico*, que se muestra en el paso 2 de la figura. La ruptura del enlace peptídico (paso 3) se produce en este estado activado, dando un *intermediario acilo-enzima* en el que la parte N-terminal del sustrato polipeptídico se une de forma covalente a la enzima. La porción C-terminal del polipéptido extrae el protón (que originalmente era el protón de la serina) de la histidina, para formar un nuevo grupo amino terminal. Esta parte de la cadena del sustrato no está unida por sí misma de manera fuerte a la enzima.

Hasta este punto, el H_2O no ha entrado en acción, pero sí lo hace ahora para desplazar la porción C-terminal de la cadena y posteriormente romper el intermediario acilo. En el paso 4, una molécula de agua se coloca entre el grupo acilo y la His 57; en el paso 5, se transfiere un protón a la His 57 y, a continuación, se une al intermediario acilo para formar un segundo estado de transición tetraédrico. Obsérvese que este proceso es esencialmente una inversión de la formación del intermediario acilo inicial, y que la molécula de agua desempeña el papel de la parte liberada de la cadena polipeptídica. Por último (paso 6), el protón se transfiere desde la histidina de nuevo a la Ser 195, y se libera el resto de la cadena polipeptídica. La enzima vuelve a su estado original, y está preparada para catalizar la hidrólisis de otra cadena.

La catálisis de la ruptura del enlace peptídico por las serina proteasas comporta la estabilización de estados intermediarios tetraédricos.

Una clave del mecanismo de la catálisis de las serina proteasas se encuentra en la estabilidad de los dos estados intermedios tetraédricos, que son muy semejantes a los estados de transición esenciales. ¿Por qué son tan estables? Una posibilidad muy probable emerge de los estudios detallados de las estructuras de rayos X de los compuestos intermedios atrapados, que señalan que los protones amino del esqueleto de los residuos Ser 195 y Gly 193 pueden formar enlaces de hidrógeno con uno de los oxígenos del complejo tetraédrico. Este oxígeno es el que estaba en el carbonilo del sustrato, y el enlace de hidrógeno puede producirse sólo con la formación del estado tetraédrico. De esta forma, este enlace de hidrógeno estabiliza dichos intermediarios.

La quimotripsina es un ejemplo excelente de la forma en que actúan las enzimas. Obsérvese que son importantes para reducir la energía libre de activación tanto la estabilización energética de los estados activados como la colocación correcta de los reactantes.

Habrá observado que las dos enzimas que se han descrito con detalle, la triosa fosfato isomerasa y la quimotripsina, tienen ambas histidina y un residuo ácido en su lugar activo, lo cual no es infrecuente, ya que la histidina es muy común en los lugares activos debido a su facilidad para aceptar o donar protones a pH fisiológico. Los residuos como Glu, Asp, Lys y Arg son también participantes comunes en las transferencias de protones y sirven frecuentemente para realizar enlaces electrostáticos con las moléculas de sustrato. Otros residuos, como serina y cisteína, a veces también desempeñan funciones importantes en los lugares activos de las enzimas.

Cinética de la catálisis enzimática

En el apartado anterior, hemos descrito los detalles de los mecanismos de algunos ejemplos de reacciones catalizadas por enzimas. Se conocen otros muchos y este conocimiento es esencial en muchos aspectos de la medicina moderna, ya que ayuda a entender las situaciones patológicas y en el diseño de fármacos y tratamientos. ¿De dónde proceden estos conocimientos de los mecanismos? En gran parte de los análisis matemáticos detallados de la cinética enzimática. De esta forma, es hacia esos análisis a los que nos dirigimos.

VELOCIDAD DE REACCIÓN PARA UNA REACCIÓN SIMPLE CATALIZADA POR UNA ENZIMA: CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN

Hemos descrito detalladamente los mecanismos de dos reacciones catalizadas por enzimas. Estos ejemplos demuestran que la ecuación *mínima* para describir una reacción simple con un sustrato y un producto, catalizada por una enzima es la siguiente:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Hemos supuesto que las condiciones son tales que hacen que la reacción inversa entre E y P sea desdeñable. La formación catalítica del producto, con regeneración de la enzima, será pues una reacción simple de primer orden, y su velocidad vendrá determinada únicamente por la concentración de ES y el valor de k_2. En consecuencia, podemos expresar la rapidez o velocidad de reacción, definida como la velocidad de formación de los productos, de la misma forma que hicimos en la ecuación (11.3):

$$V = k_2[ES] \tag{11.14}$$

Si pudiéramos medir V y [ES] para una enzima y sustrato específicos, ello nos proporcionaría la constante de velocidad k_2 para esa reacción específica. Sin embargo, [ES] generalmente no es una concentración medible. Lo que sí *podemos* medir son las concentraciones del sustrato (o producto) y la concentración *total* de la enzima, que debe ser la suma de la enzima libre y la enzima ocupada:

$$\underset{\text{Enzima total}}{[E]_t} = \underset{\text{Enzima libre}}{[E]} + \underset{\text{Enzima en el complejo ES}}{[ES]} \tag{11.15}$$

Así pues, podremos expresar la velocidad, V, en función de la concentración de sustrato [S] y la concentración total de enzima $[E]_t$.

Podría pensarse, por la forma en que hemos escrito la reacción, que E y S deben estar en equilibrio con ES, con una constante de disociación de equilibrio K_S:

$$K_S = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \tag{11.16}$$

Ésta es, normalmente, una suposición incorrecta, pero en determinadas circunstancias (k_2 es mucho menor que k_{-1}), esta aproximación es válida. Se utilizó en los primeros intentos de resolver el problema de expresar la velocidad de reacción. Pero no es aplicable de manera general, ya que E, S y ES no están realmente en equilibrio, pues parte de ES se extrae de manera continua para producir P. Un análisis que evita la suposición del equilibrio es el que presen-

taron G. E. Briggs y J. B. S. Haldane en 1925. El modelo de Briggs-Haldane se basa en el siguiente argumento. Cuanto más ES haya, más rápidamente se disociará ES en los productos, o volverá a dar lugar a los reactantes. En consecuencia, cuando se inicia la reacción mezclando enzimas y sustratos, la concentración de ES aumenta al principio, pero alcanza rápidamente un **estado estacionario**, en el que se mantiene casi constante. Este estado estacionario persiste hasta que se ha consumido la mayor parte del sustrato (Figura 11.14). Dado que el estado estacionario da cuenta de la casi totalidad del tiempo de reacción, podemos calcular la velocidad de reacción suponiendo unas condiciones de estado estacionario. Normalmente, medimos las velocidades únicamente después de que se haya establecido el estado estacionario, y antes de que [ES] haya cambiado mucho. Podemos expresar entonces la velocidad de la siguiente forma.

En el estado estacionario, las velocidades de formación y degradación de ES son iguales. Por consiguiente,

$$\underset{\text{Formación a partir de la enzima y el sustrato}}{k_1[\mathrm{E}][\mathrm{S}]} = \underset{\text{Descomposición en la enzima y el sustrato}}{k_{-1}[\mathrm{ES}]} + \underset{\text{Descomposición en la enzima y los productos}}{k_2[\mathrm{ES}]} \qquad (11.17)$$

que podemos reordenar de la forma siguiente

$$[\mathrm{ES}] = \left(\frac{k_1}{k_{-1} + k_2}\right)[\mathrm{E}][\mathrm{S}] \qquad (11.18)$$

Combinamos la relación de las constantes de velocidad de la ecuación (11.18) en una sola constante, K_M:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \qquad (11.19)$$

La ecuación (11.18) puede volver a escribirse entonces como

$$K_M[\mathrm{ES}] = [\mathrm{E}][\mathrm{S}] \qquad (11.20)$$

En este punto, tenemos [ES] en términos de [E] y [S]. Para introducir $[E]_t$ en la ecuación, en vez de [E], basta recordar de la ecuación (11.15), que $[E] = [E]_t - [ES]$. Introduciendo esta expresión en la ecuación (11.20) obtenemos

$$K_M[\mathrm{ES}] = [\mathrm{E}]_t[\mathrm{S}] - [\mathrm{ES}][\mathrm{S}] \qquad (11.21)$$

Si transferimos el segundo término del lado derecho de la ecuación al lado izquierdo y luego sacamos factor común, obtenemos

$$[\mathrm{ES}] \cdot (K_M + [\mathrm{S}]) = [\mathrm{E}]_t[\mathrm{S}] \qquad (11.22)$$

Con una reordenación se puede pasar a

$$[\mathrm{ES}] = \frac{[\mathrm{E}]_t[\mathrm{S}]}{K_M + [\mathrm{S}]} \qquad (11.23)$$

Por último, si introducimos este resultado en la ecuación (11.14), obtenemos lo que buscábamos, una expresión para V en función de $[E]_t$ y [S]:

$$V = \frac{k_2[\mathrm{E}]_t[\mathrm{S}]}{K_M + [\mathrm{S}]} \qquad (11.24)$$

La hipótesis del estado estacionario establece que la concentración del complejo enzima-sustrato se mantiene casi constante durante gran parte de la reacción.

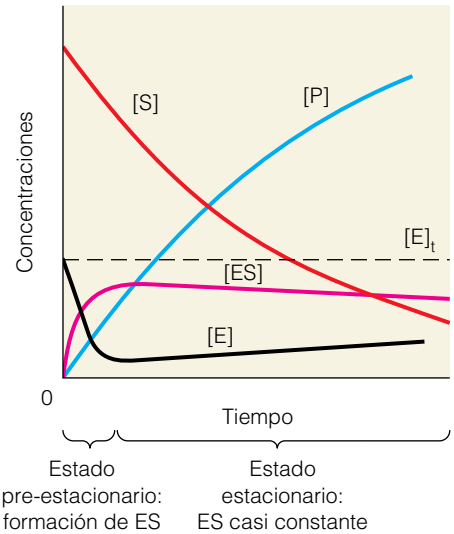


FIGURA **11.14**

Estado estacionario en la cinética enzimática. Para una reacción simple catalizada por una enzima ($E + S \rightleftharpoons ES \longrightarrow E + P$), el gráfico muestra la manera en que varían a lo largo del tiempo las concentraciones de sustrato [S], enzima libre [E], complejo enzima-sustrato [ES] y producto [P]. Tras un período inicial muy breve, [ES] alcanza un estado estacionario en el que ES se consume con una velocidad aproximadamente igual a la de su formación, de manera que $d[ES]/dt \cong 0$. Se han exagerado considerablemente las cantidades de E y ES para mayor claridad. Obsérvese que $[E] + [ES] = [E]_t$, es decir, la concentración de enzima total, y que [ES] disminuye en realidad muy lentamente a medida que se consume el sustrato, mientras [E] aumenta en consonancia con ello.

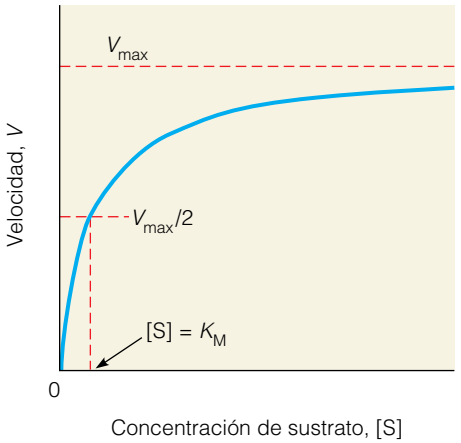


FIGURA **11.15**

Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción. En este gráfico, que representa la ecuación (11.26), se muestra la variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato, según la cinética de Michaelis-Menten. En el punto en que [S] = K_M, la reacción tiene exactamente la mitad de su velocidad máxima. Obsérvese que es difícil valorar la velocidad máxima a partir de los datos con el empleo de este gráfico, puesto que se produce una aproximación asintótica a $V_{máx}$.

La ecuación (11.24) se denomina **ecuación de Michaelis-Menten** y K_M se llama **constante de Michaelis**, en honor de dos pioneras en el análisis de la cinética enzimática, Leonor Michaelis y Maude Menten. Consideraremos en breve el significado de K_M; por el momento tengamos en cuenta dos puntos importantes. En primer lugar, puesto que K_M es una relación de constantes de velocidad para una determinada reacción [véase la ecuación (11.19)], es una característica de esa reacción. Así pues, una determinada enzima que actúe sobre un sustrato dado tiene una K_M definida. En segundo lugar, de la ecuación (11.20) puede verse que K_M tiene unidades de concentración.

Consideremos ahora el gráfico de V frente a [S] que se muestra en la Figura 11.15. A concentraciones de sustrato elevadas, en que [S] es muy superior a K_M, la reacción se aproxima a una **velocidad máxima**, $V_{máx}$, puesto que las moléculas de enzima están *saturadas*; todas las moléculas de enzima están ocupadas con el sustrato y están realizando el paso catalítico. Expresamos esta situación matemáticamente haciendo que [S] sea mucho mayor que K_M en la ecuación (11.24), de forma que $K_M + [S] \cong [S]$. Obtenemos la siguiente expresión para $V_{máx}$:

$$V_{máx} = k_2[E]_t \tag{11.25}$$

Así pues, podemos expresar $k_2[E]_t$ en la ecuación (11.24) como $V_{máx}$, y volver a escribir la ecuación de Michaelis-Menten de la forma

$$V = \frac{V_{máx}[S]}{K_M + [S]} \tag{11.26}$$

Ésta es la forma en que más la utilizaremos.

EXPRESIÓN DE LAS VELOCIDADES DE REACCIÓN PARA LAS REACCIONES DE MÚLTIPLES PASOS

Hemos deducido la ecuación de Michaelis-Menten para la reacción enzimática simple de dos pasos que se da en la página 420. Sin embargo, esta ecuación también puede utilizarse para describir procesos más complicados en determinadas circunstancias. Consideremos la reacción

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} EP \xrightarrow{k_3} E + P$$

Una reacción de múltiples pasos como ésta puede describirse mediante una ecuación de la forma de la ecuación de Michaelis-Menten, pero la k_2 de la ecuación (11.24) debe sustituirse por una constante más general, a la que denominaremos k_{cat}:

$$V = \frac{k_{cat}[E]_t[S]}{K_M + [S]} \tag{11.27}$$

La magnitud k_{cat} incorpora las constantes de velocidad de todas las reacciones entre ES y E + P. Para las reacciones de dos pasos que hemos considerado antes, $k_{cat} = k_2$. Para reacciones más complejas, k_{cat} es una combinación de otras constantes de velocidad; su valor depende de los pasos del proceso que sean limitantes de la velocidad. (Véase el ejemplo de la página 427.) En cualquier caso, la ecuación (11.26) se mantiene inalterada, si definimos $V_{máx} = k_{cat}[E]_t$. Dado que la definición de k_{cat} incluye k_2 como un caso especial, utilizaremos k_{cat} en todas las ecuaciones posteriores, incluso para las reacciones más sencillas.

SIGNIFICADO DE K_M, k_{cat} Y k_{cat}/K_M

Las dos magnitudes que caracterizan a una enzima que obedezca la cinética de Michaelis Menten son K_M y k_{cat}. ¿Qué significado tienen? La constante de Michaelis, K_M, se suele asociar con la afinidad de la enzima por el sustrato. Esta relación es cierta en el caso limitante, una reacción de dos pasos en la que k_2 es mucho más pequeña que k_{-1}, puesto que entonces la ecuación (11.19) da lugar a $K_M \cong k_{-1}/k_1 = K_S$, la constante de equilibrio definida en la ecuación (11.16). En estas circunstancias, un valor de K_M elevado significa que k_{-1} es mucho mayor que k_1, y la enzima se une al sustrato de forma muy débil. Así pues, cuando la velocidad de formación del producto es baja, podemos interpretar K_M como una medida inversa de la fuerza de unión del sustrato. Pero un valor de k_2 muy alto puede llevar también a una K_M alta, como muestra la ecuación (11.19). Podríamos decir que K_M mide la tendencia de ES a disociarse en cualquier dirección, en comparación con su tendencia a formarse. Sin embargo, esta definición no es muy útil, puesto que una K_M elevada puede significar que el producto se forma rápidamente (k_2 alta) o que el complejo se disocia rápidamente (k_{-1} alta). Tal vez la forma más útil de interpretar K_M sea la que se muestra en la Figura 11.15, en la que se representa gráficamente la ecuación (11.26). Esta representación muestra que, para cualquier reacción que siga la ecuación de Michaelis-Menten, K_M es numéricamente igual a la concentración de sustrato a la que la velocidad de reacción ha alcanzado la *mitad* de su valor máximo. Así pues, K_M es una medida de la concentración de sustrato necesaria para que se produzca una catálisis eficaz. *Una enzima con una K_M alta requiere una concentración de sustrato mayor para alcanzar una velocidad de reacción dada, que una enzima con una K_M baja,* pero la misma k_{cat}. En la Tabla 11.1 se indican los valores de K_M para diversas enzimas importantes.

La constante de Michaelis, K_M, mide la concentración de sustrato a la que la velocidad de reacción es $V_{máx}/2$.

La segunda constante, k_{cat}, constituye una medida directa de la producción catalítica de producto en condiciones óptimas (enzima saturada). Las unidades de k_{cat} son s^{-1}, por lo que el recíproco de k_{cat} puede interpretarse como un tiempo, el tiempo necesario para que una molécula de enzima "recambie" una molécula de sustrato. Otra posibilidad es interpretar k_{cat} como el número de moléculas de sustrato recambiadas por molécula de enzima por segundo. Así pues, k_{cat} se denomina a veces **número de recambio**. En la Tabla 11.1 se indican algunos números de recambio característicos.

TABLA 11.1 Parámetros de Michaelis-Menten para algunas enzimas, dispuestas por orden de eficacia creciente según mide k_{cat}/K_M

Enzima	Reacción catalizada	K_M (mol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M [$(mol/L)^{-1}\ s^{-1}$]
Quimotripsina	Ac–Phe–Ala $\xrightarrow{H_2O}$ Ac–Phe + Ala	1.5×10^{-2}	0.14	9.3
Pepsina	Phe–Gly $\xrightarrow{H_2O}$ Phe + Gly	3×10^{-4}	0.5	1.7×10^{3}
Tirosil-tRNA sintetasa	Tirosina + tRNA $\longrightarrow$ tirosil-tRNA	9×10^{-4}	7.6	8.4×10^{3}
Ribonucleasa	Citidina 2′, 3′ fosfato cíclico $\xrightarrow{H_2O}$ Citidina 3′-fosfato	7.9×10^{-3}	7.9×10^{2}	1.0×10^{5}
Anhidrasa carbónica	$HCO_3^- + H^+ \longrightarrow H_2O + CO_2$	2.6×10^{-2}	4×10^{5}	1.5×10^{7}
Fumarasa	Fumarato $\xrightarrow{H_2O}$ malato	5×10^{-6}	8×10^{2}	1.6×10^{8}

El número de recambio, k_{cat}, mide la velocidad del proceso catalítico.

Las enzimas indicadas en la Tabla 11.1 están dispuestas en orden creciente de la relación k_{cat}/K_M. Esta relación se supone frecuentemente que es una medida de la eficacia enzimática. Obsérvese que proporcionan un valor k_{cat}/K_M grande, tanto un valor grande de k_{cat} (que significa un recambio rápido), como un valor pequeño de K_M (que significa una afinidad elevada por el sustrato). Podemos obtener otra perspectiva del significado de k_{cat}/K_M teniendo en cuenta la situación que se da a concentraciones muy bajas de sustrato. En este caso, $[S] << K_M$, y la mayor parte de la enzima está libre, con lo que $[E]_t \cong [E]$. La ecuación (11.27) pasa a ser entonces

$$V \cong \frac{k_{cat}}{K_M}[E][S] \tag{11.28}$$

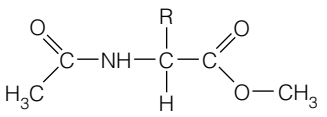
La relación k_{cat}/K_M es una medida adecuada de la eficacia enzimática.

Así pues, en estas circunstancias, la relación k_{cat}/K_M se comporta como una constante de velocidad de segundo orden para la reacción entre el sustrato y la enzima libre. Esta relación es importante, ya que proporciona una medida directa de la eficacia y la especificidad de la enzima. Muestra lo que la enzima y el sustrato pueden realizar cuando se dispone de lugares enzimáticos abundantes, y permite una comparación directa de la eficacia de una enzima respecto a distintos sustratos. Supongamos que una enzima puede actuar sobre dos sustratos, A o B, presentes a concentraciones iguales. Entonces, en condiciones en las que los dos sustratos están diluidos y compiten por la enzima, obtenemos

$$\frac{V_A}{V_B} = \frac{(k_{cat}/K_M)_A[E][A]}{(k_{cat}/K_M)_B[E][B]} = \frac{(k_{cat}/K_M)_A}{(k_{cat}/K_M)_B} \tag{11.29}$$

En la Tabla 11.2 se indican los valores de k_{cat}/K_M para la quimotripsina con diversos sustratos. Dentro del grupo mostrado, k_{cat}/K_M varía 1 millón de veces, lo cual indica la diversidad de preferencias de la enzima incluso para sustratos muy semejantes. A partir de estos datos queda bastante clara la preferencia para romper cerca de los residuos más hidrófobos.

Acabamos de ver que la proporción k_{cat}/K_M corresponde a la constante de velocidad de segundo orden para la combinación enzima-sustrato cuando la concentración de sustrato es baja. Esta constante de velocidad tiene un valor máximo posible, que viene dado por la frecuencia con la que pueden colisionar las moléculas de enzima y sustrato. Una reacción que alcanza esta velocidad se dice que es de "difusión limitada": cada encuentro conduce a la reacción, de forma que sólo limita la velocidad la cantidad de encuentros moleculares. Si *cada* colisión da lugar a la formación de un complejo enzima-sustrato, la teoría de la difusión predice que k_{cat}/K_M alcanzará un valor de aproximadamente 10^8 a



Éster metílico de N-acetilaminoácido

TABLA 11.2 Preferencias de la quimotripsina en la hidrólisis de varios ésteres metílicos de N-acetilaminoácido, medidas por k_{cat}/K_M

Aminoácido en el éster	Cadena lateral del aminoácido	k_{cat}/K_M [(mol/L)$^{-1}$ s^{-1}]
Glicina	—H	1.3×10^{-1}
Norvalina	—$CH_2CH_2CH_3$	3.6×10^{2}
Norleucina	—$CH_2CH_2CH_2CH_3$	3.0×10^{3}
Fenilalanina	—CH_2—	1.0×10^{5}

10^9 $(mol/L)^{-1}s^{-1}$ (véase el Problema 4). Así pues, una enzima que se aproxime a la eficacia máxima posible lo evidenciará con un valor de k_{cat}/K_M de este orden. Como se indica en la Tabla 11.1, algunas enzimas, como la anhidrasa carbónica y la fumarasa, se aproximan realmente a este límite. La triosa fosfato isomerasa, que hemos estudiado ya, es otro ejemplo, con una $k_{cat}/K_M = 2.4 \times 10^8$ $(mol/L)^{-1}s^{-1}$. De hecho, se ha señalado que la triosa fosfato isomerasa es una enzima casi perfecta que ha evolucionado hasta alcanzar casi la eficacia máxima. En apoyo de esta idea cabe citar la observación de que las triosa fosfato isomerasas de organismos tan distantes desde el punto de vista evolutivo como las levaduras y los vertebrados presentan muy pocas diferencias de estructura. Parece que esta enzima vital alcanzó casi la perfección en una fase temprana de la evolución y desde entonces se ha modificado poco.

ANÁLISIS DE LOS DATOS CINÉTICOS: COMPROBACIÓN DE LA ECUACIÓN DE MICHAELIS-MENTEN

Supongamos que queremos ver si una reacción catalizada por una enzima sigue la ley de Michaelis-Menten [ecuación (11.27)] y determinar las constantes K_M y k_{cat}. ¿Cómo podemos hacerlo? En primer lugar, necesitaremos alguna forma de seguir la formación de producto o el consumo de sustrato, para medir la velocidad de reacción.

En Herramientas de la Bioquímica 11A se describen diversos métodos analíticos para la medida de velocidades. Debe destacarse una cuestión general: en principio podríamos mezclar simplemente la enzima y el sustrato y seguir los cambios de la concentración de sustrato y de la velocidad de reacción con el tiempo, como se muestra en la Figura 11.1a. A medida que se consume el sustrato, la velocidad disminuye, hasta alcanzar finalmente el equilibrio. Pero la medida de la velocidad instantánea en momentos concretos durante la reacción resulta difícil y en general inexacta. Habitualmente, resulta más fácil establecer una serie de experimentos, todos ellos con la misma concentración enzimática pero con distintas concentraciones de sustrato, y medir las velocidades *iniciales* (Figura 11.1c). Puesto que conocemos con exactitud el valor de [S] inicial, y el cambio de [S] frente a t es casi lineal en las fases iniciales, pueden obtenerse datos exactos de V en función de [S].

Disponiendo de los datos de concentraciones y velocidades iniciales, ¿cómo podemos determinar K_M y k_{cat}? La mejor forma es reordenar la ecuación (11.26), de manera que proporcione una gráfica lineal. Hay varios tipos de gráficas posibles, pero la que se utiliza más es una **representación doble inversa**, también llamada **representación de Lineweaver-Burk** (Figura 11.16). Si invertimos simplemente los dos lados de la ecuación (11.26), obtenemos

Las formas más adecuadas de determinar K_M y k_{cat} son con las representaciones de Lineweaver-Burk o de Eadie-Hofstee.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M + [S]}{V_{máx}[S]} = \frac{K_M}{V_{máx}[S]} + \frac{[S]}{V_{máx}[S]} \qquad (11.30a)$$

es decir

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{K_M}{V_{máx}}\right)\left(\frac{1}{[S]}\right) + \frac{1}{V_{máx}} \qquad (11.30b)$$

Así pues, representando $1/V$ frente a $1/[S]$, debemos obtener una línea recta. Donde $1/[S] = 0$, [S] es infinitamente grande y la velocidad de reacción se encuentra en su máximo. En consecuencia, podemos determinar $1/V_{máx}$ a partir de la intersección de la recta con el eje $1/V$. Teniendo $V_{máx}$ y conociendo $[E]_t$ a partir de la concentración en peso y del peso molecular de la enzima, podemos

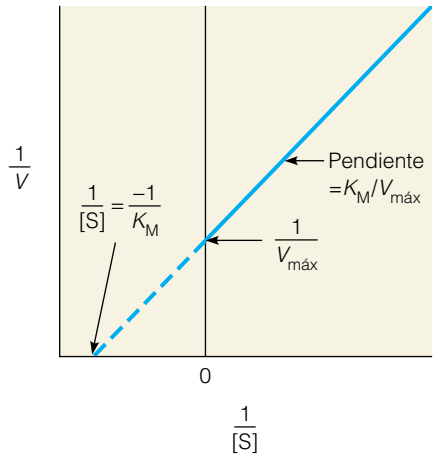


FIGURA **11.16**

Representación de Lineweaver-Burk. En este gráfico doble inverso, se representa $1/V$ frente a $1/[S]$, según la ecuación (11.30b). Obsérvese que una extrapolación lineal de los datos nos proporciona tanto $V_{máx}$ como K_M.

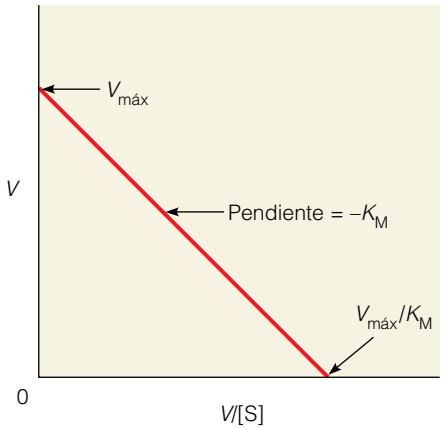


FIGURA **11.17**

Representación de Eadie-Hofstee. Se representa V frente a $V/[S]$; obtenemos $V_{máx}$ a $(V/[S]) = 0$ y K_M a partir de la pendiente de la recta.

Las reacciones con varios sustratos son de diversas clases, según el orden de unión de los sustratos: aleatorio, ordenado o ping-pong.

calcular k_{cat} mediante $V_{máx} = k_{cat}[E]_t$. Para obtener K_M, extrapolamos el gráfico de Lineweaver-Burk hasta el punto hipotético en que $1/V = 0$, que nos da

$$0 = \frac{K_M}{V_{máx}[S]_0} + \frac{1}{V_{máx}} \tag{11.31}$$

en donde $[S]_0$ indica el valor de $[S]$ a $1/V = 0$. Obtenemos entonces de la ecuación (11.31):

$$1/[S]_0 = -1/K_M \tag{11.32}$$

Así pues, la intersección de la representación de Lineweaver-Burk con el eje $1/[S]$ da $-1/K_M$. (Véase la Figura 11.16.) De otra manera, podemos obtener $K_M/V_{máx}$ a partir de la pendiente.

Una representación de Lineweaver-Burk proporciona una forma rápida de comprobar el cumplimiento de la cinética de Michaelis-Menten y permite evaluar con facilidad las constantes críticas. Como veremos, también permite discriminar los distintos tipos de inhibición y regulación enzimática. Un inconveniente de la representación de Lineweaver-Burk es que suele requerir una extrapolación larga para determinar K_M con la correspondiente incertidumbre del resultado. Por consiguiente, a veces se utilizan otras formas de representación de los datos. Una alternativa es reordenar la ecuación (11.26) de la siguiente forma

$$V = V_{máx} - K_M \frac{V}{[S]} \tag{11.33}$$

y representar V frente a $V/[S]$, que es la denominada **representación de Eadie-Hofstee** (Figura 11.17).

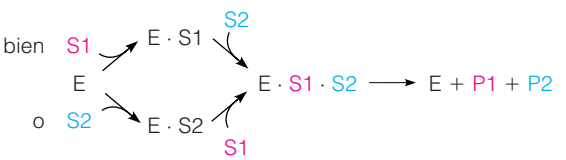
REACCIONES CON MÚLTIPLES SUSTRATOS

Hasta este punto, nuestro análisis de la cinética enzimática se ha centrado en reacciones simples, en las que una molécula de un solo sustrato se une a una enzima y sufre la reacción aquí. En realidad, estas reacciones son una minoría. La mayoría de las reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas comportan la reacción de dos o más sustratos, a menudo con la formación de múltiples productos. Un ejemplo que ya hemos considerado es el de la proteólisis, en la que intervienen dos sustratos (el polipéptido y el agua) y dos productos (los dos fragmentos de la cadena polipeptídica rota). La fosforilación de la glucosa, catalizada por la hexoquinasa, es otro ejemplo: los dos sustratos son la glucosa y el ATP, y los productos son la glucosa-6-fosfato y el ADP.

Cuando una enzima une dos o más sustratos y libera múltiples productos, el orden de los pasos pasa a ser una característica importante del mecanismo enzimático. Se reconocen varias clases principales de mecanismos para las reacciones con múltiples sustratos. Los ilustraremos con ejemplos en los que se utilicen dos sustratos, S1 y S2, y dos productos, P1 y P2.

Unión aleatoria de los sustratos

En la unión aleatoria de los sustratos, cualquiera de los sustratos puede ser el primero en unirse a la enzima, aunque en muchos casos se favorecerá la unión inicial de uno de los sustratos, y su unión puede promover luego la unión del otro. La ruta general es



La fosforilación de la glucosa por el ATP, con participación de la hexoquinasa como enzima, parece seguir un mecanismo de este tipo, aunque hay una cierta tendencia a que se una primero la glucosa.

Unión ordenada de los sustratos

En algunos casos, un sustrato *debe* unirse antes de que un segundo sustrato pueda unirse significativamente. Tenemos entonces

$$E \xrightarrow{S1} E \cdot S1 \xrightarrow{S2} E \cdot S1 \cdot S2 \longrightarrow E + P1 + P2$$

Este mecanismo se suele observar en las oxidaciones de los sustratos por la coenzima dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD^+), que se considerará posteriormente en este capítulo.

Mecanismo "ping-pong"

A veces la secuencia de sucesos de la catálisis es la siguiente. Se une un sustrato, se libera un producto, entra un segundo sustrato y se libera un segundo producto. Por razones obvias, se denomina reacción ping-pong:

$$E \xrightarrow{S1} E \cdot S1 \xrightarrow{P1} E^* \xrightarrow{S2} E^* \cdot S2 \xrightarrow{P2} E$$

Aquí E^* es una forma modificada de la enzima, que, a menudo, lleva un fragmento de S1. Un buen ejemplo es la ruptura de una cadena polipeptídica por una serina proteasa, como la tripsina o la quimotripsina. Describimos el polipéptido como S = A · B, en donde A y B indican las porciones C-terminal y N-terminal de la cadena a partir del punto de ruptura:

$$E \xrightarrow{S} E \cdot S \xrightarrow{A} E^* \cdot B \xrightarrow{H_2O} E^* \cdot B \cdot H_2O \xrightarrow{B} E$$

Aquí $E^* \cdot B$ y $E^* \cdot B \cdot H_2O$ indican los intermediarios covalentes acilo descritos en el tratamiento anterior (véase la Figura 11.13).

UN EXAMEN MÁS DETALLADO DE ALGUNAS REACCIONES COMPLEJAS

¿Cómo analizamos realmente el mecanismo de una reacción compleja catalizada por una enzima y cómo determinamos las constantes de velocidad para los distintos pasos? Consideremos por ejemplo la ruptura de un sustrato por una serina proteasa como la quimotripsina.

En primer lugar, obsérvese que no podemos analizar el paso $E^* \cdot B + H_2O \longrightarrow E^* \cdot B \cdot H_2O$. La concentración de agua es esencialmente fija en una disolución acuosa y no es una variable. En consecuencia, bastará escribir la reacción de la forma siguiente

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} E \cdot S \xrightarrow[k_2]{A} E^* \cdot B \xrightarrow[k_3]{} E + B$$

Tenemos, pues, varias constantes que determinar. Las medidas de estado estacionario no serán suficientes por sí mismas. Puede demostrarse que la velocidad del estado estacionario para esta reacción viene dada por la ecuación

$$V = \frac{\left(\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}\right)[E]_t[S]}{[S] + \left(\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}\right)} \qquad (11.34)$$

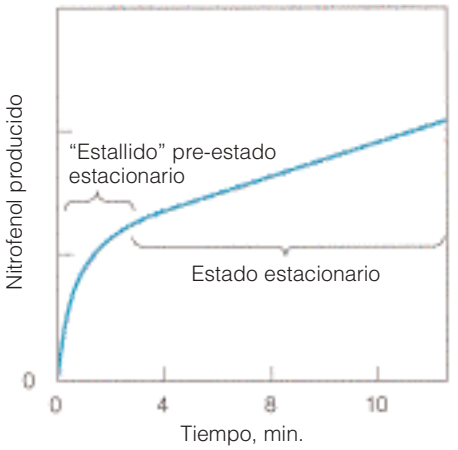


FIGURA **11.18**

Estado pre-estacionario. En esta representación se muestra la cinética de la hidrólisis del *p*-nitrofenilacetato catalizada por la quimotripsina. La producción del primer producto de la reacción (*p*-nitrofenol) se sigue espectrofotométricamente tras la mezcla de la enzima y el sustrato. El estallido inicial de formación de producto cesa cuando la enzima está casi toda unida en el intermediario acilo.

En otras palabras, la enzima cumple la cinética de Michaelis-Menten, pero k_{cat} y K_M se definen ahora de la siguiente forma:

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \tag{11.35a}$$

$$K_M = \frac{K_S k_3}{(k_2 + k_3)} \tag{11.35b}$$

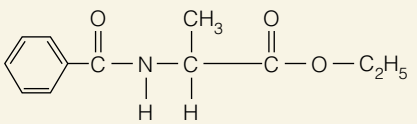
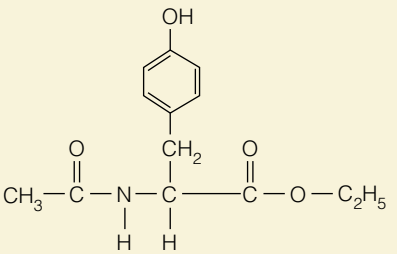
$$K_S = k_{-1}/k_1 \tag{11.35c}$$

Estos resultados ponen de relieve que las expresiones adecuadas para k_{cat} y K_M dependen del mecanismo de reacción, incluso en los casos en los que la ecuación de Michaelis-Menten describe la velocidad. Para obtener las constantes de velocidad individuales en un caso de este tipo, deben utilizarse medidas fuera del margen del estado estacionario. Uno de los primeros indicios de la posible participación de un intermediario en la hidrólisis vino de los estudios cinéticos rápidos de las fases iniciales de la hidrólisis de los ésteres por la quimotripsina. Si seguimos la liberación del producto A en nuestra reacción del ejemplo, observamos que su concentración aumenta rápidamente durante unos pocos minutos, hasta que se ha producido aproximadamente 1 mol por mol de enzima. Pasado este tiempo, observamos la producción de estado estacionario (Figura 11.18).

El estallido inicial de producción del primer producto, denominado *producción pre-estado estacionario* se ha explicado de la siguiente forma. Para la hidrólisis de un éster, k_3 es mucho más pequeña que k_2. En consecuencia, el intermediario acilo se forma rápidamente en cada molécula de enzima, con la liberación asociada de 1 mol del producto A. Pero tras este período, puede formarse mayor cantidad de A tan sólo después de que se degrade cada intermediario acilo y la enzima vuelva a estar disponible. La disociación del intermediario acilo es el paso limitante de la velocidad.

Las medidas aún más rápidas, con el empleo de técnicas de flujo detenido (véase Herramientas de la Bioquímica 11A), permiten determinar la velocidad de formación del complejo enzima-sustrato (ES). Las medidas de la degradación de los intermediarios acilo una vez agotado el sustrato nos dan k_3. Con el empleo de una combinación de estos métodos, junto con los estudios del estado estacionario, podemos obtener todas las constantes de la ecuación (11.34). En la Tabla 11.3 se presentan dos ejemplos de estos datos cinéticos detallados para la

TABLA **11.3 Constantes de velocidad para la hidrólisis de dos ésteres de *N*-acilaminoácido por la quimotripsina**

Sustrato	k_{cat} (s^{-1})	k_2 (s^{-1})	k_3 (s^{-1})	K_M (mM)	K_S (mM)
	0.069	0.069	0.6	5.87	5.97
	192	5000	200	0.663	17.2

hidrólisis de los ésteres de *N*-acilaminoácidos. En el ejemplo 1, tenemos $k_{cat} \cong k_2$ y $K_M \cong K_S$. Éstos son los resultados que cabe prever cuando la reacción de acilación (k_2) es el paso limitante de la velocidad, con $k_2 << k_3$. En el segundo caso, la desacilación es el paso limitante de la velocidad ($k_2 >> k_3$) y $k_{cat} \cong k_3$. En esta situación, $K_M = K_S(k_3/k_2)$. Puede comprobar cada una de estas afirmaciones viendo cómo se comportan las ecuaciones (11.35) en los casos específicos.

Este ejemplo demuestra que un análisis del estado estacionario es tan sólo un primer paso en el estudio de cualquier enzima y que para descubrir los mecanismos deben utilizarse varias técnicas.

Inhibición enzimática

Podemos aprender más acerca de la forma en que actúan las enzimas mediante los estudios de inhibición. Muchos tipos diferentes de moléculas inhiben las enzimas, y actúan de diversas formas. Debe establecerse una distinción importante entre la **inhibición reversible** y la **inhibición irreversible**. La primera comporta una unión *no covalente* del inhibidor que siempre puede revertirse, al menos en principio, mediante la eliminación del inhibidor. En algunos casos, la unión no covalente puede ser tan fuerte que *parezca* irreversible en condiciones fisiológicas. Un ejemplo de ello es la unión del inhibidor de la tripsina a la tripsina. En cambio, en la inhibición irreversible, una molécula se une de forma *covalente* a la enzima y la incapacita realmente. La inhibición irreversible se suele observar en la acción de toxinas y venenos específicos, muchos de los cuales pueden causar la muerte al incapacitar enzimas clave (véase la página 433). Por otro lado, la acción terapéutica de muchos fármacos depende de su actuación como inhibidores enzimáticos, como veremos en muchos ejemplos.

La inhibición de las enzimas puede ser reversible o irreversible.

INHIBICIÓN REVERSIBLE

Los diversos modos de inhibición reversible implican todos ellos la unión no covalente de un inhibidor a la enzima, pero difieren en los mecanismos por medio de los cuales reducen la actividad enzimática y en la forma en que afectan la cinética de la reacción.

Inhibición competitiva

Supongamos que existe una molécula que se parece tanto al sustrato de una reacción catalizada por una enzima, que la enzima aceptará esta molécula en su lugar de unión. Si la molécula puede procesarse también por la enzima, se trata simplemente de un sustrato alternativo competitivo. Sin embargo, si la molécula se une al lugar activo pero *no puede* sufrir el paso catalítico, simplemente hace perder el tiempo a la enzima. Una molécula de este tipo se denomina **inhibidor competitivo** (Figura 11.19).

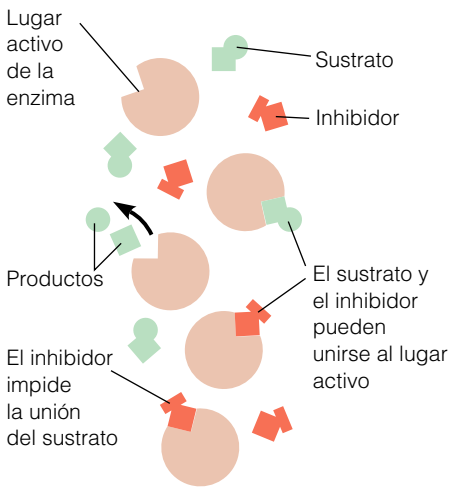
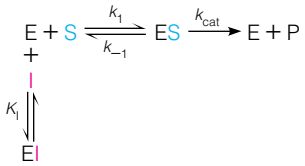


FIGURA **11.19**

Inhibición competitiva. Tanto el sustrato como el inhibidor se ajustan al lugar activo. El sustrato puede procesarse por la enzima, mientras que el inhibidor no.

Durante la fracción de tiempo en que la molécula de inhibidor competitivo está ocupando el lugar activo, la enzima no está disponible para la catálisis. El efecto global es como si la enzima no pudiera unirse al sustrato tan bien cuando está presente el inhibidor. Así pues, cabe prever que la enzima actúe como si su K_M se incrementara por la presencia del inhibidor. Matemáticamente, expresamos estas ideas escribiendo el esquema de reacción de la siguiente forma

Un inhibidor competitivo compite con el sustrato por el lugar de unión. Aumenta la K_M aparente.



En este caso I indica la sustancia inhibidora y K_I es una constante de disociación para la unión del inhibidor, que se define como $K_I = [E][I]/[EI]$, en donde [I] = concentración de inhibidor libre. Podemos resolver las ecuaciones de velocidad de la misma forma que en el apartado anterior, pero teniendo en cuenta que ahora

$$\underset{\text{Enzima total}}{[E]_t} = \underset{\text{Enzima libre}}{[E]} + \underset{\text{Enzima unida al sustrato}}{[ES]} + \underset{\text{Enzima unida al inhibidor}}{[EI]} \qquad (11.36)$$

En el análisis de este caso, se obtiene que la expresión para V es la siguiente

$$V = \frac{k_{cat}[E]_t[S]}{K_M(1 + [I]/K_I) + [S]} \qquad (11.37a)$$

que puede formularse también de la siguiente forma

$$V = \frac{k_{cat}[E]_t[S]}{K_M^{ap} + [S]} = \frac{V_{max}[S]}{K_M^{ap} + [S]} \qquad (11.37b)$$

Esta expresión se asemeja a la ecuación de Michaelis-Menten, con una K_M "aparente" dada por $K_M^{ap} = K_M\,(1 + [I]/K_I)$. Como se preveía, el aumento de [I] produce un aumento de la K_M aparente. Obsérvese que la velocidad máxima no cambia, puesto que cuando [S] llega a ser muy grande, V se aproxima a $V_{máx}$, al igual que en ausencia de inhibición, y $V_{máx} = k_{cat}[E]_t$. Físicamente, esto significa simplemente que si hacemos [S] muy grande para un valor dado de [I], las numerosas moléculas de sustrato harán que no compita el inhibidor. El efecto de la inhibición competitiva en una gráfica de V frente a [S] se muestra en la Figura 11.20a.

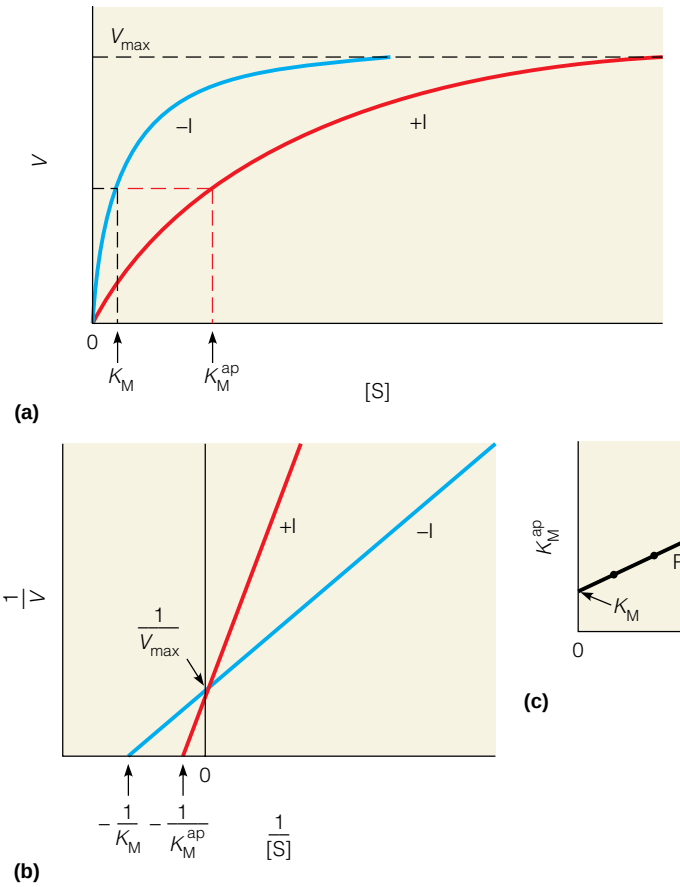


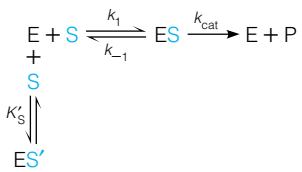
FIGURA **11.20**

Efectos de la inhibición competitiva sobre la cinética enzimática. **(a)** Efecto de un inhibidor competitivo (I) sobre la velocidad de reacción a distintas concentraciones de sustrato. La adición del inhibidor reduce la velocidad pero no la $V_{máx}$. La K_M aparente es mayor en presencia del inhibidor. **(b)** Representaciones de Lineweaver-Burk de las reacciones que se muestran en (a). La línea corta el eje $1/V$ a la misma $V_{máx}$, lo cual indica que I es un inhibidor competitivo. **(c)** Determinación de K_M y K_I. Si se repite la medición de K_M^{ap} a distintas concentraciones de I, puede determinarse K_I a partir de la pendiente de la recta, y el valor verdadero de K_M a partir de la intersección de la recta donde [I] = 0.

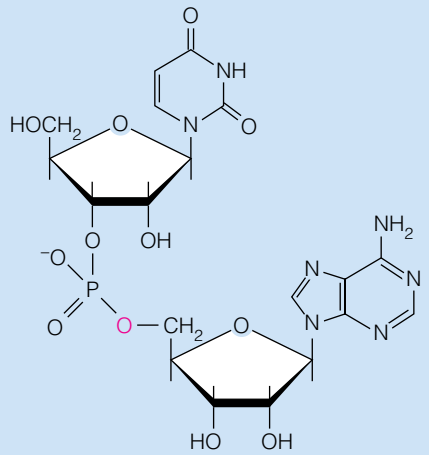
Dado que el sistema, a una [I] dada, continúa cumpliendo una ecuación de la forma de la de Michaelis-Menten, debemos prever que las representaciones de Lineweaver-Burk y de Eadie-Hofstee continúen siendo gráficas lineales, y que el valor de K_M (pero no el de $V_{máx}$) cambie con la presencia del inhibidor. Como muestra la Figura 11.20b, esto es exactamente lo que ocurre. Si representamos gráficamente los valores de K_M^{ap} obtenidos a partir de las intersecciones de Lineweaver-Burk obtenidas a diferentes concentraciones del inhibidor frente a [I], podemos determinar tanto el valor verdadero de K_M como el de K_I como se muestra en la Figura 11.20c.

Un ejemplo claro de un inhibidor competitivo es el que se presenta en la Figura 11.21. El dinucleótido UpA es un excelente sustrato de la enzima ribonucleasa que cataliza la hidrólisis del enlace fosfodiéster entre los dos nucleótidos. Pero si el átomo de oxígeno en el lugar de ruptura de UpA se sustituye por un grupo CH_2, la molécula pasa a ser el análogo *fosfonato* UpcA, un potente inhibidor competitivo. La ribonucleasa se une al análogo lo suficientemente fuerte en el lugar activo para permitir los estudios de difracción de rayos X del complejo, pero no puede romper el enlace fosfonato.

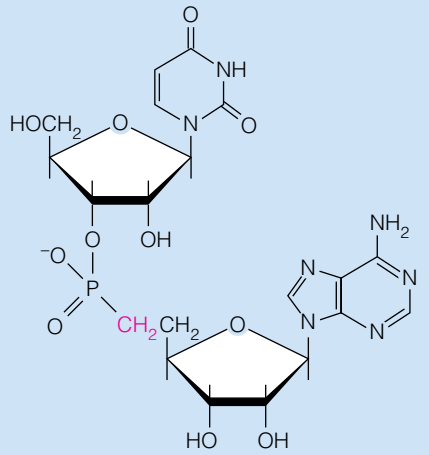
Una variante de la inhibición competitiva es la **unión no productiva**. A veces, una molécula de sustrato posee una forma adicional de encaje en el lugar de unión, una forma en la que no puede producirse el proceso catalítico normal:



Aquí, ES′ es el complejo enzima-sustrato que no conduce a producto. En estos casos, tanto K_M como k_{cat} se modifican, ya que incluso a concentraciones saturantes de los sustratos, una fracción de las moléculas de sustrato se unirá de una forma no productiva. Un ejemplo es el que se da en la acción de la carboxipeptidasa sobre dipéptidos como la glicil-L-tirosina. Recuérdese del Capítulo 5 que la carboxipeptidasa rompe los residuos C-terminales de las cadenas polipeptídicas. Los dipéptidos se rompen sólo lentamente, debido probablemente a que pueden unirse de una forma en la que el grupo amino N-terminal interfiere con el lugar catalítico.



UpA: sustrato de la ribonucleasa

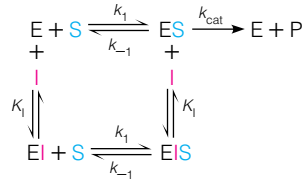


UpcA: inhibidor competitivo de la ribonucleasa

FIGURA **11.21**
Un sustrato y su inhibidor competitivo. El sustrato UpA y la molécula muy similar UpcA son competidores para la enzima ribonucleasa. La única diferencia entre el sustrato y el inhibidor se indica en rojo.

Inhibición no competitiva

Esta forma de inhibición se produce cuando una molécula o un ion pueden unirse a un *segundo* lugar de una superficie enzimática (no el lugar activo) de tal manera que modifican la k_{cat}. Podrían distorsionar, por ejemplo, la enzima de manera que el proceso catalítico no fuera tan eficaz (Figura 11.22). Un **inhibidor no competitivo** de este tipo puede ser una molécula que no se parece al sustrato en absoluto, sino que tiene una fuerte afinidad por un segundo lugar de unión. El caso más sencillo que cabe considerar es uno en el que la molécula del inhibidor no interfiera en forma alguna con la unión del sustrato sino que impida por completo el paso catalítico. Dado que el lugar de unión de I está completamente separado del lugar de unión de S, podemos suponer que el inhibidor se unirá igual de bien a E que a ES, con la misma K_I para ambos. El diagrama de estas reacciones es el siguiente:



Un inhibidor no competitivo no compite por el lugar activo sino que afecta al fenómeno catalítico. Modifica la k_{cat} aparente.

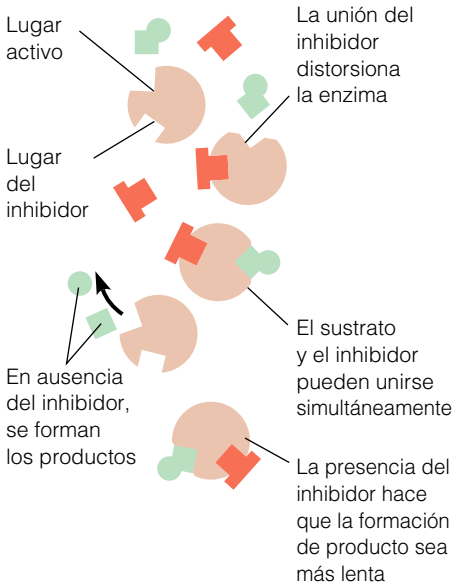


FIGURA **11.22**

Inhibición no competitiva. El inhibidor (rojo) se une a un lugar de la superficie enzimática distinto del lugar del sustrato (verde). En este ejemplo sencillo, el inhibidor no interfiere en la unión del sustrato, pero sí inhibe el fenómeno catalítico. El inhibidor y el sustrato pueden unirse de manera independiente.

El análisis matemático proporciona:

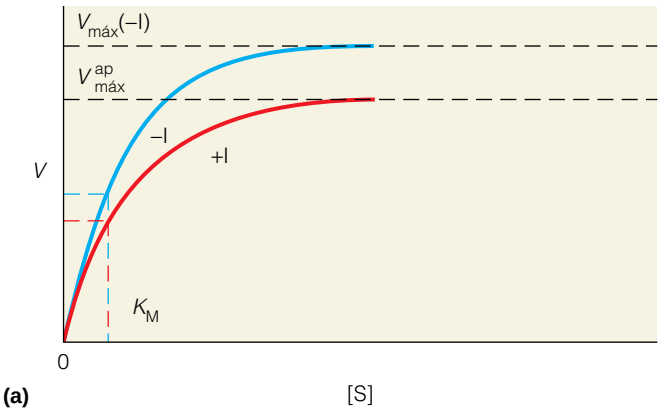
$$V = \frac{\{k_{cat}/(1 + [I]/K_I)\}[E]_t[S]}{K_M + [S]} = \frac{k_{cat}^{ap}[E]_t[S]}{K_M + [S]} \qquad (11.38)$$

Este resultado es exactamente el que cabía esperar. La K_M aparente no está influenciada por el inhibidor, pero la k_{cat} aparente, que viene dada por $k_{cat}/([1 + [I]/K_I])$, *disminuye* al aumentar [I]. En consecuencia, $V_{máx}$ se modifica en este caso (Figura 11.23a) puesto que a un valor alto de [S] obtenemos

$$V \longrightarrow V_{máx}^{ap} = k_{cat}^{ap}[E]_t = \frac{k_{cat}[E]_t}{1 + [I]/K_I} \qquad (11.39)$$

El efecto de la inhibición no competitiva sobre una representación de Lineweaver-Burk se muestra en la Figura 11.23b. Puede determinarse el valor real tanto de k_{cat} como de K_I mediante el gráfico de $1/V_{máx}^{ap}$ frente a [I] (Figura 11.23c). Se encuentra un ejemplo en la inhibición de la acetilcolinesterasa (véase el Capítulo 21) por las aminas terciarias (R_3N). Estos compuestos se unen a la enzima en sus diversas formas, pero el complejo acil-intermedio-amina no puede descomponerse en la enzima más el producto.

En realidad, la situación suele ser más compleja que este caso sencillo que hemos descrito. Así por ejemplo, el complejo ESI puede ser capaz de sufrir el proceso catalítico de manera lenta, o la unión del inhibidor puede modificar tanto k_{cat} como K_M. A este último caso se le denomina, por razones obvias, **inhibición mixta**. En estas circunstancias, las ecuaciones cinéticas pasan a ser más complicadas y no se considerarán aquí.



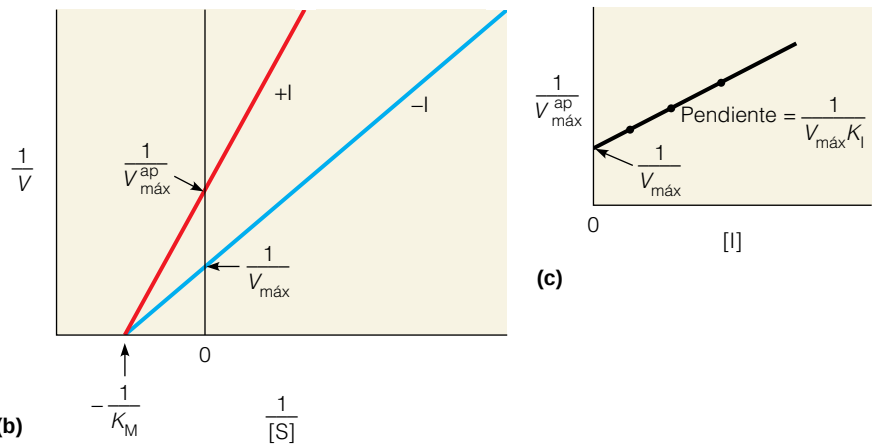


FIGURA **11.23**

Efectos de la inhibición no competitiva sobre la cinética enzimática. **(a)** Efecto de un inhibidor no competitivo (I) sobre la velocidad de reacción a diferentes concentraciones de sustrato. En este ejemplo sencillo, K_M no se afecta, mientras que $V_{máx}$ disminuye debido a que la enzima no es catalíticamente tan eficaz en presencia del inhibidor. **(b)** Representaciones de Lineweaver-Burk de las reacciones que se muestran en (a). Las líneas cortan el eje $1/V$ en distintos puntos, lo cual diferencia claramente esta situación de la inhibición competitiva (véase la Figura 11.20b). **(c)** Determinación de K_I y de la $V_{máx}$ sin inhibición (que proporcionará k_{cat}).

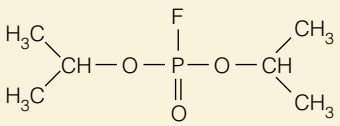
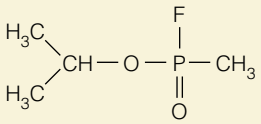
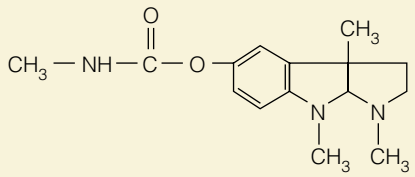
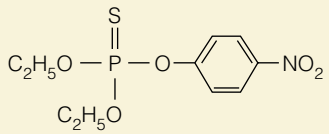
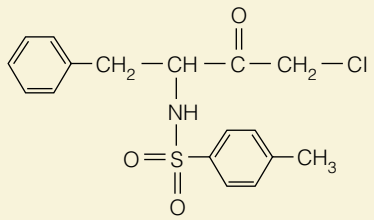
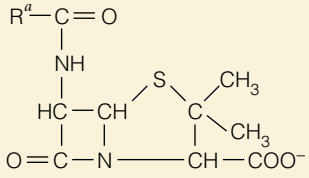
INHIBICIÓN IRREVERSIBLE

Muchos inhibidores irreversibles se unen covalentemente a los lugares activos de las enzimas.

Algunas sustancias se combinan de forma *covalente* con las enzimas y las inactivan de manera irreversible. Casi todos los **inhibidores enzimáticos irreversibles** son sustancias tóxicas, naturales o sintéticas. En la Tabla 11.4 se indican algunas de ellas. En la mayoría de los casos estas sustancias reaccionan con algún grupo funcional del lugar activo para bloquear el lugar del sustrato o para dejarlo catalíticamente inactivo.

Un ejemplo característico de un inhibidor competitivo irreversible es el del *diisopropil fluorofosfato* (*DFP*). Este compuesto reacciona de manera rápida e irreversible con los grupos hidroxilo de serina para formar un *aducto* covalen-

TABLA 11.4 Inhibidores enzimáticos irreversibles

Nombre	Formula[a]	Origen	Modo de acción
Cianuro	CN^-	Almendras amargas	Reacciona con iones metálicos de enzimas (p. ej., Fe, Zn, Cu); sus dianas primarias son las enzimas de la cadena respiratoria (véase el Capítulo 15)
Diisopropil fluorofosfato (DFP)		Sintético	Inhibe enzimas con serina en el lugar activo, como la acetilcolinesterasa
Sarín		Sintético (gas nervioso)	Como el DFP
Fisostigmina		Semillas de *Physostigma venosum*	Como el DFP
Paratión		Sintético (insecticida)	Como el DFP, pero especialmente inhibidor de la acetilcolinesterasa de insectos
N-Tosil-L-fenilalaninacloro-metil cetona (TPCK)		Sintético	Reacciona con la His 57 de la quimotripsina
Penicilina		Del hongo *Penicillium*	Inhibe las enzimas de la síntesis de la pared de la célula bacteriana (véase el Capítulo 16)

[a] R = grupo variable; difiere en las distintas penicilinas.

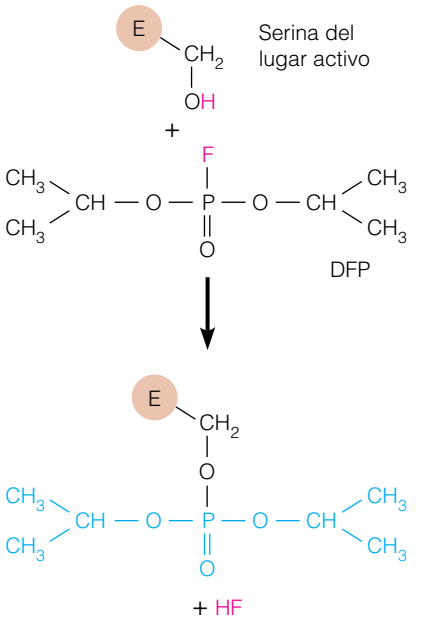


FIGURA **11.24**

Inhibición irreversible mediante la formación de un aducto. El diisopropil fluorofosfato (DFP) reacciona con un grupo de serina de una proteína para formar un aducto covalente. El enlace covalente hace que la serina, que es catalíticamente importante, pase a ser ineficaz en la catálisis. El aducto puede bloquear también el lugar del sustrato.

te, como se indica en la Figura 11.24. En consecuencia, el DFP actúa como inhibidor irreversible de las enzimas que contienen una serina esencial en su lugar activo. Entre estas enzimas se encuentran las serina proteasas y la enzima *acetilcolinesterasa.* Es la inhibición de la acetilcolinesterasa la que hace que el DFP sea una sustancia tan tóxica para los animales. La acetilcolinesterasa es esencial para la conducción nerviosa (véase el Capítulo 21) y su inhibición causa una parálisis rápida de las funciones vitales. Muchos insecticidas y gases nerviosos se parecen al DFP y son inhibidores potentes de la acetilcolinesterasa. En la Tabla 11.4 se presentan algunos ejemplos.

Para que estos inhibidores irreversibles reaccionen de manera selectiva con un residuo crítico, deben unirse fuertemente al lugar activo. Muchos lo hacen porque contienen un grupo de átomos con una configuración que se parece al estado de transición. Como ejemplos de estos **análogos del estado de transición** cabe citar el DFP y el *sarín* (véase la Tabla 11.4), que tienen una estructura tetraédrica que rodea al átomo de fósforo, muy similar al estado de transición tetraédrico del sustrato en muchas enzimas hidrolíticas.

En otros casos, los inhibidores irreversibles pueden ser extraordinariamente selectivos debido a que se parecen mucho al sustrato más que a su estado de transición. Un ejemplo es la *N-tosil-L-fenilalaninaclorometil cetona* (*TPCK*) (véase la Tabla 11.4). La TPCK es un excelente inhibidor de la quimotripsina, puesto que el grupo fenilo se ajusta exactamente en el bolsillo del lugar activo, colocando el cloro para el desplazamiento nucleófilo por un nitrógeno del anillo imidazol de la His 57. Se han sintetizado un gran número de estos inhibidores irreversibles para facilitar el análisis de los mecanismos enzimáticos y para controlar la actividad enzimática. Así por ejemplo, un bioquímico que utilice la quimotripsina para hidrolizar una proteína puede detener la reacción instantáneamente en cualquier momento mediante la simple adición de TPCK. Otro uso de estas sustancias es para marcar los residuos del lugar activo de una enzima de manera específica con el fin de facilitar su identificación. Cuando se utilizan inhibidores irreversibles de esta forma, se les denomina **marcadores de afinidad**. En algunos casos, un marcador de afinidad no es reactivo hasta que la enzima actúa sobre él, y en este momento se une de forma irreversible. Estas sustancias se llaman **inhibidores suicidas**, puesto que la enzima se "destruye" a sí misma al procesar el inhibidor.

Muchas toxinas naturales son inhibidores enzimáticos irreversibles. El alcaloide *fisostigmina* (véase la Tabla 11.4), que se encuentra en las semillas de *Physostigma venosum*, es tóxico porque es un potente inhibidor de la acetilcolinesterasa. Los antibióticos del grupo de las *penicilinas* actúan también como inhibidores irreversibles de las enzimas que contienen serina y que se utilizan en la síntesis de la pared celular bacteriana (véase el Capítulo 16).

Coenzimas, vitaminas y metales esenciales

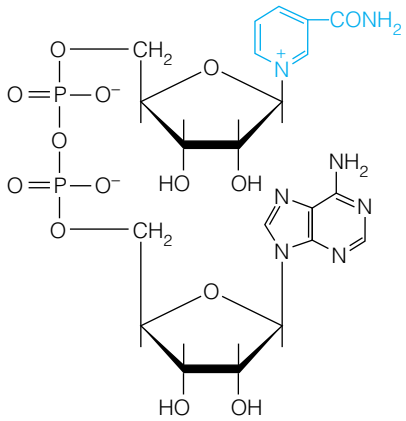
Muchas enzimas utilizan moléculas pequeñas unidas, que se denominan coenzimas, para facilitar la catálisis.

La complejidad de la estructura de una proteína globular y la variedad de las cadenas laterales existentes en una proteína permiten la formación de muchos tipos de lugares catalíticos. Esta variabilidad permite, a su vez, a las propias proteínas actuar como catalizadores enzimáticos eficaces en muchas reacciones. Sin embargo, para algunos tipos de procesos biológicos, el vocabulario molecular de las cadenas laterales de las proteínas no es suficiente. Una proteína puede requerir la ayuda de alguna otra molécula o ion pequeño para llevar a cabo la reacción. Las moléculas que se unen a las enzimas con este fin se denominan **coenzimas**. Igual que las enzimas, las coenzimas no se modifican de manera irreversible durante la catálisis; o bien no se modifican o bien se regeneran.

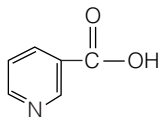
LAS COENZIMAS Y SUS FUNCIONES

Muchas vitaminas esenciales son componentes de las coenzimas.

Las coenzimas poseen frecuentemente estructuras orgánicas complejas que no pueden sintetizarse por algunos organismos, en particular los mamíferos. Las vitaminas hidrosolubles, aquellas que normalmente se denominan como el complejo vitamínico B, son precursores metabólicos de diversas coenzimas, razón por la que estas vitaminas son tan importantes en el metabolismo. Nuestra estrategia en este libro es presentar la bioquímica detallada de cada coenzima la primera vez que encontremos esa coenzima en el tratamiento de las rutas metabólicas. En la Tabla 11.5 se da una lista de diversas coenzimas importantes, junto con sus vitaminas relacionadas, la clase de reacciones con las que están asociadas y dónde encontrará una descripción y tratamiento detallados. En este punto, para dar una idea más concreta de cómo funcionan las coenzimas, describiremos una clase con algún detalle. Se trata de los nucleótidos de nicotinamida de los que un ejemplo fundamental es el **dinucleótido de nicotinamida y adenina** (**NAD+**) derivado de la vitamina **niacina**.



NAD⁺

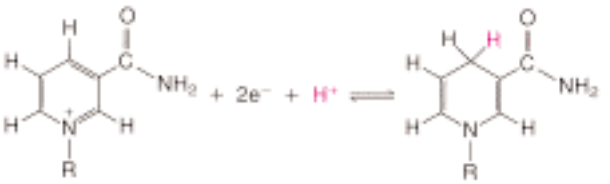


Niacina

TABLA 11.5 Algunas coenzimas importantes y las vitaminas relacionadas

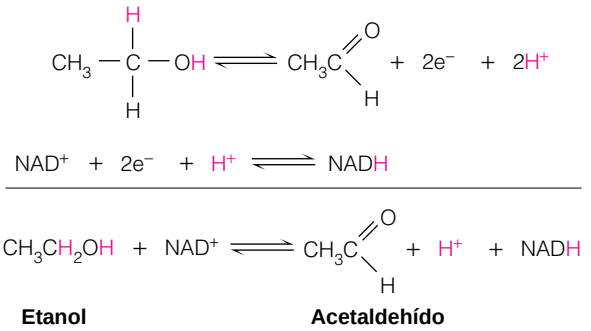
Vitamina	Coenzima	Reacciones en que intervienen estas coenzimas	Pagina donde se presenta la coenzima
Tiamina (vitamina B_1)	Pirofosfato de tiamina	Activación y transferencia de aldehídos	550
Riboflavina (vitamina B_2)	Mononucleótido de flavina; dinucleótido de flavina y adenina	Oxidación-reducción	551
Niacina	Dinucleótido de nicotinamida y adenina; dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato	Oxidación-reducción	435,
Ácido pantoténico	Coenzima A	Activación y transferencia de grupos acilo	553
Piridoxina	Piridoxal fosfato	Varias reacciones que implican activación de aminoácidos	818
Biotina	Biotina	Activación y transferencia de CO_2	567
Ácido lipoico	Lipoamida	Activación de grupos acilo; oxidación-reducción	550
Ácido fólico	Tetrahidrofolato	Activación y transferencia de grupos funcionales de un carbono	820
Vitamina B_{12}	Adenosil cobalamina; metil cobalamina	Isomerizaciones y transferencia de grupos metilo	826

La porción nicotinamida es el "extremo de los negocios" del NAD^+, ya que es capaz de reducirse y, de este modo, servir como un agente oxidante.



En donde R corresponde al resto de la molécula. En la reducción, se añaden al anillo de nicotinamida dos electrones y un protón. La reacción probablemente puede considerarse de forma más exacta como la transferencia de un **ion hidruro**: $NAD^+ + H^- \rightleftharpoons NADH$.

Una reacción característica en la que actúa el NAD^+ como agente oxidante es la conversión de los alcoholes en aldehídos o cetonas (por ejemplo, por la acción de la *alcohol deshidrogenasa* hepática):



Es el H ligado al C y no el H ligado al O el que se transfiere al NAD^+, como puede demostrarse mediante los estudios en que se emplean compuestos deuterados. Además, estas reacciones tienen una fuerte estereoespecificidad. A pesar de que el carbono del hidroxilo tenga *dos* hidrógenos unidos a él (como en el caso del etanol), es un hidrógeno concreto el que se transfiere al NAD^+. Esta especificidad puede parecer sorprendente, puesto que el carbono del grupo hidroxilo del etanol no es un centro quiral. ¿Cómo puede verse favorecido un H concreto cuando la molécula de sustrato tiene un plano de simetría? La respuesta está en la naturaleza asimétrica de la superficie de la enzima a la que se unen tanto el NAD^+ como el alcohol. Si una molécula simétrica como el etanol se une por *tres* puntos a un objeto asimétrico, los dos átomos de H dejan de ser equivalentes y se denominan *proquirales* (Figura 11.25). Además, aunque el anillo de nicotinamida está en un plano, la transferencia de hidrógeno en una reacción concreta es siempre a una cara específica del anillo, puesto que las dos caras *no* son equivalentes en el entorno asimétrico de una enzima. Estas consideraciones subyacen en la estereoespecificidad elevada de muchas reacciones catalizadas por enzimas, a diferencia de lo que ocurre en la catálisis no enzimática.

A veces resulta difícil establecer una distinción clara entre una verdadera coenzima y un segundo sustrato de la reacción. Las reacciones que acabamos de considerar son buenos ejemplos de este problema. Las enzimas deshidrogenasas, como la alcohol deshidrogenasa, tienen un lugar de unión fuerte para la forma oxidada, el NAD^+. Tras la oxidación del sustrato, la forma reducida, NADH, deja la enzima y se reoxida por otros sistemas aceptores de electrones de las células. El NAD^+ formado así puede unirse ahora a otra molécula de enzima y re-

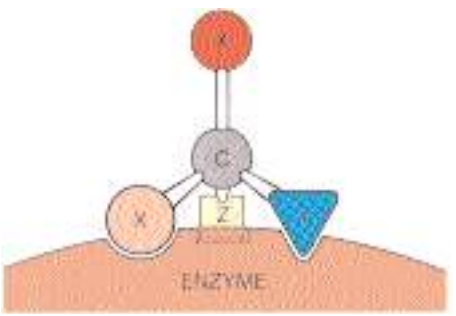


FIGURA **11.25**

Estereoespecificidad conferida por una enzima. Esta figura muestra la forma en que la superficie asimétrica de una enzima puede conferir estereoespecificidad a la reacción de un sustrato simétrico. Si la molécula de sustrato X_2CYZ debe establecer tres contactos con grupos complementarios específicos de la enzima, sus dos átomos X dejan de ser equivalentes. Tan sólo uno de los dos átomos X puede contactar adecuadamente con la superficie.

petir el ciclo. En estos casos, el NAD^+ actúa más como un segundo sustrato que como una verdadera coenzima. Sin embargo, el NAD^+ y el NADH difieren de la mayor parte de los sustratos en que se reciclan continuamente en la célula y se utilizan una y otra vez. Como consecuencia de este comportamiento, los consideramos coenzimas.

Un ejemplo de conducta del NAD^+ claramente como coenzima es la que se encuentra en la reacción de la *UDP-galactosa-4-epimerasa* que se muestra en la Figura 11.26. Esta enzima facilita la síntesis de los polisacáridos complejos mediante la interconversión de la UDP-glucosa en UDP-galactosa (véanse los Capítulos 9 y 13). El mecanismo mediante el cual el hidroxilo de la posición 4 cambia de orientación estereoquímica comporta la oxidación del hidroxilo a carbonilo como estado intermediario. En este caso, el NAD^+ y el NADH no abandonan nunca la enzima y se reducen y reoxidan de forma cíclica, proporcionando un lugar de reposo temporal a los electrones y al hidrógeno del sustrato. Esta reacción constituye un buen ejemplo de lo que hacen las coenzimas y de por qué son necesarias. El intermediario carbonilo proporciona un excelente estado intermediario para la interconversión de los azúcares, pero ninguna de las cadenas laterales de los aminoácidos normales de una proteína es realmente adecuada para promover este tipo de oxidación y reducción. Mediante la unión del NAD^+, la enzima puede llevar a cabo esta función.

IONES METÁLICOS EN LAS ENZIMAS

Muchas enzimas contienen iones metálicos, que generalmente se mantienen unidos mediante enlaces covalentes coordinados con las cadenas laterales de los aminoácidos, aunque a veces se unen mediante un grupo prostético como el hemo. Estas enzimas se denominan **metaloenzimas**. Los iones actúan de una forma muy parecida a las coenzimas, confiriendo a la metaloenzima una propiedad que no poseería en su ausencia. Como se muestra en la Tabla 11.6, las funciones de estos iones son diversas. Algunos de ellos, como el ion zinc en la *carboxipeptidasa A*, actúan como catalizadores metálicos para las reacciones hidrolíticas (Figura 11.27). El ion zinc participa en la estabilización del estado intermediario de la hidrólisis de una forma muy parecida a la acción de la serina en la quimotripsina (para la comparación, véase la Figura 11.13).

En otros casos, el metal de la metaloenzima actúa como reactivo redox. Hemos mencionado el ejemplo de la enzima que contiene hierro-hemo *catalasa*, que cataliza la degradación del peróxido de hidrógeno, un agente potencialmente destructor de las células. Dado que la reacción comporta una reduc-

TABLA 11.6 Metales y oligoelementos importantes como cofactores enzimáticos

Metal	Ejemplo de enzima	Función del metal
Fe	Citocromo oxidasa	Oxidación-reducción
Cu	Ácido ascórbico oxidasa	Oxidación-reducción
Zn	Alcohol deshidrogenasa	Facilita la unión de NAD^+
Mn	Histidina amoníaco liasa	Facilita la catálisis mediante la extracción de electrones
Co	Glutamato mutasa	El Co forma parte de la coenzima cobalamina
Ni	Ureasa	Lugar catalítico
Mo	Xantina oxidasa	Oxidación-reducción
V	Nitrato reductasa	Oxidación-reducción
Se	Glutatión peroxidasa	Sustituye al S en una cisteína del lugar activo

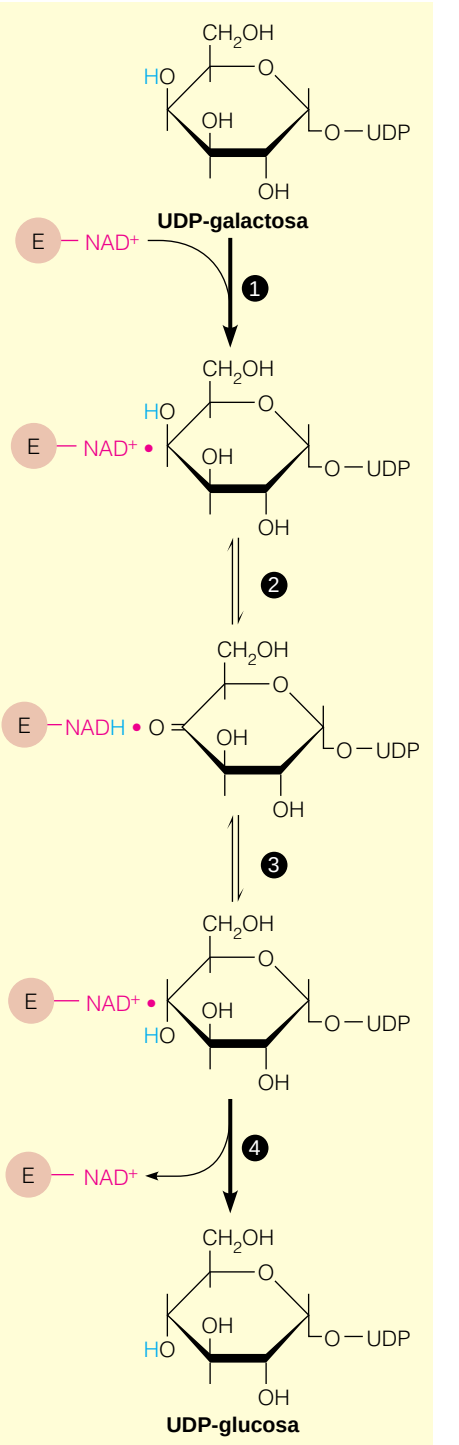


FIGURA **11.26**

Mecanismo propuesto para la UDP-galactosa epimerasa. La UDP-galactosa se une a la enzima, que lleva la coenzima NAD^+ (paso 1). Se extrae un protón para producir el intermediario carbonilo (paso 2) y luego se vuelve a introducir con la orientación enantiomérica contraria (paso 3). Se libera entonces el producto, UDP-glucosa (paso 4).

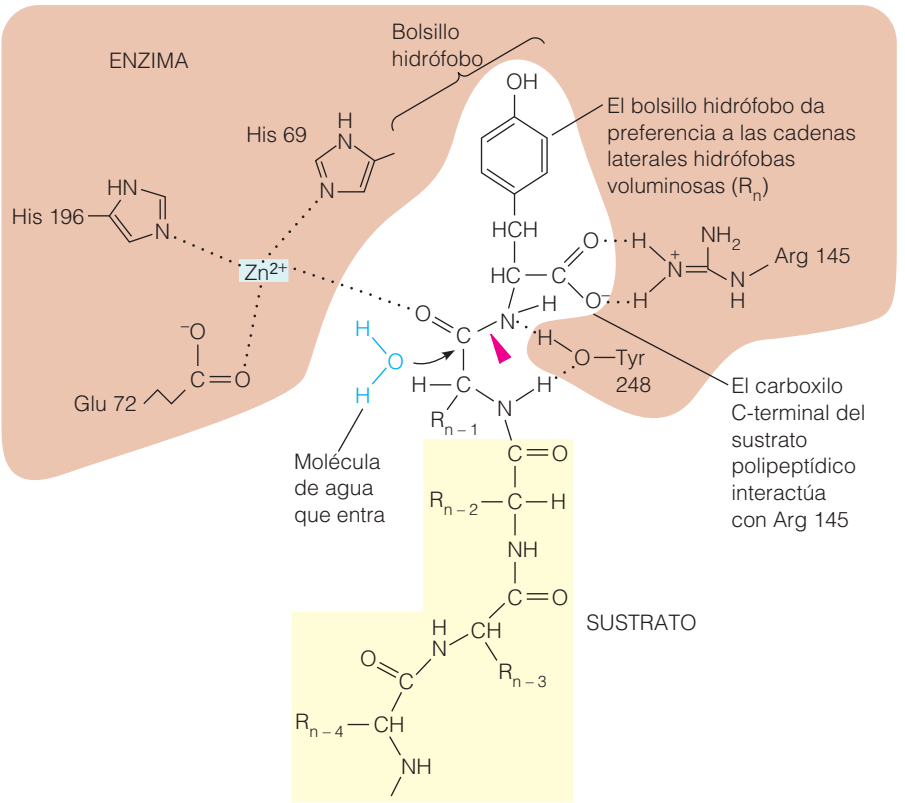


FIGURA **11.27**

Lugar activo de la proteasa carboxipeptidasa A. El átomo de zinc actúa como catalizador iónico metálico que fomenta la hidrólisis. Actúa así estabilizando la carga negativa sobre el oxígeno en el estado de transición tetraédrico. El enlace que se rompe se indica con la cuña roja.

Algunas enzimas necesitan iones metálicos para su función catalítica.

ción y una oxidación de H_2O_2, el Fe^{2+} se oxida y reduce de manera reversible, y actúa como intercambiador de electrones. Como se ha señalado anteriormente, la catalasa es una enzima muy eficaz ya que su valor de k_{cat}/K_M de 4×10^7 se aproxima al límite teórico. La hemoglobina, que también contiene Fe^{2+}, tiene una actividad catalasa más débil debido a que la oxidación a Fe^{3+} es en gran parte irreversible en un entorno proteico diferente. Esta actividad redox requiere metales como Fe o Cu con varios estados de oxidación.

En otras muchas reacciones enzimáticas son necesarios determinados iones para la eficacia catalítica, a pesar de que puedan no permanecer unidos de manera permanente a la proteína ni desempeñar un papel directo en el proceso catalítico. Así por ejemplo, diversas enzimas que acoplan la hidrólisis del ATP a otros procesos requieren Mg^{2+} para una función eficaz. En la mayoría de los casos, es necesario el Mg^{2+} puesto que el complejo Mg-ATP (véase el Capítulo 3) es un sustrato mejor que el propio ATP.

Diversidad de la función enzimática

CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEICAS

En este punto debe estar claro ya que hay una enorme cantidad de proteínas diferentes que actúan como enzimas. Muchas de estas enzimas recibieron nombres comunes, en especial durante los primeros años de la enzimología. Algunos de los nombres, como *triosa fosfato isomerasa*, son descriptivos de la función de la enzima; otros, como *tripsina*, no lo son. Con objeto de reducir la confusión, la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) ha diseñado un sistema lógico de denominación y numeración. Las enzimas se dividen en seis grandes clases con grupos y subgrupos

que definen sus funciones con mayor precisión. Las principales clases son las siguientes:

1. *Oxidorreductasas* que catalizan reacciones de oxidación-reducción.
2. *Transferasas* que catalizan transferencias de grupos funcionales de una molécula a otra.
3. *Hidrolasas* que catalizan rupturas hidrolíticas.
4. *Liasas* que catalizan eliminaciones de un grupo o adiciones de un grupo a un doble enlace, u otras rupturas que implican un reordenamiento electrónico.
5. *Isomerasas* que catalizan reordenamientos intramoleculares.
6. *Ligasas* que catalizan reacciones en las que se unen dos moléculas.

La Comisión de Enzimas (EC) de la IUBMB ha dado a cada enzima un número con cuatro partes, como EC 3.4.21.5. Los tres primeros números definen la clase principal, la subclase y la sub-subclase, respectivamente. El último es un número de serie dentro de la sub-subclase, que indica el orden en el que cada enzima se ha añadido a la lista, y que va creciendo continuamente. En el libro *Enzyme Nomenclature* (Academic Press, 1992) se da una lista de casi todas las enzimas actualmente identificadas, junto con información sobre cada una de ellas y referencias bibliográficas. Las 3196 entradas de esta edición no incluyen ciertamente todas las enzimas ya que se continúan descubriendo otras nuevas. De hecho, se ha calculado que una célula típica contiene muchos miles de enzimas diferentes. En la Tabla 11.7 se da una lista con un ejemplo de enzima y reacción para cada una de las clases principales. Consideraremos una por una estas reacciones en apartados posteriores de este libro. El punto principal que queremos resaltar aquí es la enorme diversidad de funciones enzimáticas y cómo se ha racionalizado su nomenclatura.

INGENIERÍA MOLECULAR DE ENZIMAS NUEVAS Y MODIFICADAS

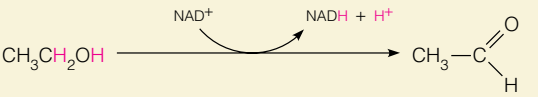
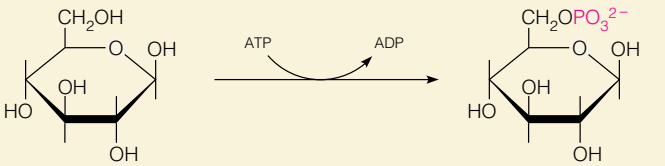
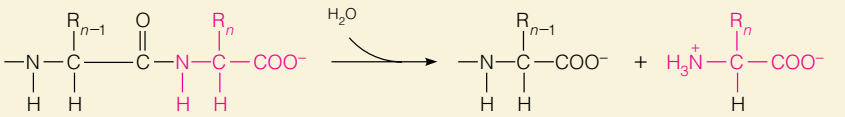
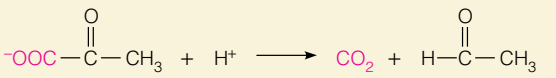
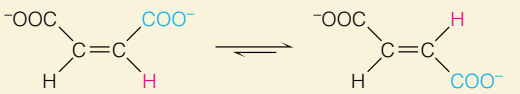
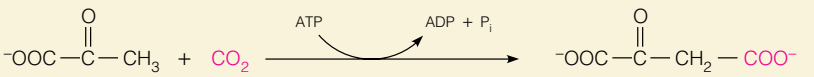
A pesar de la variedad de funciones enzimáticas existentes en la naturaleza, la biotecnología moderna se enfrenta continuamente con la necesidad de sustancias con nuevas capacidades catalíticas o enzimas que actúen con especificidades diferentes o en condiciones poco habituales. Estas necesidades han generado un campo, que está todavía en su inicio, de diseño e ingeniería enzimáticas. Se están realizando diversas estrategias en este campo, que tiene un enorme potencial en la industria y la medicina.

Pueden crearse enzimas nuevas o radicalmente modificadas mediante la mutagénesis dirigida a un lugar, la hibridación proteica o la formación de anticuerpos catalíticos.

Mutagénesis dirigida a un lugar

En la actualidad es posible clonar los genes de muchas enzimas utilizando los métodos descritos en Herramientas de la Bioquímica 25E, para realizar mutaciones específicas en puntos concretos. El método ha resultado extraordinariamente útil para el estudio de los mecanismos enzimáticos, como lo demuestra el estudio de la triosa fosfato isomerasa (véanse las páginas 414-415). Pero se está utilizando también para cambiar las especificidades enzimáticas. Un estudio de la proteasa *subtilisina* realizado por James Wells y colaboradores (véase Oxender y Fox 1987 en la Bibliografía) se ha centrado en las mutaciones en un lugar específico (residuo 166) del bolsillo de especificidad. Este lugar está ocupado normalmente por Gly, y la enzima rompe preferentemente las cadenas polipeptídicas cercanas a un residuo hidrófobo voluminoso. La actividad respecto a los polipéptidos que contienen ácido glutámico en la misma posición es muy baja. La sustitución de Gly 166 por Lys aumenta la frecuencia de corte cerca del ácido glutámico en 500 veces. Aunque algunos intentos de ingeniería proteica con fines industriales se han dirigido a la fabricación de enzimas para reaccio-

TABLA 11.7 Ejemplos de cada una de las principales clases de enzimas

Clase	Ejemplo (tipo de reacción)	Reacción catalizada
1. Oxidorreductasas	Alcohol deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) (oxidación con NAD^+)	 Etanol — Acetaldehído
2. Transferasas	Hexoquinasa (EC 2.7.1.2) (fosforilación)	 D-Glucosa — D-Glucosa-6-fosfato
3. Hidrolasas	Carboxipeptidasa A (EC 3.4.17.1) (ruptura de enlace peptídico)	 C-terminal del polipéptido — Polipéptido acortado — Residuo C-terminal
4. Liasas	Piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1) (descarboxilación)	 Piruvato — Acetaldehído
5. Isomerasas	Maleato isomerasa (EC 5.2.1.1) (isomerización *cis–trans*)	 Maleato — Fumarato
6. Ligasas	Piruvato carboxilasa (EC 6.4.1.1) (carboxilación)	 Piruvato — Oxalacetato

nes nuevas, la mayoría se han centrado en la aparición de tolerancia a las condiciones ambientales extremas (calor, acidez, salinidad) características de las operaciones industriales o agrarias especializadas. Sin embargo, hasta la fecha, la naturaleza (evolución) parece haber sido un mejor diseñador que los seres humanos, ya que las enzimas más interesantes capaces de tolerar ambientes extremos se han encontrado en las bacterias que habitan manantiales termales, desiertos y cavidades termales submarinas. Actualmente está claro que en la naturaleza existen enzimas capaces de realizar una función eficaz a temperaturas cercanas a los 100°C.

Enzimas híbridas

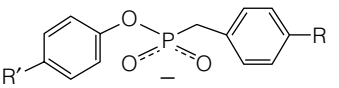
El reordenamiento de los genes que puede realizarse con las técnicas modernas nos permite producir **proteínas de fusión**, proteínas codificadas por genes que se han fusionado juntos in vitro a partir de dos o más orígenes. Esta fusión hace posible recombinar los lugares de unión y los lugares catalíticos de formas novedosas. Para poner un ejemplo, considere el problema de digerir los β-glucanos de los cereales, tal como se encuentran en la cebada. Estos polisacáridos tienen enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ y $\beta(1\rightarrow3)$ entre los residuos de glucosa. En la fabricación de cerveza se emplean una glucanasa y una celulasa microbiana, pero esta últi-

ma, con frecuencia, es ineficaz en las condiciones industriales, produciendo productos viscosos que interfieren con la fabricación de la cerveza. Ha sido posible construir una enzima híbrida con la capacidad de romper ambos tipos de enlaces y, de esta forma, digerir los glucanos a glucosa en un paso.

Otro tipo de enzima híbrida es la que se muestra en la Figura 11.28. En este caso, un oligonucleótido sintético de secuencia definida se ha injertado en la enzima *nucleasa estafilocócica* mediante un enlace disulfuro. La nucleasa estafilocócica es eficaz en el corte del RNA o del DNA de una sola cadena, pero normalmente lo hace con una especificidad muy baja. Sin embargo, cuando se ha unido a un oligonucleótido, éste se une a una secuencia complementaria específica de un ácido nucleico de cadena única, y la enzima corta junto a esa secuencia. De este modo, puede diseñarse una especificidad elevada en una enzima normalmente inespecífica.

Anticuerpos catalíticos

Recuérdese del Capítulo 7, que los anticuerpos presentan una especificidad notablemente elevada en cuanto a la unión a sus antígenos. Las enzimas se unen de la manera más fuerte al estado de transición de una reacción. ¿Qué sucede si fabricamos anticuerpos contra moléculas que son estructuralmente análogas a los estados de transición de determinados sustratos? La respuesta es que estos anticuerpos actúan como enzimas de forma que actualmente se les llama **abzimas**. Supongamos, por ejemplo, que deseamos fabricar un anticuerpo que actúe como catalizador de la hidrólisis de ésteres. De la misma manera que en la hidrólisis de las amidas, es necesario un estado de transición tetraédrico (véase la página 417) en la hidrólisis del éster. Un tipo de molécula que simula una estructura de este tipo es la que se muestra a continuación:



Con el empleo de diversos tipos de moléculas como antígenos, ha sido posible producir abzimas que catalizan varias de las reacciones que se muestran en la Tabla 11.7. En algunos casos, se han obtenido velocidades de reacción de hasta 10^7 veces la velocidad de reacción sin catalizar.

Durante muchos años, la principal dificultad para producir anticuerpos catalíticos dirigidos hacia compuestos específicos o grupos funcionales, era la necesidad de utilizar el sistema inmunitario de algún animal para realizar la selección. Sin embargo, recientemente se han creado sistemas de selección que evitan este requerimiento. La idea básica es que se clonan fragmentos Fab reagrupados al azar (véase el Capítulo 7) y la mezcla se somete a una selección de acuerdo con la afinidad química con la molécula o estructura deseada. Estas técnicas han permitido producir abzimas dirigidas hacia moléculas sustrato sin-

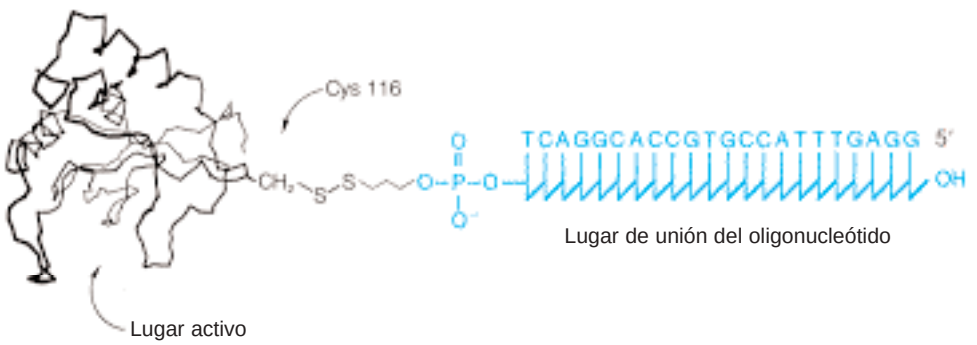


FIGURA **11.28**

Una enzima híbrida. La enzima nucleasa estafilocócica (en negro) se ha unido mediante un puente disulfuro de la cisteína 116 con un oligonucleótido de secuencia definida (azul). El oligonucleótido forma pares de bases con secuencias complementarias de polinucleótidos de una sola cadena, proporcionando la especificidad de lugar de la nucleasa.

P. G. Schultz, *Science* (1988) 240:425-432. © 1988 AAAS.

téticas que serían muy difíciles de presentar como antígenos a un sistema in vivo debido a los efectos tóxicos.

Los anticuerpos catalíticos están haciéndose de una importancia considerable en la química orgánica sintética. Un problema importante en la síntesis in vitro de moléculas orgánicas complejas es la consecución de la estereoquímica correcta. La estereoespecificidad notable que exhiben las enzimas (incluyendo las abzimas) ha ayudado enormemente en este tipo de síntesis. En este punto, parece ser que los bioquímicos sólo han empezado a explorar las posibilidades de la ingeniería de las enzimas con fines específicos.

Biocatalizadores no proteicos: ribozimas

Las ribozimas, una clase de ácidos ribonucleicos, funcionan como catalizadores biológicos.

A lo largo de este capítulo hemos descrito la forma en la que las proteínas denominadas enzimas actúan como biocatalizadores. Hasta hace poco, se suponía que *toda* la catálisis bioquímica la realizaban las proteínas; pero la bioquímica está llena de sorpresas, y la investigación ha revelado algo totalmente inesperado: algunas moléculas de RNA pueden actuar como enzimas. A estas moléculas se las denomina **ribozimas**.

El primer indicio de este fenómeno se obtuvo en los estudios de la **ribonucleasa P**, una enzima que fragmenta los precursores de los tRNA para producir los tRNA funcionales (Figura 11.29). Se sabía desde hacía tiempo que la ribonucleasa P activa contenía una porción proteica y un "cofactor" de RNA, pero se consideraba de manera general que el lugar activo se encontraba en la porción proteica. Sin embargo, estudios cuidadosos realizados por Sidney Altman y sus colaboradores en 1983 sobre los componentes aislados revelaron un hecho sorprendente: mientras que el componente proteico sólo era totalmente inactivo, el RNA por sí mismo, si se le proporcionaba una concentración suficientemente elevada de magnesio o una cantidad baja de magnesio y la molécula básica pequeña espermina, era capaz de catalizar la fragmentación específica de los pre-

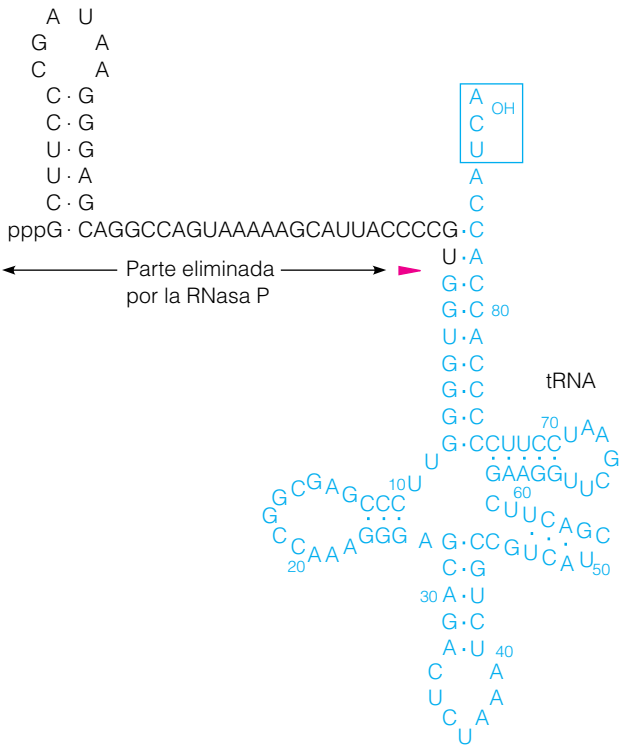


FIGURA **11.29**

Ruptura de un pre-tRNA característico por la ribonucleasa P. La producción de tRNA a partir de pre-tRNA la cataliza un complejo RNA-proteína denominado ribonucleasa P. La parte eliminada del tRNA se indica con color negro, y el tRNA resultante con color azul. La parte de RNA de la ribonucleasa P puede catalizar por sí misma la hidrólisis del enlace fosfodiéster específico indicado con la cuña roja.

tRNA. Además, el RNA actuaba como una verdadera enzima, sin modificarse en el proceso y obedeciendo la cinética de Michaelis-Menten. La adición de la porción proteica de la ribonucleasa P aumenta ciertamente la actividad (k_{cat} se incrementa de manera notable) pero no es en modo alguno esencial para la unión del sustrato ni para la fragmentación. A concentraciones salinas elevadas el propio RNA pasa a ser un catalizador muy eficaz; K_M se hace muy baja y k_{cat}/K_M se aproxima a 10^7 $(mol/L)^{-1}s^{-1}$.

Aproximadamente al mismo tiempo, Thomas Cech y sus colaboradores descubrieron otra clase notable de reacciones del RNA. Examinando la eliminación de un intrón (secuencia de interposición, o IVS) de los RNA prerribosómicos del protista *Tetrahymena*, encontraron que el *propio* rRNA llevaba a cabo la escisión de su intrón de 413 nucleótidos, así como el reempalme necesario (Figura 11.30a). Además, el IVS escindido pasaba por una nueva serie de reacciones con especificidad de lugar. El producto final es una molécula denominada L-19 IVS, la secuencia de interposición con 19 nucleótidos más eliminados. Esta actividad no se considera una verdadera catálisis, puesto que el "catalizador" en sí se modifica en la reacción. Sin embargo, el L-19 IVS tiene capacidades catalíticas reales: es capaz de alargar o acortar pequeños oligonucleótidos, de la forma que se indica en la Figura 11.30b. Este ejemplo no es, en modo alguno, único y, en el Capítulo 28, consideraremos otras reacciones catalizadas por el RNA.

Aunque muchos bioquímicos quedaron sorprendidos por estos descubrimientos, observados retrospectivamente podemos ver que no hay motivo alguno por el que las moléculas de RNA no puedan tener funciones catalíticas. Como vimos en el Capítulo 4, las moléculas de RNA pueden adoptar estructuras terciarias complejas, igual que hacen las proteínas y éste es el tipo de estructura que parece ser esencial para la actividad enzimática.

El hecho de que las moléculas de RNA posean capacidad de autorreplicacion y catálisis ha llevado a algunos científicos a sugerir que estas moléculas pueden haber sido las sustancias primordiales en la evolución de la vida. Estos teóricos piensan en un "mundo de RNA" antes de que evolucionaran las proteínas y el DNA, en el que sólo existirían moléculas de RNA capaces de autorreplicarse y capaces de catalizar un metabolismo sencillo. El soporte de la idea de que las ribozimas pudieran ser auto-replicativas procede de experimentos notables. Wright y Joyce (véase la Bibliografía) han demostrado que la ribozima representada en la Figura 11.31 es capaz de una replicación auto-catalizada (con una pequeña ayuda de algunas enzimas proteicas). La estructura marcada RNA es capaz de catalizar la unión de otro segmento de RNA (en este caso, portador de un promotor del bacteriófago T7) a sí mismo. En presencia de las enzimas transcriptasa inversa y RNA polimerasa (véase el Capítulo 26), se genera una nueva copia de RNA. Si ésta se "alimenta" con el fragmento promotor de T7, se produce la unión y se forma una nueva copia de la ribozima. En un experimento de este tipo, el sistema produjo 1000 duplicaciones en un período de 2 días. Durante este tiempo, la secuencia evolucionó hacia una ribozima más eficaz. Aunque hasta la fecha, ningún experimento ha funcionado completamente sin proteínas, estos estudios proporcionan un soporte al modelo del "mundo de RNA" para el origen de la vida.

Regulación de la actividad enzimática: enzimas alostéricas

La analogía entre una célula viva y una fábrica (véase el Capítulo 1) es especialmente adecuada cuando consideramos las funciones que desempeñan las enzimas. Observamos que una célula dispone de determinadas materias primas y

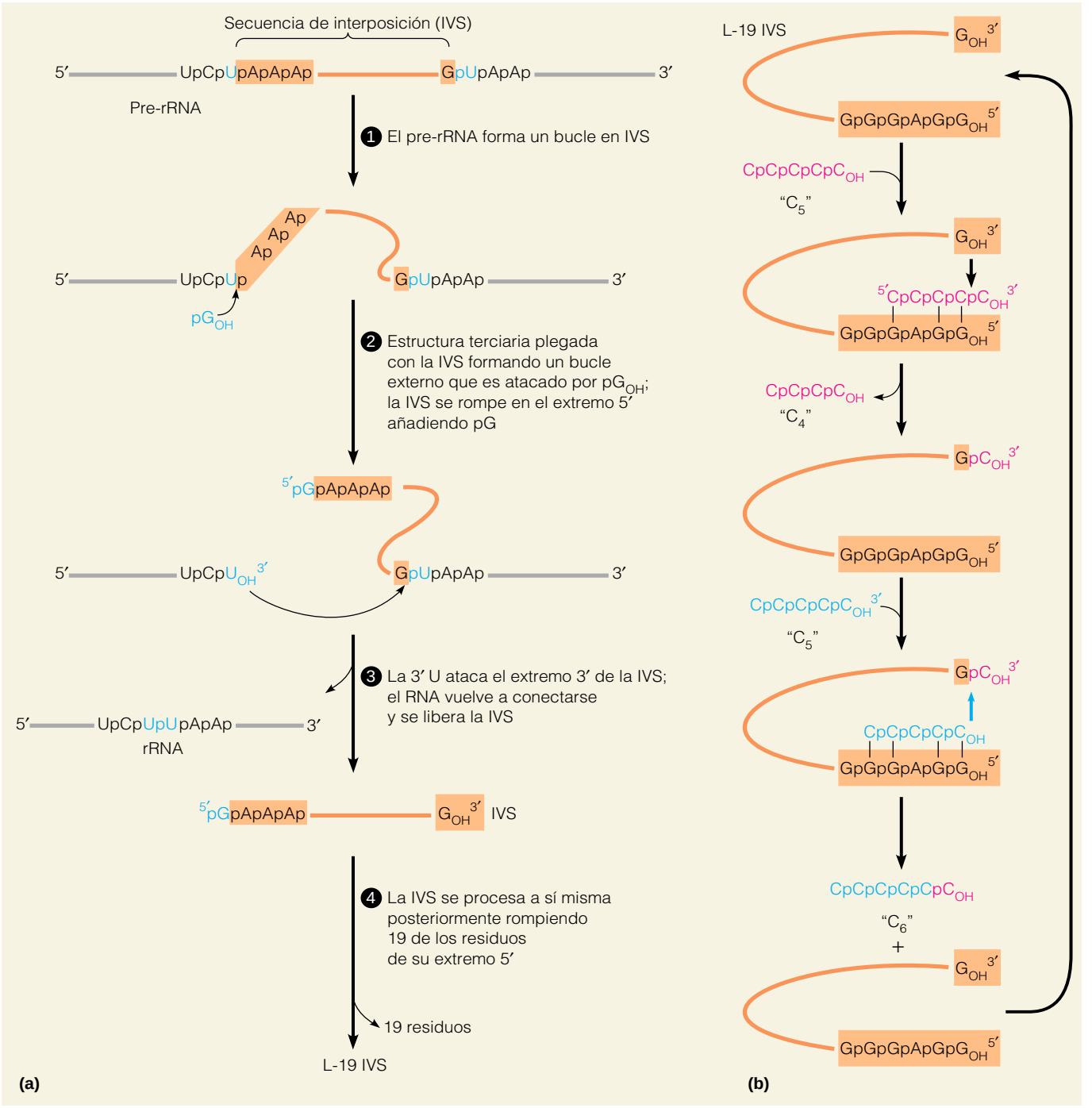
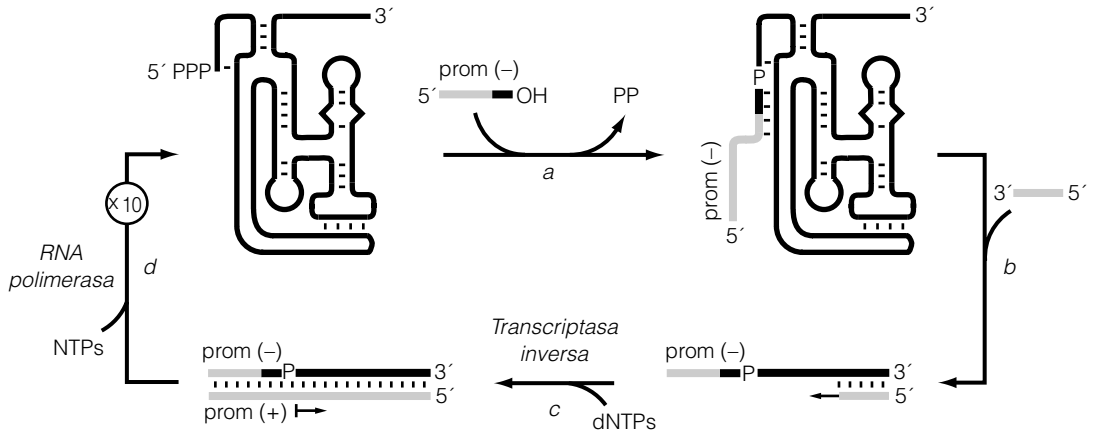


FIGURA **11.30**

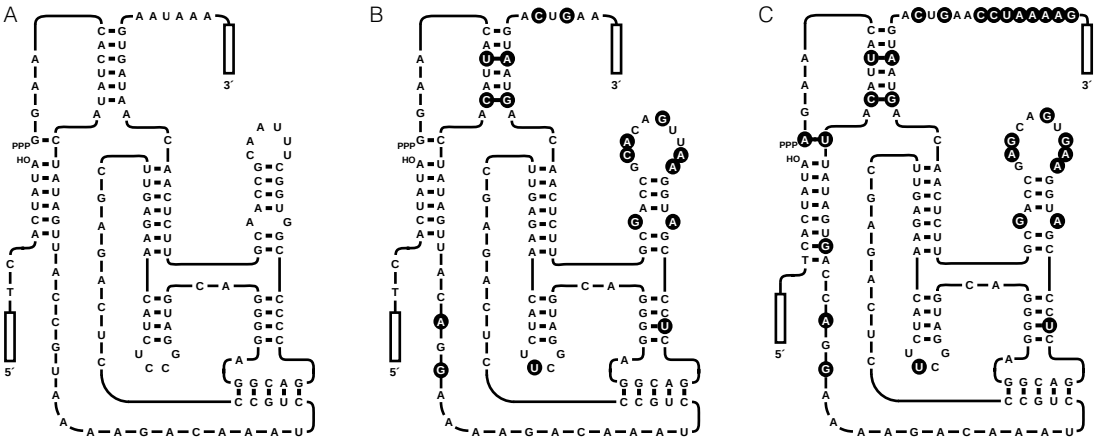
Catálisis mediante la secuencia de interposición en el RNA prerribosómico de *Tetrahymena*. **(a)** Autocortado y empalmado de la secuencia interpuesta (IVS). Obsérvese que se añade una pG$_{OH}$ en la reacción. Una serie de pasos posteriores reducen la IVS a L-19 IVS. **(b)** Conversión de 2C$_5$ en C$_4$ + C$_6$ por la L-19 IVS. Este oligonucleótido puede por sí mismo acortar o alargar pequeños oligonucleótidos, actuando aquí como una verdadera ribozima catalizadora.

debe producir a partir de ellas unos productos específicos. Las máquinas que facilitan estas transformaciones de la célula son las enzimas. Como veremos, las enzimas suelen estar dispuestas en “lineas de ensamblaje” para llevar a cabo los pasos secuenciales necesarios en una ruta metabólica.

Ninguna fábrica opera de manera eficaz si cada máquina está funcionando con su velocidad máxima. Las capacidades de las máquinas son muy diversas y si todas ellas funcionaran a la velocidad máxima, pronto se producirían problemas masivos. Los productos intermediarios se acumularían en algunas líneas de montaje, y algunas partes del producto terminado se producirían de manera muy excesiva. Diferentes líneas de montaje podrían utilizar la misma mate-



(a)



(b)

FIGURA **11.31**

Auto-replicación y mutación de una ribozima. **(a)** Ciclo de replicación de la ribozima, que implica una replicación repetida de la ribozima, cuando se "alimenta" con una secuencia promotora de T7 y ribonucleótidos trifosfato. También se necesitan transcriptasa inversa y RNA polimerasa. **(b)** Mutaciones que surgen durante la evolución de la ribozima. Los rectángulos abiertos indican la porción 5′ del sustrato y el lugar de unión del cebador en el extremo 3′ de la ribozima (5′-CCAAUCGCAGGCUCAGC-3′), ambos inmutables durante la evolución. Los residuos realzados son los que mutaron con relación a la ribozima de partida. **(A)** Ribozima prototipo utilizada para construir el conjunto inicial. **(B)** Una ribozima individual aislada antes de comenzar la evolución continua. **(C)** Una ribozima individual aislada tras 52 horas de evolución continua.

Cortesía de G. F. Joyce de M. C. Wright y G. F. Joyce, *Science* (1997) 276:614-616. © 1997 AAAS, con permiso de *Science*.

ria prima, y las más rápidas podrían agotar los suministros de forma tan completa que otras líneas igualmente importantes quedarían anuladas. Evidentemente, es necesaria una *coordinación* y *regulación* para hacer que una fábrica grande funcione de manera eficaz.

Los mismos tipos de problemas podrían producirse si la maquinaria enzimática de la célula no estuviera regulada de manera precisa. La eficacia con la que las enzimas individuales actúan ha de controlarse de una forma que refleje la disponibilidad de los sustratos, la utilización de los productos y las necesidades generales de la célula. Veremos, pues, en los capítulos siguientes, muchos ejemplos de regulación.

CONTROL A NIVEL DE SUSTRATO

Parte de la regulación enzimática se produce de una forma sencilla, mediante la interacción directa de los sustratos y los productos de cada reacción catalizada por una enzima con la propia enzima. A esto se le denomina **control a nivel del sustrato.** Como ha demostrado nuestro análisis de la cinética, cuanto mayor es la concentración de un sustrato, más rápidamente se produce una reacción, al menos hasta que se llega a la saturación de la enzima. Y a la inversa, las concentraciones elevadas de producto, que pueden unirse también a la enzima, tienden

La regulación de la actividad enzimática es esencial para el flujo ordenado del metabolismo.

a inhibir la conversión del sustrato en producto. Por lo que respecta a la reacción metabólica que se desea, el producto puede actuar como un inhibidor competitivo. Como ejemplo, consideremos el primer paso de la glucólisis (véase el Capítulo 13): la fosforilación de la glucosa para producir glucosa-6-fosfato:

$$\text{Glucosa} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexoquinasa}} \text{glucosa-6-fosfato} + \text{ADP}$$

La enzima hexoquinasa, que cataliza esta reacción, se inhibe por su producto, la glucosa-6-fosfato. Si la glucólisis se bloquea por cualquier razón, se acumulará glucosa-6-fosfato. Esta acumulación inhibirá la hexoquinasa y hará que la nueva entrada de glucosa en la ruta sea más lenta.

Sin embargo, el control a nivel del sustrato no es suficiente para la regulación de muchas rutas metabólicas. En muchos casos, es esencial disponer de una enzima regulada por alguna sustancia bastante diferente del sustrato o del producto inmediato, lo cual requiere unos mecanismos bastante diferentes, como veremos a continuación.

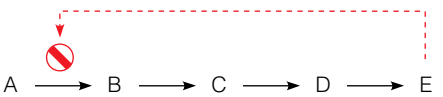
CONTROL POR RETROACCIÓN

Hemos resaltado que la mayoría de las rutas metabólicas se parecen a líneas de montaje. La línea de montaje metabólica más sencilla tiene el siguiente aspecto:

$$A \xrightarrow{\text{Enzima 1}} B \xrightarrow{\text{Enzima 2}} C \xrightarrow{\text{Enzima 3}} D \xrightarrow{\text{Enzima 4}} E$$

en donde A es el reactante inicial o materia prima; B, C y D son productos intermediarios; y E es el producto final.

El producto final de esta ruta se utilizará probablemente en alguna otra ruta. De igual modo, la "materia prima" puede participar también en algún otro conjunto de procesos. Supongamos que la utilización de E disminuye bruscamente. Si todo lo demás se mantuviera como antes, E se acumularía y el consumo de A continuaría. Pero este proceso es ineficaz. Una línea de montaje automatizada moderna resolvería el problema manteniendo un inventario de E y, cuando esta sustancia se acumulara, enviaría una señal hacia atrás para que la línea actuara con mayor lentitud. La célula puede controlar la generación del producto final mediante la activación ( ) o la inhibición ( ) de un paso de la ruta. Lo más eficaz sería lentificar el *primer paso*, la conversión de A en B. Así pues, la "máquina" A ⟶ B debe regularse por la cantidad de E.

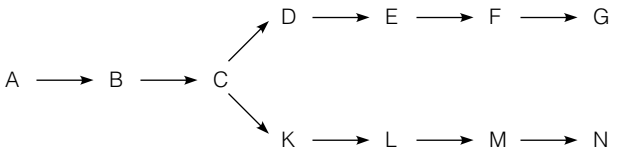


El control por retroacción es importante para la regulación eficaz de las rutas metabólicas complejas.

Este proceso se denomina **control por retroacción** o, más exactamente, **control por retroacción negativa**, puesto que un *aumento* de la concentración de E conduce a un *descenso* de su velocidad de producción. Obsérvese que al inhibir el primer paso, impedimos la utilización no deseada de A y la acumulación de E. Además, dado que la mayoría de los procesos bioquímicos son reversibles en cierto grado, la generación de una gran cantidad de E tenderá a aumentar la concentración de los productos intermediarios. El mecanismo de control por retroacción que se ha indicado arriba evitará la acumulación de cualquiera de los intermediarios, que podrían tener efectos indeseables sobre el metabolismo.

Otras situaciones metabólicas requieren patrones más complicados, en los que puede ser útil la **activación**, al igual que la inhibición. Así por ejemplo, consideremos un caso ligeramente más complejo, en el que A se utiliza para ali-

mentar dos rutas que conducen a dos productos necesarios en cantidades aproximadamente equivalentes. El esquema que se produce entonces es como el siguiente:



Para controlar las rutas de manera que G y N se mantengan en equilibrio, las concentraciones elevadas de G podrían *inhibir* la enzima C ⟶ D y/o *activar* la enzima C ⟶ K. Y a la inversa, N podría inhibir la enzima C ⟶ K y/o activar la enzima C ⟶ D. Finalmente, podría ser útil hacer que tanto G como N inhibieran la enzima A ⟶ B, para establecer una regulación global. Un ejemplo de este tipo de control se encuentra en la síntesis de los monómeros de purina y pirimidina que intervienen en la formación del DNA, puesto que son necesarias cantidades aproximadamente iguales de los cuatro desoxirribonucleótidos para la replicación del DNA.

Es importante señalar que tanto la inhibición como la activación de las enzimas son esenciales para el metabolismo regulado. Además, el control de las rutas mediante sus productos finales hace que las inhibiciones y las activaciones necesarias *deban* producirse por moléculas que proceden de un lugar alejado de la línea de montaje, y que, por tanto, no se parecen a los sustratos ni a los productos directos de las enzimas a regular. Ninguno de los tipos de regulación que hemos considerado hasta este momento satisfará estas necesidades. Para conseguir este tipo de control, en los organismos ha evolucionado una clase especial de enzimas capaces de realizar una **regulación alostérica**. El término *alostérico* procede de las palabras griegas que significan "otra estructura", resaltando que las estructuras de los reguladores no tienen que parecerse al sustrato o al producto directo.

ENZIMAS ALOSTÉRICAS

Las enzimas alostéricas son invariablemente proteínas con múltiples subunidades, con múltiples lugares activos. Presentan cooperatividad de unión del sustrato (**homoalosterismo**) y una regulación de su actividad por otras moléculas efectoras (**heteroalosterismo**).

Hemos estudiado ya un ejemplo de control alostérico de la función proteica. La hemoglobina (véase el Capítulo 7) es una proteína con cuatro subunidades que tiene cuatro lugares de unión para su "sustrato", el oxígeno. La unión del oxígeno es cooperativa y está influida por otras moléculas e iones. Las ideas básicas que se presentaron en el análisis de la función de la hemoglobina son igualmente aplicables a las enzimas alostéricas.

Homoalosterismo

Consideremos en primer lugar los efectos homoalostéricos (unión cooperativa del sustrato). En el Capítulo 7 comparamos la unión del O_2 por la proteína mioglobina de una única subunidad, con la unión por la hemoglobina de múltiples subunidades. La mioglobina daba una curva de unión hiperbólica (Figura 7.6); la hemoglobina, con su unión cooperativa, daba una curva sigmoidea (Figura 7.19). Encontramos *exactamente el mismo contraste* al comparar la curva de V frente a [S] de una enzima con un solo lugar que obedece la cinética de Michaelis-Menten, con la de una enzima con múltiples lugares que muestra una unión cooperativa (Figura 11.32a). Puede aplicarse el mismo tipo de razona-

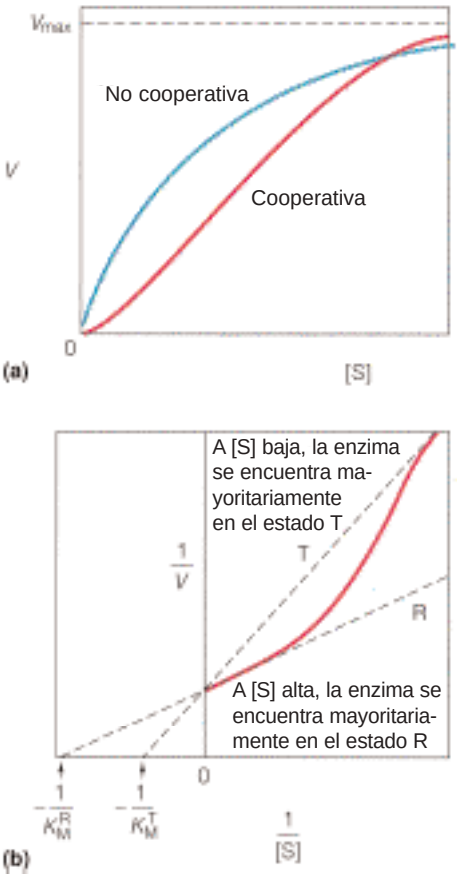


FIGURA **11.32**

Efecto de la unión cooperativa del sustrato sobre la cinética enzimática. **(a)** Comparación de las curvas de V frente a [S] para una enzima no cooperativa y una enzima alostérica con unión cooperativa. Se supone que las dos enzimas tienen la misma $V_{máx}$. Compárese esta representación con las curvas de unión del oxígeno a la mioglobina y la hemoglobina que se presentan en la Figura 7.8 (página 245). **(b)** Representación de Lineweaver-Burk correspondiente a la curva de unión cooperativa que se muestra en (a). El estado T tiene un valor elevado de K_M (une S débilmente). A medida que se une más S, el equilibrio T ⟶ R se desplaza hacia R, con una unión más fuerte y una K_M menor.

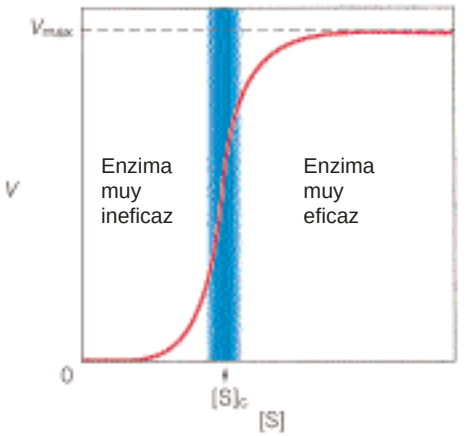


FIGURA **11.33**

Efecto del homoalosterismo extremo. Se muestra la curva de *V* frente a [S] para una enzima hipotética con una cooperatividad *muy* elevada para la unión del sustrato. A concentraciones por debajo de $[S]_c$, la enzima es casi inactiva, y por encima de esta concentración, es muy activa. El sustrato puede acumularse con facilidad hasta la concentración $[S]_c$, pero a concentraciones superiores será procesado con gran rapidez.

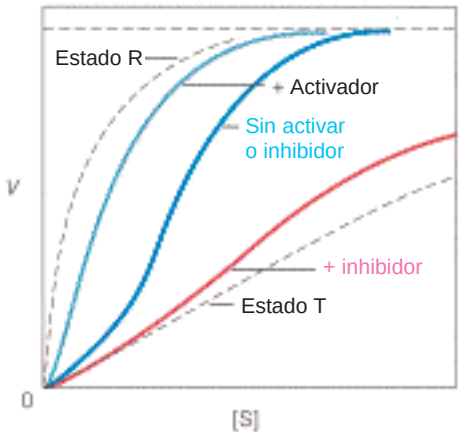


FIGURA **11.34**

Control heteroalostérico de una enzima. En ausencia de activación o de inhibidores, la curva de *V* frente a [S] es sigmoidea. Los activadores desplazan el sistema hacia el estado R y los inhibidores estabilizan el estado T.

Las enzimas alostéricas muestran una unión cooperativa del sustrato y pueden responder a diversos inhibidores y activadores.

miento: una enzima que une el sustrato de manera cooperativa se comportará, a concentraciones de sustrato bajas, como si uniera mal el sustrato (es decir, como si tuviera una K_M elevada). Pero cuando aumentan las concentraciones de sustrato y hay una mayor cantidad del mismo unida, la enzima pasa a ser cada vez más eficaz puesto que une al sustrato con mayor avidez en los últimos lugares a ocupar (véase la Figura 11.32b). Imaginemos que sucede así, como en el caso de la hemoglobina, porque la enzima sufre, al unirse el sustrato, una transición desde un estado de unión débil (estado T) a un estado de unión fuerte (estado R). Los tipos de modelos que se han utilizado para describir la unión del O_2 por la hemoglobina (es decir, el modelo MWC y el modelo KNF; páginas 247-251) pueden explicar igualmente bien la cinética que presentan las enzimas con una unión cooperativa del sustrato.

¿Qué función fisiológica cumple la cinética sigmoidea? En los casos extremos, las enzimas que siguen una cinética sigmoidea pueden regular las concentraciones de los sustratos en valores bastante constantes. Consideremos un sustrato que está siendo suministrado de manera constante por otras reacciones y sobre el que actúa una enzima que presenta la cooperatividad extrema que se muestra en la Figura 11.33. El sustrato puede acumularse con facilidad hasta la concentración crítica $[S]_c$; la enzima es esencialmente inactiva a una [S] inferior. Pero cualquier nuevo incremento da lugar a un notable aumento de la actividad enzimática, de manera que la concentración del sustrato se mantendrá cerca del valor de $[S]_c$. Aunque las enzimas alostéricas reales rara vez o nunca presentan curvas tan sigmoideas como la de la Figura 11.33, el principio continúa siendo válido: las enzimas con múltiples subunidades pueden ser útiles para mantener la homeostasia de un sistema dinámico. Dicho de otro modo, el homoalosterismo permite un control más estricto a nivel del sustrato.

Heteroalosterismo

La principal ventaja del control alostérico se encuentra en los **efectores heteroalostéricos**, que pueden ser inhibidores o activadores. Estos efectores son los análogos, en la cinética enzimática, del CO_2, el BPG y el H^+ que regulan de forma tan elegante la unión del O_2 por la hemoglobina. La activación e inhibición de las enzimas por los efectores alostéricos son la clave del complejo tipo de control por retroacción que se describe en las páginas 446-447. Si una molécula de enzima puede existir en dos estados conformacionales (T y R), que difieren notablemente en la fuerza con la que se une el sustrato o en la velocidad catalítica, su cinética puede controlarse por *cualquier* otra sustancia que, al fijarse a la proteína, desplace el equilibrio T $\rightleftharpoons$ R. Los *inhibidores* alostéricos desplazan el equilibrio hacia T, y los *activadores* lo desplazan hacia R (Figura 11.34). Algunas enzimas se regulan por inhibidores y activadores múltiples, lo cual permite unos patrones de control metabólico extremadamente sutiles y complejos.

ASPARTATO CARBAMOILTRANSFERASA: UN EJEMPLO DE ENZIMA ALOSTÉRICA

Un excelente ejemplo de regulación alostérica es el que proporciona la **aspartato carbamoiltransferasa** (también denominada aspartato transcarbamoilasa, o ATCasa), una enzima clave en la síntesis de las pirimidinas. Como puede apreciarse en la Figura 11.35, la ATCasa se encuentra en un cruce de rutas de biosíntesis. La glutamina, el glutamato y el aspartato se utilizan también para la síntesis de proteínas; pero una vez que el aspartato se ha carbamoilado para formar ***N*-carbamoil-L-aspartato** (CAA), la molécula está destinada ya a la síntesis de pirimidinas. Así pues, la enzima que controla este paso debe ser sensible a las necesidades de pirimidinas. En las bacterias como *E. coli*, la actividad de la ATCasa

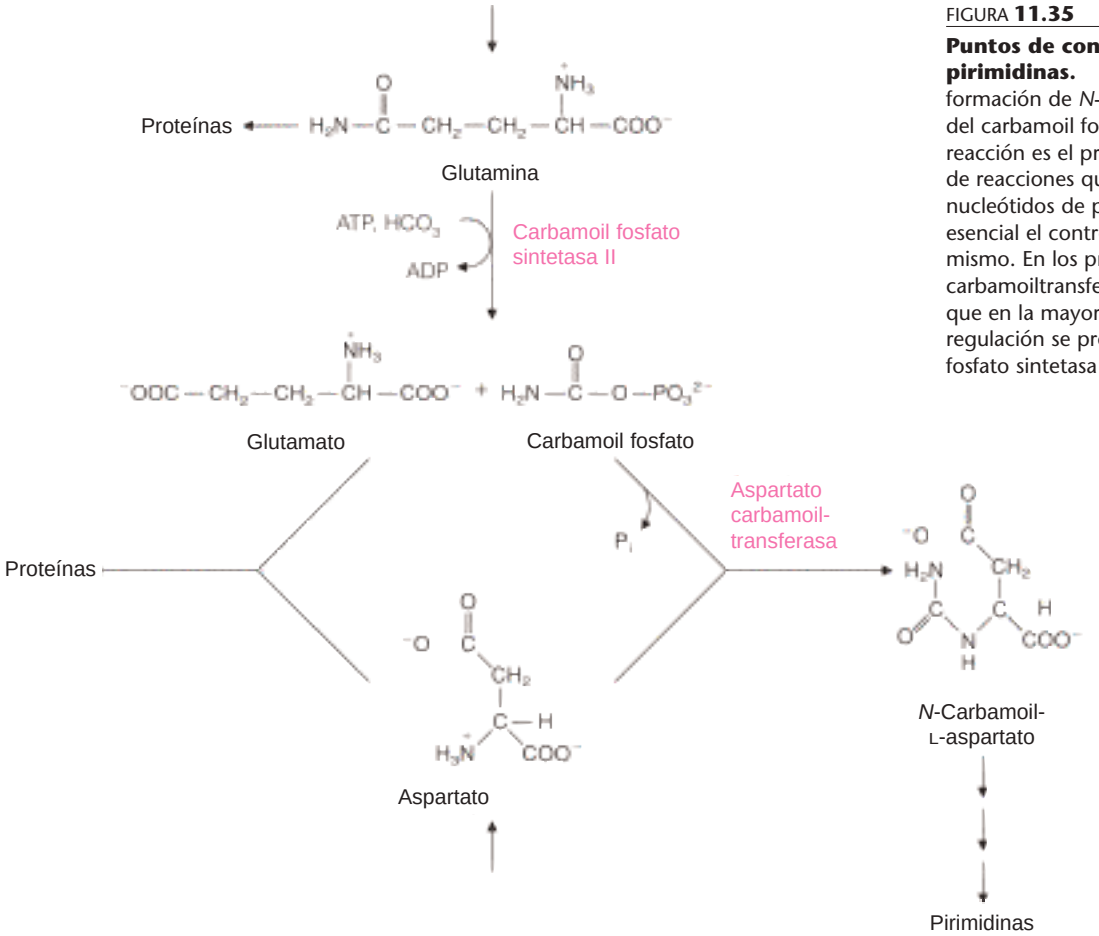


FIGURA **11.35**

Puntos de control en la síntesis de pirimidinas. Esta figura muestra la formación de *N*-carbamoil-L-aspartato a partir del carbamoil fosfato y el aspartato. Esta reacción es el primer paso dirigido en la serie de reacciones que conducen a la síntesis de los nucleótidos de pirimidina, por lo que es esencial el control en este punto o cerca del mismo. En los procariotas, la aspartato carbamoiltransferasa está regulada, mientras que en la mayor parte de los eucariotas, la regulación se produce sobre la carbamoil fosfato sintetasa II.

se regula para responder a esta necesidad. Esta enzima, como se muestra en la Figura 11.36, se inhibe por el citidín trifosfato (CTP) y se activa por el ATP. Ambas respuestas tienen una lógica fisiológica. Cuando las concentraciones de CTP ya son altas, no son necesarias más pirimidinas. En cambio, el ATP elevado señala un estado de abundancia de purinas (que necesitan pirimidinas acompañantes) y un estado celular con abundante energía, en el que la síntesis de DNA y RNA será activa.

La ATCasa es, como cabría prever, una proteína con múltiples subunidades. Su estructura cuaternaria se ha analizado con cierto detalle y se presenta esquemáticamente en la Figura 11.37a. Existen seis subunidades *catalíticas*, en dos grupos de tres, que se mantienen unidas mediante seis subunidades *reguladoras*. Los pares de subunidades reguladoras parecen conectar las subunidades catalíticas de los dos grupos. Se ha obtenido con una resolución elevada la estructura tridimensional de la ATCasa. En la Figura 11.38 se da una representación detallada de una subunidad catalítica y una subunidad reguladora. La subunidad catalítica tiene dos dominios, uno que une aspartato y el otro, carbamoil fosfato, y el lugar activo se encuentra entre ellos. La subunidad reguladora tiene asimismo dos partes; el denominado dominio de zinc y el dominio alostérico. El primero une un átomo de zinc estructuralmente necesario, mientras que el otro contiene el lugar de unión de ATP/CTP. Así, el ATP y el CTP compiten por el mismo lugar, de forma que la actividad de la ATCasa se regula por el *cociente* de ATP respecto a CTP en la célula.

Como ocurre en el caso de la hemoglobina, la regulación alostérica de la ATCasa implica cambios de la estructura cuaternaria de la molécula. Las con-

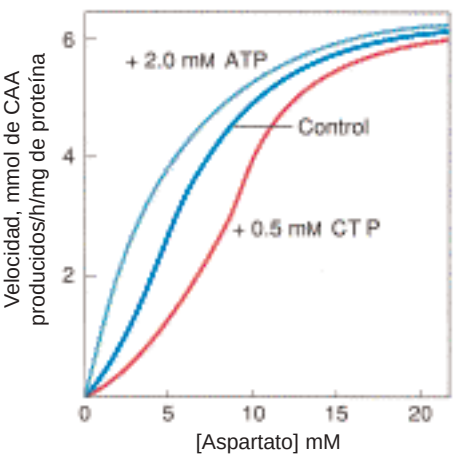
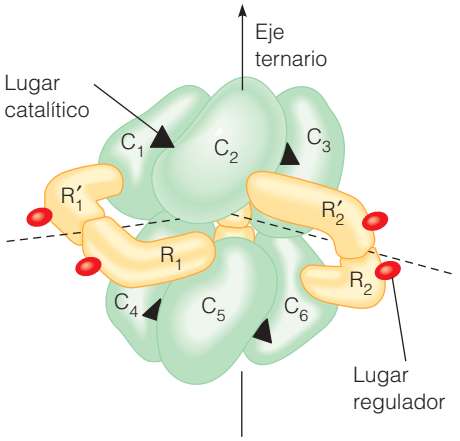
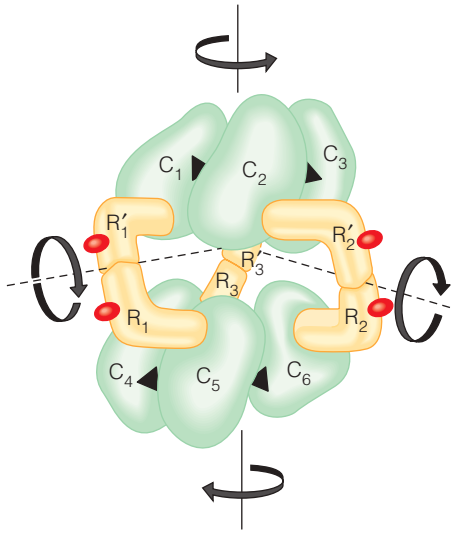


FIGURA **11.36**

Regulación de la aspartato carbamoiltransferasa por el ATP y el CTP. El ATP es un activador de la aspartato carbamoiltransferasa, y el CTP es un inhibidor de la misma. La curva señalada como "control" muestra el comportamiento de la enzima en ausencia de ambos reguladores. El *N*-carbamoil-L-aspartato (CAA) es el producto de la reacción.



(a) ATCasa: estado T



(b) ATCasa: estado R

FIGURA **11.37**

Estructura cuaternaria de la aspartato carbamoiltransferasa (ATCasa). (a) Estructura cuaternaria de la ATCasa en el estado T. Esta imagen esquemática de la enzima muestra las seis subunidades catalíticas (C) y las seis subunidades reguladoras (R). Hay seis lugares catalíticos (triángulos negros) situados en los surcos existentes entre las subunidades catalíticas o cerca de ellos. Los lugares reguladores (elipses rojas) se encuentran en las superficies externas de las subunidades reguladoras. La molécula tiene un eje ternario y tres ejes binarios (simetría D_3). Ésta es una imagen lateral de la molécula con el eje ternario en el plano del papel. **(b)** Transición de la ATCasa al estado R. La transición comporta una rotación de las subunidades reguladoras, que separa los dos grupos de subunidades catalíticas y las gira ligeramente alrededor del eje ternario.

formaciones de los estados R y T se han determinado mediante difracción de rayos X. Como se muestra en la Figura 11.37b, se produce un reordenamiento importante de las posiciones de las subunidades en la transición T ⟶ R.

Prácticamente todas las rutas metabólicas que encontraremos en los capítulos siguientes están sujetas a un control por retroacción complejo, y en la mayor parte de los casos se utilizan enzimas alostéricas de múltiples subunidades. El patrón de control, incluso en una misma ruta, no es el mismo en todos los organismos. Como ejemplo relevante de ello, mientras que la ATCasa es el principal punto de control de la ruta de las pirimidinas en las bacterias, los eucariotas realizan la regulación en el paso anterior, la síntesis de carbamoil fosfato (véase la Figura 11.35). En los mamíferos, la **carbamoil fosfato sintetasa II** se inhibe por el UDP, UTP, CTP, dUDP y UDP-glucosa. Todos estos compuestos inhiben la unión del sustrato ATP. Además, la glicina actúa como inhibidor competitivo de la glutamina.

En este punto debiera estar claro que los organismos son capaces de regular el metabolismo de formas complejas y sutiles mediante las enzimas alostéricas. Pero este tipo de regulación no basta para todas las necesidades. Pasaremos ahora a la modificación covalente, un tipo de mecanismo de regulación completamente distinto.

Modificaciones covalentes utilizadas para regular la actividad enzimática

En la analogía de la fábrica, la regulación alostérica puede considerarse como el control de retroacción en las máquinas de funcionamiento continuo. Pero en cualquier fábrica grande existen también máquinas que sólo se utilizan de vez en cuando, y que se dejan paradas y preparadas hasta el momento en que son necesarias. Lo mismo ocurre en la célula. En este apartado consideraremos las enzimas que están totalmente inactivas hasta que las altera una **modificación covalente** y empiezan entonces a funcionar. En algunos casos, la modificación actúa en la dirección contraria, inactivando enzimas que de lo contrario están activas. Algunas de estas modificaciones pueden revertirse; otras no.

Diversos tipos de modificaciones covalentes se emplean para regular la actividad enzimática. Una de las más extendidas es la fosforilación o desfosforilación de varias cadenas laterales de aminoácidos (por ejemplo, serina, treonina, tirosina e histidina). Sin embargo, estos tipos de regulación son, a menudo, una parte de rutas reguladoras complejas, con frecuencia, bajo control hormonal. Por lo tanto, diferiremos el tratamiento de este mecanismo hasta capítulos posteriores, en los que su significado será más claro. En este momento, nos concentraremos, en su lugar, en otro tipo de modificación covalente más simple, que es la activación de determinadas enzimas por la rotura proteolítica de formas precursoras.

PROTEASAS PANCREÁTICAS: ACTIVACIÓN MEDIANTE RUPTURA

Un tipo completamente distinto de activación enzimática covalente, la **ruptura proteolítica**, puede describirse mediante el ejemplo de las **proteasas pancreáticas**. Pertenecen a este grupo diversas enzimas, por ejemplo, la tripsina, la quimotripsina, la elastasa y la carboxipeptidasa, algunas de las cuales hemos considerado ya. Todas se sintetizan en el páncreas, y se segregan a través del conducto pancreático al duodeno del intestino delgado, en respuesta a una señal hormonal generada cuando el alimento sale del estómago. Sin embargo, no se sintetizan en su forma final activa, puesto que una batería de potentes pro-

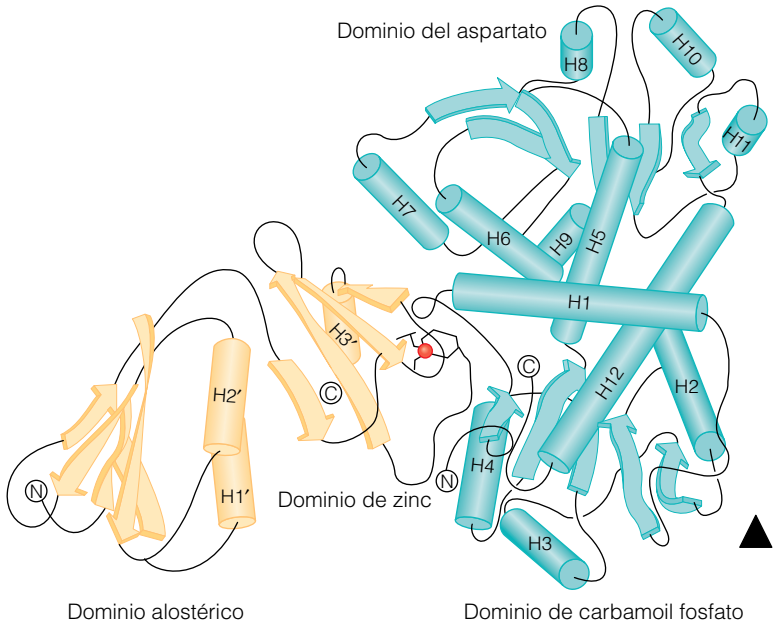


FIGURA **11.38**

Estructura detallada de una subunidad catalítica (verde) y la subunidad reguladora adyacente (amarilla) de la ATCasa. Esta imagen está por debajo del eje ternario, que se encuentra en la parte inferior derecha. La subunidad reguladora se encuentra, en su mayoría, por debajo del plano, y la subunidad catalítica, en su mayoría, por encima.

Tomado de W. N. Lipscomb, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, (1994) 73:67-151. © 1994 Wiley-Liss, Inc. Reproducido con permiso de John Wiley and Sons, Inc.

teasas libres en el páncreas causarían una digestión del tejido pancreático. En su lugar, se elaboran en forma de moléculas ligeramente más grandes, catalíticamente inactivas, denominadas **zimógenos**. Los nombres que se dan a los zimógenos de las enzimas citadas anteriormente son *tripsinógeno*, *quimotripsinógeno*, *proelastasa* y *procarboxipeptidasa*, respectivamente. Los zimógenos deben romperse proteolíticamente en el intestino para producir las enzimas activas. Estas enzimas se degradan tras haber cumplido sus fines, por lo que no ponen en peligro el tejido intestinal, que también está, de alguna manera, protegido por su superficie glucosilada. La ruptura de los zimógenos a enzimas activas se representa esquemáticamente en la Figura 11.39.

Algunas enzimas, como las proteasas pancreáticas, se activan de manera irreversible por la ruptura proteolítica.

El primer paso es la activación de la tripsina en el duodeno. Se elimina un hexapéptido del extremo N-terminal del tripsinógeno por la *enteropeptidasa*, una proteasa secretada por las células duodenales. Esta acción produce la tripsina activa, que a su vez activa los demás zimógenos, mediante rupturas proteolíticas específicas. De hecho, una vez que se encuentra presente algo de tripsina activa, activará otras moléculas de tripsinógeno para formar más tripsina; así pues, su activación es *autocatalítica*. Éste es un ejemplo del tipo de proceso en

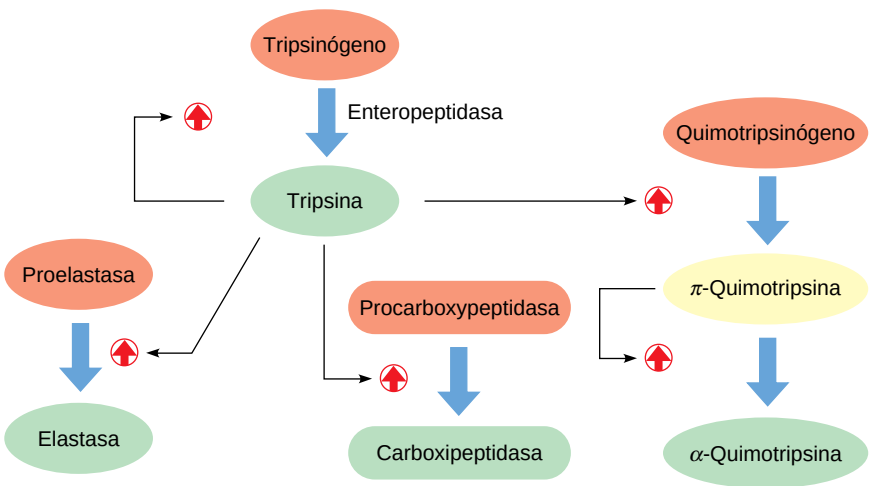


FIGURA **11.39**

Activación de zimógenos mediante ruptura proteolítica. En este esquema se muestra la activación de los zimógenos pancreáticos, que son moléculas que pasan a ser catalíticamente activas cuando sufren la ruptura. Los zimógenos se indican en rojo y las proteasas activas en amarillo o verde. En la Figura 11.40 se muestra la diferencia entre la π-quimotripsina y la α-quimotripsina.

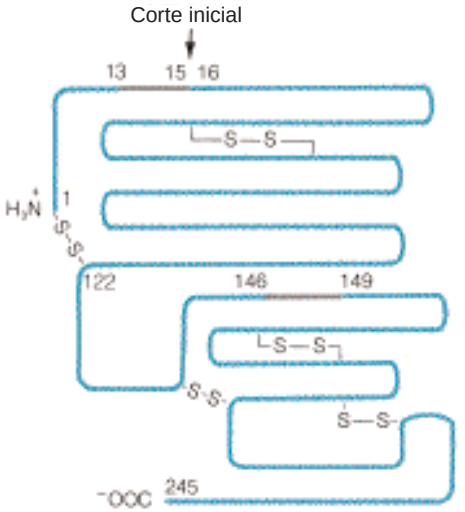


FIGURA **11.40**

Activación del quimotripsinógeno. Esta figura muestra esquemáticamente la molécula de quimotripsinógeno. Una serie de rupturas dan lugar a la enzima quimotripsina, con los enlaces disulfuros que continúan manteniendo la estructura unida. La ruptura inicial entre los aminoácidos 15 y 16 (flecha) da lugar a la formación de π-quimotripsina. La posterior eliminación de los segmentos que se indican en negro produce α-quimotripsina.

cascada que se observa con frecuencia cuando las enzimas se activan mediante modificaciones covalentes. La producción de tan sólo unas pocas moléculas de tripsina conduce rápidamente a muchas más, ya que cada molécula de enzima, al ser activada, puede procesar muchas más cada minuto. Estas moléculas pueden activar a su vez a los demás zimógenos. Un ejemplo muy espectacular de un proceso de este tipo es el que se produce en la coagulación de la sangre, que describiremos en el apartado siguiente.

La activación del quimotripsinógeno a quimotripsina es uno de los ejemplos más complejos y mejor estudiados de la activación proteolítica de una enzima; se ilustra en la Figura 11.40. En el primer paso, la tripsina rompe el enlace entre la arginina 15 y la isoleucina 16. El péptido N-terminal continúa unido al resto de la molécula debido al enlace disulfuro entre los residuos 1 y 122. El producto, denominado π-*quimotripsina*, es una enzima activa.

La forma en que la ruptura de un enlace peptídico transforma una proteína totalmente inactiva en una activa puede comprenderse ahora como resultado de los estudios de difracción de rayos X detallados del zimógeno y la enzima. La ruptura del enlace peptídico entre los residuos 15 y 16 crea un nuevo residuo N-terminal cargado positivamente en Ile 16. Este residuo desplaza su posición y forma un puente salino con Asp 194, que es el adyacente al lugar activo Ser 195 (véase la Figura 11.11). Este cambio desencadena a su vez otros reordenamientos conformacionales en la proximidad del lugar activo. Estos cambios incluyen el modelado correcto del bolsillo del lugar activo y el movimiento de los grupos amino de la cadena principal de los residuos 193 y 195 a un lugar en el que puedan establecer enlaces de hidrógeno con el sustrato oxianión en el estado de transición tetraédrico. Así pues, tanto el bolsillo de unión como el lugar catalítico se forman correctamente sólo después de que se haya roto el enlace peptídico entre Arg 15 e Ile 16.

La quimotripsina no está completamente "terminada" con esta ruptura. Se producen nuevas rupturas autocatalíticas que eliminan de la molécula los residuos 14-15 y 147-148, para producir la α-*quimotripsina* final, que es la forma principal y totalmente activa de la enzima que se encuentra en el tubo digestivo.

Esta batería de enzimas, tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasa, junto con la *pepsina* del estómago y otras proteasas secretadas por las células de la pared intestinal, es capaz de digerir finalmente la mayor parte de las proteínas ingeridas a aminoácidos libres, que pueden absorberse por el epitelio intestinal. Las propias enzimas están sometidas continuamente a una digestión mutua, y autodigestión, de manera que nunca llegan a acumularse concentraciones elevadas de estas enzimas en el intestino.

Incluso los zimógenos inactivos son una posible fuente de peligro para el páncreas. Dado que la activación de la tripsina puede ser autocatalítica, la presencia de una sola molécula activa de tripsina podría poner en marcha toda la cadena de manera prematura. En consecuencia, el páncreas se protege a sí mismo mediante la síntesis de una proteína denominada *inhibidor de la tripsina pancreática secretor* (para distinguirlo del inhibidor de la tripsina pancreática descrito en el Capítulo 6, que es una proteína intracelular que se encuentra únicamente en los rumiantes). Este inhibidor competitivo se une de manera tan intensa al lugar activo de la tripsina que la inactiva de manera eficaz incluso a una concentración muy baja. La unión entre la tripsina y su inhibidor es una de las asociaciones no covalentes más fuertes que se conocen en bioquímica. Tan sólo se encuentra presente una mínima cantidad de inhibidor de la tripsina, muy inferior a la necesaria para inhibir toda la posible tripsina del páncreas. Así pues, sólo se inhibe una fracción de la tripsina generada en el duodeno, y el resto puede activarse. Dado que la protección es limitada, la activación del zimó-

geno puede desencadenarse a veces en el páncreas, por ejemplo, si el conducto pancreático está obstruido. Las enzimas activas inician entonces una digestión del propio tejido pancreático. El trastorno, denominado *pancreatitis aguda*, es extremadamente doloroso y a veces resulta mortal.

UN EXAMEN MÁS DETENIDO DE LA ACTIVACIÓN POR RUPTURA: COAGULACIÓN DE LA SANGRE

La coagulación de la sangre comporta una cascada de activación proteolítica de proteasas específicas, que culmina con la transición del fibrinógeno a fibrina.

La activación de los zimógenos es la clave de otro proceso de importancia biológica: la coagulación de la sangre de los vertebrados. Si se observa un coágulo sanguíneo con el microscopio electrónico, se ve que está formado por fibras estriadas de una proteína denominada *fibrina* (Figura 11.41a). Los monómeros de

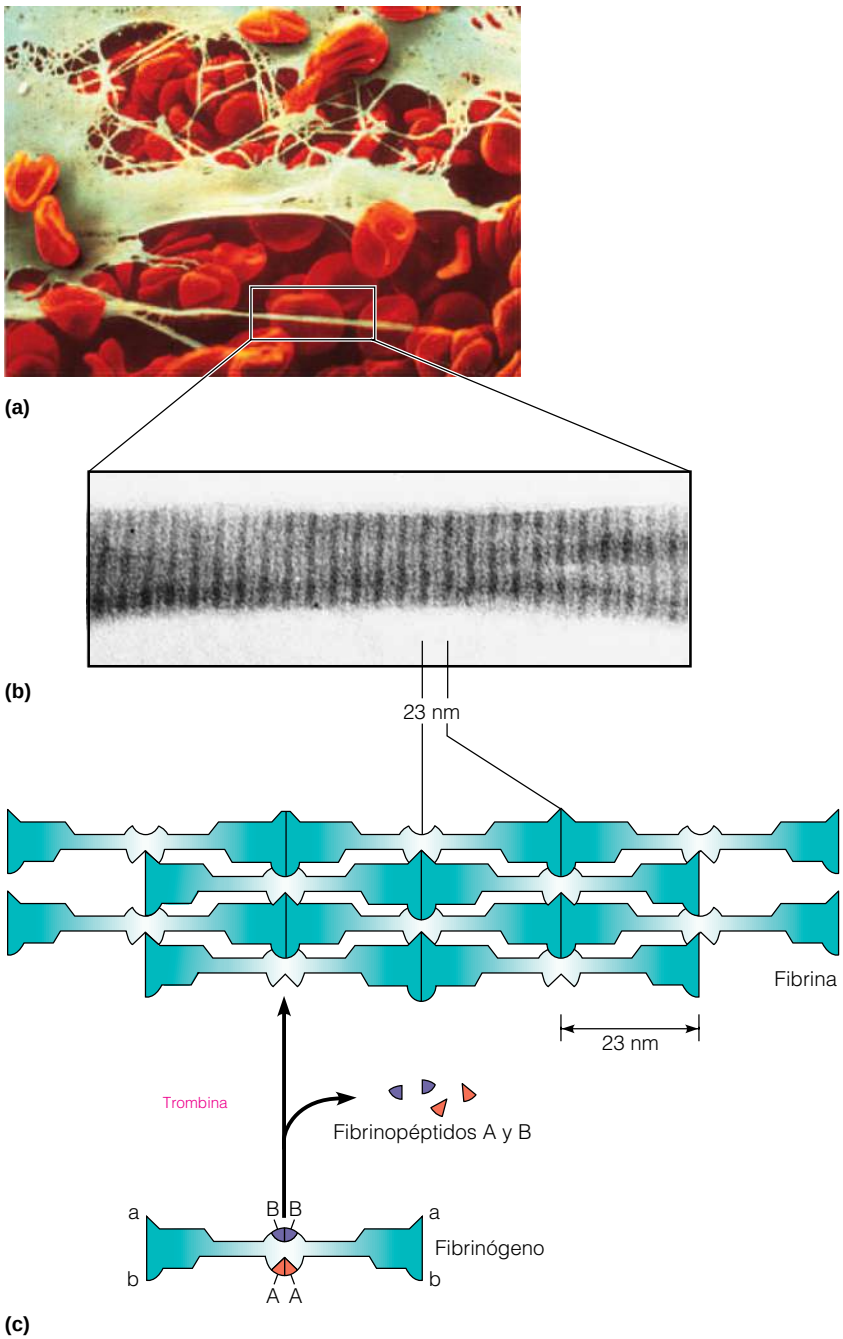


FIGURA **11.41**

Formación de un coágulo sanguíneo. **(a)** Eritrocitos atrapados en una red de hebras insolubles de un coágulo de fibrina. **(b)** Fotografía de microscopia electrónica de parte de una fibra de fibrina. **(c)** Representación esquemática de la forma en que se cree que se asocian los monómeros de fibrina para formar una fibra. La eliminación de los fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno por la trombina hace que estos lugares sean accesibles para la asociación con los lugares complementarios a y b en los monómeros adyacentes. Se cree que las moléculas se solapan como se indica aquí, ya que las estriaciones que se observan en las fibras tienen una anchura de 23 nm, exactamente la mitad de la longitud de la molécula de fibrinógeno.

(a) Lennart Nilsson/Albert Bonniers Forlag AB; **(b)** cortesía del Dr. Henry Slayter.

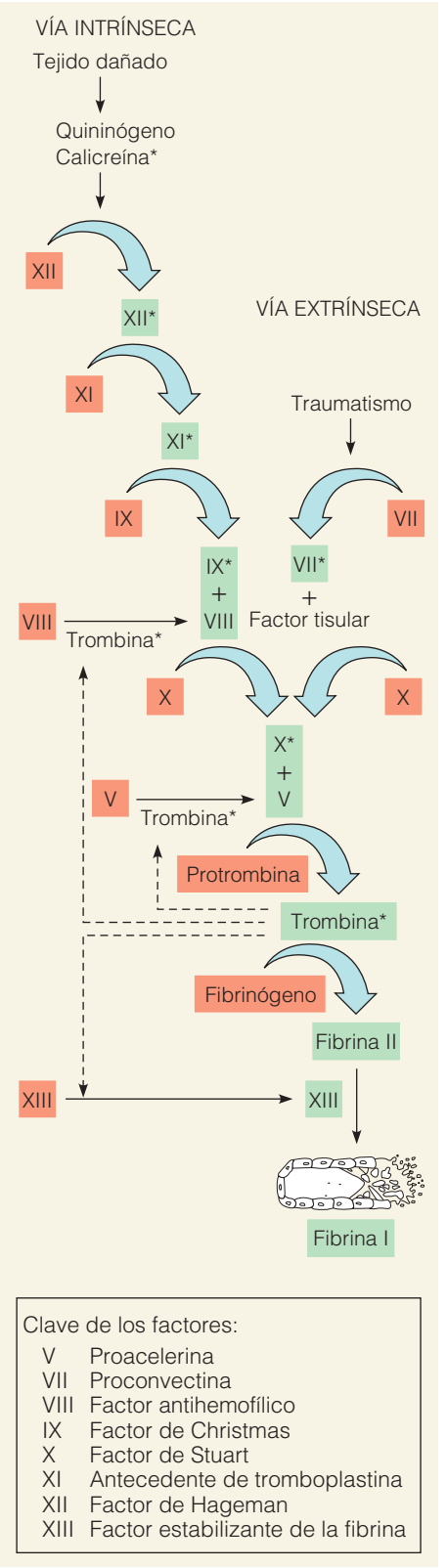


FIGURA **11.42**

Proceso en cascada de la coagulación de la sangre. Cada factor (proteasa) de la vía puede encontrarse en una forma inactiva (roja) o activa (verde). La cascada de activaciones proteolíticas puede iniciarse a partir del contacto de la sangre con superficies de tejido dañadas (vía intrínseca) o por un traumatismo interno de los vasos sanguíneos (vía extrínseca). El resultado común es la activación del fibrinógeno a la fibrina coagulante. Se muestran también los factores auxiliares que facilitan algunos de los pasos. El asterisco (*) indica serina proteasas.

fibrina son moléculas alargadas, de unos 46 nm de longitud, que se juntan formando una serie escalonada, como se observa en la Figura 11.41b. Los monómeros de fibrina proceden de un precursor, el *fibrinógeno* (Figura 11.41c), mediante rupturas proteolíticas que liberan pequeños *fibrinopéptidos* (A y B en la Figura 11.41c). La pérdida de estos péptidos deja al descubierto posiciones en las que las moléculas de fibrina pueden pegarse unas a otras. Una vez formado el coágulo, éste se estabiliza mediante entrecruzamientos covalentes entre residuos de glutamina y lisina.

La proteólisis del fibrinógeno a fibrina está catalizada por la serina proteasa *trombina*. La trombina tiene una secuencia y estructura semejantes a la tripsina, pero como proteasa con una función muy específica, rompe solamente unos pocos tipos de enlaces, principalmente los de Arg-Gly. La trombina se produce a partir de la *protrombina*, por otra proteasa específica; de hecho, como muestra la Figura 11.42, toda la cascada de reacciones de activación proteolítica conduce finalmente a la formación de un coágulo de fibrina. En ello intervienen una serie de proteasas denominadas *factores*. En los tejidos dañados, las proteínas *quininógeno* y *calicreína* activan el factor XII (denominado *factor de Hageman*), que a su vez activa el factor XI, y se produce la cascada de reacciones que se muestran. Esta serie de reacciones iniciales se denomina **vía intrínseca**. Otra posibilidad es que la lesión de los vasos sanguíneos dé lugar a la liberación del *factor tisular* y a la activación del factor VII, iniciando la **vía extrínseca**. Las dos vías se unen en la activación del factor X, que causará la proteólisis y, por tanto, activará la protrombina.

Algunos de los pasos de activación requieren proteínas auxiliares. Así por ejemplo, la activación del factor X de la vía intrínseca por el factor IX (*factor de Christmas*) requiere una proteína de 330 kilodalton denominada *factor antihemofílico* (factor VIII). La ausencia parcial o completa de actividad del factor VIII es la causa de la **hemofilia** clásica. El gen del factor VIII se encuentra en el cromosoma X, por lo que las mujeres, que poseen dos copias de este cromosoma, pueden ser portadoras heterocigotas del rasgo pero sólo presentarán síntomas si son homocigotas. Sin embargo, un hijo varón que reciba como único cromosoma X el que está dañado para el gen del factor VIII experimentará una dificultad más o menos grave de la coagulación de la sangre. El trastorno puede tratarse en la actualidad mediante transfusiones frecuentes de una fracción del suero sanguíneo concentrado en factor VIII. El gen de esta proteína se ha clonado recientemente y expresado en bacterias, y la disponibilidad de este factor VIII sintético puede permitir a estos pacientes evitar los peligros de las transfusiones regulares.

Al cicatrizar las heridas o repararse el daño tisular, es esencial que la sangre coagulada se disuelva. El principal agente de disolución del coágulo es una enzima denominada **plasmina**, que fragmenta la fibrina. La propia plasmina deriva de la fragmentación proteolítica de un precursor inactivo, el **plasminógeno**. La activación del plasminógeno la catalizan diversas proteasas, de las que la más importante es el **activador del plasminógeno** de tipo tisular (**t-PA**). Además de su función normal, el t-PA puede ser muy eficaz en la iniciación de la cascada de disolución de los coágulos sanguíneos indeseables, culpables de la apo-

plejía y el infarto. La puesta a punto reciente de métodos para producir t-PA mediante técnicas de DNA recombinante promete un tratamiento nuevo y eficaz.

Los mecanismos de regulación que hemos mencionado aquí no describen en modo alguno el repertorio completo de la célula. Además de la regulación del *funcionamiento* de las enzimas, las células y los organismos pueden regular también la síntesis y la degradación de las enzimas. Pero la descripción de estos procesos es más adecuada dentro del marco más amplio que se plantea en el Capítulo 12.

RESUMEN

La velocidad de una reacción química viene dada por las concentraciones de los reactantes y por la constante de velocidad. Esta última depende a su vez de la energía de activación necesaria para alcanzar el estado de transición. Todos los catalizadores funcionan reduciendo la energía de activación de una reacción. Al hacerlo, no afectan al equilibrio químico sino que sólo aumentan las velocidades. Las enzimas son catalizadores biológicos que aumentan las velocidades de los procesos bioquímicos mientras se mantienen inalteradas. La mayoría, aunque no todas, las enzimas son proteínas. En la catálisis enzimática, uno o más sustratos se unen al lugar activo de una enzima, para formar el complejo enzima-sustrato; tras ello se liberan los productos. La hipótesis del ajuste inducido establece que las enzimas inducen en los sustratos unidos la adopción de unas conformaciones próximas al estado de transición. La mayoría de las reacciones enzimáticas sencillas pueden describirse mediante la ecuación de Michaelis-Menten, con dos parámetros, la constante de Michaelis, K_M, y el número de recambio, k_{cat}. Las enzimas pueden inhibirse de manera reversible o irreversible. La inhibición reversible puede ser competitiva o no competitiva. La inhibición competitiva afecta la K_M aparente; la inhibición no competitiva afecta la k_{cat} aparente. La inhibición irreversible suele comportar la unión covalente al lugar activo. Muchas enzimas utilizan coenzimas en su función; otras requieren iones metálicos específicos. Diversas coenzimas están estrechamente relacionadas con vitaminas necesarias en la alimentación humana.

En la actualidad es posible crear enzimas nuevas o modificadas mediante ingeniería molecular o por la generación de anticuerpos con capacidades enzimáticas. Además, se ha encontrado que algunas moléculas de ácido ribonucleico actúan como enzimas; se las denomina ribozimas.

La regulación de la actividad enzimática adopta muchas formas. La regulación a nivel de sustrato depende simplemente de las concentraciones de reactantes y productos en el medio. La regulación alostérica proporciona un control sensible por retroacción de las rutas metabólicas complejas. Para cambios más drásticos de la actividad, algunas enzimas se activan o desactivan (o ambas cosas) mediante una modificación covalente.

BIBLIOGRAFÍA

General

Creighton, T. E. (1993) *Proteins*, 2.ª ed. W. H. Freeman, Nueva York. El Capítulo 9 de este excelente libro contiene un resumen sucinto de la catálisis enzimática, junto con muchas citas bibliográficas recientes de la literatura especializada.

Fersht, A. (1985) *Enzyme Structure and Mechanism*, 2.ª ed. W. H. Freeman, Nueva York. Un tratado preciso sobre casi todos los aspectos de la enzimología.

Gutfreund, H. (1995) *Kinetics for the Life Sciences.* Cambridge University Press, Cambridge, UK. Un análisis y exposición cuidadosos de los principios cinéticos, tal como se aplican a los problemas biológicos.

Webb, E. (1992) *Enzyme Nomenclature.* Academic Press, Orlando, Fla. Ésta es la relación de enzimas más reciente elaborada por el Comité de Nomenclatura de la Comisión de Enzimas de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

Mecanismos y cinética enzimáticos

Åqvist, J. y M. Fothergill (1996) Computer simulation of the triosephosphate isomerase reaction. *J. Biol. Chem.* 271:10010-10016.

Bennet, W. S. y T. A. Steitz (1978) Glucose-induced conformational change in yeast hexokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4848-4852.

Cleland, W. W. (1977) Determining the chemical mechanisms of enzyme catalyzed reactions by kinetic studies. *Adv. Enzymol.* 45:273-387.

Knowles, J. R. (1991) Enzyme catalysis: Not different, just better. *Nature* 350:121-124. La mayor parte sobre la triosa fosfato isomerasa, pero con implicaciones para las enzimas en general.

Kraut, J. (1988) How do enzymes work? *Science* 242:533-540. Un nuevo análisis detallado de la teoría del estado de transición según la información actual.

Walsh, C. T. (1977) *Enzymatic Reaction Mechanisms.* W. H. Freeman, Nueva York. Un trabajo exhaustivo que incluye un tratamiento detallado de las coenzimas.

Proteasas

Corey, D. R. y C. S. Craik (1992) An investigation into the minimum requirements for peptide hydrolysis by mutation of the catalytic triad of trypsin. *J. Am. Chem. Soc.* 114:1784-1790.

Kraut, J. (1977) Serine proteases: Structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 46:331-358.

Steitz, T. A. y R. G. Shulman (1982) Crystallographic and NMR studies of the serine proteases. *Annu. Rev. Biochem. Biophys.* 11:419-444.

Inhibición irreversible

Abeles, R. H. (1983) Suicide enzyme inactivators. *Chem. Eng. News* 61:48-56. Un tratamiento claro y conciso.

Rando, R. R. (1975) Mechanisms of action of naturally occurring irreversible enzyme inhibitors. *Acc. Chem. Res.* 8:281-288.

Ingeniería molecular de las enzimas

Olsen, O., K. K. Thomsen, J. Weber, J. Duus, I. Svendsen, C. Wegener y D. von Wettstein (1996) Transplanting two unique β-gluconase catalytic activities into one multienzyme which forms glucose. *Nat. Biotechnol.* 14:71-76.

Oxender, D. L. y C. F. Fox, eds. (1987) *Protein Engineering.* Alan R. Liss, Nueva York. Una recopilación fascinante de artículos sobre técnicas y resultados. El Capítulo 25 de J. A. Wells y 12 colaboradores describe el trabajo sobre la subtilisina que se comenta en el texto.

Schultz, P. G. (1988) The interplay between chemistry and biology in the design of enzymatic catalysts. *Science* 240:426-433. Una exposición breve y bien redactada de los métodos.

Anticuerpos catalíticos

Benkovic, S. J. (1992) Catalytic antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* 61:29-54. Una revisión exhaustiva por uno de los líderes del campo.

Janda, K. D., L.-C. Lo, C.-H. Lo, M.-M. Sim, R. Wang, C.-H. Wong y R. A. Lerner (1997) Chemical selection for catalysis in combinatorial antibody libraries. *Science* 275:945-948.

Powell, M. J. y D. E. Hansen (1989) Catalytic antibodies—a new direction in enzyme design. *Protein Eng.* 3:69-75.

Ribozimas

Cech, T. R. (1987) The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes. *Science* 236:1532-1539.

Gesteland, R. F., T. R. Cech y J. F. Atkins (1999) *The RNA World.* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

McCorkle, G. M. y S. Altman (1987) RNA's as catalysts. *Concepts Biochem.* 64:221-226.

Waugh, D. S., C. J. Green y N. R. Pace (1989) The design and catalytic properties of a simplified ribonuclease P RNA. *Science* 244:1569-1571. Bioingeniería de las ribozimas.

Wright, M. C. y G. F. Joyce (1997) Continuous in vitro evolution of catalytic function. *Science* 276:614-616.

Regulación alostérica

Lipscomb, W. N. (1994) Aspartate transcarbamylase from *Escherichia coli*: Activity and regulation. *Adv. Enzymol.* 73:67-151. Una descripción muy completa de nuestro conocimiento actual de este ejemplo importante.

Monod, J., J.-P. Changeux y F. Jacob (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6:306-329. Este artículo presentó el concepto de control alostérico.

Activación de zimógenos

Bode, W. y R. Huber (1986) Crystal structure of pancreatic serine endopeptidases. En: *Molecular and Cellular Basis of Digestion*, editado por P. Desnuelle, H. Sjorstrom y O. Noren, pp. 213-234. Elsevier, Nueva York.

Neurath, H. (1986) The versatility of proteolytic enzymes. *J. Cell Biochem.* 32:35-49. Una revisión útil de las proteasas.

Coagulación de la sangre

Davie, E. W. (1986) Introduction to the blood coagulation cascade and the cloning of blood coagulation factors. *J. Protein Chem.* 5:247-253.

Doolittle, R. F. (1984) Fibrinogen and fibrin. *Annu. Rev. Biochem.* 53:195-229.

Lawn, R. M. y G. A. Vehar (1986) The molecular genetics of hemophilia. *Sci. Am.* 254:48-65. Una panorámica general de fácil lectura.

PROBLEMAS

1. Demuestre que la semivida de una reacción de primer orden es inversamente proporcional a la constante de velocidad, y determine la constante de proporcionalidad.
2. Una sustancia A se consume en una reacción de orden desconocido. La concentración inicial es 2 mM, y las concentraciones en los momentos posteriores son las que se indican a continuación:

Tiempo (min)	[A] (mM)
1	1.66
2	1.44
4	1.12
8	0.76
16	0.48

Compruebe si los datos se ajustan o no a una reacción de primer orden.

3. La enzima ureasa cataliza la hidrólisis de la urea a amoníaco y dióxido de carbono. A 21°C, la reacción sin catalizar tiene una energía de activación de aproximadamente 125 kJ/mol, mientras que en presencia de ureasa la energía de activación se reduce a unos 46 kJ/mol. ¿En qué factor incrementa la ureasa la velocidad de la reacción?

4. La velocidad máxima posible de una reacción entre dos moléculas se produce cuando cada colisión da lugar a la reacción. En este caso, puede predecirse que la constante de velocidad de segundo orden es:

$$k = \frac{4\pi N}{1000}(D_1 + D_2)r_{12}$$

que tiene como unidades $(\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}$. En esta expresión, N es el número de Avogadro (6.02×10^{23} moléculas/mol), r_{12} es la distancia crítica de la reacción, y D_1 y D_2 son los coeficientes de difusión de los dos participantes. En una reacción característica catalizada por enzimas, cabría prever que r_{12} fuera de aproximadamente 10^{-7} cm, $D_{\text{enzima}} = 5 \times 10^{-7}$ cm^2/s y $D_{\text{sustrato}} = 5 \times 10^{-6}$ cm^2/s. ¿Qué predicen estos datos respecto al valor de k? Compare con los valores de $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ de la Tabla 11.1. [Pista: La ecuación está escrita para las unidades antes indicadas. No haga conversiones.]

*5. En algunas reacciones en las que una molécula proteica se une a un lugar específico del DNA, se observa una velocidad *superior* a la prevista según la ecuación del Problema 4. Sugiera una explicación para ello. [Pista: La molécula de proteína puede unirse también de forma débil e inespecífica a *cualquier* lugar del DNA.]

*6. Obtenga una expresión para el cambio de concentración del reactante en función del tiempo en una reacción reversible de primer orden (ecuación (11.5)), suponiendo [B] = 0 a $t = 0$. (Advertencia: esto es mucho más difícil de lo que parece.)

7. (a) Obtenga una expresión para la concentración del reactante en función del tiempo para la reacción de segundo orden $2\text{A} \longrightarrow \text{B}$.
   (b) En función de su respuesta a la pregunta (a), indique cómo podría obtenerse un gráfico lineal para una reacción de segundo orden.
   (c) Compruebe los datos que se han presentado en el Problema 2 con su método.

8. Se ha determinado la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima para diversas concentraciones de sustrato. Los datos obtenidos son los siguientes:

[S] (μmol/L)	V [(μmol/L) min^{-1}]
5	22
10	39
20	65
50	102
100	120
200	135

   (a) Calcule $V_{\text{máx}}$ y K_{M} a partir de un gráfico directo de V frente a [S]. ¿Tiene dificultades para obtener respuestas claras?
   (b) Utilice ahora una representación de Lineweaver-Burk para analizar los mismos datos. ¿Funciona mejor?
   (c) Por último, pruebe una representación de Eadie-Hofstee de los mismos datos.

9. (a) Si la concentración total de la enzima en el Problema 8 fuera de 1 nmol/L, ¿cuántas moléculas de sustrato puede procesar una molécula de enzima cada minuto?
   (b) Calcule $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ para la reacción enzimática del Problema 8. ¿Es ésta una enzima eficaz? (Véase la Tabla 11.1.)

*10. (a) Si escribimos la ecuación de Michaelis-Menten de la siguiente forma:

$$\frac{d[\text{S}]}{dt} = -\frac{d[\text{P}]}{dt} = -\frac{V_{\text{máx}}[\text{S}]}{K_{\text{M}} + [\text{S}]}$$

debe ser posible integrarla y obtener una expresión para la concentración de sustrato en función del tiempo. Hágalo, llamando $[\text{S}]_0$ a la concentración inicial de sustrato en el momento $t = 0$.
   (b) Demuestre a partir del resultado de (a) que, en condiciones en las que $[\text{S}]_0 >> K_{\text{M}}$, la disminución de la concentración de sustrato con el tiempo es aproximadamente lineal. Interprete este resultado.

*11. Diseñe un método gráfico para utilizar la ecuación obtenida en el Problema 10a para determinar $V_{\text{máx}}$ y K_{M}.

12. La eficacia catalítica de muchas enzimas depende del pH. La quimotripsina muestra un valor máximo de $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ a pH 8. Un análisis detallado indica que k_{cat} aumenta rápidamente entre pH 6 y 7, y se mantiene constante a un pH superior. K_{M} aumenta rápidamente entre pH 8 y 10. Sugiera explicaciones para estas observaciones.

13. Los siguientes datos describen la catálisis de la ruptura de los enlaces peptídicos en péptidos pequeños por la enzima elastasa.

Sustrato	K_{M} (mM)	k_{cat} (s^{-1})
P A P A$\downarrow$G	4.0	26
P A P A$\downarrow$A	1.5	37
P A P A$\downarrow$F	0.64	18

La flecha indica el enlace peptídico que se rompe en cada caso.
   (a) Si se presentara una mezcla de estos tres sustratos a la elastasa, con una concentración de cada péptido igual a 0.5 mM, ¿cuál sería digerido con mayor rapidez? ¿Cuál lo sería de la forma más lenta? (Asuma que la enzima se encuentra presente en exceso.)
   (b) Basándose en estos datos, sugiera qué características de la secuencia de aminoácidos dictan la especificidad de la ruptura proteolítica por la elastasa.
   (c) La elastasa está muy relacionada con la quimotripsina. Sugiera dos tipos de residuos de aminoácido que esperaría encontrar en el lugar activo o cerca del mismo.

14. La serina proteasa, subtilisina, se utiliza en algunos detergentes de lavandería para facilitar la eliminación de las manchas de proteínas.
   (a) ¿Qué tipo poco habitual de estabilidad sugiere esto para la subtilisina?
   (b) La subtilisina tiene un problema, por cuanto queda inactivada por la oxidación de una metionina próxima al lugar activo. Sugiera una forma de obtener una subtilisina mejor.

15. Se estudia la cinética del estado estacionario de una enzima en ausencia y en presencia de un inhibidor (inhibidor A). La velocidad inicial viene dada en función de la concentración de sustrato en la tabla siguiente:

	V [(mmol/L)min^{-1}]	
[S] (mmol/L)	Sin inhibidor	Inhibidor A
1.25	1.72	0.98
1.67	2.04	1.17
2.50	2.63	1.47
5.00	3.33	1.96
10.00	4.17	2.38

(a) ¿Qué tipo de inhibición (competitiva o no competitiva) se produce?
(b) Determine $V_{máx}$ y K_M en ausencia y en presencia del inhibidor.

16. La misma enzima del Problema 15 se estudia en presencia de un inhibidor diferente (inhibidor B). En este caso, se utilizan dos concentraciones diferentes de inhibidor. Los datos son los siguientes:

	V [(mmol/L)min^{-1}]		
[S] (mmol/L)	Sin inhibidor	Inhibidor B 3 mM	Inhibidor B 5 mM
1.25	1.72	1.25	1.01
1.67	2.04	1.54	1.26
2.50	2.63	2.00	1.72
5.00	3.33	2.86	2.56
10.00	4.17	3.70	3.49

(a) ¿Qué tipo de inhibidor es el inhibidor B?
(b) Determine la $V_{máx}$ y K_M para cada concentración del inhibidor.
(c) Calcule K_I a partir de estos datos.

17. Hemos mencionado las representaciones de Eadie-Hofstee como alternativa a las representaciones de Lineweaver-Burk para la expresión de los datos cinéticos. Dibuje el aspecto que tendrían los gráficos de Eadie-Hofstee para una serie de experimentos a diferentes concentraciones de
(a) Un inhibidor competitivo
(b) Un inhibidor no competitivo

18. Hemos considerado el papel de la TPCK como inhibidor irreversible de la quimotripsina. Diseñe un inhibidor comparable para la tripsina.

*19. En otro tipo de inhibición reversible, denominada *acompetitiva*, el inhibidor se une sólo al complejo ES (no a la enzima libre) pero bloquea la catálisis al hacerlo. Deduzca la ecuación cinética para este caso, y dibuje las representaciones de Lineweaver-Burk.

20. Los siguientes datos corresponden a la cinética de estado estacionario de una enzima de múltiples subunidades.

[S] (mmol/L)	Velocidad inical [(mmol/L)s^{-1}]
0.25	0.26
0.33	0.45
0.50	0.92
0.75	1.80
1.00	2.50
2.00	4.10
4.00	4.80

(a) ¿Sigue esta enzima la cinética de Michaelis-Menten?
(b) Calcule $V_{máx}$.

*21. Deduzca una ecuación que exprese $\log\left(\frac{V/V_{máx}}{1 - V/V_{máx}}\right)$ en función de log[S] para una enzima que siga la ecuación de Michaelis-Menten.
(a) Para una enzima *alostérica*, indique de qué manera podría utilizar esta ecuación para obtener K_M^T y K_M^R (los valores de K_M para los estados T y R) a partir de una representación de Hill de datos cinéticos.
(b) Aplique los resultados a los datos del Problema 20.

*22. En algunos casos, se ha demostrado que las enzimas de múltiples subunidades presentan una *cooperatividad negativa*; es decir, la unión de la primera molécula de sustrato reduce notablemente la afinidad de unión de las moléculas posteriores. Indique el aspecto que tendría una representación de Hill para una enzima que presente una cooperatividad negativa. [Pista: Consulte el Problema 21a.]

23. La teoría MWC (véanse las páginas 248-251 en el Capítulo 7) no puede explicar la cooperatividad negativa, pero la teoría KNF sí puede hacerlo. Explíquelo.

*24. Aunque la teoría MWC que describe la unión a una proteína de múltiples lugares es bastante complicada, podemos deducir con facilidad ecuaciones para un caso sencillo. Supongamos una enzima dimérica, con dos lugares, y con estados T y R. Para mayor simplicidad, supongamos que el estado R puede unir una o dos moléculas de sustrato, mientras que el estado T no puede unirlas. Tendremos, entonces, las siguientes ecuaciones:

$$T \rightleftharpoons R \qquad L = \frac{[T]}{[R]}$$

$$R + S \rightleftharpoons RS \qquad K = \frac{2[R][S]}{[RS]}$$

$$RS + S \rightleftharpoons RS_2 \qquad 2K = \frac{[RS][S]}{[RS_2]}$$

El factor 2 aparece porque hay dos lugares equivalentes en cada R para unir S.
(a) A partir de esta información, demuestre que la fracción de lugares ocupados a la concentración de sustrato [S] es

$$\theta = \frac{[S]}{K}\left(\frac{1 + [S]/K}{L + (1 + [S]/K)^2}\right) = \frac{V}{V_{máx}}$$

(b) Tomando un valor elevado de L (por ejemplo, 10^5), y con $K = 10^{-6}$ M, demuestre que se obtiene una curva sigmoidea para $V/V_{máx}$ frente a [S].

25. Sugiera los efectos de cada una de las siguientes mutaciones sobre la función fisiológica del quimotripsinógeno:
(a) Arg 15 ⟶ Ser
(b) Cys 1 ⟶ Ser
(c) Thr 147 ⟶ Ser

26. Suponga que dispone de una muestra de la ribozima IVS-19 procedente de *Tetrahymena*. Describa el protocolo de un experimento sencillo que pudiera poner de manifiesto la reacción indicada en la Figura 11.30b.

27. A partir del ejemplo de la página 441 sugiera el diseño de un antígeno que pudiera producir un anticuerpo catalítico capaz de hidrolizar el enlace amida.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 11A

Cómo medir las velocidades de las reacciones catalizadas por enzimas

Existen dos enfoques básicos para el análisis de la cinética enzimática. El primero y más sencillo es realizar medidas de las velocidades en condiciones en las que se mantiene la aproximación del estado estacionario (véase la página 421). En estas condiciones, a menudo es aplicable la ecuación de Michaelis-Menten, y la determinación de la velocidad de la reacción en función de las concentraciones de sustrato y de enzima proporcionará K_M y k_{cat}. Casi todos los estudios enzimáticos se inician al menos de esta forma. Pero si el experimentador desea obtener más información sobre los detalles del mecanismo, con frecuencia es importante llevar a cabo estudios antes de que se haya alcanzado la fase de estado estacionario. Estos experimentos *pre-estado estacionario* requieren el empleo de técnicas rápidas especiales. En las páginas 427-428 describimos la manera en que puede utilizarse una combinación de estos enfoques para diseccionar un proceso enzimático complejo y para comprenderlo detalladamente. Algunas de las técnicas experimentales que pueden utilizarse se describen aquí.

Análisis en el estado estacionario

El estado estacionario se establece en la mayor parte de las reacciones enzimáticas en un plazo de segundos o de pocos minutos, y persiste durante muchos minutos o incluso horas. En consecuencia, no es importante la rapidez extrema de la medida, y se dispone de muchas técnicas con las que el experimentador puede seguir la reacción. Se describen a continuación las utilizadas más frecuentemente.

Espectrofotometría

Los métodos espectrofotométricos son sencillos y exactos (véase Herramientas de la Bioquímica 6A). Sin embargo, una exigencia obvia es que o bien un sustrato o bien un producto de la reacción deben absorber la luz en una región del espectro en la que los demás sustratos o productos no lo hagan. Son ejemplos clásicos las reacciones que generan o consumen NADH. El NADH absorbe con bastante intensidad a 340 nm, mientras que el NAD^+ no absorbe en esta región del espectro. En consecuencia, podríamos seguir, por ejemplo, la oxidación del etanol a acetaldehído, catalizada por la alcohol deshidrogenasa, determinando espectrofotométricamente la formación de NADH. Aun en el caso de que en la reacción estudiada no intervenga una sustancia que absorba luz, puede ser posible *acoplar* esta reacción con otra muy rápida que sí tenga esta característica.

Fluorescencia

Las aplicaciones de la fluorescencia son semejantes a las de la espectrofotometría, y los problemas son similares: un sustrato o un producto deben tener un espectro de emisión de fluorescencia distintivo (véase Herramientas de la Bioquímica 6A). Sin embargo, la fluorescencia tiene la ventaja de una sensibilidad elevada, por lo que pueden utilizarse soluciones extremadamente diluidas, que permiten al experimentador ampliar notablemente la gama de concentraciones a las que pueden realizarse los estudios.

Titulación automática

Si la reacción produce o consume ácidos o bases, puede seguirse con el empleo de un dispositivo denominado *pH-stat*. Un electrodo de vidrio mide el pH de la solución y su señal se utiliza para activar una jeringa con motor que titula el ácido o la base en la cubeta de reacción para mantener el pH constante. El registro del ácido o la base consumidos constituye un indicador del progreso de la reacción catalizada enzimáticamente.

Análisis de radiactividad

Si se marca el sustrato con un isótopo radiactivo que se pierde o se transfiere durante la reacción a estudiar, la medida de los cambios de radiactividad puede ser un método cinético extremadamente sensible. Esta técnica requiere que el compuesto marcado pueda separarse con rapidez en momentos diferentes, y definidos con precisión durante la reacción. Un ejemplo es un método que se utiliza a menudo con ATP radiactivo. El ATP puede adsorberse en un disco de un filtro impregnado de carbón mediante la filtración muy rápida de alícuotas de la mezcla de reacción. A continuación, puede medirse la radiactividad mediante un contador de centelleo (véase Herramientas de la Bioquímica 12A).

Análisis de las reacciones muy rápidas

Las reacciones que son extremadamente rápidas requieren técnicas especiales para investigar los procesos previos al estado estacionario. En la actualidad se emplean tres métodos principales, para cubrir las escalas temporales que se indican en la Figura 11A.1.

Flujo detenido

En la Figura 11A.2 se muestra un aparato de flujo detenido. La enzima y el sustrato están inicialmente en jeringas distintas. Las jeringas se activan rápidamente para hacer pasar su contenido a través de una cámara de mezclado y a una tercera jeringa "de detención". Este paso hace que un detector empiece a observar (por ejemplo, mediante absorción de luz o fluorimetría) la disolución en el tubo que conecta el mezclador con la jeringa de detención. El flujo puede llegar a ser con facilidad de 1000 cm/s. Si la mezcla se estaba moviendo a esta velocidad

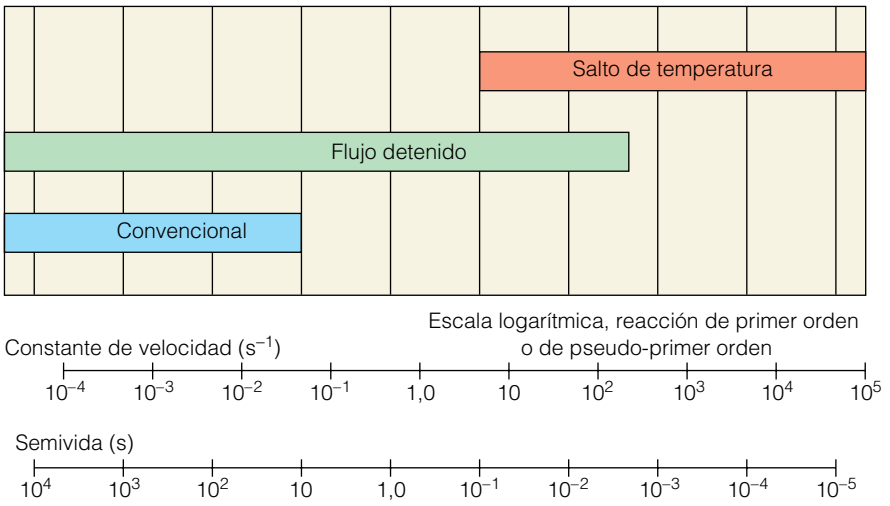


FIGURA **11A.1**
Escalas temporales para las técnicas cinéticas que se describen aquí.
Cortesía de Dionex Instruments.

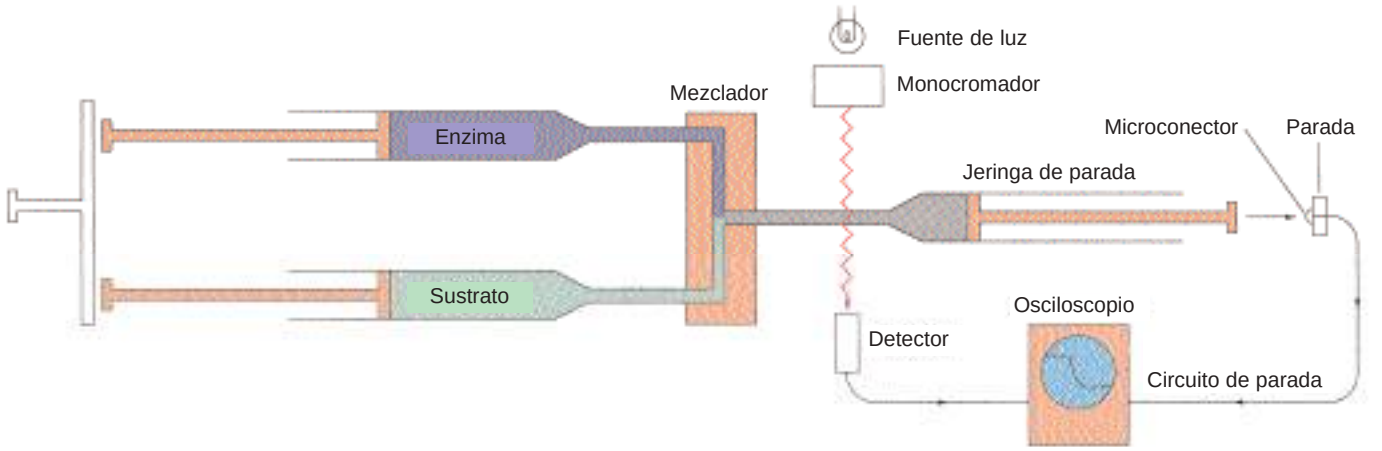


FIGURA **11A.2**
Aparato característico de flujo detenido.

cuando se detuvo el flujo, y si el punto de observación está situado a 1 cm del mezclador, el sistema de detección observa una mezcla que tiene 1 ms de "edad". La reacción puede seguirse entonces durante el tiempo que se desee, a menudo durante un período de sólo unos segundos. Las limitaciones del método vienen dadas por el "tiempo muerto" inicial (en el ejemplo citado, 1 ms), y la rapidez del sistema de detección.

Salto de temperatura

Algunos procesos son tan rápidos que se completan prácticamente en el tiempo muerto de un aparato de flujo detenido. El experimentador puede acudir entonces a los métodos de salto de temperatura (salto de T). El aparato básico y el principio del método se muestran en la Figura 11A.3a y b, respectivamente. Una mezcla de reacción que esté en equilibrio a una temperatura T_1 se hace pasar bruscamente a una temperatura T_2. La posición de equilibrio se desplazará, y deberá producirse una reacción para alcanzar este nuevo equilibrio. Un salto rápido de temperatura (5-10°C en 1 μs) puede obtenerse mediante el paso de una gran irrupción de corriente eléctrica entre los electrodos sumergidos en la mezcla de reacción. Pueden obtenerse saltos aún más rápidos (10-100 ns) si se emplea un láser infrarrojo de pulsos para calentar la mezcla. La relajación (aproximación) a un nuevo equilibrio, seguida del empleo de medidas de absorción o de fluorescencia, es un proceso exponencial. Para una reacción simple, el cambio de la concentración del reactivo viene dado por

$$\Delta[\mathrm{A}] = (\Delta[\mathrm{A}])_{\text{total}} e^{-t/\tau} \qquad (11\mathrm{A}.1)$$

en donde τ se denomina *tiempo de relajación* y puede estar relacionado con las constantes de velocidad de la reacción. Así por ejemplo, para la isomerización reversible simple

$$\mathrm{A} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathrm{B}$$

tenemos

$$\frac{1}{\tau} = k_1 + k_{-1} \qquad (11\mathrm{A}.2)$$

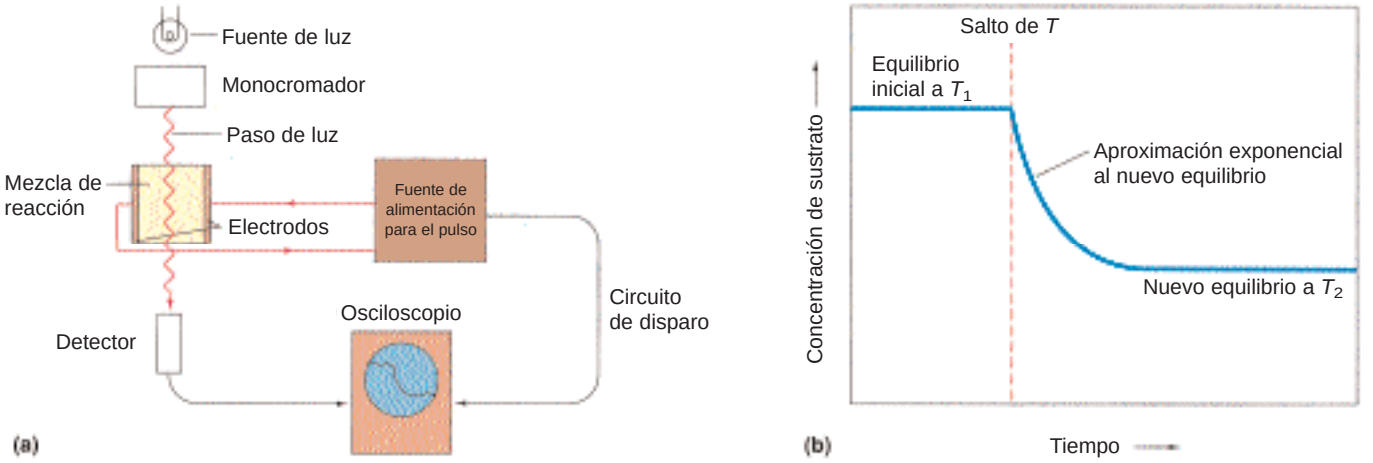


FIGURA **11A.3**
Método de salto de temperatura.

Las reacciones más complejas tienen tiempos de relajación múltiples y curvas más complejas que las expresadas en la ecuación (11A.1). Los experimentos de salto de T pueden manejar reacciones con valores de τ de tan sólo unos 10^{-5} s.

Aunque se utilizan otras técnicas para las reacciones aún más rápidas, como algunos de los métodos de RMN puestos a punto recientemente, y las técnicas de láser de pulso, los métodos que se han descrito aquí son los más utilizados. Si consideramos la variedad de técnicas de que dispone el investigador podemos comprobar que cubren una amplia gama de tiempos. Globalmente, pueden estudiarse tiempos que van desde los nanosegundos hasta las horas.

Bibliografía

Fersht, A. (1985) *Enzyme Structure and Mechanism*, 2.ª ed. W. H. Freeman, Nueva York. Los Capítulos 4, 6 y 7 contienen mucha información sobre técnicas y bibliografía.

Himori, K. (1979) *Kinetics of Fast Enzyme Reactions.* Halstead, Nueva York.

CAPÍTULO 12

Introducción al metabolismo

UN QUÍMICO QUE REALIZA UNA SÍNTESIS ORGÁNICA RARA VEZ LLEVA A CABO más de una reacción en un mismo recipiente. Este procedimiento es esencial para evitar reacciones secundarias y para optimizar el rendimiento del producto deseado. Sin embargo, una célula viva lleva a cabo miles de reacciones simultáneamente, y cada secuencia de reacción está controlada de tal manera que no se acumulan ni faltan intermediarios o productos. Se producen reacciones de una gran complejidad de mecanismo y selectividad estereoquímica, de una manera suave y en condiciones no extremas (presión de 1 atm, temperatura moderada y pH próximo a la neutralidad). Uno de los objetivos de los capítulos siguientes es comprender la manera en la que las células llevan a cabo y regulan estas secuencias de reacciones complejas.

Una primera mirada al metabolismo

Como se ha indicado antes, una de las tareas principales del bioquímico es la de comprender cómo regula la célula la multitud de secuencias de reacciones y, de este modo, controla su medio interno. En el Capítulo 11 hemos considerado las propiedades de las diversas enzimas y los mecanismos de control que afectan a su actividad. En este capítulo analizaremos las secuencias específicas de reacciones, o **rutas**, la relación entre cada ruta y la arquitectura celular, la importancia biológica de cada ruta, el mecanismo de control que regula el **flujo** o velocidad de reacción intracelular y los métodos experimentales que se utilizan para el estudio del metabolismo. La Figura 12.1, que es un esquema simplificado de los procesos que consideraremos, ilustra dos principios importantes: (1) el metabolismo puede subdividirse en dos categorías principales, el **catabolismo**, aquellos procesos relacionados con la degradación de las sustancias complejas, y el **anabolismo**, los procesos relativos fundamentalmente a la síntesis de las moléculas orgánicas complejas. (2) Tanto las rutas catabólicas como las anabólicas se producen en tres niveles de complejidad: el nivel 1, la interconversión de los polímeros y los lípidos complejos con los intermediarios monoméricos; el nivel 2, la interconversión de los azúcares monoméricos, los aminoácidos y los lípidos

con los compuestos orgánicos aún más sencillos; y el nivel 3, la degradación final hasta compuestos inorgánicos, como CO_2, H_2O y NH_3, o la síntesis a partir de los mismos. A medida que avancemos en este capítulo, iremos añadiendo nuevos detalles a este cuadro general, presentando de esta forma cada proceso metabólico importante e identificando sus funciones.

A lo largo de nuestra presentación, veremos que las rutas de producción de energía generan también intermediarios que se utilizan en los procesos de biosíntesis. Así pues, aunque nos centraremos en primer lugar en la degradación de los compuestos orgánicos para producir energía, debe tenerse en cuenta que el metabolismo es, en realidad, todo un espectro, de tal manera que muchas de sus reacciones desempeñan funciones tanto en los procesos de degradación como en los de biosíntesis.

El metabolismo intermediario representa fundamentalmente la biosíntesis, la utilización y la degradación de los compuestos de bajo peso molecular.

También utilizaremos los términos **metabolismo intermediario**, **metabolismo energético** y **rutas centrales**. El metabolismo intermediario comprende todas las reacciones relacionadas con el almacenamiento y la generación de energía metabólica y con el empleo de esa energía en la biosíntesis de compuestos de bajo peso molecular y compuestos de almacenamiento de energía. No se incluye la biosíntesis de los ácidos nucleicos y las proteínas a partir de sus precursores monoméricos. Las reacciones del metabolismo intermediario pueden interpretarse como aquellas que no implican un molde de ácido nucleico, puesto que la información necesaria para especificar cada reacción está incluida en la estructura de la enzima que cataliza esa reacción. El metabolismo energético es la parte del metabolismo intermediario formada por las rutas que almacenan o generan energía metabólica. En los Capítulos 12 a 23 se presentará el metabolismo intermediario, y en los Capítulos 13 a 18 se hará especial hincapié en sus aspectos energéticos. Las rutas centrales del metabolismo son básicamente las mismas en muchos organismos muy distintos, y explican las cantidades relativamente grandes de transferencia de masa y de generación de energía que se producen en el interior de una célula; son las rutas principales desde el punto de vista cuantitativo. Más adelante identificaremos y trataremos con mayor detalle cada ruta central, pero por el momento nos centraremos en el proceso global.

La mayoría de los organismos obtienen la materia prima y la energía para la biosíntesis a partir de moléculas de combustible orgánico como la glucosa. Las rutas centrales comprenden la oxidación de las moléculas de combustible y la síntesis de biomoléculas pequeñas a partir de los fragmentos resultantes; estas rutas se encuentran en todos los organismos aerobios. Pero una diferencia fundamental entre estos organismos es el origen de sus moléculas de combustible. Los **autótrofos** (del griego, "que se alimentan a sí mismos") sintetizan la glucosa y todos sus demás compuestos orgánicos a partir del carbono inorgánico, obtenido en forma de CO_2. En cambio, los **heterótrofos** ("que se alimentan a partir de otros") pueden sintetizar sus metabolitos orgánicos únicamente a partir de compuestos orgánicos, que por tanto han de consumir. Una diferencia fundamental entre las plantas y los animales es que las plantas son autótrofas y los animales son heterótrofos. Excepto en el caso de algunas plantas raras que comen insectos, como la Venus atrapamoscas, las plantas verdes obtienen todo su carbono orgánico mediante la fijación fotosintética del dióxido de carbono. Los animales se alimentan de plantas o de otros animales y sintetizan sus metabolitos transformando las moléculas orgánicas que consumen. Los microorganismos presentan una amplia gama de capacidades biosintéticas y de fuentes de energía metabólica.

Los microorganismos presentan también adaptabilidad con respecto a su capacidad de sobrevivir en ausencia de oxígeno. Prácticamente todos los orga-

nismos multicelulares y muchas bacterias son organismos **aerobios** estrictos; dependen por completo de la **respiración**, que es el acoplamiento de la generación de energía con la oxidación de los nutrientes por el oxígeno. En cambio, muchos microorganismos pueden crecer o tienen que hacerlo en medios **anaerobios**, y obtienen su energía metabólica de procesos en los que no interviene el oxígeno molecular.

En tanto en cuanto las moléculas biológicas se sintetizan en última instancia a partir del CO_2 que sufre una fijación de carbono fotosintética, puede considerarse que el sol es el origen último de la energía biológica. Sin embargo, este concepto no es del todo exacto, dada la existencia de organismos extremadamente **termófilos**, que viven a temperaturas de hasta 100°C o superiores, ya sea en las corrientes hidrotérmicas profundas del océano, ya sea en las corrientes geotérmicas de las regiones volcánicas activas. Aunque nos queda mucho que aprender sobre el metabolismo de estos organismos termófilos, parece claro que la mayor parte de su energía metabólica no procede de la luz solar.

Autopistas del mapa de carreteras metabólico

Volvamos ahora a las rutas centrales y a su identificación. Es probable que haya visto mapas metabólicos como los que adornan los laboratorios y despachos de bioquímica. En la Figura 12.1 se presenta un mapa metabólico muy simplificado. La Figura 12.2 muestra el metabolismo con mayor detalle y constituye el mapa de carreteras básico de esta sección del libro. Esta figura volverá a aparecer en capítulos posteriores, y se resaltarán en ella las rutas presentadas en cada capítulo.

Ante los miles de reacciones individuales que constituyen el metabolismo, ¿cómo abordamos este amplio tema? Nuestro primer interés son las rutas centrales y el metabolismo energético. En consecuencia, en los capítulos siguientes analizaremos los procesos de degradación que son más importantes para la generación de energía: el catabolismo de los hidratos de carbono y de los lípidos. También consideraremos cómo se biosintetizan estas sustancias. Estas reacciones se encuentran en la parte media de los mapas metabólicos y se ilustran con las flechas más grandes; son, por así decirlo, las autopistas del mapa de carreteras metabólico.

La analogía del mapa de carreteras resulta útil también cuando consideramos el flujo direccional del metabolismo. De la misma manera que el tráfico fluye de las zonas periféricas al centro de la ciudad por la mañana y en dirección inversa por la tarde, veremos que algunas condiciones favorecen la biosíntesis mientras que otras favorecen el catabolismo, y que se utilizan determinadas partes de las mismas carreteras para ambos tipos de procesos.

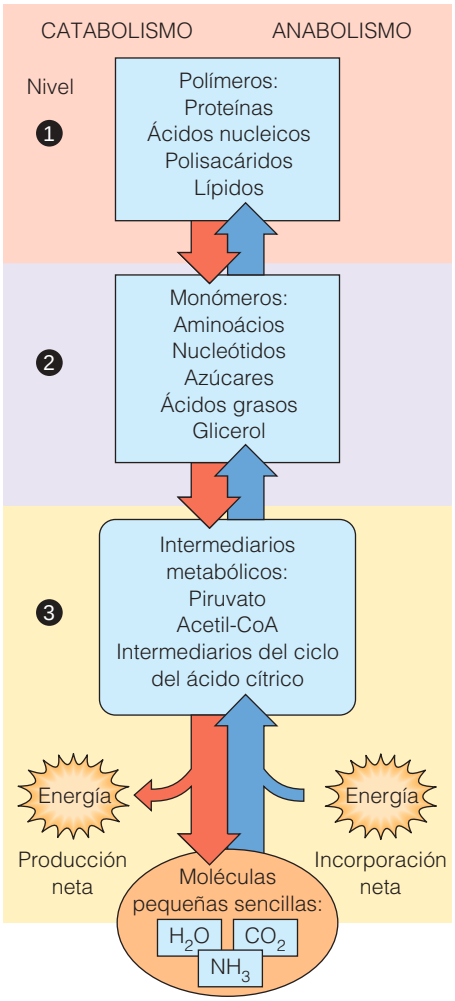


FIGURA **12.1**
Una breve visión general del metabolismo.

Las rutas centrales dan cuenta de la mayor parte de las transformaciones de masa del metabolismo.

RUTAS CENTRALES DEL METABOLISMO ENERGÉTICO

Recuérdese del comentario de la Figura 12.1 que el metabolismo puede subdividirse en tres niveles de complejidad de los metabolitos que intervienen en el mismo. La primera ruta que presentamos con detalle (en el Capítulo 13) es la **glucólisis**, una ruta de nivel 2 para la degradación de los hidratos de carbono, en las células aerobias o anaerobias. Como se esquematiza en la Figura 12.3, la principal entrada a la glucólisis es la glucosa, que generalmente procede de los polisacáridos de almacenamiento de energía o de los hidratos de carbono del alimento. Esta ruta conduce al piruvato, un cetoácido de tres carbonos. Los organismos anaerobios reducen el piruvato a diversos productos, por ejemplo, etanol y dióxido de carbono. Estos procesos se denominan *fermentaciones* (véase la

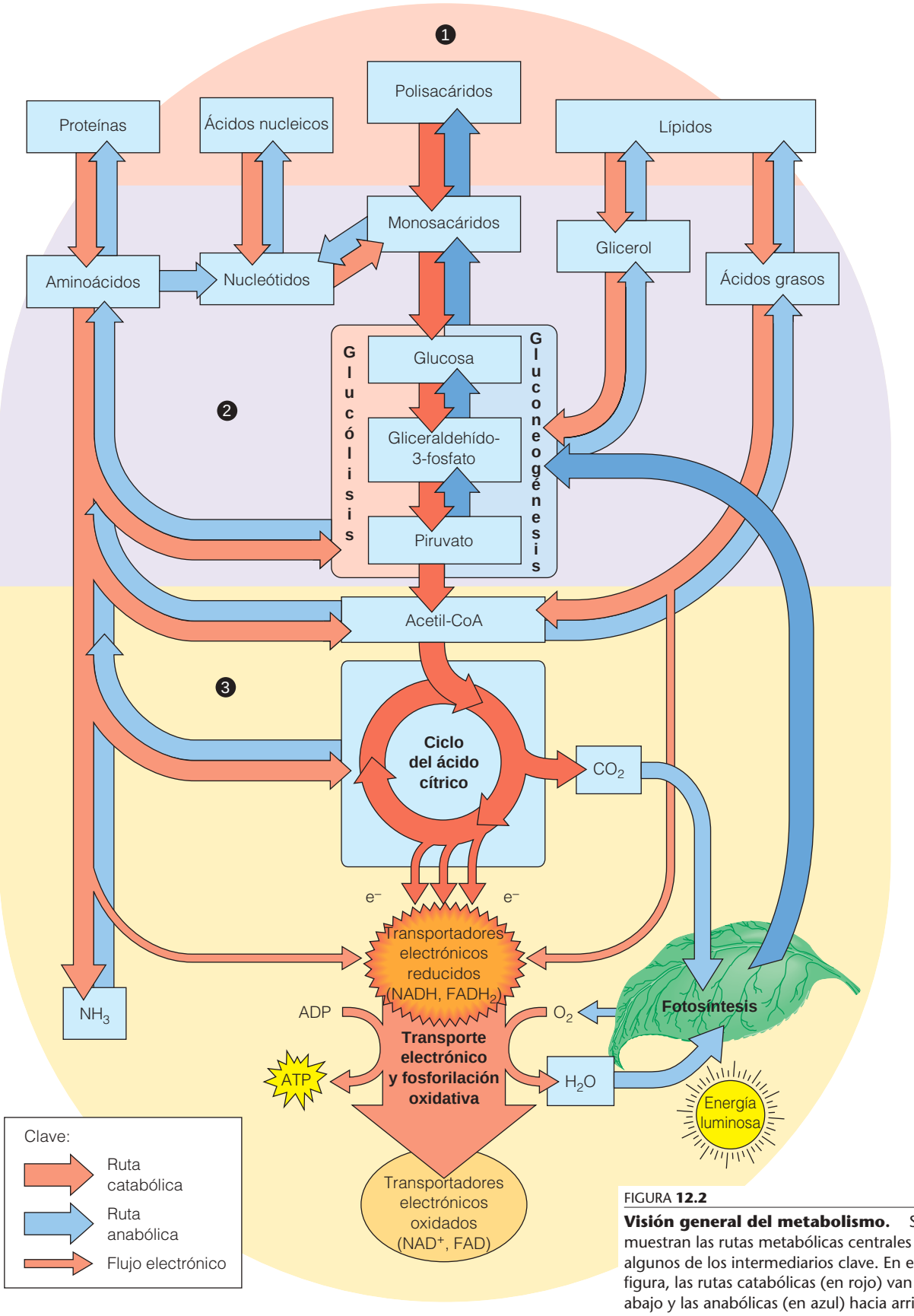


FIGURA **12.2**

Visión general del metabolismo. Se muestran las rutas metabólicas centrales y algunos de los intermediarios clave. En esta figura, las rutas catabólicas (en rojo) van hacia abajo y las anabólicas (en azul) hacia arriba. Obsérvese los tres niveles del metabolismo.

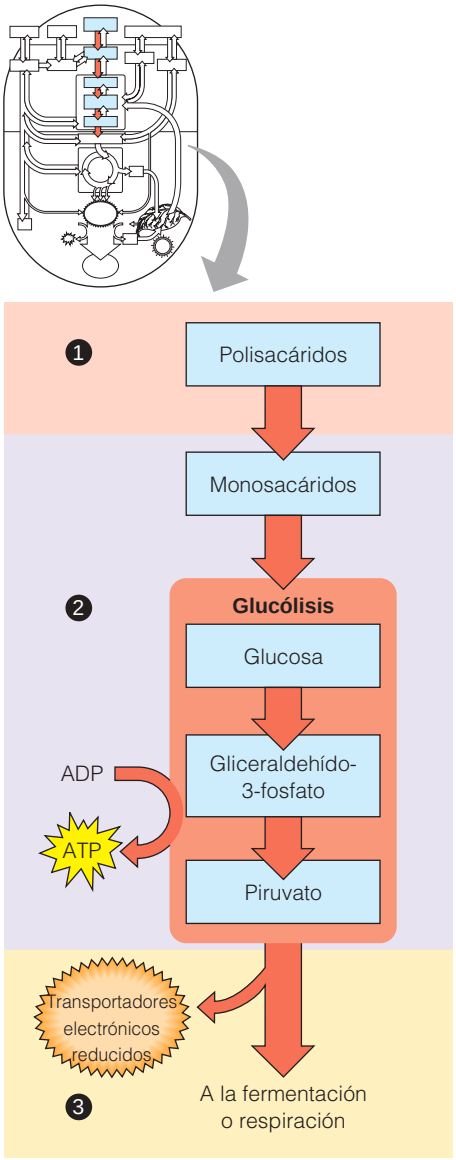


FIGURA **12.3**

Fase inicial del catabolismo de los hidratos de carbono: glucólisis. El piruvato experimenta una reducción en las reacciones de fermentación, o bien entra en el metabolismo oxidativo (respiración) mediante su conversión en acetil-CoA.

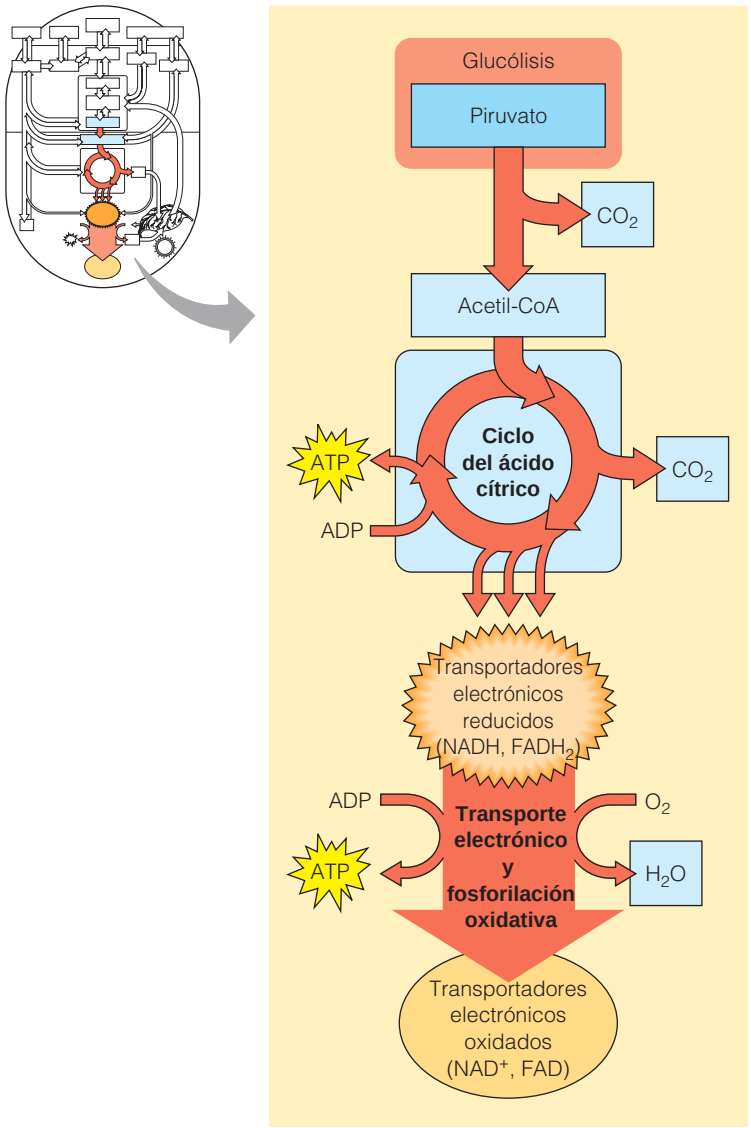


FIGURA **12.4**

Metabolismo oxidativo. El metabolismo oxidativo comprende la oxidación del piruvato, el ciclo del ácido cítrico, el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa. La oxidación del piruvato proporciona acetil-CoA al ciclo del ácido cítrico.

página 472). En el metabolismo oxidativo (respiración), el principal destino del piruvato es su oxidación a un fragmento de dos carbonos metabólicamente activado, la **acetil-coenzima A**, o acetil-CoA (véase la página 552). Los dos carbonos del grupo acetilo sufren posteriormente una oxidación en el **ciclo del ácido cítrico** (Figura 12.4). En los organismos aerobios, el ciclo del ácido cítrico, que se presentará en el Capítulo 14, es la principal ruta de nivel 3. Esta ruta cíclica acepta compuestos de carbono sencillos, procedentes no sólo de los hidratos de carbono, sino también de los lípidos o las proteínas, y los oxida a CO_2. Utilizando de nuevo la analogía de la autopista, veremos que numerosas entradas de las carreteras y desviaciones del metabolismo de los niveles 1 y 2 con-

En los organismos aerobios todas las rutas catabólicas convergen en el ciclo del ácido cítrico.

ducen al ciclo del ácido cítrico. En realidad, todas las rutas catabólicas convergen en este punto.

Las reacciones oxidativas del ciclo del ácido cítrico generan transportadores electrónicos reducidos cuya reoxidación impulsa la biosíntesis de ATP, fundamentalmente a través de procesos de la cadena respiratoria mitocondrial: el **transporte electrónico** y la **fosforilación oxidativa**, que se muestran también en la Figura 12.4. Como se describirá en el Capítulo 15, la membrana mitocondrial utiliza la energía oxidativa para mantener un gradiente transmembrana de concentración de iones hidrógeno, y la descarga de esta energía osmótica está acoplada a la síntesis de ATP a partir de ADP.

Las rutas de nivel 2 distintas de la glucólisis aportan también combustible al ciclo del ácido cítrico. La acetil-CoA procede no sólo de la oxidación del piruvato, sino también de la degradación de los ácidos grasos mediante la ***β*-oxidación** (Figura 12.5; presentada en el Capítulo 18) y de las rutas de oxidación de algunos aminoácidos (Figura 12.6; presentadas en los Capítulos 20 y 21). Si los dos carbonos de la acetil-CoA no se oxidan en el ciclo del ácido cítrico, pueden ir en la dirección anabólica, y proporcionar sustratos para la síntesis de ácidos grasos y esteroides (Figura 12.5; presentada en el Capítulo 18). Éstos y

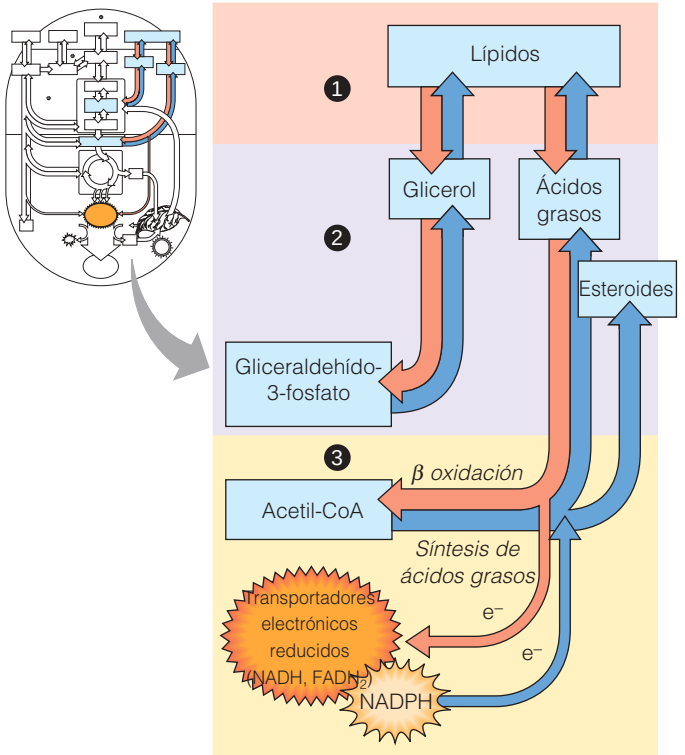


FIGURA **12.5**

Metabolismo de los lípidos y los esteroides. La *β*-oxidación de los ácidos grasos proporciona acetil-CoA al ciclo del ácido cítrico. Las reacciones biosintéticas reductoras utilizan como coenzima NADPH (véase la página 473). No se muestran aquí las rutas que conducen a los fosfolípidos de membrana.

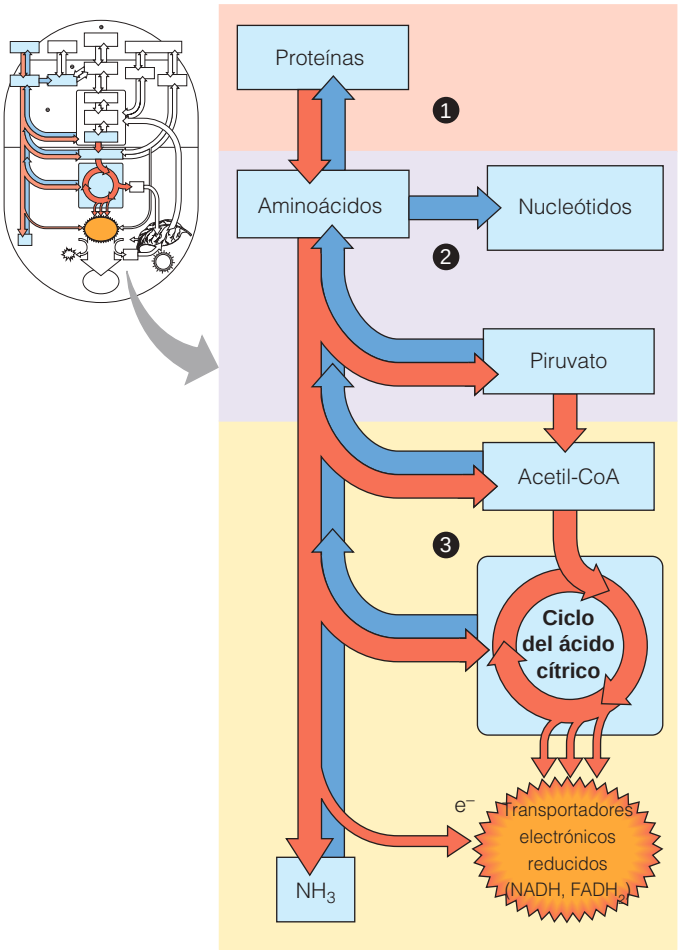


FIGURA **12.6**

Metabolismo de los aminoácidos. Los aminoácidos aportan combustibles al ciclo del ácido cítrico a través de varias rutas, y se emplean también en la biosíntesis de los nucleótidos y de otros muchos metabolitos.

otros procesos de biosíntesis utilizan un transportador electrónico reducido, el NADPH, que es estructuralmente muy similar al NADH (página 473).

Nos ocuparemos de varios procesos importantes de biosíntesis de los hidratos de carbono (Figura 12.7). En el Capítulo 16 se presentará la **gluconeogénesis**, la síntesis de glucosa a partir de precursores que no son hidratos de carbono, y la biosíntesis de polisacáridos, en especial la biosíntesis de glucógeno en las células animales. En el Capítulo 17 presentaremos la **fotosíntesis** (Figura 12.8), el proceso de suma importancia mediante el cual las plantas verdes capturan la energía de la luz para impulsar la generación de energía (ATP) y poder reductor (NADPH), elementos ambos que se utilizan para la síntesis de los hidratos de carbono.

RUTAS DIFERENCIADAS PARA LA BIOSÍNTESIS Y LA DEGRADACIÓN

De las Figuras 12.1 y 12.2 podría deducirse que algunas rutas actúan simplemente como el inverso de otras. Así, por ejemplo, los ácidos grasos se sintetizan a partir de acetil-CoA, pero también se convierten en acetil-CoA por la β-oxidación. De forma análoga, la glucosa-6-fosfato se sintetiza a partir del piruva-

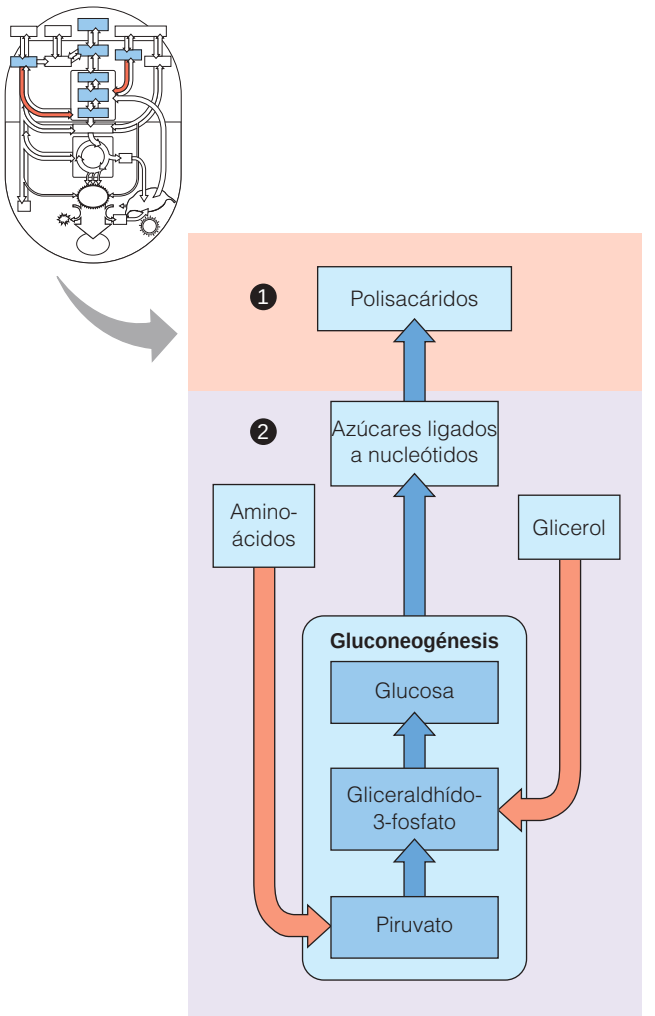


FIGURA **12.7**

Anabolismo de los hidratos de carbono. La biosíntesis de los hidratos de carbono incluye la gluconeogénesis y la síntesis de polisacáridos.

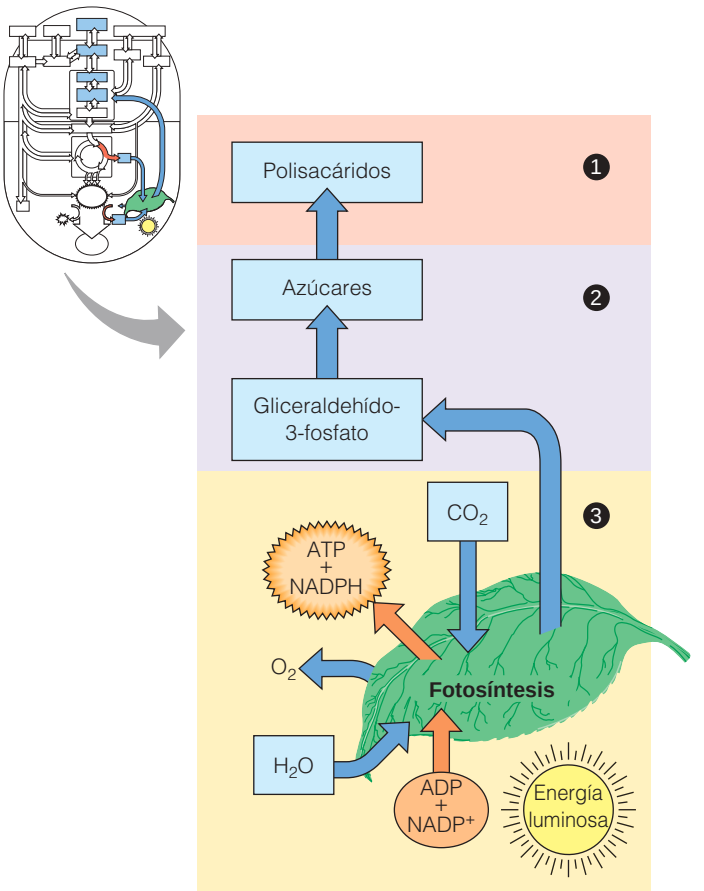


FIGURA **12.8**

Fotosíntesis.

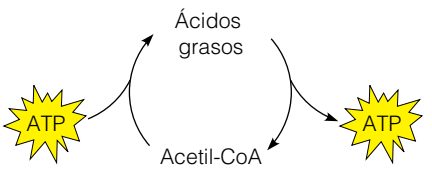
to en la gluconeogénesis, que a primera vista parece una simple inversión de la glucólisis. Es importante apreciar que en estos casos las rutas contrarias son bastante distintas entre sí. Pueden tener en común algunos intermediarios o reacciones enzimáticas, pero se trata de secuencias de reacción distintas, reguladas por mecanismos diferentes y con enzimas distintas para catalizar sus reacciones reguladas. Pueden producirse incluso en compartimientos celulares independientes. Así, por ejemplo, la síntesis de los ácidos grasos se produce en el citosol, mientras que la degradación de los ácidos grasos tiene lugar en las mitocondrias.

Las rutas de biosíntesis y de degradación son diferentes por dos razones: una ruta sólo puede ser exergónica en una dirección, y las rutas deben estar reguladas por separado para evitar ciclos inútiles.

Las rutas de biosíntesis y de degradación rara vez, quizás nunca, son simples inversiones unas de otras, a pesar de que suelen empezar y terminar con los mismos metabolitos. La existencia de rutas diferentes es importante por dos motivos. En primer lugar, para que una ruta se produzca en una determinada dirección, debe ser exergónica en esa dirección. Si una ruta es fuertemente exergónica, la inversión de la misma es endergónica en igual medida en las mismas condiciones.

En segundo lugar, e igualmente importante, está la necesidad de controlar el flujo de metabolitos en relación con el estado bioenergético de una célula. Cuando las concentraciones de ATP son altas, se necesita menos oxidación de carbono en el ciclo del ácido cítrico. En estos momentos, la célula puede almacenar carbono en forma de grasas e hidratos de carbono, por lo que entran en funcionamiento la síntesis de ácidos grasos, la gluconeogénesis y otras rutas relacionadas. Cuando las concentraciones de ATP son bajas, la célula debe movilizar el carbono almacenado para generar sustratos para el ciclo del ácido cítrico, por lo que debe producirse la degradación de los hidratos de carbono y de las grasas. La utilización de rutas distintas para los procesos de biosíntesis y de degradación es crucial para el control, de tal manera que las condiciones que activan una ruta tienden a inhibir la ruta opuesta y viceversa.

Consideremos lo que ocurriría, por ejemplo, si la síntesis y la oxidación de los ácidos grasos se produjeran en el mismo compartimiento celular y de una forma descontrolada. Los fragmentos de dos carbonos liberados mediante oxidación se utilizarían de inmediato para la síntesis, creando una situación denominada **ciclo inútil**. No se realiza un trabajo útil, y el resultado neto es simplemente el consumo de ATP que se utiliza en las reacciones endergónicas de la síntesis de ácidos grasos. Un ciclo inútil similar sería el que podría producirse con la interconversión de la fructosa-6-fosfato en fructosa-1,6-bisfosfato en el metabolismo de los hidratos de carbono.



$$\text{Fructosa-6-fosfato} + \text{ATP} \longrightarrow \text{fructosa-1,6-bisfosfato} + \text{ADP}$$

$$\text{Fructosa-1,6-bisfosfato} + H_2O \longrightarrow \text{fructosa-6-fosfato} + P_i$$

$$\text{Neto:} \quad \text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{ADP} + P_i$$

La compartimentación y el control alostérico de los procesos anabólicos y catabólicos impide los ciclos inútiles que simplemente derrochan energía.

La primera reacción se produce en la glucólisis y la segunda participa en una ruta de biosíntesis, la gluconeogénesis. Ambos procesos tienen lugar en el citosol. El efecto neto de realizar ambas reacciones simultáneamente sería una hidrólisis inútil de ATP a ADP y P_i. Sin embargo, las enzimas que catalizan las dos reacciones indicadas responden a efectores alostéricos, de tal manera que una enzima se inhibe por las condiciones que activan a la otra. De esta forma, un control eficaz impide que se produzca el ciclo inútil, a pesar de que las dos enzimas se encuentren en el mismo compartimiento celular. En consecuencia, es más apropiado denominar a esa situación, con dos reacciones celulares aparentemente opuestas que se controlan de manera independiente, **ciclo de sustrato**.

Los estudios sobre el control metabólico sugieren que un ciclo de sustrato constituye un mecanismo de regulación eficaz, puesto que un pequeño cambio de la actividad de una o ambas enzimas puede tener un efecto muy importante en el flujo de metabolitos en uno u otro sentido. Puede analizar esta idea en el Problema 6, al final de este capítulo.

Algunas consideraciones bioenergéticas

LA OXIDACIÓN COMO FUENTE DE ENERGÍA METABÓLICA

Dado que el centro de interés de los capítulos siguientes será el metabolismo energético, consideraremos ahora brevemente cómo se genera la energía metabólica. Como vimos en el Capítulo 3, una reacción termodinámicamente desfavorable, o endergónica, tiene lugar de manera continuada en la dirección no favorecida únicamente si puede acoplarse a una reacción termodinámicamente favorable, es decir, exergónica. En principio, cualquier reacción exergónica puede ser útil para este fin, siempre que libere una cantidad suficiente de energía libre. En los sistemas vivos, la mayor parte de la energía necesaria para las reacciones de biosíntesis procede de la *oxidación* de sustratos orgánicos. El oxígeno, que es el aceptor último de electrones para los organismos aerobios, es un oxidante potente y tiene una intensa tendencia a atraer electrones, quedando reducido en el proceso. Dada esta tendencia y la abundancia de oxígeno en nuestra atmósfera, no es de extrañar que los sistemas vivos hayan adquirido la capacidad de obtener energía a partir de la oxidación de los sustratos orgánicos.

Oxidaciones biológicas: liberación de energía en pequeños incrementos

En un sentido termodinámico, la oxidación biológica de los sustratos orgánicos es comparable a las oxidaciones no biológicas como la combustión de la madera. La energía libre liberada es la misma tanto si nos referimos a la oxidación del polímero de glucosa celulosa en un incendio forestal, como si hablamos de la combustión de glucosa en un calorímetro o de la oxidación metabólica de glucosa:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -2870 \text{ kJ/mol}$$

La mayor parte de la energía biológica procede de la oxidación de metabolitos reducidos en una serie de reacciones, en las que el oxígeno constituye el aceptor electrónico final.

No obstante, las oxidaciones biológicas son procesos mucho más complejos que la combustión. Cuando se quema madera, toda la energía se libera en forma de calor y no puede realizarse un trabajo útil, excepto por la acción de un dispositivo como una máquina de vapor. En cambio, en las oxidaciones biológicas, las reacciones de oxidación se producen sin que haya un aumento importante de la temperatura y con la captura de parte de la energía libre en forma de energía química. Esta captura de energía se produce, en gran medida, a través de la síntesis de ATP y, como se ha comentado en el Capítulo 3, la hidrólisis del ATP puede acoplarse a muchos procesos para proporcionar energía para el trabajo biológico. En el catabolismo de la glucosa, alrededor del 40% de la energía liberada se utiliza para la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i.

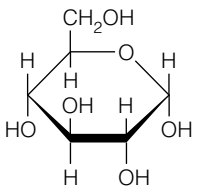
A diferencia de la oxidación de la glucosa por el oxígeno que se ha mostrado en la ecuación anterior, la mayor parte de las oxidaciones biológicas no se producen con una transferencia directa de electrones desde un sustrato reducido al oxígeno (Figura 12.4). Se produce más bien una serie de reacciones de oxidación-reducción acopladas, de tal manera que los electrones pasan a transportadores electrónicos intermediarios como el NAD^+ y finalmente se transfieren al oxígeno. La secuencia de reacción se denomina **cadena de transporte**

electrónico o **cadena respiratoria**, y el oxígeno se denomina **aceptor electrónico terminal**. Dado que la energía potencial almacenada en el sustrato orgánico se libera en pequeños incrementos, es más fácil controlar la oxidación y la captura de parte de la energía a medida que se va liberando, ya que las pequeñas transferencias de energía desperdician menos energía que una única transferencia grande. Esta situación es análoga, hasta cierto punto, a la generación de la potencia hidroeléctrica, en la que una serie de pequeñas caídas de agua en un río genera más electricidad que una sola caída de agua grande, a pesar de que la distancia total que desciende el agua sea la misma en ambos casos.

No toda la energía metabólica procede de la oxidación por el oxígeno. Hay otras sustancias distintas del oxígeno que también pueden actuar como aceptores electrónicos finales. Muchos microorganismos pueden o deben vivir en **anaerobiosis** (en ausencia de oxígeno). La mayor parte de los mismos obtienen su energía mediante **fermentaciones**, que son rutas catabólicas productoras de energía que se llevan a cabo sin un cambio neto del estado de oxidación de los productos, en comparación con el de los sustratos. Un buen ejemplo de ello es la producción de etanol y CO_2 a partir de glucosa, que se presentará en el Capítulo 13. Otras rutas anaerobias de producción de energía son las que se observan en algunas bacterias de corrientes marinas hidrotérmicas profundas, que reducen el azufre a sulfuro como reacción final de transferencia electrónica, así como en otras bacterias que reducen el nitrito a amoníaco. Estos organismos oxidan los sustratos que los mantienen pero utilizan aceptores electrónicos distintos del oxígeno.

Rendimientos energéticos, cocientes respiratorios y equivalentes reductores

Si la energía metabólica procede fundamentalmente de las reacciones oxidativas, de ello se deduce que cuanto más reducido esté un sustrato, mayor será su potencial de generación de energía biológica. Podemos utilizar un calorímetro para medir la producción de calor (entalpía) procedente de la oxidación de las grasas, los hidratos de carbono o las proteínas. La combustión de las grasas proporciona más energía calórica que la combustión de una cantidad equivalente de hidratos de carbono. En otras palabras, la grasa tiene un **contenido calórico** superior al de los hidratos de carbono. Como ejemplo, comparemos la oxidación de la glucosa con la oxidación de un ácido graso saturado característico, el ácido palmítico:



Glucosa

$CH_3(CH_2)_{14}COOH$

Ácido palmítico

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -3.74 \text{ kcal/g}$$

$$C_{16}H_{32}O_2 + 23O_2 \longrightarrow 16CO_2 + 16H_2O \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -9.30 \text{ kcal/g}$$

Convirtiendo las calorías (las unidades de nutrición) en julios (las unidades de la bioquímica), observamos que la oxidación de la glucosa produce 15.64 kJ/g, y la oxidación del ácido palmítico produce 38.90 kJ/g. Los carbonos de las grasas están reducidos, en general, en mayor grado que los de los hidratos de carbono, por lo que contienen más protones y electrones que pueden combinarse con el oxígeno en la ruta que conduce al CO_2 que los carbonos del azúcar. Podemos comprobarlo contando los átomos de oxígeno. La glucosa tiene más oxígenos por cada carbono que el ácido palmítico. Cada carbono de la glucosa está ligado al menos a un átomo de oxígeno.

También podemos decir que la glucosa es la sustancia más oxidada, puesto que su oxidación produce más moles de CO_2 por mol de O_2 consumido durante la oxidación. Esta proporción se denomina **cociente respiratorio** o **CR**. Las ecuaciones anteriores indican que el CR de la glucosa es de 1 ($6CO_2/6O_2$), mientras que el del ácido palmítico es de 0.70 ($16CO_2/23O_2$). En general, cuan-

to más bajo es el CR de un sustrato, se consume más oxígeno por carbono oxidado y mayor es el potencial de generación de energía por mol de sustrato.

Otra forma de expresar el grado de oxidación de un sustrato es decir que se obtienen más **equivalentes reductores** de la oxidación de una grasa que de la oxidación de un hidrato de carbono. Un equivalente reductor puede definirse como 1 mol de átomos de hidrógeno (un protón y un electrón por átomo de H). Así, por ejemplo, se utilizan dos equivalentes reductores en la reducción de un átomo de oxígeno a agua:

$$\tfrac{1}{2}O_2 + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O$$

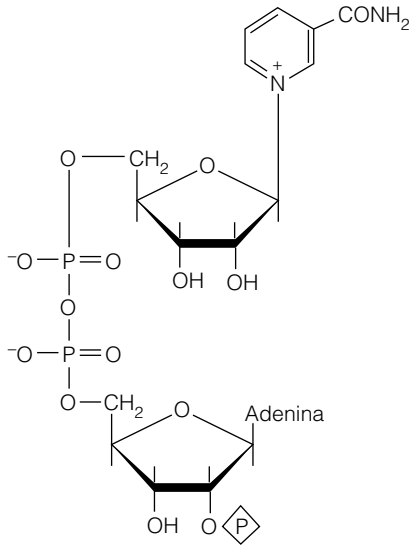
Igual que la degradación de un compuesto orgánico complejo produce tanto energía como equivalentes reductores, la biosíntesis de estos compuestos utiliza ambas cosas. Así, por ejemplo, sabemos que los dos carbonos del acetato se utilizan para la biosíntesis de los ácidos grasos:

$$8CH_3COO^- \longrightarrow \longrightarrow \longrightarrow CH_3(CH_2)_{14}COO^-$$

Acetato **Palmitato**

Quince de los 16 átomos de carbono del palmitato están muy reducidos: 14 al nivel de metileno y 1 al nivel de metilo. En consecuencia, son necesarios muchos equivalentes reductores para completar esta biosíntesis.

La principal fuente de electrones para la biosíntesis reductora es el **NADPH, el dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato** (**reducido**). El $NADP^+$ y el NADPH son idénticos al NAD^+ y al NADH, respectivamente, excepto que los primeros tienen un grupo fosfato adicional esterificado en C-2′ en el grupo adenilato. El NAD^+ y el $NADP^+$ son equivalentes en su tendencia termodinámica a aceptar electrones, ya que poseen unos potenciales estándar de reducción iguales (que se comentarán más adelante en el Capítulo 15). Sin embargo, por razones que todavía no están claras, las enzimas ligadas a los nucleótidos de nicotinamida que actúan fundamentalmente en una dirección catabólica suelen utilizar el par NAD^+-NADH, mientras que las que actúan principalmente en rutas anabólicas utilizan $NADP^+$ y NADPH. En otras palabras, como se indica en la Figura 12.9, las enzimas ligadas a los nucleótidos de nicotinamida que oxidan sustratos (deshidrogenasas) suelen emplear NAD^+, mientras que las enzimas que reducen sustratos (reductasas) emplean generalmente NADPH. Una excepción es la de las dos deshidrogenasas de la **ruta de las pentosas fosfato** (véase el Capítulo 14), que convierten el $NADP^+$ en NADPH y constituyen la principal ruta de síntesis del nucleótido reducido.



$NADP^+$
Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (oxidado)

El NAD^+ es el cofactor de la mayoría de las deshidrogenasas que oxidan metabolitos. El NADPH es el cofactor de la mayoría de las reductasas.

EL ATP COMO MONEDA DE ENERGÍA LIBRE

El ATP se denomina comúnmente como "la moneda de energía libre". ¿Qué significa esto? La moneda es un medio de intercambio. Un billete de veinte dólares posee un valor generalmente reconocido que puede cambiarse con facilidad por diversas mercancías o servicios, por ejemplo, cuatro pares de calcetines, o una comida en un restaurante de precio moderado o alrededor de media hora de trabajo de un mecánico de automóviles cualificado. En el mismo sentido, las células intercambian la energía liberada en la rotura del ATP para llevar a cabo funciones esenciales, a menudo convirtiendo la energía química liberada en la hidrólisis del ATP en otras formas de energía como, por ejemplo, energía mecánica en la contracción muscular, o energía eléctrica en la conducción de los impulsos nerviosos, o energía osmótica en el transporte de sustancias a través de las membranas en contra de un gradiente de concentración.

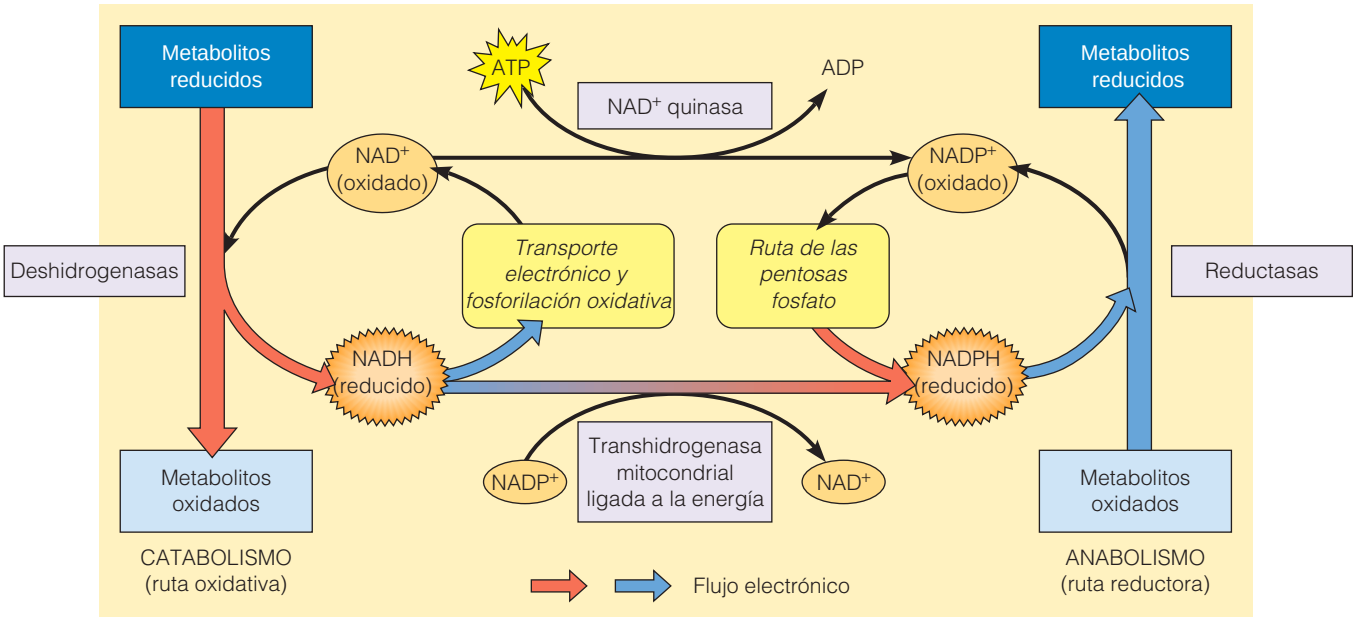


FIGURA **12.9**

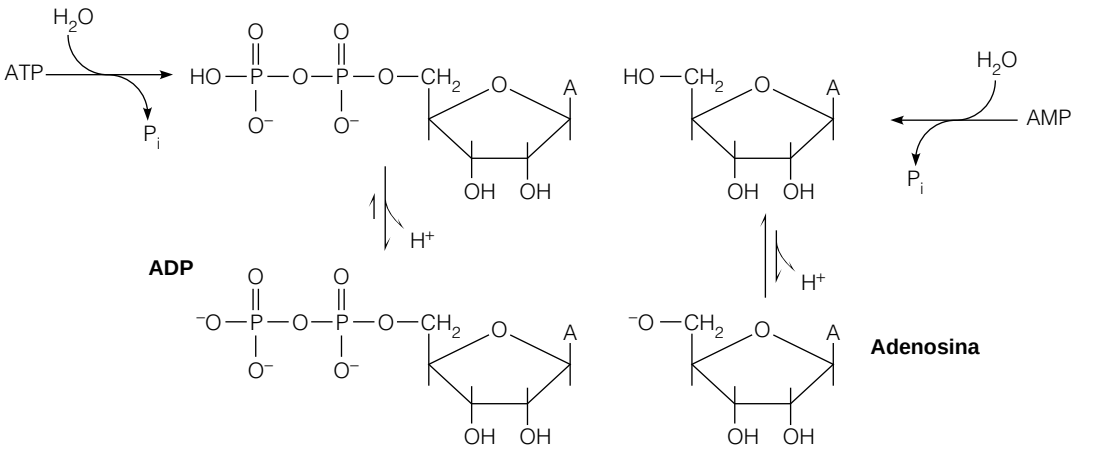
Nucleótidos de nicotinamida en el catabolismo y la biosíntesis. El NAD^+ es el cofactor de la mayoría de las enzimas que actúan en la dirección de oxidación de los sustratos (deshidrogenasas), mientras que el NADPH suele actuar como cofactor para las reductasas, que son enzimas que catalizan la reducción del sustrato. El NADPH se sintetiza o bien a partir del $NADP^+$ en la ruta de las pentosas fosfato (véase el Capítulo 14), o bien a partir del NADH mediante la acción de la transhidrogenasa mitocondrial ligada a la energía (véase el Capítulo 15). El $NADP^+$ se sintetiza a partir del NAD^+ por una quinasa dependiente de ATP.

Propiedades termodinámicas del ATP

¿Qué factores dotan al ATP para su función especial como moneda energética? En primer lugar, no hay nada distintivo en la química del ATP; los enlaces fosfoanhídrido, cuya rotura puede acoplarse para realizar reacciones endergónicas, también los tienen los demás nucleósidos di y trifosfato, y varios otros metabolitos. Cuando llamamos al ATP "un compuesto de energía elevada", como lo hicimos en el Capítulo 3, utilizamos ese término dentro de un contexto definido, esto es, un compuesto de energía elevada es aquel que contiene, al menos, un enlace con un $\Delta G^{o\prime}$ de hidrólisis elevado. El ATP posee dos enlaces fosfoanhídrido. La rotura de uno produce adenosina difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (P_i), y la rotura del otro da adenosina monofosfato (AMP) y pirofosfato (PP_i). Cualquiera de las dos reacciones tiene lugar con un $\Delta G^{o\prime}$ de hidrólisis de unos –31 kJ/mol. Sin embargo, obsérvese que llamar a una sustancia compuesto de energía elevada no significa que sea químicamente inestable o anormalmente reactivo. En realidad, el ATP es un compuesto relativamente estable y su hidrólisis espontánea es lenta, pero cuando se produce la hidrólisis, ya sea espontáneamente o catalizada por una enzima, se libera una energía libre sustancial. Sin embargo, tenga en cuenta que la utilización de esa energía para impulsar reacciones endergónicas normalmente *no* implica la hidrólisis, sino que la rotura del ATP está normalmente acoplada con una reacción termodinámicamente desfavorable, como la síntesis de glucosa-6-fosfato a partir de glucosa. En este caso, el fosfato liberado del ATP no se transforma en P_i sino que se transfiere a la glucosa para formar el fosfato esterificado de la glucosa-6-fosfato. De esta ma-

nera, probablemente es más exacto decir que el ATP tiene un "potencial de transferencia de grupo fosfato" elevado, que llamarle un compuesto de energía elevada. Hasta que entienda el contexto en que se emplea el término, el concepto de compuesto de energía elevada es bastante útil.

Recuérdese del Capítulo 3 que varios factores contribuyen a la estabilidad termodinámica de un enlace hidrolizable y determinan si el $\Delta G^{o\prime}$ es relativamente elevado, como en los enlaces anhídrido fosfato del ATP, el ADP o el pirofosfato, o relativamente bajo, como en los enlaces éster fosfato de la glucosa-6-fosfato o del AMP. Estos factores incluyen la repulsión electrostática entre las cargas negativas en la molécula antes de la hidrólisis, la estabilización de resonancia de los productos de hidrólisis y la tendencia de los productos de hidrólisis a desprotonarse (véase las páginas 87-88). Como contrapunto, la hidrólisis de un éster fosfato, como el AMP, genera un alcohol (el hidroxilo 5′ del azúcar), que casi no tiene tendencia a perder un protón.



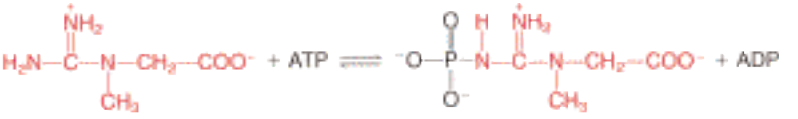
Los factores mencionados anteriormente se combinan para dar al ATP un $\Delta G^{o\prime}$ de –31 kJ/mol, el doble del potencial de transferencia de fosfato de ésteres fosfato como el AMP. Por otro lado, varios metabolitos importantes poseen valores de $\Delta G^{o\prime}$ mucho más negativos que el del ATP. Entre los ejemplos se encuentran el fosfoenolpiruvato, el 1,3-bisfosfoglicerato y la creatina fosfato (véase la Figura 3.7), con valores de $\Delta G^{o\prime}$ de –62, –49 y –43 kJ/mol, respectivamente. Esto significa que el ATP se encuentra realmente en el medio de la escala de "salud energética". Esto también es importante, ya que significa que la rotura de un compuesto de "energía super-elevada" como el fosfoenolpiruvato puede acoplarse para impulsar la síntesis del propio ATP a partir de ADP y P_i. De hecho, estas reacciones acopladas, denominadas reacciones de **fosforilación a nivel de sustrato**, representan el proceso mediante el cual se sintetiza ATP en la glucólisis, como señalaremos en el Capítulo 13.

La importancia de las diferencias entre $\Delta G'$ y $\Delta G^{o\prime}$

¿Qué es lo que proporciona la energía para la síntesis de compuestos con un potencial de transferencia de fosfato mucho mayor que el del propio ATP? La respuesta radica, en su mayor parte, en el hecho de que los valores de $\Delta G'$ en las condiciones intracelulares son bastante diferentes de los valores estándar ($\Delta G^{o\prime}$), lo cual se debe principalmente a que las concentraciones intracelulares son muy diferentes de las concentraciones 1 M que se utilizan para obtener las energías libres estándar. Si hace el Problema 5 al final de este capítulo, verá que la hidrólisis del ATP tiene un valor de $\Delta G'$ considerablemente mayor a las concen-

traciones intracelulares de ATP, ADP y AMP que el que tiene en condiciones estándar, lo cual permite al ATP impulsar la síntesis del compuesto de mayor contenido energético creatina fosfato. Este compuesto hace de lanzadera de energía de enlace fosfato desde el ATP de la mitocondria a las miofibrillas, donde esa energía de enlace se transduce a la energía mecánica de la contracción muscular.

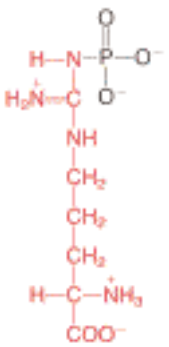
La creatina fosfato se sintetiza dentro de la mitocondria por la enzima **creatina quinasa**:



Creatina **Creatina fosfato**

A partir de los valores respectivos de $\Delta G^{\circ\prime}$ para la creatina fosfato y el ATP se puede calcular que esta reacción es endergónica en condiciones estándar, con un valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ de +12 kJ/mol. Sin embargo, debido a que las concentraciones de ATP son muy elevadas dentro de la mitocondria, y las concentraciones de creatina fosfato son relativamente bajas, la reacción es exergónica tal y como está escrita y se desplaza hacia la derecha. La creatina fosfato difunde, a continuación, desde las mitocondrias a las miofibrillas, donde proporciona la energía necesaria para la contracción muscular. No obstante, la fuente directa de energía para la contracción es otra vez la hidrólisis del ATP. Las concentraciones elevadas de ADP que se forman durante la contracción favorecen la reacción inversa, es decir, la nueva síntesis de ATP, a costa de la ruptura de la creatina fosfato a creatina que posteriormente puede volver a la mitocondria para sintetizar de nuevo creatina fosfato. La popularidad de la creatina como suplemento dietético en los atletas, para incrementar la fuerza muscular, sugiere que la biosíntesis de la propia creatina (véase la ruta en el Capítulo 20) puede ser un factor limitante de la operación de esta lanzadera intracelular de energía.

El ATP puede impulsar la síntesis de compuestos de energía más alta, si las concentraciones intracelulares fuera del equilibrio hacen que estas reacciones sean exergónicas.

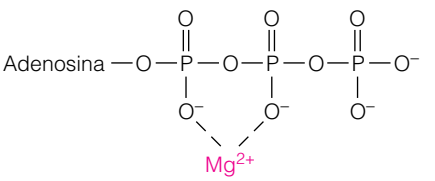


Arginina fosfato

En algunos animales invertebrados, la **arginina fosfato**, en lugar de la creatina fosfato, desempeña una función similar como almacén de fosfato de energía elevada para la producción rápida de ATP cuando sea necesaria. En ambos casos, las concentraciones variables de los nucleótidos de adenina en los dos ambientes, las mitocondrias y las miofibrillas, ambos con concentraciones alejadas de los valores estándar, son cruciales para entender la forma en la que pueden sintetizarse y utilizarse los compuestos de "energía super-elevada".

Sin embargo, además de la concentración, otros factores se combinan para hacer los ΔG biológicos bastante distintos de los valores estándar. Por ejemplo, al aumentar el pH, aumenta la carga negativa del ATP, lo cual a su vez aumenta la repulsión electrostática entre los átomos de oxígeno ligados a los átomos de fósforo adyacentes, y esto a su vez promueve la hidrólisis, haciendo el ΔG más negativo.

Es significativo también el hecho de que la mayor parte del ATP esté como quelato dentro de las células, como un complejo con Mg^{2+}:



El ADP está también como complejo con el Mg^{2+}, pero el ADP tiene una afinidad por el Mg^{2+} diferente de la del ATP. La modificación de la concentración de Mg^{2+} cambiará ΔG de forma complicada, dependiendo de las afinidades relativas de los reactantes y los productos por el ion magnesio. (Véase el artículo de R. Alberty citado en la Bibliografía del Capítulo 3 para un tratamiento detallado de los efectos del pH, el magnesio y otras condiciones iónicas.)

Otros nucleótidos de energía elevada

Como se ha señalado antes, no hay nada singular en las propiedades del ATP que le adjudiquen la función especial como moneda energética. Los demás nucleósidos trifosfato, y otros nucleótidos más complejos, como el NAD^+, poseen valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ cercanos a –31 kJ/mol y podrían haber sido elegidos para la función que realiza el ATP. Sin embargo, la evolución ha creado una serie de enzimas que se unen preferentemente al ATP y utilizan su energía libre de hidrólisis para impulsar las reacciones endergónicas. Existen excepciones, como el empleo de GTP como el principal suministrador de energía en la síntesis de proteínas. Sin embargo, la energía del enlace fosfato se crea casi exclusivamente al nivel del nucleótido de adenina, a través de la fosforilación oxidativa en las células aerobias, la fotosíntesis en las plantas y la glucólisis en prácticamente todos los organismos. Como consecuencia de esto, el ATP es realmente el nucleótido más abundante.

En la mayor parte de las células, las concentraciones de ATP de 2-8 mM, son varios órdenes de magnitud superiores que las de otros nucleósidos trifosfato y también varios órdenes de magnitud superiores que las concentraciones de ADP o AMP. Estos factores proporcionan al ATP una fuerte tendencia a distribuir su fosfato γ (el más exterior) en la síntesis de otros nucleósidos trifosfato. Esto se produce por la acción de la **nucleósido difosfato quinasa**, que sintetiza CTP a partir de CDP en el ejemplo siguiente

$$ATP + CDP \rightleftharpoons ADP + CTP$$

La nucleósido difosfato quinasa es activa con una gran variedad de donadores y aceptores de fosfato. Debido a que su constante de equilibrio es cercana a la unidad y a que el ATP es el nucleótido más abundante dentro de las células, la enzima normalmente utiliza ATP para impulsar la síntesis de los otros ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos trifosfato comunes a partir de sus difosfatos respectivos.

Algunas reacciones metabólicas, como la activación de los aminoácidos para la síntesis de proteínas, rompen el ATP, no a ADP y P_i, sino a AMP y PP_i. La conversión de AMP en ATP que permite la reutilización del nucleótido, utiliza otra enzima, la **adenilato quinasa** (denominada también mioquinasa debido a su abundancia en el músculo).

$$AMP + ATP \rightleftharpoons 2ADP$$

El ADP se reconvierte en ATP mediante la fosforilación a nivel de sustrato, fosforilación oxidativa, o (en las plantas) energía fotosintética. Debido a que la reacción es fácilmente reversible, también puede utilizarse para volver a sintetizar ATP cuando aumenta la concentración de ADP, por ejemplo, tras un incremento brusco del consumo de energía. Esta función es de especial importancia en el metabolismo muscular.

Carga energética de adenilato

Como se ha señalado más arriba, las concentraciones de ATP normalmente son mucho mayores que las concentraciones de ADP y AMP en las células bien

nutridas y con energía suficiente. Muchas enzimas que participan en la regulación de las rutas de generación o de almacenamiento de energía son muy sensibles a las concentraciones de los nucleótidos de adenina. En general, las rutas que generan energía, como la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico, se activan por los estados de energía baja, cuando las concentraciones de ATP son relativamente bajas y las de ADP y AMP son relativamente altas. Es útil poder describir la situación energética de una célula en términos cuantitativos. Daniel Atkinson ha comparado la célula con una batería. Cuando la batería celular está completamente cargada, todos los ribonucleótidos de adenina se encuentran presentes en forma de ATP. Cuando está totalmente descargada, todo el ATP se ha degradado a AMP. Atkinson ha propuesto el término **carga energética de adenilato**, que se define en términos de las concentraciones intracelulares de ATP, ADP y AMP.

$$\text{Carga energética de adenilato} = \frac{[\text{ATP}] + 0.5[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]} \qquad (12.1)$$

El término es la proporción de los enlaces totales de gran energía que pueden estar presentes en los nucleótidos de adenina de una célula con relación a los que están realmente presentes. Obsérvese que el ADP tiene un enlace de gran energía en comparación con los dos del ATP, de forma que tiene la mitad de peso que el ATP en el numerador de la ecuación (12.1). Las células aerobias bien nutridas normalmente tienen valores de la carga energética de adenilato cercanos a 0.9, como corresponde a concentraciones de ATP mucho mayores que las de ADP o AMP.

Principales mecanismos de control metabólico

La célula viva utiliza una maravillosa gama de dispositivos de regulación para controlar sus funciones. Entre estos mecanismos se encuentran los que actúan fundamentalmente controlando la *actividad* enzimática, como por ejemplo, la concentración de sustrato y el control alostérico, que se han considerado en el Capítulo 11. El control de la *concentración* enzimática, mediante la regulación de la síntesis y degradación de las enzimas, se analizará en los Capítulos 26-28. En las células eucariotas, la *compartimentación* constituye otro mecanismo de regulación, que permite controlar el destino de un determinado metabolito mediante el flujo del mismo a través de una membrana. Por encima de todos estos mecanismos se encuentran las acciones de las *hormonas*, mensajeros químicos que actúan a todos los niveles de regulación.

CONTROL DE LAS CONCENTRACIONES ENZIMÁTICAS

Si preparara un extracto sin células de un determinado tejido y determinara las concentraciones intracelulares de diversas enzimas, observaría enormes diferencias. Las enzimas de las rutas centrales de generación de energía se encuentran en cantidades de muchos miles de moléculas por célula, mientras que las enzimas que tienen funciones limitadas o especializadas podrían estar presentes en una cantidad inferior a la docena de moléculas por célula. La electroforesis en gel bidimensional de un extracto celular (véase Herramientas de la Bioquímica 12A) nos aporta una estimación aproximada, basada en las diferencias de intensidad de las manchas, de la amplia variación que existe en las cantidades de las diversas proteínas que se encuentran en una determinada célula.

La concentración de una determinada enzima puede variar también mucho en distintas condiciones ambientales, debido en gran parte a la variación de la velocidad de síntesis de la enzima. Por ejemplo, cuando se añade un sustrato utilizable a un medio de cultivo bacteriano, la abundancia de las enzimas necesarias para procesar el sustrato puede aumentar, gracias a la síntesis de nueva proteína desde menos de una molécula por célula a muchos miles de moléculas por célula. Este fenómeno se denomina **inducción** enzimática. De forma análoga, la presencia del producto final de una ruta puede desactivar la síntesis de las enzimas que son necesarias para generar ese producto final, un proceso denominado **represión**.

Las concentraciones enzimáticas en una célula pueden variar como respuesta a las variaciones de las necesidades metabólicas.

Durante cierto tiempo se pensó que el control de la concentración intracelular de una proteína se basaba principalmente en el control de la *síntesis* de dicha proteína, es decir, mediante regulación genética. Actualmente sabemos que la *degradación* intracelular de las proteínas es importante también para determinar las concentraciones de las enzimas.

CONTROL DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad enzimática se regula por la interacción con sustratos, productos y efectores alostéricos, y por la modificación covalente de la proteína enzimática.

La *actividad catalítica* de una molécula enzimática puede controlarse de dos formas: mediante la interacción reversible con los ligandos (sustratos, productos o modificadores alostéricos) y mediante la modificación covalente de la molécula proteica.

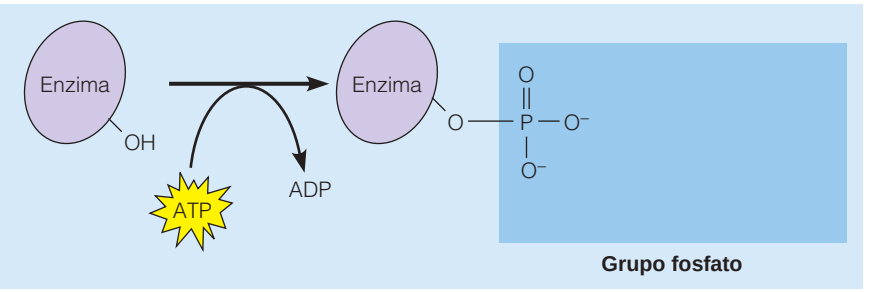
Los ligandos que controlan la actividad enzimática pueden ser polímeros. Así, por ejemplo, las interacciones proteína-proteína pueden afectar a la actividad enzimática, y hay varias enzimas del metabolismo de los ácidos nucleicos que se activan mediante la unión al DNA. Nuestro interés se centra ahora en los ligandos de bajo peso molecular, principalmente los sustratos y los efectores alostéricos. Los sustratos suelen estar presentes en el interior de las células a unas concentraciones inferiores a los valores de K_M de las enzimas que actúan sobre ellos, pero sin apartarse en más de un orden de magnitud de estos valores. En otras palabras, las concentraciones de sustrato se encuentran generalmente dentro de los límites de primer orden de las curvas concentración de sustrato-velocidad de las enzimas que actúan sobre ellos. Por lo tanto, las actividades enzimáticas responden a pequeños cambios de la concentración de sustrato.

En el Capítulo 11 vimos que la activación o inhibición alostéricas actúan generalmente sobre determinados pasos de una ruta metabólica, frecuentemente las reacciones iniciales. Los efectores actúan uniéndose a lugares de regulación específicos, con lo que afectan a las interacciones entre distintas subunidades en la proteína enzimática. Este efecto facilita o dificulta, a su vez, la unión de los sustratos. Un mecanismo de este tipo tiene una actuación obvia para controlar la formación de producto si una ruta es unidireccional y sin ramificar. Sin embargo, algunos sustratos intervienen en numerosas rutas, y ello hace que existan muchos puntos de ramificación. En consecuencia, algunas de las enzimas alostéricas que describiremos ejercen una regulación algo más compleja que la de los ejemplos presentados en el Capítulo 11.

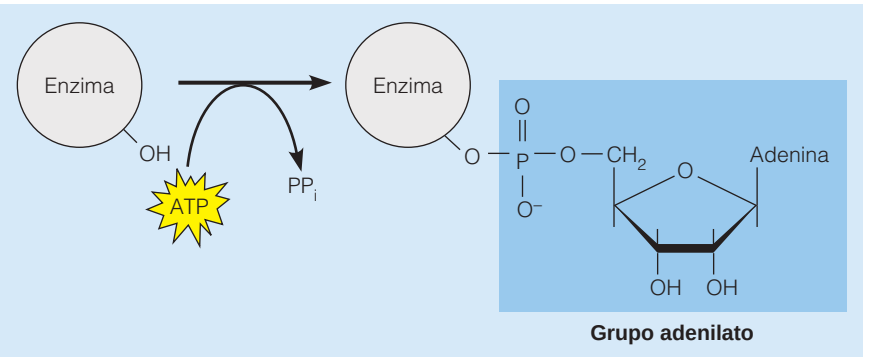
La modificación covalente de la estructura enzimática constituye otra forma eficaz de controlar la actividad enzimática. En la Figura 12.10 se presentan tres tipos de modificación covalente. En el Capítulo 11 presentamos la regulación de la actividad de la glucógeno fosforilasa, que se ejerce a través de la **fosforilación** dependiente del ATP de un residuo específico de serina. Otras proteínas pueden sufrir una fosforilación de residuos de treonina o tirosina. Otras reacciones más complejas implican una **adenililación**, es decir, la transferencia de un adenilato desde el ATP, y una **ADP-ribosilación**, es decir, la transferencia de un

FIGURA **12.10**

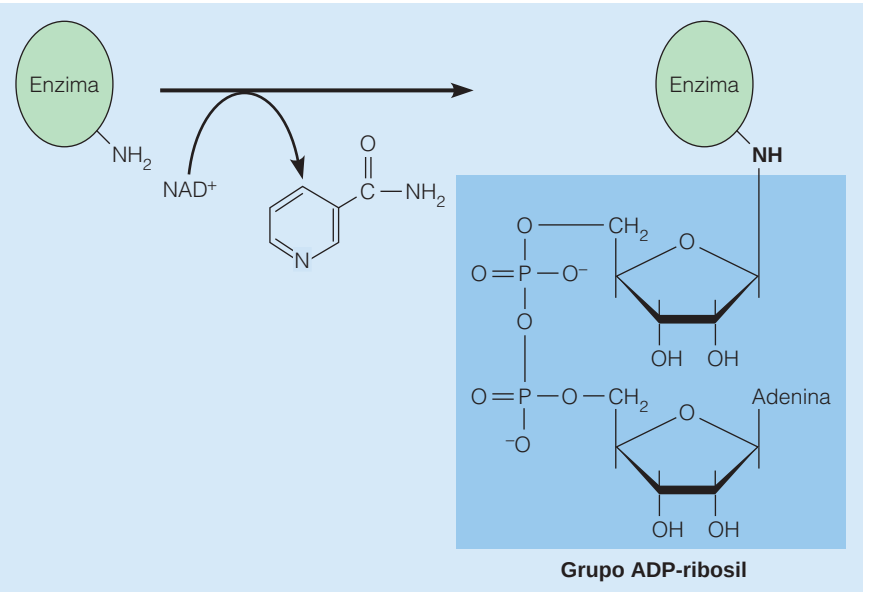
Tres tipos de modificaciones covalentes que controlan las actividades de las enzimas. El residuo que se fosforila o se adenilila suele ser la serina, la treonina o la tirosina, mientras que la ADP-ribosilación puede afectar a la arginina o a un residuo de histidina modificada.



(a) Fosforilación



(b) Adenililación



(c) ADP-ribosilación

ADP-ribosilo procedente del NAD^+. Sin embargo, la fosforilación es, con mucho, la modificación covalente más utilizada para el control de la actividad enzimática.

El control a través de la modificación covalente se asocia frecuentemente con cascadas reguladoras. La modificación activa una enzima, que a su vez actúa sobre una segunda enzima, la cual puede activar todavía a una tercera, que finalmente actúa sobre el sustrato. Dado que las enzimas actúan de manera catalítica, esta cascada proporciona una forma eficaz de *amplificar* la señal

biológica inicial. Supongamos que la señal original que modifica la enzima A la activa 10 veces, que, a continuación, la enzima A modificada activa la enzima B 10 veces y que finalmente la enzima C se activa 10 veces. De esta forma, con la participación de un número relativamente bajo de moléculas de enzima se activa una ruta 1000 veces.

La primera cascada reguladora que se llegó a conocer bien fue la que controla la degradación del glucógeno en las células animales, un proceso crucial que proporciona sustratos de hidratos de carbono para la generación de energía. Esta cascada reguladora, que comporta una fosforilación y desfosforilación enzimáticas, se ha presentado en el Capítulo 11 y se describirá con mayor detalle en el Capítulo 13. La coagulación de la sangre, que también se ha descrito en el Capítulo 11, es otra cascada reguladora bien conocida.

Un gran interés por las reacciones de modificación proteica se ha centrado en los productos proteicos de los **oncogenes** (genes causantes de cáncer), muchos de los cuales son **proteína quinasas**. Las actividades aberrantes de estas enzimas, que fosforilan a otras proteínas en el interior de una célula y alteran sus actividades, intervienen en la transformación de una célula normal en una célula cancerosa, como se comentará en el Capítulo 23.

COMPARTIMENTACIÓN

Hemos descrito ya la división física del trabajo que se produce en una célula eucariota, en el sentido de que las enzimas que participan en el mismo proceso están situadas en un *compartimiento* concreto dentro de la célula. Así, por ejemplo, las RNA polimerasas se encuentran en el núcleo y el nucléolo, que es en donde se produce la transcripción del DNA, y las enzimas del ciclo del ácido cítrico están todas en las mitocondrias. En la Figura 12.11 se presentan las localizaciones de diversas rutas metabólicas dentro de las células eucariotas.

La compartimentación crea una división del trabajo en el interior de una célula, lo cual aumenta la eficacia de la función celular. Además, la compartimentación tiene una función reguladora importante. Esta función deriva en gran parte de la permeabilidad selectiva de las membranas para los distintos metabolitos, con lo que se controla el paso de intermediarios desde un compartimiento a otro. Es característico que los intermediarios de una ruta queden atrapados en el interior de un orgánulo, mientras que los transportadores específicos permiten la entrada de los sustratos y la salida de los productos. El flujo a través de una ruta puede regularse, por tanto, mediante el control de la velocidad con la que un sustrato entra en el compartimiento. Así, por ejemplo, una de las formas por las que la hormona insulina estimula la utilización de los hidratos de carbono es desplazando los transportadores de glucosa hacia la membrana plasmática, de manera que pueda producirse con mayor facilidad la captación de glucosa en las células para el catabolismo o para la síntesis de glucógeno.

La compartimentación es algo más que una simple acumulación de enzimas en los orgánulos adecuados. La yuxtaposición de las enzimas que catalizan reacciones secuenciales localiza a los sustratos incluso en ausencia de orgánulos limitados por membranas. Las posibilidades de difusión se reducen, ya que el producto de una reacción se libera cerca del lugar activo de la enzima siguiente de la ruta. Las enzimas pueden estar unidas unas a otras en una membrana, como ocurre con las enzimas del transporte electrónico mitocondrial. Otra posibilidad es que puedan formar parte de un complejo de múltiples proteínas, muy organizado, como el complejo piruvato deshidrogenasa, un punto principal de entrada al ciclo del ácido cítrico.

Las enzimas que catalizan reacciones secuenciales suelen estar asociadas, incluso en el citosol, en donde las estructuras organizadas son difíciles de observar.

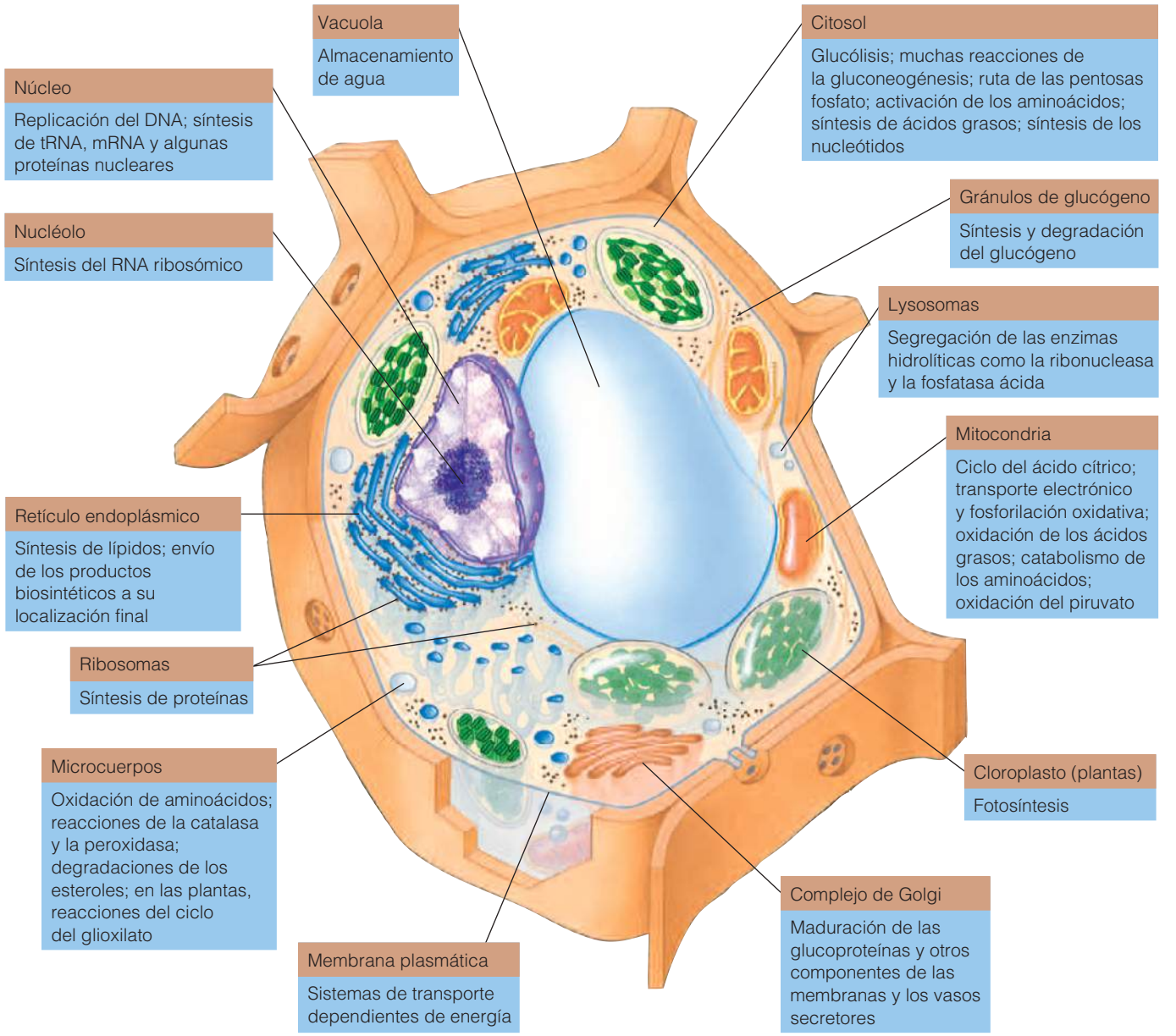


FIGURA **12.11**

Localizaciones de las principales rutas metabólicas en una célula eucariota. Esta célula combina características propias de una célula vegetal y de una célula animal.

Tomado de Neil Campbell, Jane Reece, y Larry Mitchell, *Biology*, 5.ª ed. (Menlo Park, CA: Addison Wesley Longman, 1999). © Addison Wesley Longman, Inc.

La compartimentación puede producirse también como consecuencia de las interacciones débiles entre las enzimas que no se mantienen formando complejos cuando se aíslan. Así, por ejemplo, la conversión de glucosa en piruvato mediante la glucólisis está catalizada por enzimas que interactúan de manera bastante débil en disolución. Sin embargo, se ha comprobado que estas enzimas interactúan en el citosol, formando una estructura supramolecular que facilita la realización de los múltiples pasos de la ruta glucolítica. El concepto de interacciones intracelulares entre enzimas fácilmente solubilizables surgió cuando los científicos empezaron a comprobar que el citosol estaba mucho más estructurado de lo que anteriormente se había pensado. Las fotografías de microscopia electrónica de alta resolución del citosol de los mamíferos descubren una estructura organizada, a la que se ha denominado **citomatriz**, de la que se presenta un modelo en la Figura 12.12. Es probable que estas estructuras se formen como consecuencia de la concentración extremadamente elevada de proteínas

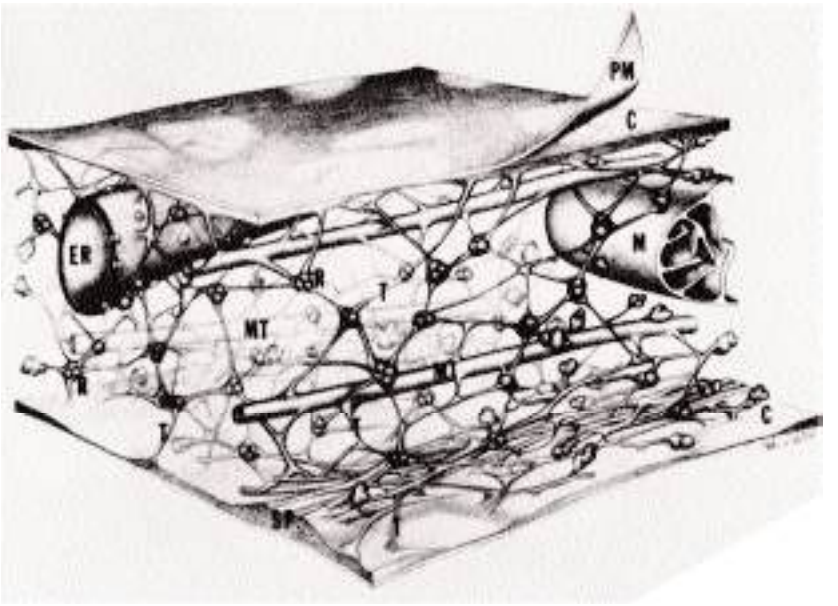


FIGURA **12.12**

Modelo de la organización estructural de la citomatriz. El modelo se basa en un examen de microscopia electrónica de alto voltaje de fibroblastos de mamífero en cultivo. PM = membrana plasmática; C = corteza (parte de la superficie celular); ER = retículo endoplásmico; MT = microtúbulos; R = ribosomas libres; M = mitocondria. Aumentos aproximados, ×150 000.

Reproducido de J. J. Wolosewick y K. R. Porter, *J. Cell Biol.* (1979) 82:114-139, con permiso de © Rockefeller University Press.

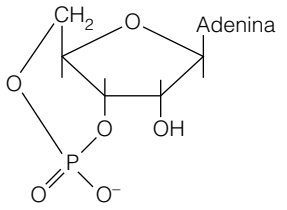
que existe en el interior de las células, la cual reduce la concentración de agua e impulsa a asociarse a las proteínas que interactúan débilmente. Se ha propuesto que las enzimas solubles están unidas dentro de la célula a los elementos estructurales de la citomatriz.

Tanto si están muy estructurados como si su asociación es laxa, los complejos multienzimáticos permiten un control eficaz de las rutas de reacción. Los complejos enzimáticos restringen la difusión de los intermediarios, con lo que mantienen las concentraciones medias de los intermediarios en valores bajos (aunque sus concentraciones locales son elevadas en los lugares catalíticos de las enzimas). Esta formación de complejos reduce el *tiempo de tránsito*, que es el tiempo medio necesario para que una molécula pase por una ruta. Así pues, el flujo a través de una ruta puede modificarse rápidamente en respuesta a un cambio de la concentración del primer sustrato de esa ruta.

REGULACIÓN HORMONAL

Superpuestos y entremezclados con los mecanismos reguladores que actúan dentro de una célula eucariota, se encuentran los mensajes procedentes de otros tejidos y órganos. El proceso de transmisión de estos mensajes y la realización de los cambios metabólicos se denomina **transducción de señal**. Los mensajeros extracelulares son las hormonas, los factores de crecimiento, los neurotransmisores y las feromonas. Una **hormona** es una sustancia que se sintetiza en células especializadas y se transporta por la circulación hasta células diana remotas. Aquí interactúa con receptores específicos, lo cual da lugar a cambios metabólicos específicos en la propia célula diana; un ejemplo es la rápida generación de energía que se produce por la secreción de **adrenalina** (también denominada **epinefrina**). Otras formas de transducción de señal, que se tratarán en los Capítulos 21 y 23, tienen mecanismos similares.

Hay dos tipos de respuesta metabólica a las hormonas que son especialmente bien conocidos. El primero, que se observa con las hormonas esteroideas, comporta modificaciones de la expresión génica. Una hormona esteroidea, como un estrógeno, entra en una célula diana, donde interactúa con un receptor proteico intracelular, y el complejo hormona-receptor resultante se desplaza a con-



Adenosina-3′, 5′-monofosfato

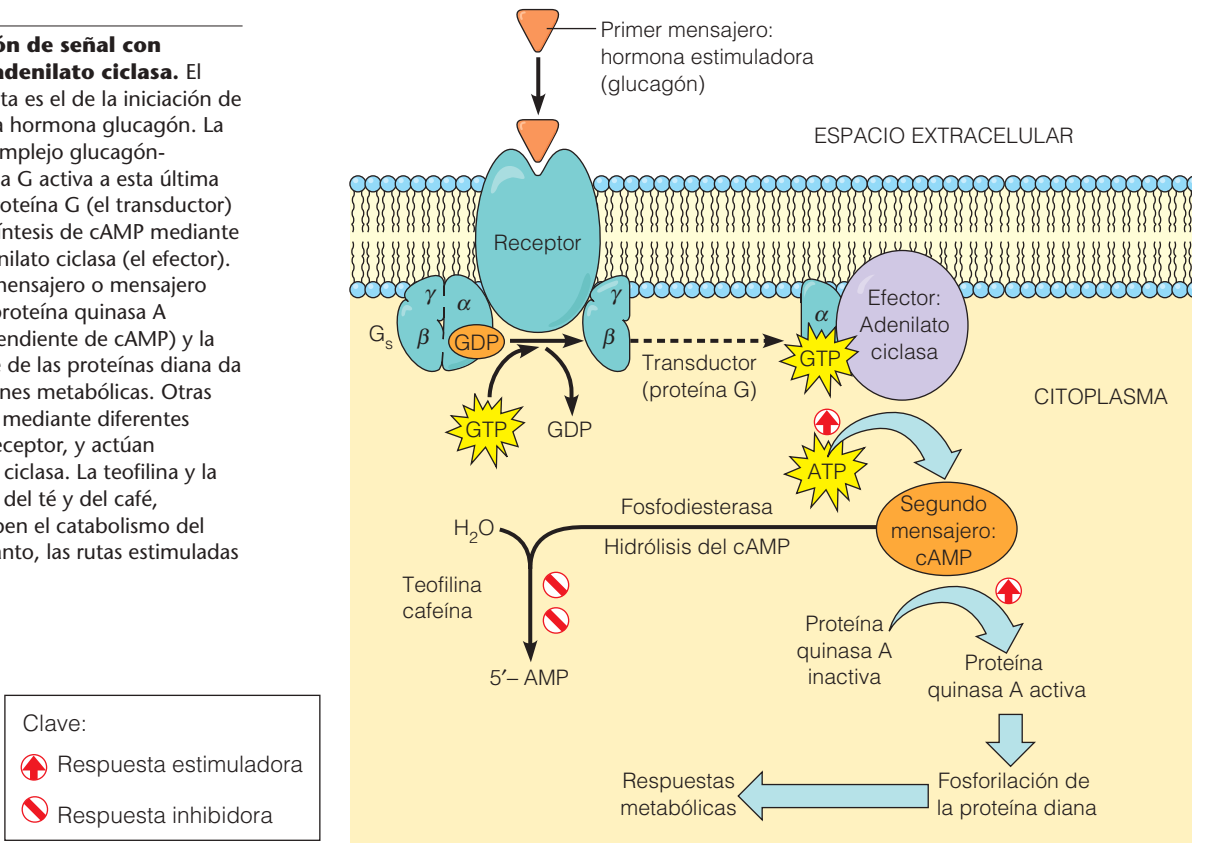
tinuación hacia el núcleo. Aquí, el complejo se une a lugares específicos del genoma, y activa o reprime la transcripción de determinados genes. Así pues, las hormonas esteroideas y otras hormonas relacionadas controlan el metabolismo mediante la regulación de las concentraciones intracelulares de proteínas.

La otra respuesta bien conocida a las hormonas es la que utiliza la síntesis de **segundos mensajeros** intracelulares, que controlan las reacciones metabólicas (véase la Figura 12.13). La hormona (primer mensajero) actúa extracelularmente, uniéndose a receptores de la membrana plasmática. Debido a que la proteína receptora atraviesa la membrana, en el lado intracelular puede estimular la formación de un segundo mensajero como respuesta a la unión extracelular del primer mensajero. Entre las hormonas que actúan de esta forma se encuentran la mayor parte de las hormonas polipeptídicas, como el **glucagón**, y algunas hormonas, como la adrenalina, que están relacionadas con los aminoácidos. Como ejemplo de este tipo de respuesta, consideremos los fenómenos que conducen a la degradación de las reservas intracelulares de glucógeno para dar glucosa-1-fosfato. Hemos presentado ya estos procesos como un ejemplo de cascada metabólica. La movilización del glucógeno, o **glucogenólisis**, se controla por el glucagón en el hígado y por la adrenalina en el músculo. En ambos casos, el segundo mensajero es la **adenosina 3′,5′-monofosfato**, al que se denomina más comúnmente **AMP cíclico** o simplemente **cAMP**. Consideraremos aquí la glucogenólisis que se produce en las células hepáticas, como se muestra en la Figura 12.13, pero los procesos que se producen en las células musculares son muy semejantes.

El sistema de transducción de señal es modular, y está formado por tres componentes proteicos: un **receptor**, un **transductor** y un **efector**. El receptor es

FIGURA **12.13**

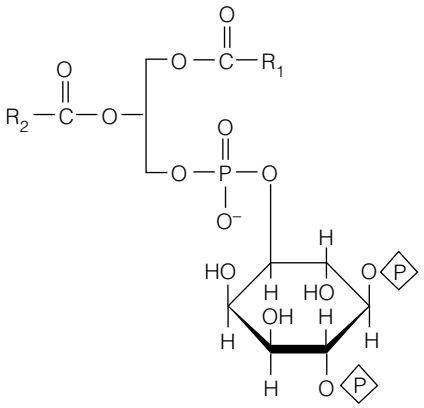
Ruta de transducción de señal con intervención de la adenilato ciclasa. El ejemplo que se presenta es el de la iniciación de la glucogenólisis por la hormona glucagón. La interacción entre el complejo glucagón-receptor y una proteína G activa a esta última (G_s en la figura). La proteína G (el transductor) estimula, a su vez, la síntesis de cAMP mediante la activación de la adenilato ciclasa (el efector). El cAMP (el segundo mensajero o mensajero intracelular) activa la proteína quinasa A (proteína quinasa dependiente de cAMP) y la fosforilación resultante de las proteínas diana da lugar a las modificaciones metabólicas. Otras proteínas G se activan mediante diferentes complejos hormona-receptor, y actúan *inhibiendo* la adenilato ciclasa. La teofilina y la cafeína (componentes del té y del café, respectivamente) inhiben el catabolismo del cAMP y activan, por tanto, las rutas estimuladas por el cAMP.



una proteína transmembrana que reconoce y une una hormona específica, en este caso el glucagón. El transductor es una **proteína G**, a la que se da este nombre por su elevada afinidad por los nucleótidos de guanina. La interacción del complejo hormona-receptor con el transductor estimula una reacción de intercambio, en la que el GDP unido a la proteína G es sustituido por GTP. Este intercambio activa la proteína G, que interactúa entonces con el efector, la enzima **adenilato ciclasa**. En la respuesta de las células hepáticas al glucagón, esa interacción estimula la adenilato ciclasa, que cataliza la conversión de ATP en AMP cíclico, el segundo mensajero intracelular. Como se señalará en el Capítulo 13, el cAMP activa una proteína quinasa. Algunas enzimas se activan por la fosforilación, mientras que otras se inhiben; de esta forma, se activan las reacciones de la cascada metabólica que conduce a la glucogenólisis. Así pues, la unión de la hormona a la superficie celular estimula la síntesis del segundo mensajero en el interior de la célula, lo que provoca, a su vez una respuesta metabólica deseable.

Los segundos mensajeros transmiten la información desde las hormonas unidas a la superficie celular y de esta forma controlan los procesos metabólicos intracelulares.

La naturaleza modular de este sistema de control hormonal permite diversas respuestas metabólicas basadas en los mismos principios de funcionamiento. En primer lugar, el empleo de receptores diferentes, para el glucagón en el hígado y para la adrenalina en el músculo, permite que se produzca la misma respuesta metabólica en uno u otro tejido, pero únicamente con una demanda específica, provocada por la liberación de una u otra hormona. En segundo lugar, la proteína transductora que interviene en la glucogenólisis no es más que una de las que constituyen una amplia familia de proteínas G. Algunas proteínas G activan la adenilato ciclasa y otras la inhiben. La inhibición reduce la concentración de cAMP y desactiva las respuestas controladas por ese mensajero. En tercer lugar, existen otras proteínas efectoras, distintas de la adenilato ciclasa, cada una de las cuales cataliza la producción de un segundo mensajero diferente. Así, por ejemplo, en el Capítulo 23 consideraremos el **sistema fosfoinosítido**, un par de segundos mensajeros derivados de la hidrólisis del **fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato** estimulada hormonalmente. Así pues, la secreción de una hormona puede tener unos efectos bastante distintos en diversos tejidos, en función de la naturaleza de las proteínas receptora y transductora, y de los conjuntos formados por las proteínas efectoras y los sistemas de segundo mensajero de las diferentes células diana. Además, un mismo segundo mensajero puede tener efectos diversos dentro de una misma célula. Así, por ejemplo, el AMP cíclico, que activa la cascada glucogenolítica, activa también una cascada que inhibe la síntesis de glucógeno. Este efecto doble constituye un ejemplo de respuesta metabólica coordinada: la síntesis de glucógeno se *inhibe* en las mismas condiciones fisiológicas que *fomentan* la degradación del glucógeno. Consideraremos con mayor detalle la regulación hormonal en el Capítulo 23.



Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

CONTROL DISTRIBUTIVO DEL METABOLISMO

En los últimos años ha surgido un principio importante de la regulación metabólica. Con el descubrimiento en los años 1950 y 1960 de las enzimas reguladas de forma alostérica, surgió el concepto de que el flujo de las rutas metabólicas está regulado, en primer lugar, mediante el control de la actividad intracelular de una o unas pocas de las enzimas clave de esa ruta. Cuando se comprobó que las enzimas alostéricas suelen catalizar reacciones comprometidas, que son la primera reacción de una ruta que conduce a un intermediario sin otra función conocida, surgió el concepto de que estas enzimas catalizan "la reacción limitante de la velocidad" en las rutas metabólicas. Tomado de forma literal, el término *reacción limitante de la velocidad* implica que el flujo de las

rutas es idéntico a la actividad intracelular del paso limitante de la velocidad. Sin embargo, debido a que en un estado estacionario metabólico todos los pasos a lo largo de una ruta lineal se producen a la misma velocidad, es difícil o imposible establecer que la velocidad está controlada por un único paso enzimático. En otras palabras, está gravemente resquebrajado el concepto de enzima limitante de la velocidad.

En la actualidad sabemos que la regulación metabólica es más compleja y que todas las enzimas de una ruta contribuyen al control del flujo. Un planteamiento denominado **análisis del control metabólico** asigna a cada enzima de una ruta un **coeficiente de control del flujo**, un valor que puede variar entre cero y uno. Para una determinada enzima, el coeficiente de control del flujo es el aumento relativo del flujo dividido por el aumento relativo de la actividad enzimática que ocasiona ese aumento de flujo. Para una verdadera enzima limitante de la velocidad, el coeficiente de control del flujo es uno; un aumento de un 20% de la actividad de esa enzima aumentará ese flujo un 20%. Sin embargo, la teoría del control metabólico predice que todas las enzimas de una ruta contribuyen a la regulación, lo cual significa que todas las enzimas tienen coeficientes de control del flujo mayores de cero (aunque ninguna tiene un valor de uno, que sería el caso si el flujo estuviese realmente controlado únicamente por una enzima limitante de la velocidad).

Las predicciones de la teoría del control metabólico pueden analizarse, por ejemplo, utilizando mutaciones que afecten a una enzima específica para producir cambios definidos de la actividad de esa enzima in vivo, y posteriormente medir el cambio del flujo de una ruta en la que participe esa enzima. Este tipo de análisis confirma que las enzimas que catalizan reacciones comprometidas desempeñan funciones importantes en la regulación, esto es, tienen coeficientes de control del flujo altos. Sin embargo, es más importante que estos análisis confirmen que *cada* enzima en una ruta contribuye al control de esa ruta; en otras palabras, cada enzima tiene un coeficiente de control del flujo mayor de cero. De esta forma, la regulación de una ruta *se distribuye* entre todas las enzimas de la ruta, dando lugar al concepto de **control distributivo del metabolismo**. Mirando hacia atrás, este concepto debería haber sido predicho simplemente a partir de la complejidad del metabolismo. Muchos intermediarios participan en más de una ruta, haciendo a las diferentes rutas interdependientes y entrelazadas. Los esquemas reguladores, que dependen del control de una o dos enzimas en cada ruta, carecen de la flexibilidad y sutilidad que refleja la capacidad de las células para mantener la homeostasia en unas condiciones que varían mucho, tanto desde el punto de vista nutritivo como energético. Para estar seguros, para cada ruta o proceso, se han identificado una o unas pocas enzimas reguladoras de primera importancia y éstas serán las señaladas cuando se presenten las rutas individuales implicadas.

Análisis experimental del metabolismo

OBJETIVOS DEL ESTUDIO DEL METABOLISMO

Dado que el metabolismo incluye todas las reacciones químicas que se producen en la materia viva, ¿cómo aborda un bioquímico el metabolismo en el laboratorio? Para subdividir un proceso metabólico concreto en unos objetivos alcanzables experimentalmente, el bioquímico busca: (1) identificar los reactantes, los productos y los cofactores, así como la estequiometría, de cada una de las reacciones; (2) entender cómo se controla la velocidad de cada reacción en el tejido de origen; y (3) identificar la función fisiológica de cada reacción y el

mecanismo de control. Estos objetivos requieren aislar y caracterizar la enzima que cataliza cada reacción de la ruta. Esta última tarea, la extrapolación de la bioquímica del tubo de ensayo a la célula intacta, resulta especialmente difícil. Así, por ejemplo, dado que la mayor parte de las enzimas catalizan reacciones que pueden tener lugar en cualquier dirección, ¿qué dirección tiene una reacción enzimática in vivo? Muchas reacciones que inicialmente se encontró que iban en una determinada dirección in vitro se ha demostrado luego que van en la dirección contraria in vivo. La enzima mitocondrial que sintetiza ATP a partir de ADP, por ejemplo, se aisló inicialmente como una ATPasa, una enzima que hidroliza ATP a ADP y P_i. Por tanto, no basta con aislar una enzima y demostrar que cataliza una determinada reacción en el tubo de ensayo. Debemos averiguar también que la misma enzima cataliza la misma reacción en el tejido intacto, lo cual suele resultar más difícil.

Para alcanzar los objetivos indicados, el bioquímico debe realizar análisis a varios niveles de la organización biológica, desde los organismos vivos y las células intactas hasta preparados de células rotas y, finalmente, componentes purificados. Las preparaciones acelulares, o in vitro, pueden manipularse de formas que no son posibles con las células intactas, por ejemplo, mediante la adición de sustratos y cofactores que no atravesarían las membranas celulares. Los investigadores intentan reproducir in vitro el proceso que se sabe que se produce in vivo.

La preparación de componentes acelulares destruye generalmente la organización biológica. Las células pueden romperse mediante ultrasonidos, fuerzas de desgarro o digestión enzimática de las paredes celulares. Estos tratamientos destructivos dan lugar a una mezcla de componentes que estaban en compartimientos separados en la célula intacta, lo cual hace posible interpretar erróneamente los datos obtenidos de los sistemas in vitro. Un ejemplo de ello es el que procede de los estudios de la biosíntesis proteica. La existencia del RNA mensajero como molde para la síntesis proteica se predijo en 1961 a partir del comportamiento de mutantes bacterianos que presentaban una alteración de la regulación genética. Sin embargo, fue difícil demostrar in vitro la existencia del RNA mensajero, ya que el supuesto molde estaba presente en cantidades muy pequeñas y lo degradaban rápidamente las enzimas en los extractos acelulares. Tan sólo cuando los investigadores averiguaron de qué manera podían impedir la degradación fue posible demostrar la existencia del RNA mensajero.

Las consideraciones precedentes ponen de manifiesto la necesidad de estudiar el metabolismo a diversos niveles de organización biológica, desde el organismo intacto hasta los componentes químicos purificados. Consideraremos aquí lo que puede averiguarse en cada uno de estos niveles.

NIVELES DE ORGANIZACIÓN A LOS QUE SE ESTUDIA EL METABOLISMO

Organismo entero

Los bioquímicos deben investigar el metabolismo en los organismos enteros, puesto que nuestro objetivo final es comprender los procesos químicos en los sistemas vivos intactos. Los isótopos radiactivos trazadores se utilizan mucho para caracterizar las rutas metabólicas, como se describe en Herramientas de la Bioquímica 12A. Un ejemplo clásico es la determinación de la síntesis del colesterol en los años 1940. Konrad Bloch inyectó acetato marcado con ^{14}C a ratas y siguió el flujo del marcador en los intermediarios, sacrificando a las ratas a diversos intervalos y analizando los compuestos radiactivos de sus hígados. Al diseñar experimentos de este tipo, el investigador debe prestar gran atención a la eficacia del transporte del precursor marcado a los órganos de interés, la

captación del precursor en las células y la competencia de precursores exógenos con las reservas preexistentes de intermediarios no marcados.

Muchas de las pruebas diagnósticas que se utilizan en medicina clínica son experimentos metabólicos in vivo. En vez de utilizar isótopos radiactivos, obtenemos muestras de tejido a distintos intervalos y realizamos análisis bioquímicos. Así, por ejemplo, en la **prueba de tolerancia a la glucosa**, una persona ingiere una dosis oral alta de glucosa, y se determina luego la concentración de la misma en la sangre a intervalos durante varias horas. La prueba de tolerancia a la glucosa se emplea para diagnosticar la diabetes y otros trastornos del metabolismo de los hidratos de carbono.

En los últimos años, se ha utilizado la espectroscopia de *resonancia magnética nuclear* (RMN), como método de seguimiento no invasor de células y órganos intactos. Como se explica en Herramientas de la Bioquímica 6A, los compuestos que contienen determinados núcleos atómicos pueden identificarse a partir de un espectro de RMN, que mide los desplazamientos de la frecuencia de la radiación electromagnética absorbida. Un investigador puede determinar un espectro de RMN de células enteras, o de órganos o tejidos de un animal o una planta intactos. Para la mayor parte, los componentes macromoleculares no tienen una contribución en el espectro, ni tampoco los compuestos que están presentes en menos de 0.5 mM. Los núcleos que se utilizan con más frecuencia en esta técnica in vivo son ^{1}H, ^{31}P y ^{13}C. En la Figura 12.14 se muestran los espectros de RMN de ^{31}P que corresponden a componentes del músculo del antebrazo del ser humano. Los cinco picos principales corresponden a los núcleos de fósforo del ortofosfato (P_i), la creatina fosfato y los tres fosfatos del ATP. Dado que el área de los picos es proporcional a la concentración, puede determinarse el estado energético de las células intactas. Así, por ejemplo, un músculo con mucha energía tiene una gran cantidad de creatina fosfato, mientras que un músculo fatigado utiliza casi toda su creatina fosfato para mantener la concentración de ATP (obsérvese también la acumulación de AMP, pico 6, en el tercer barrido). La RMN tiene una gran aplicación en el seguimiento de la recuperación de los ataques cardíacos, en los que la isquemia celular (oxigenación insuficiente) daña las células al reducir su contenido de ATP. La RMN puede usarse también para estudiar la compartimentación de los metabolitos, las velocidades de flujo por las principales rutas metabólicas y el pH intracelular.

Órgano aislado o perfundido

Algunas de las dificultades que existen para el transporte de un precursor o inhibidor al órgano deseado pueden evitarse con el empleo de un órgano aislado. Un investigador generalmente **perfunde** el órgano aislado durante las manipulaciones experimentales. Este procedimiento implica el bombeo de una disolución isotónica amortiguada que contiene nutrientes, fármacos u hormonas a través del órgano. La disolución asume en parte el papel de la circulación nor-

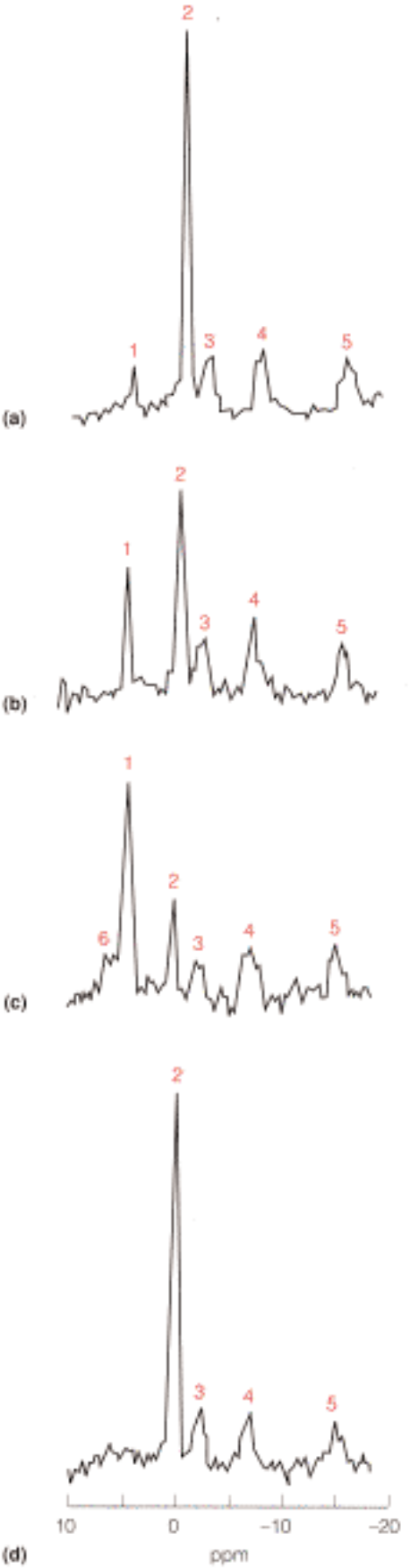


FIGURA **12.14**

Efecto del ejercicio anaerobio sobre los espectros de RMN con ^{31}P del músculo del antebrazo humano. **(a)** Antes del ejercicio. **(b)** Primer minuto de un período de ejercicio de 19 minutos. **(c)** Minuto 19. **(d)** Diez minutos después del ejercicio. Las áreas de los picos son proporcionales a las concentraciones intracelulares. Pico 1 = P_i; 2 = creatina fosfato; 3 = ATP γ-fosfato; 4 = ATP α-fosfato; 5 = ATP β-fosfato; 6 = fosfomonoésteres. Véase Herramientas de la Bioquímica 6A para la interpretación de los espectros de RMN.

Reproducido con permiso de G. K. Radda, *Science* (1988) 233:640–645. Copyright © 1988 by the AAAS.

mal, aportando nutrientes y eliminando productos de desecho. El investigador puede perfundir también un órgano situado en el animal vivo, utilizando las técnicas quirúrgicas adecuadas. Naturalmente, la perfusión es mucho menos eficaz que la circulación; en consecuencia, los experimentos a este nivel han de tener una duración limitada.

El problema de la circulación puede superarse en parte seccionando el tejido en cortes finos antes de iniciar las manipulaciones experimentales. Se pierde la integridad estructural del órgano, pero la mayor parte de las células continúan estando intactas, y tienen un mejor contacto con el líquido que baña el tejido. Las células pueden estar mejor oxigenadas y pueden recibir un aporte de sustratos mejor que en un órgano entero. La determinación del ciclo del ácido cítrico se basó en gran parte en experimentos realizados con cortes de hígado y de corazón.

Células enteras

En la actualidad no se utilizan de manera general los cortes de tejidos, debido en parte a que hoy en día disponemos de métodos para desagregar un órgano o un tejido en las células que lo forman. Pueden hacerse preparaciones de células de hígado, riñón y corazón mediante el tratamiento de estos órganos con tripsina o colagenasa, para degradar la matriz extracelular que mantiene el órgano unido. En el caso de las células vegetales, pueden utilizarse enzimas como la celulasa o la pectinasa, que atacan a la pared celular, para obtener preparaciones comparables.

Cualquier órgano de una planta o de un animal contiene una mezcla compleja de distintos tipos celulares. Se utilizan varios medios para fraccionar las células tras la desagregación de un órgano para obtener preparaciones enriquecidas en un tipo celular. Un método es la centrifugación que separa las células en función de su tamaño. En los últimos años, se ha pasado a utilizar ampliamente el **clasificador de células activadas por fluorescencia**. En una aplicación característica, se trata una suspensión celular con un anticuerpo marcado con fluorescencia que va dirigido contra un antígeno de la superficie celular que está presente en cantidades diferentes en los distintos tipos celulares. Las células pasan en una sola fila por un rayo láser y se separan físicamente de acuerdo con la cantidad de fluorescencia registrada en cada una. Estos aparatos, que pueden separar varios miles de células por segundo, producen un fraccionamiento basado en la abundancia del antígeno de superficie seleccionado.

La uniformidad de una población celular se suele conseguir mediante el crecimiento de las células en un **cultivo de tejido**. Con una técnica especialmente cuidadosa, puede inducirse el crecimiento de las células desagregadas de un órgano o un tejido en un medio que contenga nutrientes celulares y factores de crecimiento proteicos. Las células crecen y se dividen independientemente unas de otras, de manera muy parecida a lo que ocurre con las células de un cultivo bacteriano. Aunque las células animales generalmente dejan de crecer tras un cierto número de divisiones en el cultivo, aparecen líneas variantes que son capaces de crecer de manera indefinida, mientras se les proporcione una nutrición adecuada. En estos cultivos, pueden generarse líneas celulares **clónicas** en las que todas las células de una línea proceden de una única célula, con lo que son genética y metabólicamente uniformes. Esta uniformidad resulta muy útil para muchas investigaciones bioquímicas. Así, por ejemplo, gran parte de nuestros conocimientos sobre la replicación vírica se basan en la capacidad de infectar a un gran número de células idénticas en cultivo de manera simultánea y seguir luego los cambios metabólicos que se producen mediante la obtención de muestras del cultivo celular en diversos momentos tras la infección.

Un problema que se produce con el cultivo de tejidos es que las células adaptadas a un crecimiento prolongado en cultivo adoptan características diferentes de las que tenían sus células de origen, que estaban incluidas inicialmente en el tejido vegetal o animal. El mantenimiento de las características de las células especializadas en cultivo plantea siempre al investigador un reto importante.

Sistemas acelulares

Los problemas de transporte a través de las membranas se evitan trabajando con preparados de células rotas. Las células animales pueden lisarse (romperse) con facilidad mediante la aplicación de fuerzas de desgarro débiles, la suspensión en un medio hipotónico o la congelación y descongelación. Las células bacterianas poseen una pared celular rígida que requiere un tratamiento enérgico como los ultrasonidos. La digestión enzimática con lisozima se utiliza con frecuencia para abrir las células bacterianas en unas condiciones relativamente suaves. La ruptura de las paredes celulares especialmente resistentes de las levaduras y las plantas requiere generalmente la combinación de tratamientos enzimáticos y mecánicos.

Los experimentos metabólicos iniciales se realizan generalmente en homogeneizados acelulares sin fraccionar. Sin embargo, la localización de una ruta metabólica en un determinado compartimiento celular requiere el fraccionamiento del homogeneizado para separar los orgánulos, generalmente mediante **centrifugación diferencial**. La lisis se lleva a cabo en disoluciones de sacarosa isotónicas, que generalmente proporcionan unos orgánulos morfológicamente intactos. Estos componentes pueden precipitarse mediante centrifugación a distintas velocidades y durante períodos de tiempo diferentes. Habitualmente, núcleos, mitocondrias, cloroplastos, lisosomas y **microsomas** (agregados membranosos de ribosomas) pueden separarse, al menos en parte, unos de otros. El contenido del citosol permanece en el sobrenadante tras el último paso de centrifugación. Gran parte de nuestros conocimientos sobre la replicación y la transcripción del DNA en las células eucariotas procede de las investigaciones con núcleos aislados, mientras que las mitocondrias purificadas han aportado gran parte de nuestros conocimientos sobre el transporte electrónico respiratorio y la fosforilación oxidativa.

Componentes purificados

Para comprender un proceso biológico a nivel molecular, el investigador debe purificar hasta la homogeneidad todos los factores que se cree que intervienen en él y determinar sus interacciones. Con frecuencia, como ocurre en el ciclo del ácido cítrico, este proceso consiste simplemente en una purificación de las diversas enzimas participantes, la determinación del sustrato y los cofactores necesarios de cada una, la recombinación de las enzimas purificadas y la demostración de que todo el proceso puede catalizarse mediante los componentes purificados. Este proceso se denomina **reconstitución**. Algunas rutas requieren unos componentes celulares distintos de las enzimas, como los ribosomas y los RNA de transferencia que son necesarios para la síntesis de proteínas.

Al purificar los componentes individuales, el bioquímico corre continuamente el riesgo de perder factores que son esenciales para el control normal o para algún otro aspecto del proceso que se estudia. Evitar estos problemas obliga a realizar experimentos laboriosos en los que el investigador define los criterios de actividad biológica y examina continuamente las fracciones para comprobar que cada una de las actividades se conserva en cada paso de fraccionamiento. Un buen ejemplo de este enfoque es el que se presentará en el Capítulo 24, en el que se consideran las diversas enzimas y proteínas que deben actuar en la horquilla de replicación del DNA.

SONDAS METABÓLICAS

Mediante la inactivación de las enzimas individuales, las mutaciones y los inhibidores enzimáticos ayudan a identificar las funciones metabólicas de las enzimas.

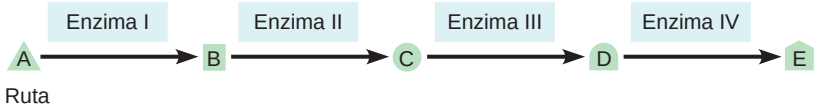
Una ayuda bioquímica de inestimable valor es el empleo de sondas metabólicas, que son agentes que permiten al investigador interferir de manera específica en una o unas pocas de las reacciones de una ruta. Las consecuencias de una interferencia de este tipo pueden ser extraordinariamente informativas. Hay dos tipos de sondas que son las más utilizadas: los *inhibidores metabólicos* y las *mutaciones*. Mediante el bloqueo de una reacción específica in vivo y la determinación de los resultados del mismo, estas sondas ayudan a identificar la función metabólica de una reacción. Así, por ejemplo, los venenos respiratorios como el monóxido de carbono y el cianuro bloquean pasos específicos de la respiración, y los inhibidores metabólicos han ayudado a identificar el orden de los transportadores electrónicos de la cadena de transporte electrónico respiratoria (véase el Capítulo 15).

Los inhibidores pueden plantear dificultades al investigador, como el mal transporte al interior de las células o sus múltiples lugares de acción. A menudo, resulta más fácil interferir en una ruta mediante la selección de cepas mutantes con un déficit de la enzima de interés. En los años 1940, George Beadle y Edward Tatum fueron los primeros en utilizar mutaciones como sondas bioquímicas, en su trabajo con el moho del pan *Neurospora crassa*. Beadle y Tatum aislaron diversos mutantes inducidos mediante rayos X que necesitaban arginina para su crecimiento, además de los componentes del medio mínimo. Asimismo, diferentes mutaciones afectaban a distintas enzimas de la ruta de biosíntesis de la arginina, de manera que cada mutante acumulaba el intermediario que constituía el sustrato de la enzima deficitaria. Esta observación permitió a Beadle y Tatum ordenar las enzimas de acuerdo con las reacciones que controlaban, según el razonamiento que se ilustra en la Figura 12.15. Si un filtrado de un cultivo procedente de un mutante permitía el crecimiento de un segundo mutante sin arginina, los investigadores concluían que la primera mutación bloqueaba un paso enzimático de la ruta que era *posterior* al paso bloqueado por la segunda mutación. Finalmente, se identificaron los intermediarios que se acumulaban y se determinó toda la ruta.

Además de para identificar las rutas, los mutantes se han utilizado para determinar los mecanismos de regulación genéticos. Los primeros éxitos procedieron de los estudios realizados en París por François Jacob y Jacques Monod, que aislaron docenas de mutantes de *Escherichia coli* con defectos de la regu-

Un mutante con un defecto en la enzima	acumula el metabolito	requiere un aporte externo de	permite el crecimiento de otro mutante, con un déficit de la enzima
I	A	B, C, D, o E	—
II	B	C, D, o E	I
III	C	D, o E	I o II
IV	D	E	I, II, o III

Análisis de mutantes



Ruta

FIGURA **12.15**

Uso de las mutaciones como sondas bioquímicas. Los pasos de una ruta metabólica hipotética se identifican mediante el análisis de mutantes que presentan un déficit en un paso concreto de la ruta. Así, por ejemplo, podemos identificar el metabolito C como sustrato de la enzima III por la ausencia de esta enzima en los mutantes que acumulan C. Sabemos que D y E siguen a C en la ruta, ya que el aporte de D o de E a los mutantes con un déficit de la enzima III evita el bloqueo genético y permite el crecimiento de las células.

lación del catabolismo de la lactosa o con anomalías de las relaciones virus-hospedador. Estos datos les llevaron finalmente al descubrimiento del mRNA y del mecanismo de regulación genética represor-operador, que consideraremos en el Capítulo 26.

Pueden utilizarse tanto los inhibidores metabólicos como las mutaciones en una misma investigación. Este enfoque combinado facilitó la determinación de la función de la DNA girasa, una de las DNA topoisomerasas que se mencionaran en el Capítulo 4. Esta enzima se inhibe por el ácido nalidíxico. Cuando se administra esta sustancia a las bacterias, se inhibe la replicación del DNA, lo que sugiere que la DNA girasa desempeña un papel esencial en la replicación del DNA. Sin embargo, dado que el ácido nalidíxico *podría* inhibir la replicación del DNA mediante el bloqueo de alguna otra enzima, es necesaria una prueba más clara. Esta prueba se obtuvo cuando se comprobó que los mutantes resistentes al ácido nalidíxico contenían una forma alterada de la DNA girasa que era resistente al ácido nalidíxico. Así pues, una sola mutación abolía la sensibilidad de la enzima al ácido nalidíxico y la capacidad de las células para replicar su DNA, lo cual respaldaba claramente un papel esencial de la DNA girasa en la replicación del DNA.

En este capítulo hemos descrito la estrategia general del metabolismo, identificado las principales rutas, descrito el modo en que se regulan las mismas e identificado los métodos experimentales que permiten comprender el metabolismo. Estamos preparados ya para una descripción detallada de las rutas metabólicas, que iniciaremos en el Capítulo 13 con los hidratos de carbono.

RESUMEN

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que se producen en una célula. Las rutas catabólicas degradan los sustratos para proporcionar energía, en gran parte mediante reacciones oxidativas, mientras que las rutas anabólicas sintetizan biomoléculas complejas a partir de moléculas pequeñas, a menudo partiendo de intermediarios de las rutas catabólicas. Las rutas catabólicas y anabólicas que tienen los mismos puntos finales son de hecho rutas diferentes, y no simples inversiones unas de otras, de forma que ambas rutas puedan actuar de manera exergónica. La mayor parte de la energía metabólica procede de la oxidación de sustratos, con una liberación de energía que se produce en una serie de pequeños pasos a medida que los electrones liberados se transfieren finalmente al oxígeno. Cuanto más reducido esté un sustrato, más energía se libera durante su catabolismo.

El flujo a través de las rutas metabólicas se controla mediante la regulación de la concentración de las enzimas (por el control de la síntesis y de la degradación de las enzimas), la actividad de las enzimas (a través de las concentraciones de sustratos, productos y efectores alostéricos, y la modificación covalente de las proteínas enzimáticas), la compartimentación y el control hormonal. La regulación hormonal puede comportar el control de la síntesis enzimática a nivel genético o la regulación de la actividad enzimática. En este último caso, se forman segundos mensajeros intracelulares en respuesta a las señales hormonales.

La comprensión de los procesos metabólicos requiere la identificación de cada reacción de una ruta, y un conocimiento de la función y el control de la reacción. Este entendimiento requiere la experimentación a todos los niveles de organización biológica, desde el organismo vivo hasta la enzima purificada. La capacidad de bloquear enzimas específicas, mediante inhibidores o mutaciones, es de gran utilidad para identificar las funciones de esas enzimas.

BIBLIOGRAFÍA

Técnicas experimentales para el estudio del metabolismo

Davey, H. M. y D. B. Kell (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: The importance of single-cell analyses. *Microbiol. Rev.* 60:641-696. La capacidad de la clasificación celular activada mediante fluorescencia.

Radda, G. K. (1992) Control, bioenergetics, and adaptation in health and disease-Noninvasive biochemistry from nuclear magnetic resonance. *Science* 233:640-645. Una revisión actual.

Shulman, R. G., D. L. Rothman y A. M. Blamire (1994) NMR studies of human brain function. *Trends Biochem. Sci.* 19:522-526. Obtención de imágenes y análisis metabólico mediante RMN de órganos completos.

Tsien, R. Y. (1994) Fluorescence imaging creates a window on the cell. *Chem. Eng. News*, 18 de Julio, pp. 34-44. Esta revisión describe otra técnica que está surgiendo para el seguimiento metabólico no invasivo de las células individuales.

Compartimentación y organización enzimática intracelular

Bessman, S. P. y C. L. Carpenter (1985) The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu. Rev. Biochem.* 54:831-862. Una descripción actual del papel bioenergético de la creatina fosfato, en la que se resalta la importancia de la compartimentación como fenómeno de control metabólico.

Goodsell, D. S. (1991) Inside a living cell. *Trends Biochem. Sci.* 16:203-206. Incluye esquemas del interior de una célula bacteriana, basados en la información física acerca de los tamaños, las formas y la distribución de los componentes celulares.

Srere, P. A., M. E. Jones y C. K. Mathews, eds. (1990) *Structural and Organizational Aspects of Metabolic Regulation.* Proceedings of a UCLA Conference. W. J. Wiley, Nueva York. Comunicaciones presentadas en un congreso dedicado a la organización estructural de las rutas metabólicas secuenciales, que incluyen los complejos membranosos y los complejos de enzimas solubles.

Control enzimático y regulación metabólica

Lefkowitz, R. J. y M. G. Caron (1988) Adrenergic receptors: Models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 263:4993-4996. Una mini-revisión de la estructura y función del receptor de membrana.

Newsholme, E. A., R. A. J. Challiss y B. Crabtree (1984) Substrate cycles: Their role in improving sensitivity in metabolic control. *Trends Biochem. Sci.* 9:277-280. Un análisis breve y lúcido del control del ciclo de sustrato, con varios ejemplos.

Taussig, R. y A. G. Gilman (1995) Membrane-bound adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 270:1-4. Análisis de la síntesis del AMP cíclico, uno de cuyos autores fue el descubridor de las proteínas G.

Taylor, S. S., J. A. Buechler y W. Yonemoto (1990) cAMP-dependent protein kinase: Framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 59:971-1006. Visiones generales de la regulación metabólica a partir de los estudios estructurales de una enzima clave.

Control distributivo del metabolismo

Fell, D., R. Heinrich, J.-P. Mazat, R. Small y H. Westerhoff (1995) Henryk Kacser, 1918-1995. *Trends Biochem. Sci.* 20:297-298. Esta necrológica de uno de los fundadores del análisis del control metabólico detalla sus funciones en el desarrollo de sus métodos y conceptos.

Ovádi, J. y P. A. Srere (1996) Metabolic consequences of enzyme interactions. *Cell Biochem. Funct.* 14:249-258. Parte de una colección de artículos, organizada por Srere, que también incluye artículos sobre el seguimiento no invasivo del metabolismo y los planteamientos de la genética molecular para entender el control de las rutas.

Veech, R. L. y D. A. Fell (1996) Distribution control of metabolic flux. *Cell Biochem. Funct.* 14:229-236. Una revisión legible con referencias recientes.

PROBLEMAS

1. Escriba una ecuación equilibrada para la oxidación completa de cada una de las siguientes sustancias y calcule el cociente respiratorio de cada una.
   (a) Etanol
   (b) Ácido acético
   (c) Ácido esteárico
   (d) Ácido oleico
   (e) Ácido linoleico

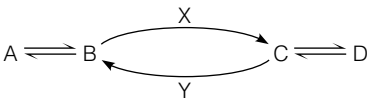
2. Teniendo en cuenta lo que sabe sobre la intervención de los nucleótidos de nicotinamida en las reacciones metabólicas oxidativas y reductoras, prediga si las siguientes proporciones de concentración intracelular deben ser: (1) la unidad, (2) superiores a la unidad, o (3) inferiores a la unidad. Explique sus respuestas.
   (a) $[NAD^+]/[NADH]$
   (b) $[NADP^+]/[NADPH]$
   Dado que el NAD^+ y el $NADP^+$ son prácticamente equivalentes en su tendencia a atraer electrones, comente de qué forma podrían mantenerse las dos proporciones de concentración en el interior de las células con valores muy diferentes.

3. (a) La NAD^+ quinasa cataliza la conversión dependiente del ATP del NAD^+ en $NADP^+$. ¿Cuántos equivalentes reductores participan en esta reacción?
   (b) ¿Cuántos equivalentes reductores intervienen en la conversión del ion férrico en ferroso?
   (c) ¿Cuántos equivalentes reductores participan en la reducción de una molécula de oxígeno gaseoso a agua?

4. En la página 472, hemos indicado que la oxidación de la glucosa y del ácido palmítico producen 15.64 kJ/g y 38.90 kJ/g, respectivamente. Calcule estos valores en kJ/mol y kJ por átomo de carbono oxidado, para la glucosa y para el ácido palmítico.

5. Los cambios de energía libre en condiciones intracelulares difieren considerablemente de los determinados en condiciones estándar. El $\Delta G°'$ para la hidrólisis del ATP en ADP y P_i es de -30.5 kJ/mol. Calcule el valor de $\Delta G'$ para la hidrólisis del ATP en una célula a 37°C que contiene ATP 3 mM, ADP 0.2 mM y P_i 50 mM.

6. Considere un ciclo de sustrato que actúa con las enzimas X e Y en la siguiente ruta metabólica hipotética:



   (a) En condiciones intracelulares, la actividad de la enzima X es de 100 pmol/10^6 células/s, y la de la enzima Y es de 80. ¿Cuál es la dirección y la velocidad del flujo metabólico entre B y C?
   (b) Calcule el efecto sobre la velocidad y dirección del flujo metabólico de: (1) un inhibidor que reduzca la actividad de X en un 10%, (2) un activador que aumente la actividad de X en un 10%, y (3) doblar la actividad de la enzima Y.
   (c) Comente posibles métodos experimentales para abordar la cuestión de si este ciclo de sustrato desempeña o no un papel importante en la regulación de la ruta que lleva de A a D.

   Lea Herramientas de la Bioquímica 12A antes de intentar resolver los Problemas 7-9.

*7. La electroforesis en gel bidimensional de las proteínas de un extracto celular proporciona una forma cualitativa de comparar proteínas en cuanto a su abundancia intracelular. Describa un método cuantitativo para determinar el número de moléculas de una enzima por célula.

*8. Se marcaron células de mamífero que crecen en cultivo durante un período de tiempo prolongado con [^{3}H]timidina para determinar la velocidad de la síntesis del DNA. La timidina administrada tenía una actividad específica de 3000 cpm/pmol. Se obtuvieron muestras del cultivo a diversos intervalos, y se acidificaron para precipitar los ácidos nucleicos. La velocidad de incorporación del isótopo al DNA era de 1500 cpm/10^6 células/min. Se tomó una parte del cultivo para la determinación de la actividad específica de la reserva de dTTP intracelular, que fue de 600 cpm/pmol.
   (a) ¿Qué fracción de dTTP intracelular se sintetiza a partir del precursor exógeno?
   (b) ¿Cuál es la velocidad de la síntesis del DNA, en moléculas por minuto por célula de nucleótidos de timidina incorporados en el DNA?
   (c) ¿De qué forma podría determinarse la actividad específica del conjunto de dTTP?

*9. Los proveedores de compuestos marcados con isótopos radiactivos proporcionan generalmente cada producto en forma de una mezcla de sustancia marcada y sin marcar. La sustancia no marcada se añade deliberadamente como **portador**, debido en parte a que la actividad específica del producto sin portador es demasiado elevada para resultar útil, y en parte a que el producto es más estable con una actividad específica más baja. Utilizando la ley de la desintegración radiactiva, calcule lo siguiente:
   (a) La actividad específica de [^{32}P]ortofosfato sin portador, en mCi/(mol.
   (b) En una preparación de [^{3}H]leucina con marcaje uniforme, que se proporciona con 10 mCi/μmol, la fracción de átomos de H que son radiactivos.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 12A

Los isótopos radiactivos y el contador de centelleo líquido

Los isótopos radiactivos revolucionaron la bioquímica cuando los investigadores empezaron a utilizarlos poco después de la Segunda Guerra Mundial. Los isótopos radiactivos amplían en varios órdenes de magnitud la sensibilidad con la que es posible detectar una especie química. Los análisis químicos tradicionales pueden detectar y cuantificar las moléculas en cantidades del orden de micromol o nanomol (es decir, 10^{-6} o 10^{-9} moles). Un compuesto "marcado", es decir, que contiene uno o varios átomos de un isótopo radiactivo, puede detectarse en cantidades de picomol o incluso femtomol (es decir, 10^{-12} o 10^{-15} moles). Los compuestos marcados radiactivamente se denominan **trazadores**, ya que permiten al investigador seguir las transformaciones químicas o bioquímicas específicas que se producen en presencia de un enorme exceso de material no radiactivo.

Recuérdese que los isótopos son formas diferentes del mismo elemento. Tienen pesos atómicos diferentes pero el mismo número atómico. En consecuencia, las propiedades químicas de los distintos isótopos de un determinado elemento son prácticamente idénticas. En la naturaleza existen formas isotópicas de un elemento, y es posible aislar y purificar sustancias enriquecidas en isótopos raros a partir de orígenes naturales. No obstante, la mayor parte de los isótopos que se utilizan en bioquímica se producen en reactores nucleares. Los compuestos químicos simples producidos en estos reactores se convierten posteriormente en productos bioquími-

cos marcados radiactivamente mediante síntesis química y enzimática.

Isótopos estables

Aunque los isótopos radiactivos se utilizan mucho en bioquímica, también se usan como trazadores isótopos estables, en especial cuando no se dispone de los isótopos radiactivos adecuados. Así, por ejemplo, los dos isótopos raros del hidrógeno son un isótopo estable ($^2H_1$ o **deuterio**) y un isótopo radiactivo ($^3H_1$ o **tritio**). De entre los múltiples usos de los isótopos estables en la investigación bioquímica, citaremos aquí tres aplicaciones. En primer lugar, la incorporación de un isótopo estable suele aumentar la densidad de un material, puesto que los isótopos raros generalmente tienen pesos atómicos superiores a los de los isótopos que se encuentran de manera más abundante. Esta diferencia proporciona una forma de separar físicamente los compuestos marcados de los no marcados, como en el experimento de Meselson-Stahl sobre la replicación del DNA (véase el Capítulo 4). En segundo lugar, los compuestos marcados con isótopos estables, en especial el ^{13}C, se utilizan mucho en los estudios de resonancia magnética nuclear de la estructura molecular y de los mecanismos de reacción (véase Herramientas de la Bioquímica 6A). En tercer lugar, los isótopos estables pueden utilizarse como trazadores en ausencia de isótopos radiactivos adecuados, como se ha indicado antes. Así, por ejemplo, no existen isótopos radiactivos del oxígeno ni del nitrógeno, por lo que el ^{18}O y el ^{15}N constituyen trazadores útiles de estos elementos. Los isótopos estables se detectan y cuantifican mediante el espectrómetro de masas, una metodología algo más laboriosa en comparación con el recuento de la radiactividad.

En la Tabla 12A.1 se presenta información acerca de los isótopos, tanto estables como radiactivos, que han resultado de mayor utilidad en bioquímica.

TABLA **12A.1**
ALGUNOS ISÓTOPOS ÚTILES EN BIOQUÍMICA

			Energía máxima	
Isótopo	**Estable o radiactivo**	**Emisión**	**Semivida**	**(mev[a])**
^2H	Estable			
^3H	Radiactivo	β	12.1 años	0.018
^{13}C	Estable			
^{14}C	Radiactivo	β	5568 años	0.155
^{15}N	Estable			
^{18}O	Estable			
^{24}Na	Radiactivo	β (γ γ)	15 horas	1.39
^{32}P	Radiactivo	β	14.2 días	1.71
^{35}S	Radiactivo	β	87 días	0.167
^{45}Ca	Radiactivo	β	164 días	0.254
^{59}Fe	Radiactivo	β (γ γ)	45 días	0.46, 0.27
^{131}I	Radiactivo	β (γ γ)	8.1 días	0.335, 0.608

[a]mev = millón de electrón-voltios.

Naturaleza de la desintegración radiactiva

El núcleo atómico de un elemento inestable puede desintegrarse, dando lugar a uno o más de los tres tipos de radiación ionizante: rayos α, β o γ. Tan sólo los isótopos radiactivos emisores β y γ son útiles en la investigación bioquímica; los más útiles se indican en la Tabla 12A.1. Un rayo β es un electrón emitido y un rayo γ es un fotón de alta energía. Los detectores de rayos γ han encontrado una amplia aplicación en la investigación inmunológica, ya que se dispone de isótopos de yodo emisores γ y es fácil yodar anticuerpos, como muchas proteínas, sin producir modificaciones sustanciales de sus propiedades biológicas. Sin embargo, la mayor parte de las aplicaciones bioquímicas de los isótopos radiactivos utilizan emisores β.

La desintegración radiactiva es un proceso cinético de primer orden. La probabilidad de que un determinado núcleo atómico se desintegre no se ve afectada por el número de fenómenos de desintegración previos que se han producido ni por la interacción con otros núcleos radiactivos. Se trata más bien de una propiedad intrínseca de ese núcleo. En consecuencia, el número de fenómenos de desintegración que se producen en un determinado intervalo de tiempo sólo está relacionado con el número de átomos radiactivos presentes. Este fenómeno da lugar a la **ley de la desintegración radiactiva**:

$$N = N_0 e^{-\lambda t}$$

en la que N_0 es el número de átomos radiactivos en el tiempo 0, N es el número de átomos que quedan en el tiempo t, y λ es una constante de desintegración radiactiva para un determinado isótopo, que está relacionada con la inestabilidad intrínseca de ese isótopo. Esta ecuación establece que es constante la *fracción* de núcleos en una población que se desintegra en un determinado intervalo de tiempo. Por este motivo, un parámetro más práctico que la constante de desintegración λ es la **semivida**, $t_{1/2}$, que es el tiempo requerido para que se desintegren la mitad de los núcleos de una muestra. La semivida es igual a $-\ln 0.5/\lambda$, es decir, $+0.693/\lambda$. La semivida, al igual que λ, es una propiedad intrínseca de cada isótopo radiactivo (véase la Tabla 12A.1).

La unidad básica de la desintegración radiactiva es el **curio** (Ci). Esta unidad se define como la cantidad de radiactividad equivalente a la existente en 1 g de radio, es decir, 2.22×10^{12} desintegraciones por minuto (dpm). Los bioquímicos suelen trabajar con cantidades mucho menores de material radiactivo, el **milicurio** (mCi) y el **microcurio** (μCi), que corresponden a 2.2×10^9 y 2.2×10^6 dpm, respectivamente. Dado que los detectores de radiactividad rara vez registran todos los fenómenos de desintegración de una muestra, es decir, no tienen una eficacia del 100%, solemos hablar de la radiactividad en términos de los fenómenos de desintegración realmente registrados, es decir, cuentas por minuto, o cpm. La eficacia del contaje es el porcentaje de fenómenos de desintegración realmente registrados, determinado, por ejemplo, mediante la comparación con estándares. Un contador que tenga una efi-

cacia del 50% para un determinado isótopo daría un contaje de 1.1×10^5 cpm para una muestra con 0.1 μCi.

Detección de radiactividad: el contador de centelleo líquido

Los contadores Geiger se utilizaron mucho hace tres décadas, pero prácticamente todo el trabajo realizado con isótopos emisores β se realiza en la actualidad con el **contador de centelleo líquido**, por dos razones. En primer lugar, el contador de centelleo tiene una eficacia muy superior al contador Geiger y, en segundo lugar, pueden determinarse simultáneamente las radiactividades de dos isótopos diferentes en la misma muestra.

En el contaje de centelleo, la muestra se disuelve o se suspende generalmente en un disolvente orgánico, aunque pueden utilizarse mezclas acuosas. También se incluyen uno o dos compuestos orgánicos fluorescentes o **flúores**. Una partícula β emitida por la muestra tiene una elevada probabilidad de golpear a una molécula del disolvente; este contacto excita a la molécula de disolvente, que hace que uno de sus electrones pase a un orbital de energía superior. Cuando ese electrón vuelve al estado basal, se emite un fotón de luz. El fotón es absorbido por una molécula del flúor, que a su vez se excita. La fluorescencia implica la absorción de luz a una determinada energía, seguida de la emisión de esa luz a una energía inferior, o longitud de onda superior. Un fotomultiplicador detecta ese pequeño destello de luz y para cada desintegración lo convierte en una señal eléctrica que se registra y cuenta.

Mientras que los rayos γ se emiten a unos valores de energía bien definidos y característicos, los isótopos emisores β presentan toda una gama de valores de energía en sus emisiones. Cada emisor β presenta un **espectro energético** característico, es decir, una representación de la energía (en millones de electrón-voltios, o mev) frente a la probabilidad de que una emisión individual tenga esa energía. En la Figura 12A.1 se muestran los espectros de energía de tres isótopos radiactivos muy utilizados (^{3}H, ^{14}C y ^{32}P).

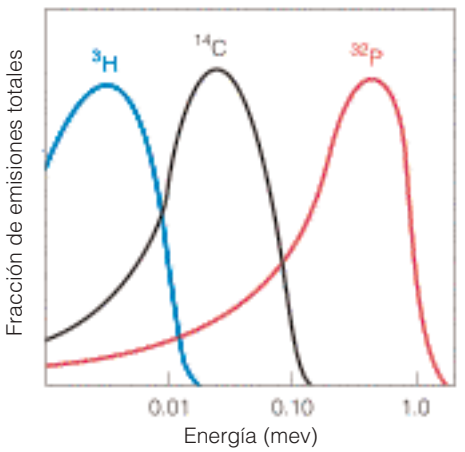


FIGURA **12A.1**

Espectros energéticos de algunos isótopos emisores β. Se muestran aquí los espectros de los tres isótopos emisores β más utilizados en bioquímica: ^{3}H, ^{14}C y ^{32}P.

Estas diferencias de las energías de emisión se utilizan en el contador de centelleo líquido, de tal manera que pueden cuantificarse simultáneamente dos isótopos de la misma muestra (experimento de doble marcaje). Una emisión β fuerte activa más moléculas del flúor que una emisión débil, por lo que produce un destello de luz más intenso. Este nivel del destello puede detectarse mediante el ajuste de discriminadores electrónicos de tal manera que se registren tan sólo los valores de energía comprendidos dentro de unos límites, es decir, estableciendo una "ventana" que se optimiza para la detección de un isótopo concreto. Esta restricción reduce la eficacia del contaje, puesto que sólo se contabiliza una fracción de las emisiones procedentes del isótopo de alta energía, pero permite una gran selectividad. La mayor parte de los contadores de centelleo tienen tres conjuntos diferentes de discriminadores o **canales de contaje**. Así pues, los isótopos pueden contarse simultáneamente en tres ventanas diferentes.

Dado que la desintegración radiactiva es un proceso aleatorio, cuantas más cuentas se observen durante el análisis de una muestra, más próxima está la radiactividad medida al verdadero valor de desintegración. Así pues, en la práctica, un investigador cuenta una muestra durante el tiempo suficiente para acumular varios miles de cuentas. Además, el investigador debe tener en cuenta la relación señal/ruido y ha de diseñar un experimento de tal manera que la radiactividad medida en las muestras de interés sea muchas veces superior a la **radiactividad de fondo**, es decir, al recuento obtenido en ausencia de una muestra radiactiva.

Algunas aplicaciones de los isótopos radiactivos en bioquímica

Los isótopos radiactivos tienen múltiples aplicaciones en las investigaciones metabólicas. Describiremos aquí algunos ejemplos. Los experimentos con trazadores pueden clasificarse en cuanto al tiempo de exposición del sistema biológico al isótopo radiactivo e incluyen: (1) marcaje de equilibrio, (2) marcaje de pulso, y (3) marcaje de pulso y caza.

En el **marcaje de equilibrio**, la exposición al trazador es relativamente prolongada, de manera que cada especie molecular marcada alcance una **radiactividad específica** o **actividad específica** constante. La actividad específica es una medida de la abundancia relativa de moléculas radiactivas en una muestra marcada y se presenta en forma de radiactividad por unidad de masa (por ejemplo, cpm/μmol).

Los experimentos para identificar los precursores metabólicos suelen utilizar unas condiciones de marcaje de equilibrio. El investigador administra un precursor marcado radiactivamente con objeto de aumentar al máximo la probabilidad de detectar el marcador en el producto. Un buen ejemplo de ello, que se ha mencionado ya anteriormente en este capítulo, es el estudio de Konrad Bloch de la biosíntesis del colesterol, en el que se administró a ratas acetato marcado con ^{14}C. Bloch aisló posteriormente el colesterol del hígado y determinó, mediante degradación química, los átomos de car-

bono concretos del colesterol que habían incorporado la radiactividad.

El marcaje de equilibrio puede utilizarse formando parte de un procedimiento de purificación de especies moleculares biológicas de interés. Un ejemplo de ello es la purificación realizada por Mark Ptashne de un represor genético (véase el Capítulo 26). Ptashne disponía de dos cepas bacterianas, una diseñada para producir un exceso del supuesto represor, y la otra idéntica excepto que no era capaz de sintetizar el represor. La primera cepa se cultivó durante varias generaciones en presencia de [^{14}C]leucina, y la segunda se cultivó de manera similar con [^{3}H]leucina. Se mezclaron los cultivos y se fraccionaron las proteínas, previendo que el represor sería la única proteína presente que estuviera marcada con ^{14}C pero no con ^{3}H. Se aisló una proteína con una elevada proporción de ^{14}C/^{3}H, que posteriormente se comprobó que era el represor.

Otra aplicación del marcaje de equilibrio es la medida de las velocidades de los procesos biológicos a partir de las velocidades de marcaje mediante precursores de bajo peso molecular. Un ejemplo de ello es la utilización de la timidina marcada radiactivamente para determinar las velocidades de síntesis de DNA, tanto en cultivos celulares como en organismos intactos. La incorporación de la timidina a macromoléculas distintas del DNA es desdeñable, por lo que el investigador sólo tiene que obtener muestras de la población a lo largo del tiempo y observar la incorporación en el material insoluble en ácido. Sin embargo, esta medida por sí sola no proporciona la velocidad real de replicación del DNA. El investigador ha de tener en cuenta el metabolismo del precursor marcado en su camino hacia el destino final. Como se observa en la Figura 12A.2, la timidina se convierte primero en timidina monofosfato, luego en el difosfato y, por último, en el trifosfato, que es el sustrato real para la síntesis del DNA. En cada fase, el precursor marcado se mezcla con el contenido intracelular global de precursores no marcados, con lo que se diluye su radiactividad específica. El experimento de marcaje proporciona tan sólo una velocidad de marcaje del DNA, en cpm incorporadas a la célula por unidad de tiempo. Para obtener la velocidad verdadera, en moléculas incorporadas por célula por unidad de tiempo, es preciso dividir el resultado inicial por la actividad específica del precursor inmediato, en este caso, el dTTP. El cálculo de esa actividad específica requiere el aislamiento del dTTP en cantidad y pureza suficientes para poder determinar su masa y su radiactividad.

A estas dificultades se añade la posibilidad de compartimentación. En este caso, una célula puede tener dos o más conjuntos de dTTP, cada uno de los cuales se marca a una

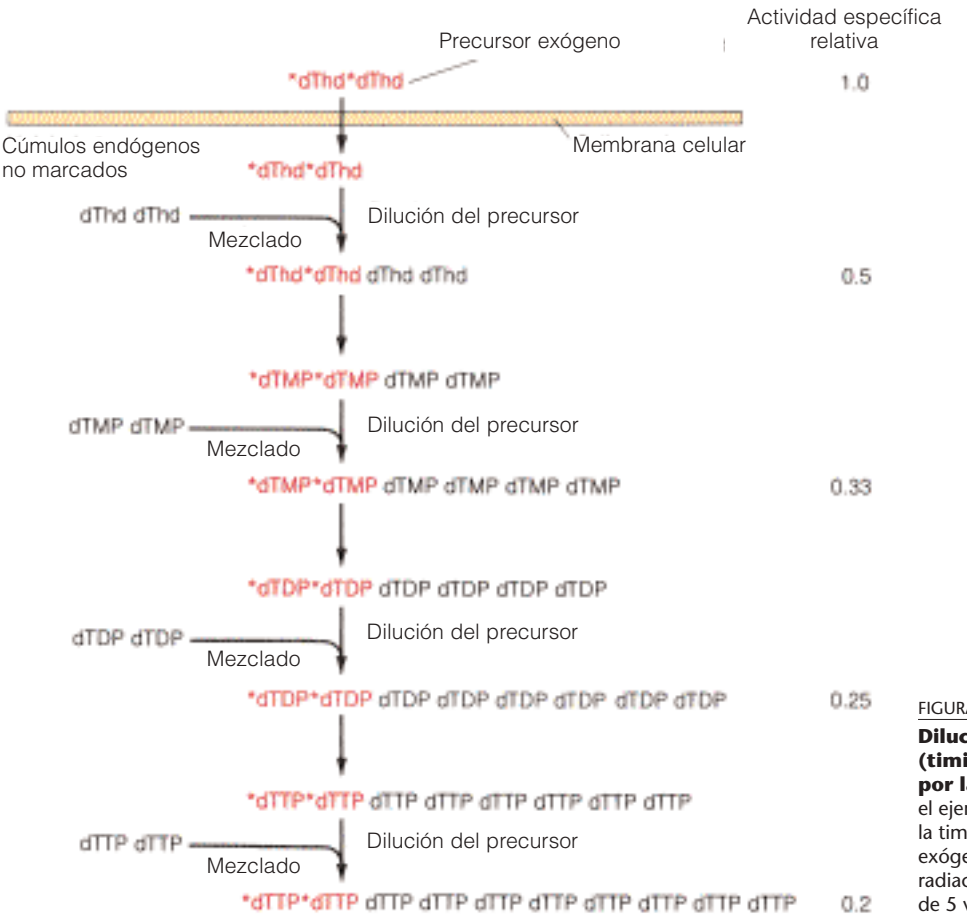


FIGURA **12A.2**

Dilución de un precursor metabólico exógeno (timidina marcada radiactivamente, *dThd) por las reservas endógenas no marcadas. En el ejemplo que se presenta, la actividad específica de la timidina trifosfato se reduce al 20% la de la timidina exógena. Así pues, la velocidad de incorporación de la radiactividad al DNA conduciría a una infravaloración de 5 veces la velocidad verdadera de síntesis del DNA.

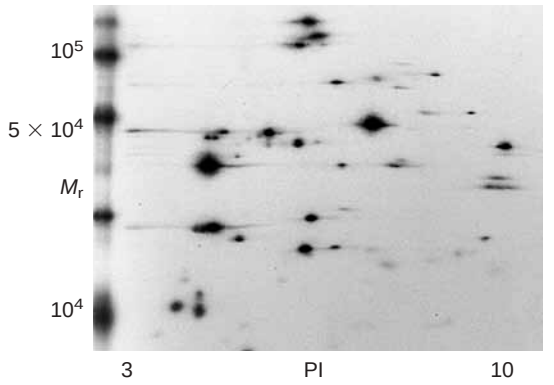


FIGURA **12A.3**

Electroforesis bidimensional de un extracto de proteínas del bacteriófago T4, marcadas de 3 a 8 minutos después de la infección de *E. coli*. Las bandas radiactivas de la izquierda identifican los estándares de peso molecular.

Cortesía de Linda J. Wheeler.

velocidad diferente, pero sólo uno de ellos se utiliza para la replicación del DNA. Existen varias formas de abordar esta situación; la mejor es el empleo de una cepa mutante que no sea capaz de sintetizar nucleótidos de timidina. Todos los compuestos de timidina han de aportarse, pues, exógenamente, y todos los conjuntos intracelulares de dTTP alcanzarán la misma actividad específica, es decir, la del precursor exógeno.

El **marcaje de pulso** se basa en la administración de un precursor isotópico durante un intervalo corto en comparación con el proceso que se estudia. El marcaje radiactivo se acumula preferentemente en las especies de vida más corta, es decir, los intermediarios primeros de la ruta metabólica, ya que cuanto más breve es el intervalo de marcaje, menos tiempo hay para la pérdida de radiactividad de un conjunto marcado mediante la degradación de los metabolitos de marcado rápido y de vida corta. Melvin Calvin identificó la ruta de fijación del carbono en la fotosíntesis marcando algas verdes con $^{14}CO_2$ durante tan sólo unos pocos segundos. Si el marcaje se realizaba durante 10 s, podían detectarse una docena de compuestos radiactivos o más. Después de un pulso de radiactividad de 5 s, sólo estaba marcado un compuesto, el 3-fosfoglicerato. Este hallazgo condujo, en última instancia, al descubrimiento de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa como la primera enzima de la ruta de fijación fotosintética del carbono (véase el Capítulo 17).

En un experimento de **pulso y caza**, el investigador administra el marcaje durante un período de tiempo breve y luego reduce rápidamente la actividad específica del precursor isotópico para impedir su posterior incorporación. Esta reducción puede realizarse mediante la adición de un precursor sin marcar con un exceso molar de alrededor de 1000 veces, con lo que se diluye mucho el isótopo radiactivo todavía presente. El investigador obtiene muestras a varios intervalos posteriores, para determinar el destino metabólico del material que se ha marcado durante el pulso. El RNA mensajero se detectó inicialmente mediante cultivos bacterianos con marcaje de pulso (véase el Capítulo 26). Los métodos analíticos tradicionales no podían detectar el mRNA, debido a su baja cantidad y a la inestabilidad metabólica en las células bacterianas. Cuando el marcador incorporado al mRNA mediante un pulso de [^{32}P]ortofosfato o uridina marcada se cazaba, se observó que el marcaje finalmente estaba distribuido uniformemente en todas las especies de RNA celular. Este hallazgo demostró que la inestabilidad metabólica del mRNA implica su degradación a los nucleótidos, que pueden utilizarse posteriormente para la síntesis de otras especies de RNA.

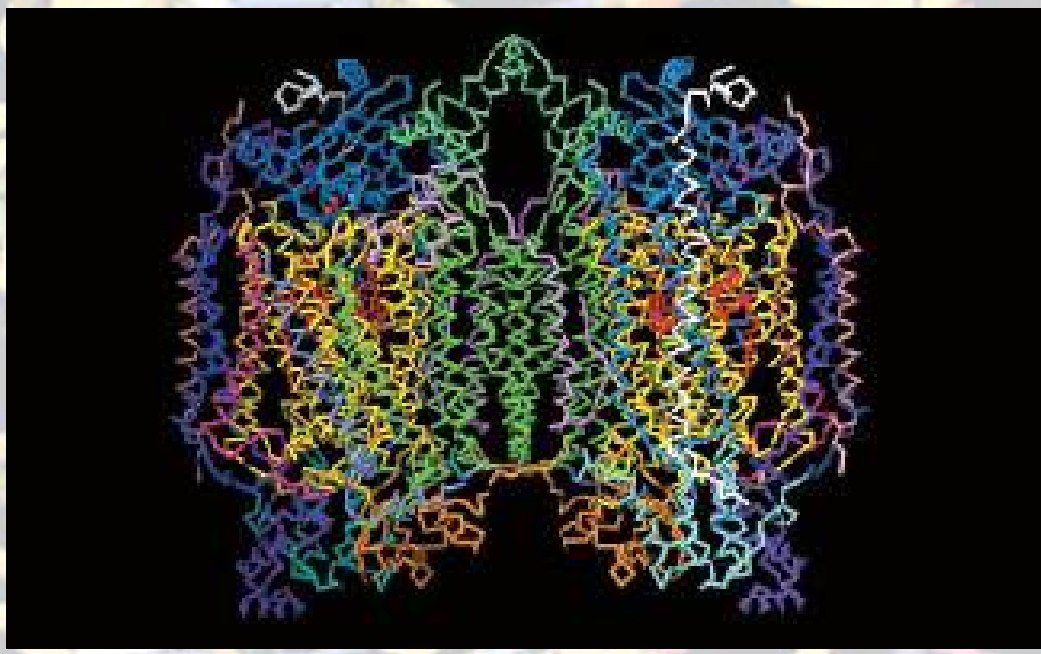
Una última aplicación de los isótopos radiactivos es la **autorradiografía**, en la que el investigador incorpora un precursor isotópico a una biomolécula y obtiene una imagen de la molécula marcada radiactivamente en una película fotográfica. En el Capítulo 24 se mostrarán varias autorradiografías de moléculas de DNA individuales a las que se aplicó un marcaje radiactivo mediante el cultivo de *E. coli* en presencia de [^{3}H]timidina. Conviene mencionar aquí la **electroforesis en gel bidimensional**, una técnica que permite visualizar la práctica totalidad de las proteínas de una célula o tejido. En el ejemplo de la Figura 12A.3, se aplicó un marcaje de pulso con [^{35}S]metionina a un cultivo de *E. coli* infectado por el bacteriófago T4. Se resolvió un extracto de las proteínas marcadas, en primer lugar mediante enfoque isoeléctrico (véase Herramientas de la Bioquímica 2A), que separa las proteínas de derecha a izquierda, y luego mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, que separa las proteínas en función de su peso molecular. Se secó el gel y se utilizó para exponer una película sensible a los rayos X. Cada mancha corresponde a una proteína, cuya velocidad de síntesis está relacionada con la intensidad de la mancha. El peso molecular y el punto isoeléctrico que proporciona la autorradiografía, junto con otra información (como las propiedades de los mutantes que afectan a la síntesis de una determinada proteína), permiten la identificación de muchas de las manchas de proteínas.

Bibliografía

Freifelder, D. (1982) *Physical Biochemistry*, 2.ª ed. W. H. Freeman, San Francisco. El Capítulo 5 de este libro presenta una descripción clara de las técnicas de marcaje y contaje radiactivo.

PARTE IV

Dinámica de la vida: Energía, biosíntesis y utilización de los precursores



CAPÍTULO 13

Metabolismo de los hidratos de carbono I: Procesos anaerobios en la generación de energía metabólica

NUESTRO ESTUDIO DETALLADO DEL METABOLISMO SE INICIA CON LAS FASES anaerobias del metabolismo de los hidratos de carbono (Figura 13.1). La mayor parte de este capítulo está dedicado a la glucólisis, que es la ruta inicial del catabolismo de los hidratos de carbono. El término *glucólisis* procede de las palabras griegas que significan "dulce" y "romper". Literalmente, la denominación es correcta, puesto que la glucólisis es la ruta por medio de la cual los azúcares de seis carbonos (que son dulces) se rompen, dando lugar a un compuesto de tres carbonos, el piruvato. Durante la glucólisis, parte de la energía potencial almacenada en la estructura de hexosa se libera y se utiliza para la síntesis de ATP a partir de ADP. La glucólisis puede realizarse en condiciones anaerobias, sin oxidación neta de los azúcares sustrato. Los **anaerobios**, que son microorganismos que viven en ambientes sin oxígeno, pueden obtener toda su energía metabólica por este proceso. No obstante, las células aerobias utilizan también la glucólisis. En estas células, la glucólisis es la parte anaerobia inicial de una ruta de degradación global que comporta un considerable consumo de oxígeno y la oxidación completa de los hidratos de carbono.

La glucólisis es por varias razones un punto adecuado para iniciar el estudio detallado del metabolismo. En primer lugar, fue la primera ruta metabólica que se entendió con detalle. En segundo lugar, se trata de una ruta casi universal en las células vivas. En tercer lugar, la regulación de la glucólisis se conoce especialmente bien. Por último, aunque no por ello menos importante, esta ruta desempeña un papel metabólico central en la generación de energía y de intermediarios metabólicos para otras rutas. Es uno de los caminos más ocupados del mapa de carreteras metabólico, pero está conectado también con otros caminos menos transitados.

Aunque las células pueden metabolizar diversas hexosas en la glucólisis, la glucosa es el principal combustible hidrato de carbono para la mayor parte de las células. De hecho, algunos tejidos animales, como el cerebro, utilizan normalmente glucosa como única fuente de energía, y toda la generación de energía de estas células se inicia con la glucólisis. Sin embargo, la mayor parte de las células pueden utilizar otros azúcares, y exploraremos cómo se convierten estos azúcares en intermediarios de la glucólisis. También analizaremos los procesos

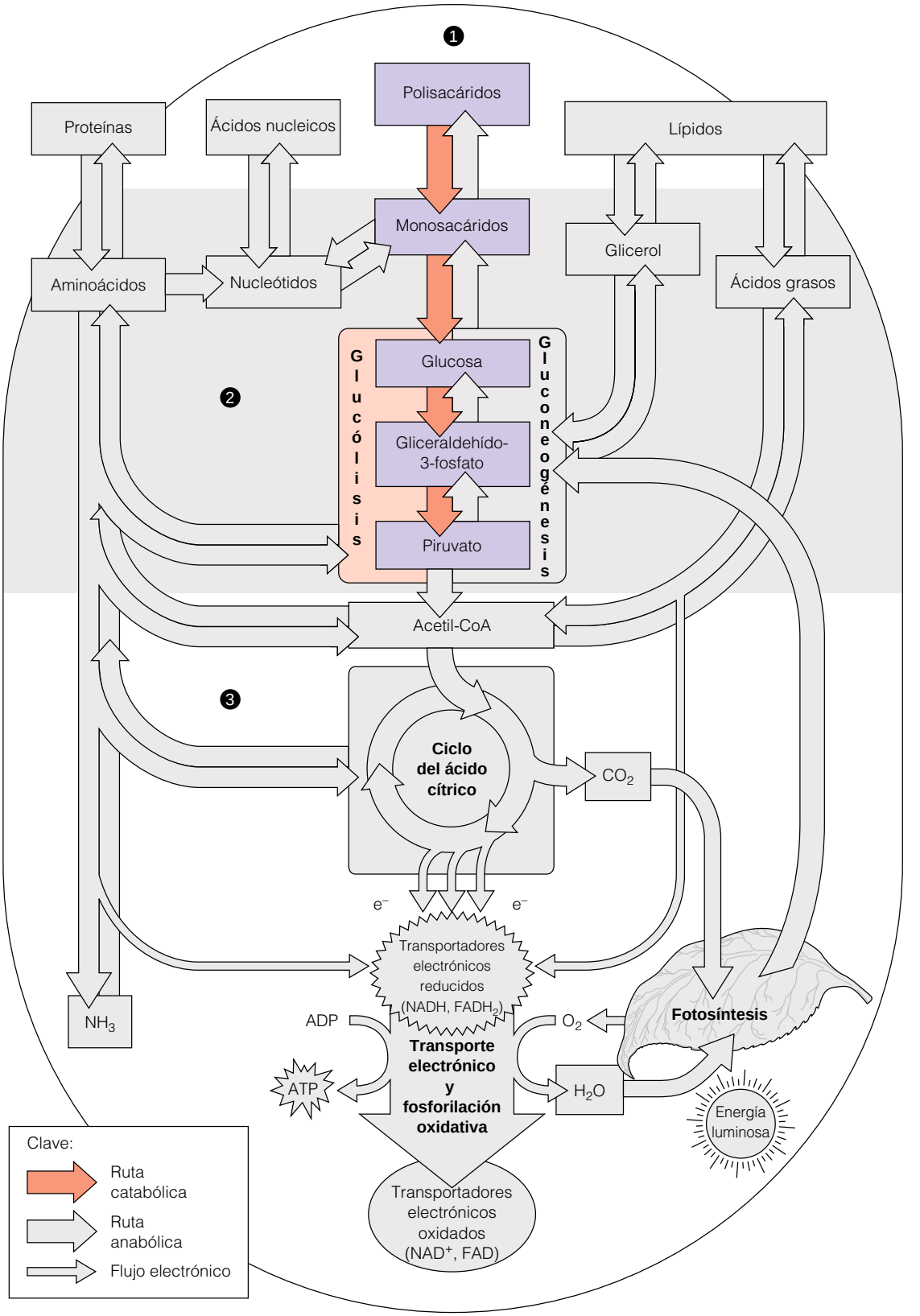


FIGURA **13.1**

Procesos anaerobios en la generación de energía metabólica. Las zonas púrpuras del mapa metabólico indican la ruta glucolítica y la degradación de los polisacáridos que aportan sustratos a esta ruta. La glucólisis genera ATP de forma anaerobia, y proporciona combustible para las rutas aerobias de generación de energía. Los números 1, 2 y 3 identifican los tres niveles del metabolismo (véase el Capítulo 12).

mediante los cuales los hidratos de carbono que se almacenan en forma de polisacáridos se ponen a disposición de la glucólisis.

Glucólisis: perspectiva

RELACIÓN DE LA GLUCÓLISIS CON OTRAS RUTAS

La glucólisis es una ruta de 10 pasos que convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, con la generación de dos moléculas de ATP. La degradación de los polisacáridos de almacenamiento y el metabolismo de los oligosacáridos da lugar a glucosa, hexosas relacionadas y azúcares fosfato, todos ellos se dirigen hacia la ruta glucolítica. Nos centraremos inicialmente en la ruta que comienza con la glucosa, y comentaremos luego las formas de entrada de otros hidratos de carbono.

Las diez reacciones entre la glucosa y el piruvato pueden considerarse como dos fases distintas, que se esquematizan en la Figura 13.2. Las cinco primeras reacciones constituyen una **fase de inversión de energía**, en la que se sintetizan azúcares fosfato a costa de dos moles de ATP (que se convierte en ADP), y el sustrato de seis carbonos se desdobla en 2 azúcares fosfato de tres carbonos. Las cinco últimas reacciones corresponden a una **fase de generación de energía**, en la que las triosas fosfato se convierten en compuestos de gran energía que transfieren 4 moles de fosfato al ADP dando lugar a 4 moles de ATP. El rendimiento neto, por mol de glucosa metabolizada, es de 2 moles de ATP y 2 moles de piruvato. Obsérvese que se generan también 2 equivalentes reductores, en forma de NADH.

En los organismos aerobios, la glucólisis es el primer paso de la oxidación completa de la glucosa a CO_2 y agua. El segundo paso es la oxidación del piruvato a acetil-CoA, y el proceso final es la oxidación de los carbonos del grupo acetilo en el ciclo del ácido cítrico (véase la Figura 13.1). En el Capítulo 14 se presentarán de manera detallada estos últimos procesos. La glucólisis da lugar también a intermedios biosintéticos. Así, la glucólisis es una ruta tanto anabólica como catabólica, cuya importancia va más allá de la síntesis de ATP y de los sustratos para el ciclo del ácido cítrico.

GLUCÓLISIS ANAEROBIA Y AEROBIA

La glucólisis es una ruta metabólica antigua que, probablemente, fue utilizada por las primeras bacterias conocidas, hace unos 3500 millones de años. Desde entonces, transcurrieron aproximadamente 1000 millones de años hasta que los primeros organismos conocidos con capacidad de fotosíntesis empezaron a aportar O_2 a la atmósfera de la Tierra, por lo que la glucólisis hubo de funcionar inicialmente en unas condiciones completamente anaerobias, sin un cambio neto del estado de oxidación cuando los sustratos se convierten en productos. Sin embargo, obsérvese en la Figura 13.2 que la conversión de la glucosa en piruvato, que oxida los carbonos de la glucosa, comporta la reducción simultánea de 2 moles de NAD^+ a NADH. Para que la ruta actúe en condiciones anaerobias, el NADH debe reoxidarse a NAD^+ mediante la transferencia de sus electrones a un **aceptor electrónico**, con objeto de *mantener un estado estacionario*. Algunos microorganismos que crecen en condiciones anaerobias pueden generar más energía mediante la transferencia de los electrones a sustancias inorgánicas como el ion sulfato o el ion nitrato, y algunos microorganismos reducen los sustratos orgánicos. La ruta más directa es la que utilizan las bacterias del ácido láctico, que emplean simplemente el NADH para reducir el piruvato a lac-

Las diez reacciones de la glucólisis se producen en dos fases: inversión de energía (primeras cinco reacciones) y generación de energía (últimas cinco reacciones).

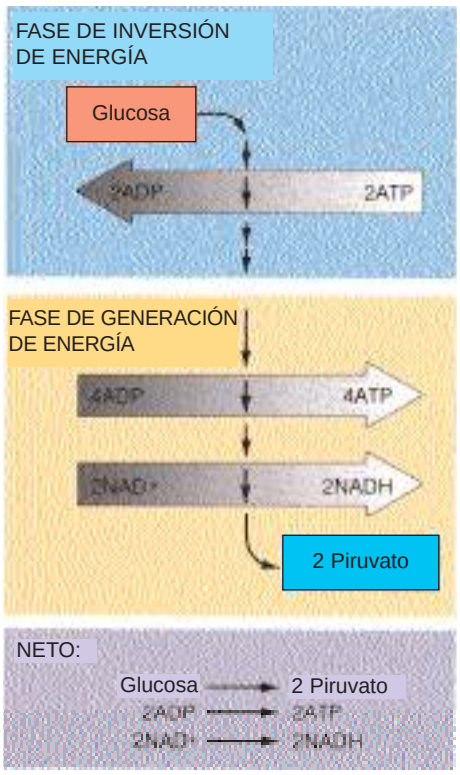
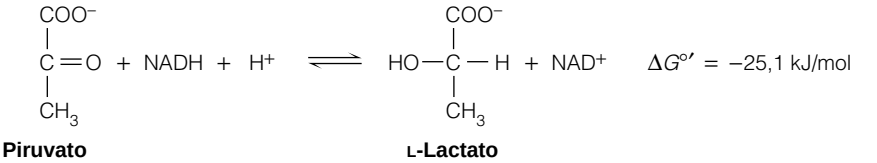


FIGURA **13.2**
Las dos fases de la glucólisis y los productos de la misma.

tato, mediante la enzima **lactato deshidrogenasa**. Esta reacción es la que se produce cuando se agria la leche.



Una fermentación es una ruta metabólica productora de energía sin un cambio neto del estado de oxidación de los productos en comparación con los sustratos.

La glucólisis forma parte, pues, de una fermentación, que se define como una ruta metabólica productora de energía que no comporta un cambio neto del estado de oxidación. La fermentación del ácido láctico (conversión de glucosa en lactato) es importante en la elaboración del queso. Otra fermentación importante es la que comporta la ruptura del piruvato a acetaldehído y CO_2 (véase la página 517), para que luego el acetaldehído se reduzca a etanol por la **alcohol deshidrogenasa**:

$$CH_3CHO + NADH + H^+ \rightleftharpoons CH_3CH_2OH + NAD^+$$

Esta fermentación, realizada por las levaduras, genera el etanol de las bebidas alcohólicas. Las levaduras utilizadas en la elaboración del pan realizan también la fermentación alcohólica; el CO_2 producido por la descarboxilación del piruvato hace que el pan se eleve, y el etanol producido se evapora durante la cocción. Entre las docenas de fermentaciones útiles se encuentran las que dan lugar al ácido acético (elaboración del vinagre) y al ácido propiónico (elaboración del queso suizo).

Las células animales, como las bacterias del ácido láctico, pueden reducir el piruvato a lactato, y lo hacen cuando el piruvato se produce con una rapidez mayor que la que puede oxidarse mediante el ciclo del ácido cítrico. Durante el ejercicio extenuante, las células del músculo esquelético obtienen la mayor parte de su energía mediante esta **glucólisis anaerobia**, la glucólisis que se produce en condiciones anaerobias.

La glucólisis anaerobia (como la glucólisis aerobia) da lugar a piruvato, pero luego el piruvato se reduce, de manera que no se produce una oxidación neta de la glucosa.

Consideremos, en cambio, lo que ocurre en una célula con una *respiración* activa, esto es, la degradación oxidativa y la liberación de energía a partir de las moléculas de nutrientes mediante la reacción con el oxígeno. En estas células, el piruvato se oxida a acetil-CoA, que entra en el ciclo del ácido cítrico. El NADH producido durante la glucólisis se oxida de nuevo mediante la cadena de transporte electrónico mitocondrial para producir más energía (véase el Capítulo 15), y los electrones se transfieren finalmente al O_2, que es el aceptor electrónico terminal. La conversión de la glucosa en piruvato en una célula que respira se denomina **glucólisis aerobia**.

EXPERIMENTOS INICIALES CRUCIALES

Desde que el ser humano utiliza las levaduras para elaborar el pan y la cerveza, se ha aprovechado la glucólisis, a pesar de que no se ha entendido hasta el siglo pasdo. (La definición inicial de *fermentación* fue "un cambio químico con efervescencia".) La demostración efectuada por Louis Pasteur en 1856 de que las fermentaciones las realizaban microorganismos constituye un hito en la historia de la ciencia. La opinión predominante en la época era que un proceso como el de la fermentación de la glucosa para dar etanol era tan complejo que no podía reproducirse fuera de una célula viva. Sin embargo, como vimos en el Capítulo 1, Eduard y Hans Büchner demostraron en 1897 que la fermentación podía producirse en condiciones acelulares.

En 1905, Arthur Harden y William Young observaron que cuando se añade fosfato inorgánico a un extracto de levaduras se estimula y se prolonga la fermentación de la glucosa. Durante la fermentación, el fosfato inorgánico desaparecía del medio de reacción, lo que llevó a Harden y Young a sugerir que la fermentación se producía mediante la formación de uno o más ésteres azúcar fosfato.

Esta observación abrió la puerta a la disección de las reacciones químicas individuales que participan en la fermentación, un logro realizado en Alemania en los años 1930, en gran parte por G. Embden, O. Meyerhof y O. Warburg. Por este motivo, a veces a la glucólisis se la denomina **ruta de Embden-Meyerhof**. Estos científicos identificaron 10 reacciones diferentes, prácticamente idénticas en una amplia gama de organismos, que llevan la glucosa a piruvato. La glucólisis es la primera ruta metabólica que se elucidó como una serie de reacciones químicas definidas. En la actualidad existe una amplia información sobre la estructura y el mecanismo de acción de cada una de las enzimas que intervienen en ella.

ESTRATEGIA DE LA GLUCÓLISIS

El ATP se sintetiza mediante tres rutas principales: fosforilación a nivel de sustrato, fosforilación oxidativa y fotofosforilación.

La glucólisis es una ruta tan importante que examinaremos cada una de sus 10 reacciones con más detalle. Antes de hacerlo, echemos un vistazo a la ruta en conjunto. En primer lugar, recordemos del Capítulo 12 que en las células eucariotas la glucólisis se produce en el citosol, y que en las mitocondrias tiene lugar la ulterior oxidación del piruvato. (Determinados tripanosomas, que son los protozoos parásitos que causan la enfermedad del sueño africana, constituyen una excepción interesante. Estos organismos llevan a cabo las siete primeras reacciones de la glucólisis en un orgánulo citoplasmático organizado, denominado **glucosoma**.)

En la Figura 13.3 se presenta de manera abreviada la conversión de la glucosa en piruvato. En la fase de inversión de energía (las cinco primeras reacciones), el azúcar se activa metabólicamente por fosforilación. Este proceso da lugar a un azúcar fosforilado de seis carbonos, la **fructosa-1,6-bisfosfato**, que se fragmenta para dar 2 moles de triosa fosfato: **gliceraldehído-3-fosfato** y **dihidroxiacetona fosfato**.

En la fase de generación de energía (reacciones 6 a 10), las triosas fosfato se activan más para dar dos compuestos que contienen enlaces fosfato de energía elevada, primero el **1,3-bisfosfoglicerato** y luego el **fosfoenolpiruvato**. Recordemos de la Figura 3.7 (página 85) que cada uno de estos compuestos tiene un $\Delta G^{\circ\prime}$ de hidrólisis superior al del ATP y se les puede considerar compuestos de energía super-elevada. Durante la fase de generación de energía, cada uno de estos compuestos transfiere su fosfato de energía elevada al ADP, dando ATP. Este proceso se denomina **fosforilación a nivel de sustrato**, es decir, la transferencia de un grupo fosforilo desde un compuesto de energía super-elevada al ADP para dar ATP. La fosforilación a nivel de sustrato es distinta de la fosforilación oxidativa que es la síntesis de ATP impulsada por el transporte electrónico (véase el Capítulo 15), y de la **fotofosforilación** que es la utilización de la energía luminosa de la fotosíntesis para impulsar la síntesis de ATP (véase el Capítulo 17).

Dado que se metabolizan 2 moles de triosa fosfato por mol de glucosa, el rendimiento de las dos fosforilaciones a nivel de sustrato de la glucólisis es de 4 moles de ATP por mol de glucosa. Restando de ello los 2 moles de ATP invertidos en la primera fase (reacciones 1-5), obtenemos una ganancia neta de dos moléculas de ATP sintetizadas por molécula de glucosa convertida en piruvato (véase la Figura 13.2).

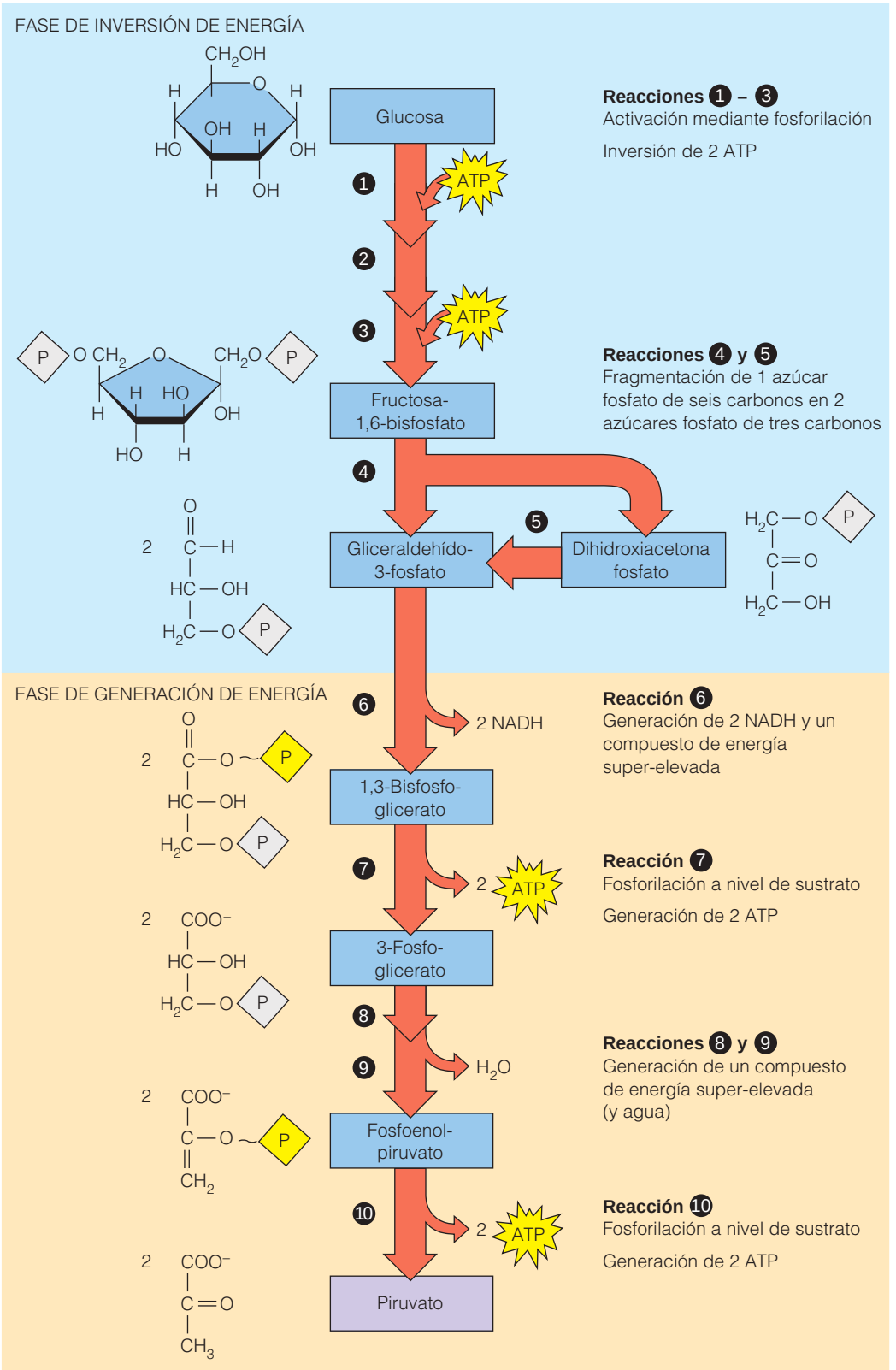


FIGURA **13.3**

Visión general de la glucólisis. Esta presentación resumida de la glucólisis muestra los intermediarios clave y las reacciones en cada una de las dos fases principales. En la fase de generación de energía, se producen dos ATP por cada ATP utilizado en la fase de inversión de energía. Aquí y en otros lugares, los enlaces fosfato de energía elevada se representan mediante el color amarillo del grupo fosfato.

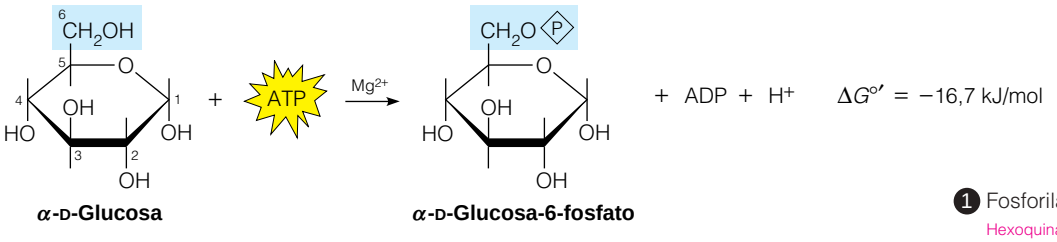
Reacciones de la glucólisis

Consideremos ahora de manera secuencial las 10 reacciones que van de la glucosa al piruvato, numerando cada reacción tal como se indica en la Figura 13.3. Se indican los nombres completos de los sustratos y los productos al presentar cada reacción, pero en el texto estos nombres se abrevian en aras de una mayor simplicidad. Así, la glucosa-6-fosfato es lo mismo que la α-D-glucosa-6-fosfato.

REACCIONES 1-5: FASE DE INVERSIÓN DE ENERGÍA

Las cinco primeras reacciones, que constituyen la fase de inversión de energía, se resumen en el margen.

Reacción 1: primera inversión de ATP
Empezamos con la fosforilación de la glucosa dependiente del ATP, catalizada por la **hexoquinasa**.

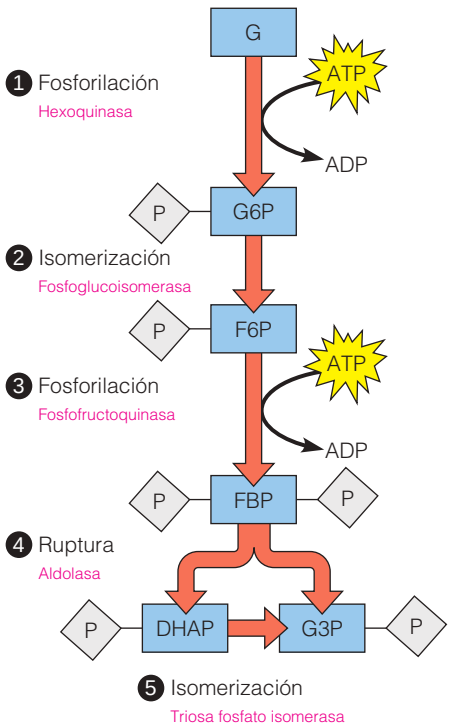


α-D-Glucosa — α-D-Glucosa-6-fosfato

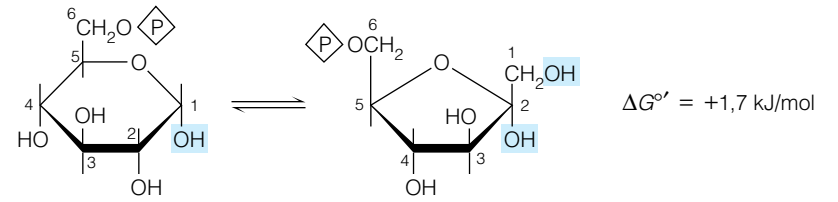
Se requiere ion magnesio, ya que la forma reactiva del ATP es su complejo quelado con Mg^{2+} (véase la página 476), lo que sucede con casi todas las enzimas que requieren ATP. La hexoquinasa se encuentra en diversas formas en los distintos organismos, pero generalmente se caracteriza por una amplia especificidad para los azúcares y un valor bajo de K_M para el azúcar sustrato (0.01 a 0.1 mM). La baja especificidad permite la fosforilación de varios azúcares hexosas, entre ellos la fructosa y la manosa, lo cual hace posible su utilización en la glucólisis. Como se ha indicado en el Capítulo 11, la hexoquinasa se inhibe por su producto, la glucosa-6-fosfato, un mecanismo que controla la entrada de sustratos en la ruta glucolítica. Recuérdese también que la estructura de la hexoquinasa proporciona una evidencia clara en favor del modelo de ajuste inducido de la catálisis enzimática (véase la página 413).

Dado que las concentraciones intracelulares de glucosa suelen ser muy superiores al valor de K_M para la hexoquinasa, la enzima suele actuar in vivo a concentraciones saturantes de sustrato. El hígado de los vertebrados contiene una forma diferenciada de hexoquinasa, que se caracteriza por un valor muy alto de K_M para la glucosa (aproximadamente 10 mM), una dependencia de la concentración de glucosa de tipo sigmoideo y una baja sensibilidad a la inhibición por parte de la glucosa-6-fosfato. Esta hexoquinasa especial permite al hígado ajustar su velocidad de utilización de glucosa en respuesta a las variaciones de las concentraciones de glucosa en sangre. De hecho, como se comentará en los Capítulos 16 y 23, una de las funciones principales del hígado consiste en regular las concentraciones sanguíneas de glucosa, y esta enzima constituye uno de los principales mecanismos mediante los que se hace. Esta forma de hexoquinasa se denomina **glucoquinasa**, aunque su especificidad de sustrato es idéntica a la de la hexoquinasa.

Reacción 2: isomerización de la glucosa-6-fosfato
La siguiente reacción, catalizada por la **fosfoglucoisomerasa**, es la isomerización fácilmente reversible de la aldosa, la glucosa-6-fosfato (G6P), a la correspondiente cetosa, la **fructosa-6-fosfato** (F6P).

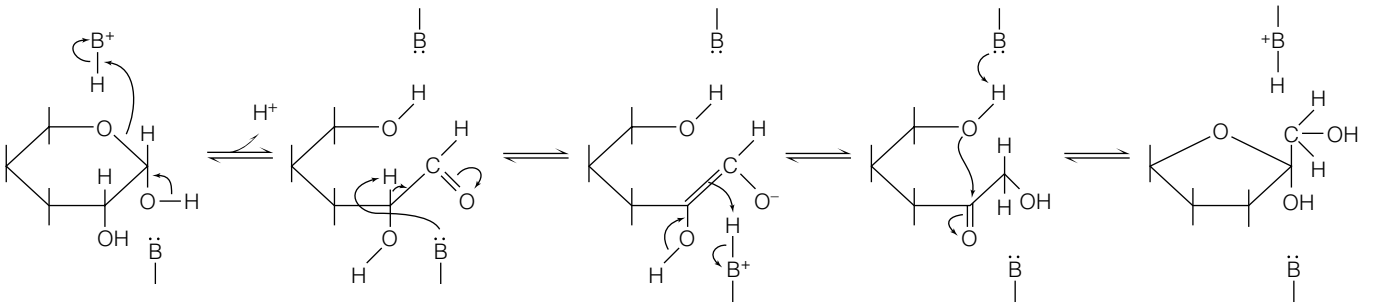


Una especie de hexoquinasa con una K_M alta en el hígado permite a ese órgano ajustar la utilización de glucosa al aporte de glucosa con concentraciones sanguíneas de glucosa elevadas.



α-D-Glucosa-6-fosfato **D-Fructosa-6-fosfato**

Esta reacción se produce a través de un intermediario enediol. B y B-H representan residuos de aminoácidos del lugar activo.



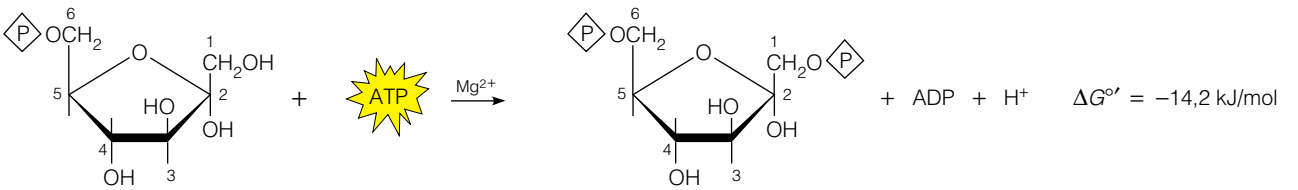
G6P **Enediol** **F6P**

El efecto de transferir el oxígeno del carbonilo desde el carbono 1 al carbono 2 es que el grupo hidroxilo generado en el carbono 1 puede fosforilarse con facilidad en la reacción siguiente. Encontraremos otras isomerizaciones aldosa-cetosa que se producen por un mecanismo similar.

Reacción 3: segunda inversión de ATP

La reacción de la fosfofructoquinasa es el paso primario en el que se regula la glucólisis.

En la reacción 3, la **fosfofructoquinasa** de ATP, lleva a cabo una segunda fosforilación dependiente de ATP, para producir un derivado de hexosa fosforilado en los carbonos 1 y 6. El producto de la reacción, la fructosa-1,6-bisfosfato (FBP), se denominaba anteriormente fructosa-1,6-difosfato. La modificación del nombre se hizo para indicar que los dos fosfatos están separados, y no unidos como en el ADP.



D-Fructosa-6-fosfato **D-Fructosa-1,6-bisfosfato**

Al igual que la fosforilación de la glucosa, esta reacción es lo suficientemente exergónica como para ser prácticamente irreversible in vivo. La irreversibilidad es importante, ya que la fosfofructoquinasa (PFK) constituye el lugar principal de regulación del flujo de carbono a través de la glucólisis. La PFK es una enzima alostérica cuya actividad es muy sensible a la situación energética de la célula, así como a las concentraciones de otros intermediarios, en especial el citrato y los ácidos grasos. Las interacciones con efectores alostéricos, que se consideran más adelante en este capítulo, activan la PFK. Esta activación aumenta el flujo de carbono a través de la glucólisis cuando existe una necesidad

de generar más ATP y lo inhibe cuando la célula contiene depósitos abundantes de ATP o de sustratos oxidables.

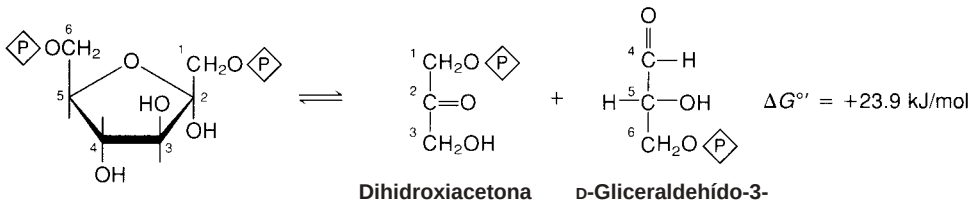
Las plantas superiores contienen dos PFK diferentes, la enzima dependiente de ATP y una forma peculiar, que utiliza pirofosfato en vez de ATP como agente fosforilante.

$$\text{Fructosa-6-fosfato} + PP_i \longrightarrow \text{fructosa-1,6-bisfosfato} + P_i$$

Esta enzima, que es comparable en su actividad a la fosfofructoquinasa dependiente de ATP, parece constituir una ruta alternativa a la catálisis del tercer paso de la glucólisis.

Reacción 4: fragmentación en dos triosa fosfatos

La reacción 4 está catalizada por la **fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa**, a la que se denomina habitualmente **aldolasa**, porque su reacción es similar a la inversa de una condensación aldólica. En esta reacción se produce la "ruptura del azúcar" al que se refiere el término *glucólisis*, puesto que el compuesto de seis carbonos, fructosa-1,6-bisfosfato, se escinde para dar lugar a dos intermediarios de tres carbonos, el gliceraldehído-3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato.



D-Fructosa-1,6-bisfosfato | **Dihidroxiacetona fosfato** | **D-Gliceraldehído-3-fosfato**

Esta reacción ilustra un principio metabólico importante. Obsérvese que la reacción es muy endergónica en condiciones estándar, de tal manera, que está muy favorecida la formación de fructosa-1-6-bisfosfato. Sin embargo, a partir de las concentraciones intracelulares reales del reactante y de los productos, según las determinaciones efectuadas en el músculo esquelético de conejo, se ha calculado un ΔG de –1.3 kJ/mol, que concuerda con la observación de que in vivo la reacción va hacia la derecha. Este ejemplo ilustra la importancia de considerar las condiciones que existen *en la célula* y *no* las condiciones del estado estándar, para decidir cuál es la dirección de la reacción favorecida.

La aldolasa rompe la fructosa-1,6-bisfosfato en las condiciones intracelulares, a pesar de que podría preverse que actuara de manera contraria en condiciones estándar.

La aldolasa de la mayor parte de los vertebrados es una proteína tetramérica. La enzima activa el sustrato para su escisión mediante la condensación del carbono ceto de la posición 2 con un grupo ε-amino de lisina en el lugar activo para producir una **base de Schiff** intermediaria, como se muestra en la Figura 13.4. Una base de Schiff es un producto de condensación entre un grupo amino y un grupo carbonilo. El sustrato activado sufre la extracción de un protón del grupo hidroxilo del carbono 4, seguido de una eliminación del ion enolato resultante, lo cual da lugar a la ruptura del enlace existente entre C-3 y C-4.

Reacción 5: isomerización de la dihidroxiacetona fosfato

Como se ha señalado antes, la reacción de la aldolasa produce 2 azúcares fosfato de tres carbonos. La función de la reacción 5, catalizada por la **triosa fosfato isomerasa**, es la conversión de uno de estos productos, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), en el otro, el gliceraldehído-3-fosfato (G3P). Dado que el G3P es

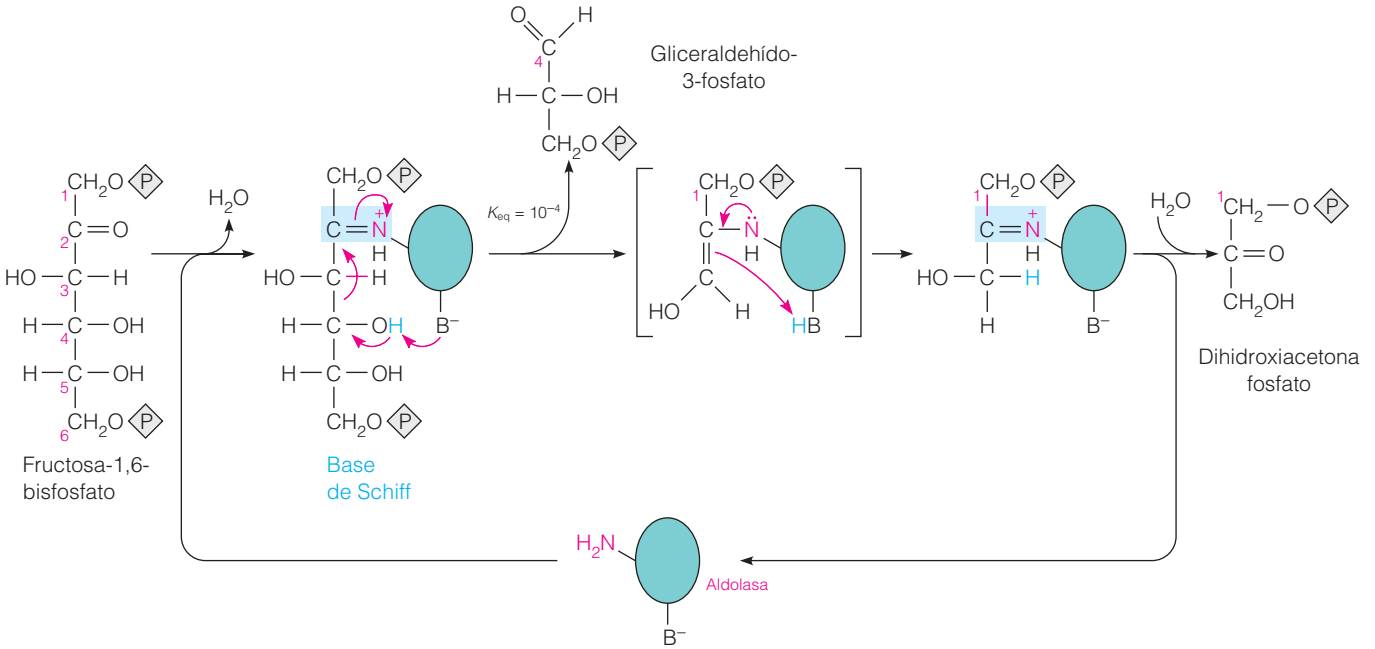
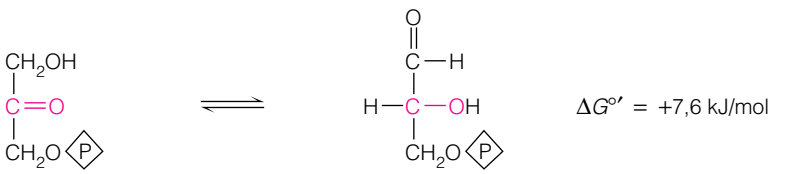


FIGURA **13.4**

Mecanismo de reacción de la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa. En la figura se muestra la base de Schiff intermediaria entre el sustrato y la lisina del lugar activo. B, un residuo de cisteína de la enzima, acepta un protón del hidroxilo de C-4 y lo devuelve a un residuo de histidina tras la ruptura entre C-3 y C-4.

el sustrato de la reacción glucolítica siguiente, esta reacción permite utilizar los seis átomos de carbono de la glucosa.



Dihidroxiacetona fosfato **D-Gliceraldehído-3-fosfato**

Esta reacción es también débilmente endergónica en condiciones estándar, pero la concentración intracelular de gliceraldehído-3-fosfato es baja, lo cual hace que la reacción se desplace hacia la derecha. Como se ha descrito en el Capítulo 11 (página 477), la isomerización de la dihidroxiacetona fosfato se produce a través de un intermediario enediol.

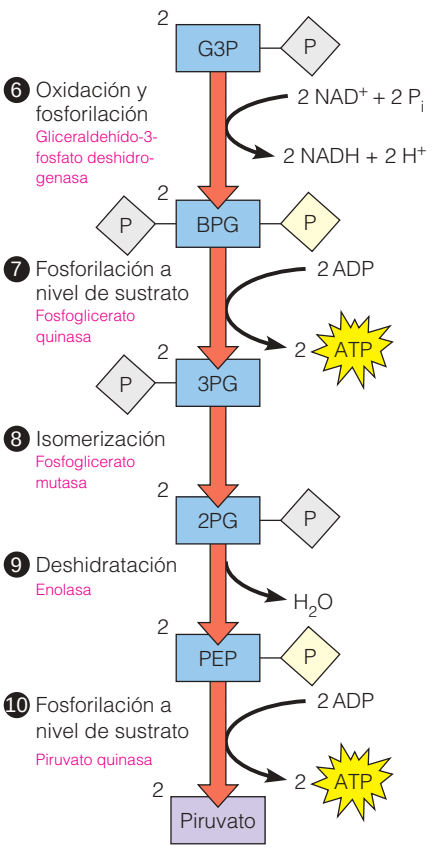
En este punto, la glucólisis ha gastado dos moléculas de ATP y ha convertido una hexosa en dos moléculas de gliceraldehído-3-fosfato, cada una de las cuales se metabolizará a continuación para producir compuestos de energía elevada que puedan impulsar la síntesis de ATP. La fase de inversión de energía del ciclo se ha completado ya, y va a iniciarse la fase de generación de energía.

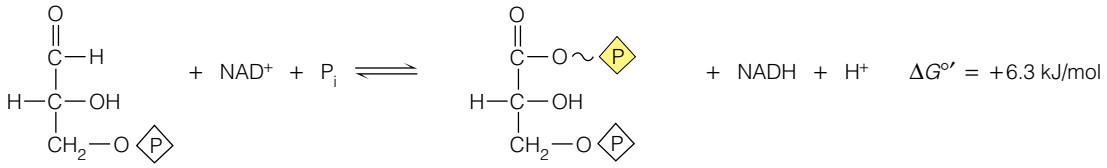
REACCIONES 6-10: FASE DE GENERACIÓN DE ENERGÍA

Las cinco reacciones de la fase de generación de energía se resumen en la figura del margen.

Reacción 6: generación del primer compuesto de energía elevada

Desde el punto de vista de su mecanismo, esta reacción, catalizada por la **gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa**, es una de las más importantes de la glucólisis, debido en parte a que genera el primer intermediario de energía elevada, y en parte porque genera un par de equivalentes reductores (véase la Figura 13.5). La reacción global es la siguiente:





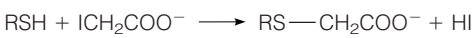
D-Gliceraldehído-3-fosfato **1,3-Bisfosfoglicerato**

La reacción 6 comporta una oxidación de dos electrones del carbono carbonilo del gliceraldehído-3-fosfato al nivel de carboxilo, una reacción que normalmente es bastante exergónica. Sin embargo, la reacción global es ligeramente *endergónica* (en condiciones *estándar*), ya que la enzima utiliza la mayor parte de la energía liberada para impulsar la síntesis de un compuesto de energía superelevada, el 1,3-bisfosfoglicerato (BPG). Este compuesto contiene un anhídrido de ácido carboxílico-fosfórico, o **grupo acil-fosfato**, en la posición 1, un grupo funcional con una energía libre estándar de hidrólisis muy alta, de –49.4 kJ/mol. Esta enzima requiere también una coenzima, el NAD^+, para aceptar los electrones del sustrato que se está oxidando.

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa crea un compuesto de energía elevada y genera un par de equivalentes reductores.

Dado que el grupo acil-fosfato posee mucha más energía que el anhídrido fosfato del ATP, el 1,3-bisfosfoglicerato puede impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP. De hecho, lo hace en la siguiente reacción de la secuencia, que es la primera de las dos fosforilaciones a nivel de sustrato de la glucólisis. Dada la importancia de comprender la forma en que se sintetiza el ATP, se ha dedicado gran atención al estudio de la forma en que se sintetizan los compuestos de energía super-elevada en la fosforilación a nivel de sustrato.

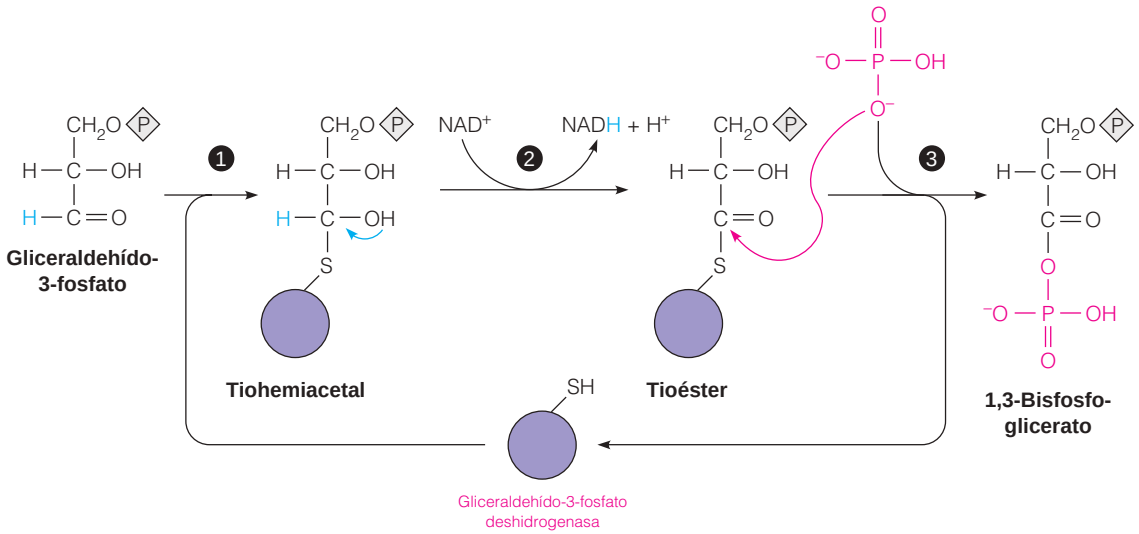
En el caso de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, ese conocimiento procede en gran parte de la antigua observación de que la glucólisis se inhibe por el yodoacetato y por metales pesados como el mercurio. Ambos compuestos reaccionan con los grupos sulfhidrilo libres, como se muestra a continuación para el yodoacetato:



La observación de que estos compuestos inhiben la glucólisis de manera específica mediante la inhibición de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa implicaba, claramente, que la enzima contiene uno o varios grupos tioles esenciales. Actualmente sabemos que la reacción se produce tal como se indica en la Figura 13.5, empezando con la formación de un grupo **tiohemiacetal** en el que

FIGURA **13.5**

Ruta de reacción de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. **Paso 1:** Formación del intermediario tiohemiacetal inicial entre el gliceraldehído-3-fosfato y la enzima. **Paso 2:** Oxidación del intermediario inicial por el NAD^+ para dar lugar a un producto intermediario acil-enzima. **Paso 3:** Ruptura fosforolítica del enlace tioéster en el intermediario acil-enzima.

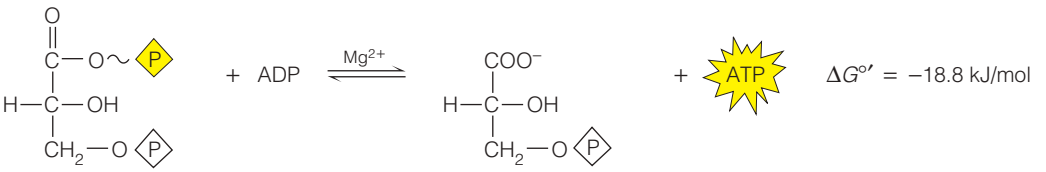


participa el grupo carbonilo del sustrato y un grupo tiol de una cisteína de la enzima. El tiohemiacetal se oxida a continuación por el NAD^+, para dar lugar a un intermediario acil-enzima o tioéster. Los tioésteres son compuestos de energía elevada; la fosforólisis de este tioéster por el P_i preserva gran parte de la energía en forma de acil-fosfato, que es el producto.

La estequiometría global de la reacción comporta la reducción de 1 mol de NAD^+ a NADH + H^+. Esta reacción es el origen del NADH formado en la glucólisis, que se identificó por vez primera en la Figura 13.2.

Reacción 7: primera fosforilación a nivel de sustrato

Como se ha indicado antes, el 1,3-bisfosfoglicerato, dado su elevado potencial de transferencia de grupo, tiene una clara tendencia a transferir su grupo acil-fosfato al ADP, con la consiguiente formación de ATP. Esta reacción de fosforilación a nivel de sustrato la cataliza la **fosfoglicerato quinasa**, de la siguiente forma:



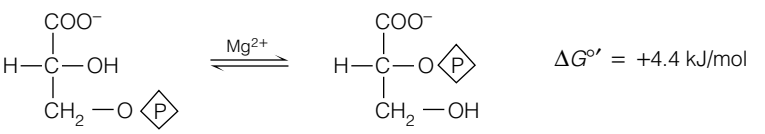
1,3-Bisfosfoglicerato **3-Fosfoglicerato**

En este punto, el rendimiento neto de ATP en la ruta glucolítica es de cero. Recuérdese que se han invertido dos ATP por mol de glucosa para generar 2 moles de triosa fosfato. La reacción que se muestra aquí genera un ATP a partir de cada mol de triosa fosfato, o dos ATP por mol de glucosa. La ruta en conjunto pasa a ser exergónica en las tres reacciones restantes. Ello comporta una activación del fosfato restante que, en el 3-fosfoglicerato (3PG), tiene un potencial de transferencia de fosfato relativamente bajo.

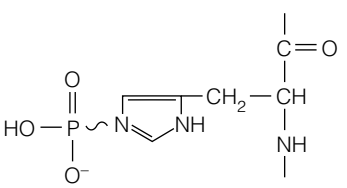
La fosfoglicerato quinasa cataliza la primera reacción glucolítica que forma ATP.

Reacción 8: preparación para la síntesis del siguiente compuesto de energía elevada

La activación del 3-fosfoglicerato se inicia con una isomerización catalizada por la **fosfoglicerato mutasa**. La enzima transfiere el fosfato de la posición 3 a la posición 2 del sustrato para dar 2-fosfoglicerato. Para esta reacción se requiere Mg^{2+}.



3-Fosfoglicerato **2-Fosfoglicerato**



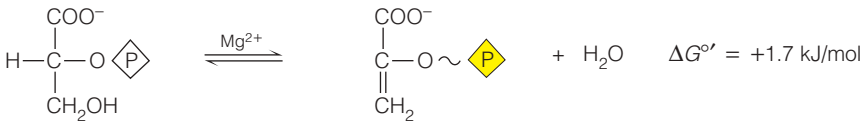
Residuo de *N*-fosfohistidina

La reacción es ligeramente endergónica en condiciones estándar. De nuevo, la concentración intracelular de 3-fosfoglicerato es alta en comparación con la de 2-fosfoglicerato (2PG), por lo que in vivo la reacción se produce hacia la derecha sin dificultad. La enzima contiene un residuo de fosfohistidina en el lugar activo. En el primer paso de la reacción, se transfiere el fosfato desde la enzima al sustrato para formar un intermediario, el 2,3-bisfosfoglicerato. La ruptura del intermediario unido a la enzima regenera la enzima fosforilada y forma el producto, que se libera.

Enzima-P + 3-P-glicerato ⟶ [Enzima-2,3-bis-P-glicerato] ⟶ Enzima-P + 2-P-glicerato

Reacción 9: síntesis del segundo compuesto de energía elevada

La reacción 9, catalizada por la **enolasa**, genera otro compuesto de energía super-elevada, el fosfoenolpiruvato (PEP), que participa en la segunda fosforilación a nivel de sustrato de la glucólisis.



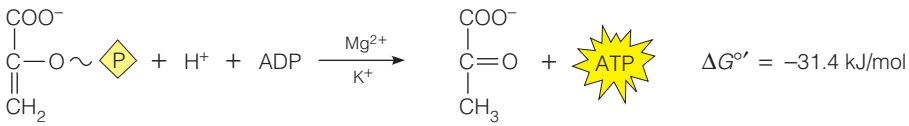
2-Fosfoglicerato **Fosfoenolpiruvato**

La reacción consiste en una deshidratación simple, o una eliminación α,β, y el cambio de energía libre global es pequeño. Sin embargo, su efecto consiste en aumentar enormemente la energía libre de hidrólisis del enlace fosfato, que pasa de –15.6 kJ/mol para el 2-fosfoglicerato a –61.9 kJ/mol para el fosfoenolpiruvato. El carbono 2 del fosfoenolpiruvato está "bloqueado" en la configuración enol desfavorecida y, como se comentó en el Capítulo 3, la gran inestabilidad termodinámica del enolpiruvato es la responsable principal de la gran energía libre negativa de la hidrólisis del fosfoenolpiruvato.

Reacción 10: segunda fosforilación a nivel de sustrato

En la última reacción, catalizada por la **piruvato quinasa**, el fosfoenolpiruvato transfiere su grupo fosforilo al ADP en otra fosforilación a nivel de sustrato. Obsérvese que la denominación que se da a la enzima corresponde a la que tendría si la reacción que se muestra a continuación, fuera hacia la izquierda, a pesar de que es fuertemente exergónica hacia la derecha. Muchas enzimas se denominaron antes de que se identificara la función o la dirección de la catálisis intracelular.

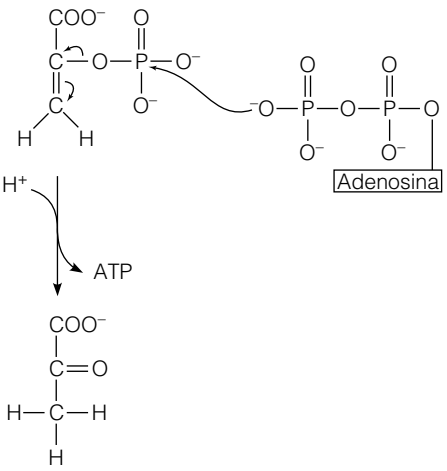
La piruvato quinasa cataliza la segunda reacción glucolítica que forma ATP.



Fosfoenolpiruvato **Piruvato**

La enzima requiere Mg^{2+} y K^+. A pesar de que la reacción implica la síntesis endergónica de ATP, la reacción global es fuertemente exergónica, ya que, como se indicó en el Capítulo 3, la tautomerización espontánea del producto, el enolpiruvato, hacia la forma ceto muy favorecida proporciona un fuerte impulso termodinámico hacia delante.

La reacción de la piruvato quinasa es otro lugar de regulación metabólica. En el hígado de los vertebrados, la enzima, un tetrámero de un M_r (peso molecular) de aproximadamente 250 000, se inhibe alostéricamente a concentraciones de ATP elevadas y se activa por la fructosa-1,6-bisfosfato. La síntesis de la enzima hepática está controlada por la alimentación, de forma que la actividad intracelular puede aumentar hasta 10 veces por el aumento o la inducción de la síntesis de la enzima, como consecuencia del consumo elevado de hidratos de carbono. Sea cual sea el mecanismo de regulación genética que participa, esta inducción puede contribuir a la eficacia de la "carga de hidratos de carbono", es decir, la práctica de ingerir una gran cantidad de hidratos de carbono antes de una competición deportiva que requiera una gran resistencia, como una carrera de maratón. El aumento de la piruvato quinasa incrementa la velocidad de generación de energía mediante la glucólisis.



Los hidratos de carbono de la alimentación inducen la formación de piruvato quinasa y aumentan la capacidad del organismo para obtener energía a partir de la glucólisis.

La actividad de la piruvato quinasa en el hígado se regula también por la fosforilación y desfosforilación de la proteína enzimática. La forma desfosforilada es mucho más activa que la forma fosforilada. La fosforilación, que está controlada por las hormonas, deriva el fosfoenolpiruvato hacia la gluconeogénesis (véase el Capítulo 16) cuando la oxidación de los ácidos grasos y el ciclo del ácido cítrico están actuando ya en un grado suficiente que satisface las necesidades energéticas de la célula. En cambio, prácticamente todo el fosfoenolpiruvato producido en el músculo se convierte en piruvato.

Se han estudiado las deficiencias genéticas humanas de la piruvato quinasa eritrocitaria. La acumulación de fosfoenolpiruvato da lugar a una concentración excesiva de otros intermediarios de la glucólisis en la sangre. Tiene gran importancia clínica la acumulación de 2,3-bisfosfoglicerato, que se presentó en el Capítulo 7 como inhibidor alostérico de la unión del oxígeno a la hemoglobina. Esta acumulación da lugar a un deterioro de la captación de oxígeno en los pulmones y del transporte del mismo, a través del torrente sanguíneo hasta los tejidos.

La reacción de la piruvato quinasa convierte toda la ruta glucolítica de un proceso neutro en cuanto a la energía en un proceso que comporta la síntesis neta de ATP. Se generan aquí dos fosfatos de energía elevada por mol de hexosa, que se suman a los dos generados por la fosfoglicerato quinasa. Restando los dos ATP invertidos en la hexoquinasa y la fosfofructoquinasa, se obtiene un rendimiento neto de dos fosfatos de energía elevada por mol de glucosa, lo cual no es, ciertamente, un rendimiento muy elevado, pero el proceso es capaz de satisfacer las necesidades energéticas de muchos anaerobios. Además, el metabolismo posterior del piruvato a través de las rutas aerobias genera mayor cantidad de fosfato de energía elevada.

La Tabla 13.1 resume las reacciones de la glucólisis, en las que se presentan los cambios de energía libre y el rendimiento de ATP de cada paso.

Destinos metabólicos del piruvato

El piruvato constituye un punto central de ramificación metabólica. Su destino depende de manera crucial del estado de oxidación de la célula, que está relacionado con la reacción catalizada por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (reacción 6). Recuérdese que esta reacción convierte 1 mol de NAD^+ en NADH por mol de triosa fosfato. *Este NADH debe reoxidarse a* NAD^+ para que continúe la glucólisis. Durante la glucólisis aerobia, como se ha indicado antes, este NADH se oxida por la cadena de transporte electrónico mitocondrial y los electrones se transfieren finalmente al oxígeno. Esta oxidación del NADH, que consideraremos con detalle en el Capítulo 15, proporciona más energía con la síntesis de unos 3 moles de ATP a partir de ADP por mol de NADH oxidado. Dado que se producen 2 moles de NADH por mol de glucosa que entra en la ruta, la glucólisis aerobia proporciona una cantidad de ATP considerablemente superior a la de la glucólisis anaerobia. Además, la oxidación del piruvato a través del ciclo del ácido cítrico genera mucha más energía.

METABOLISMO DEL LACTATO

En las células aerobias que están realizando unas tasas de glucólisis muy elevadas, el NADH generado en la glucólisis no puede reoxidarse a tasas comparables en las mitocondrias. En estos casos o en las células anaerobias, el NADH debe utilizarse para impulsar la reducción de un sustrato orgánico para mantener la homeostasia. Como se ha indicado antes, ese sustrato es el propio piruvato,

TABLA 13.1 Resumen de la glucólisis

Reacción	Enzima	Rendimiento de ATP	$\Delta G°'$ (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)
FASE DE INVERSIÓN DE ENERGÍA				
Glucosa (G)				
1 ATP → ADP	Hexoquinasa (HK)	−1	−16.7	−33.5
Glucosa-6-fosfato (G6P)				
2	Fosfoglucoisomerasa (PGI)		+1.7	−2.5
Fructosa-6-fosfato (F6P)				
3 ATP → ADP	Fosfofructoquinasa (PFK)	−1	−14.2	−22.2
Fructosa-1,6-bisfosfato (FBP)				
4	Aldolasa (ALD)		+23.9	−1.3
Gliceraldehído-3-fosfato (G3P) + dihidroxiacetona fosfato (DHAP)				
5	Triosa fosfato isomerasa (TPI)		+7.6	+2.5
Dos gliceraldehído-3-fosfato				
FASE DE GENERACIÓN DE ENERGÍA				
6 $2NAD^+ + 2P_i$ → $2NADH + 2H^+$	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH)		+12.6	−3.4
Dos 1,3-bisfosfoglicerato (BPG)				
7 2ADP → 2 ATP	Fosfoglicerato quinasa (PGK)	+2	−37.6	+2.6
Dos 3-fosfoglicerato (3PG)				
8	Fosfoglicerato mutasa (PGM)		+8.8	+1.6
Dos 2-fosfoglicerato (2PG)				
9 $2H_2O$	Enolasa (ENO)		+3.4	−6.6
Dos fosfoenolpiruvato (PEP)				
10 2ADP → 2 ATP	Piruvato quinasa (PK)	+2	−62.8	−33.4
Dos piruvato (Pyr)				
Neto: Glucosa + 2ADP + $2P_i$ + $2NAD^+$ ⟶ 2 piruvato + 2ATP + $2NADH + 2H^+ + 2H_2O$		+2	−73.3	−96.2

Nota: Los valores de ΔG se calculan a partir de las concentraciones intracelulares aproximadas de intermediarios glucolíticos en el músculo esquelético del conejo. Todos los valores de ΔG tras la reacción 5 están doblados, ya que cada reacción implica 2 sustratos de tres carbonos por molécula de glucosa.

El piruvato debe reducirse a lactato cuando los tejidos presentan unas condiciones aerobias insuficientes para oxidar todo el NADH formado en la glucólisis.

tanto en las células eucariotas como en las bacterias del ácido láctico, y el producto es el lactato. La enzima que cataliza esta reacción es la lactato deshidrogenasa (véase la página 503). El equilibrio de esta reacción está muy desplazado hacia la derecha. En la Figura 13.6, en la que se muestra el perfil energético de la glucólisis anaerobia, se observa que el NADH producido en la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato se utiliza para reducir el piruvato a lactato. Así pues, durante la glucólisis anaerobia o la **fermentación del ácido láctico**, se mantiene un equilibrio electrónico global.

En los vertebrados, algunos tejidos, como los eritrocitos, obtienen la mayor parte de su energía del metabolismo anaerobio. El músculo esquelético que obtiene la mayor parte de su energía de la respiración cuando está en reposo, recurre de manera muy intensa a la glucólisis durante el ejercicio, momento en que las reservas de glucógeno se degradan o se movilizan rápidamente para proporcionar sustratos para la glucólisis. Normalmente, el lactato producido difunde desde el tejido y se transporta, en el torrente sanguíneo, a los tejidos muy aerobios, como el hígado y el corazón. El tejido aerobio es capaz de continuar catabolizando el lactato, mediante la respiración, o puede volver a convertirlo en glucosa, mediante la gluconeogénesis. Sin embargo, si se produce lactato en grandes cantidades, no puede consumirse con facilidad. En estos casos, como se comentó en el Capítulo 7, el pH de la sangre disminuye e interviene el efecto Bohr para aumentar el aporte de oxígeno a los tejidos.

Hasta hace poco se pensaba que la acumulación de lactato en el músculo esquelético era en gran parte una consecuencia del metabolismo anaerobio, que tiene lugar cuando la necesidad de los tejidos de generar energía, supera a su capacidad de oxidar el piruvato producido en la glucólisis. Los estudios metabólicos recientes, entre ellos los análisis de RMN con ^{31}P de las concentraciones de

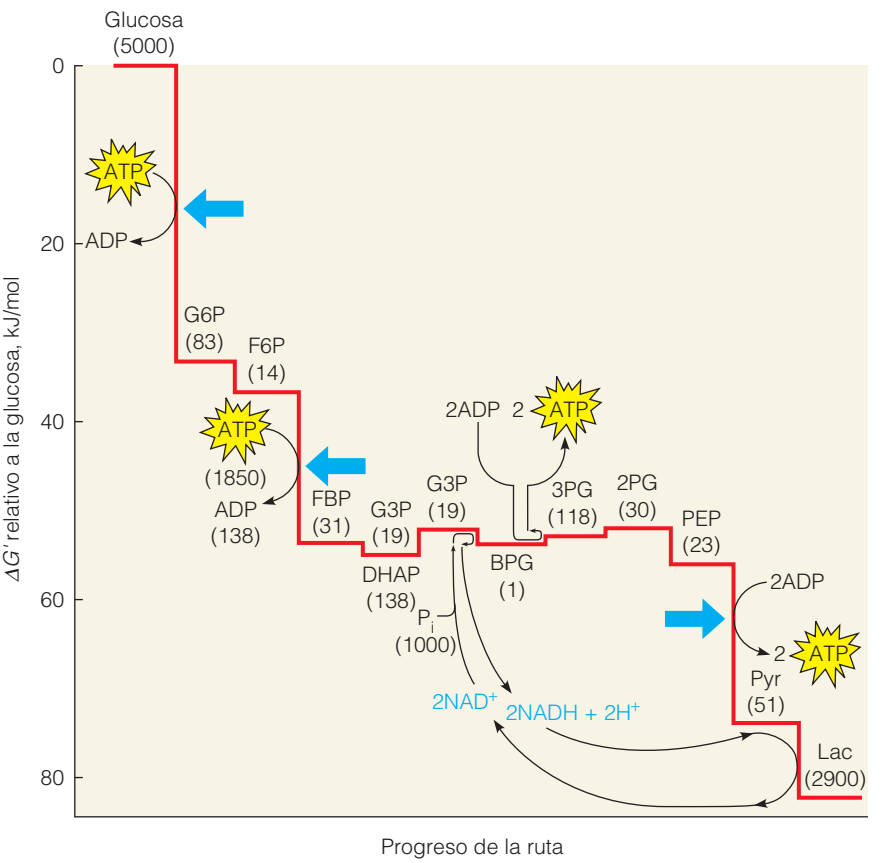


FIGURA **13.6**

Perfil energético y electrónico de la glucólisis anaerobia. En el gráfico se indica el $\Delta G'$ para cada reacción, calculado a partir de los valores de $\Delta G°'$ y de la concentración calculada de cada intermediario en el eritrocito humano. (Las cifras entre paréntesis corresponden a las concentraciones micromolares aproximadas.) Obsérvense los siguientes puntos: (1) dos de los cuatro ATP generados se utilizan para compensar la inversión inicial de ATP; (2) los equivalentes reductores generados por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa deben utilizarse para reducir un sustrato orgánico en anaerobiosis; (3) las enzimas que están sujetas al control alostérico son las que catalizan las reacciones tan exergónicas que son prácticamente irreversibles (flechas); y (4) como una reacción debe tener un $\Delta G'$ negativo para proceder totalmente, la imprecisión de la medida de las concentraciones de los metabolitos es probablemente responsable del registro de valores positivos de $\Delta G'$ en algunas reacciones.

intermediarios fosforilados en las células musculares vivas durante el ejercicio, sugieren que el lactato es realmente un producto intermediario y no una "vía muerta" metabólica, cuyo único destino es la reconversión en piruvato. Estos estudios indican que, incluso en el tejido muscular completamente oxigenado, hasta un 50% de la glucosa metabolizada se convierte en lactato, lo cual puede constituir una forma de coordinar las rutas de almacenamiento y de generación de energía en distintos tejidos, pero no se han aclarado aún los mecanismos que intervienen en ello.

ISOENZIMAS DE LACTATO DESHIDROGENASA

La lactato deshidrogenasa, como muchas enzimas, se encuentra en los tejidos animales en múltiples formas moleculares. Las distintas formas moleculares de una enzima que catalizan la misma reacción se denominan **isoenzimas** o **isozimas**. La lactato deshidrogenasa fue la primera enzima en la que se estableció la base estructural de la existencia de isoenzimas. La mayor parte de los tejidos contienen cinco isoenzimas de lactato deshidrogenasa, que pueden separarse electroforéticamente, como se muestra en la Figura 13.7.

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una proteína tetramérica, formada por dos tipos de subunidades, denominadas M y H, que presentan pequeñas diferencias de su secuencia de aminoácidos. Las subunidades M predominan en el músculo esquelético y el hígado, y las subunidades H predominan en el corazón. Las subunidades M y H se combinan de manera aleatoria entre sí, por lo que las cinco isoenzimas principales tienen las siguientes composiciones: M_4, M_3H, M_2H_2, MH_3 y H_4. Dada la reasociación aleatoria de las subunidades, la composición isoenzimática de un tejido viene determinada principalmente por las actividades de los genes que especifican las dos subunidades.

La necesidad fisiológica de la existencia de distintas formas de esta enzima no está clara todavía. No obstante, la especificidad tisular de los patrones de isoenzimas es útil en medicina clínica. Algunos procesos patológicos como el infarto de miocardio, la hepatitis infecciosa y las enfermedades musculares comportan la muerte celular del tejido afectado, con la consiguiente liberación de los contenidos celulares a la sangre. El patrón de isoenzimas de LDH que existe en el suero sanguíneo es representativo del tejido que liberó las isoenzimas. Esta información puede utilizarse para diagnosticar estos procesos y para el seguimiento de los resultados del tratamiento.

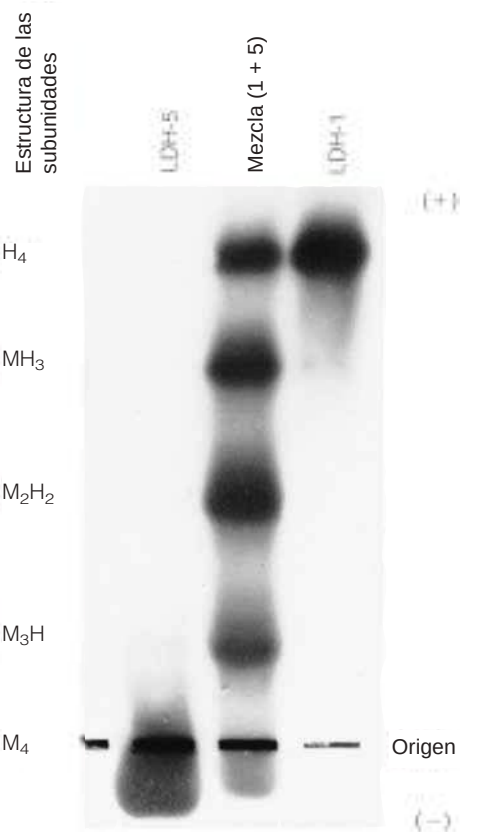


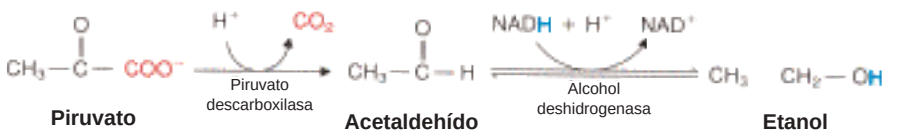
FIGURA **13.7**

Base estructural de la existencia de isoenzimas de lactato deshidrogenasa. Se sometieron las preparaciones a electroforesis en gel de almidón, que se trató luego para revelar las bandas que contenían la proteína enzimáticamente activa. La LDH-1 es un tetrámero que contiene tan sólo la subunidad H, mientras que la LDH-5 contiene tan sólo subunidades M. La calle central corresponde a un experimento en el que se mezclaron cantidades iguales de LDH-1 y LDH-5. Las subunidades se disociaron y se permitió luego que volvieran a asociarse. La presencia de cinco formas enzimáticas diferentes y sus cantidades relativas indican que las subunidades M y H individuales pueden asociarse de manera aleatoria para formar tetrámeros con una composición de subunidades mixta.

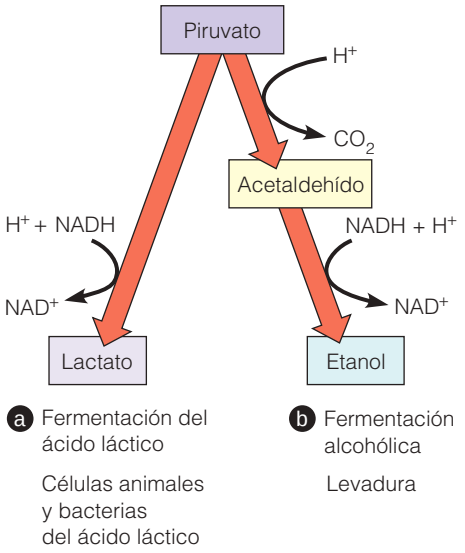
Cortesía de C. L. Markert, *Science* (1963) 140:1329. © 1963 AAAS.

METABOLISMO DEL ETANOL

El piruvato tiene numerosos destinos alternativos en los microorganismos anaerobios. Como se ha visto, las bacterias del ácido láctico reducen el piruvato a lactato en un solo paso (véase el margen de la página siguiente). En cambio, las levaduras convierten el piruvato en etanol en una ruta de dos pasos. Esta **fermentación alcohólica** comienza con la descarboxilación no oxidativa del piruvato a acetaldehído, catalizada por la **piruvato descarboxilasa**. Esta reacción va seguida de la reducción del acetaldehído a etanol, que depende del NADH, catalizada por la alcohol deshidrogenasa.



La primera reacción requiere la presencia como coenzima de **pirofosfato de tiamina**. Esta coenzima, procedente de la vitamina B_1, interviene en varias reac-



ciones de transferencia de grupos que implican una porción aldehído activada (véase el Capítulo 14).

La producción industrial de etanol ha adquirido una importancia tremenda cuando la humanidad intenta considerar dos problemas serios: (1) la sustitución del petróleo, no renovable, por fuentes de energía renovables; y (2) la utilización de los materiales biológicos de desecho. Los esfuerzos en estos campos necesitan de la bioingeniería para generar cepas bacterianas que puedan convertir sustancias como la celulosa de los desechos de la madera o de la paja o sustancias más complejas de los desechos humanos o animales en hexosas, y el análisis de la regulación glucolítica, tendente a maximizar la producción de etanol, una vez que se hayan producido los sustratos adecuados para la glucólisis.

Los tejidos animales contienen también alcohol deshidrogenasa, a pesar de que el etanol no es un producto metabólico importante en las células animales. Algunas de las consecuencias metabólicas importantes de la intoxicación por etanol se deben a la oxidación del etanol por esta enzima en el hígado. En primer lugar, se produce una reducción masiva de NAD^+ a NADH, que agota el flujo que transcurre por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, con la consiguiente inhibición de la generación de energía. En segundo lugar, el acetaldehído es bastante tóxico, y muchos de los efectos desagradables de las resacas son consecuencia de las acciones del acetaldehído y sus metabolitos posteriores.

Hojas de balance energético y electrónico

Planteando para la glucólisis una ecuación química equilibrada, podemos calcular el rendimiento energético que acompaña a la conversión de 1 mol de glucosa. Para la glucólisis anaerobia o para la fermentación del ácido láctico, podemos escribir la siguiente ecuación equilibrada:

$$\text{Glucosa} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \longrightarrow 2\ \text{lactato} + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

De igual modo, podemos escribir una ecuación equilibrada para la fermentación alcohólica:

$$\text{Glucosa} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i + 2\text{H}^+ \longrightarrow 2\ \text{etanol} + 2\text{CO}_2 + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

Obsérvese, en primer lugar, que en ninguno de los dos procesos se produce un cambio neto del estado de oxidación; ni el NAD^+ ni el NADH, que participan en las rutas de reacción, aparecen en las reacciones globales. Esto se observa también en la Figura 13.6.

Durante la glucólisis aerobia, los nucleótidos de nicotinamida sí aparecen en la ecuación global:

$$\text{Glucosa} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i + 2\text{NAD}^+ \longrightarrow 2\ \text{piruvato} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$$

El NADH genera equivalentes reductores en el interior de la mitocondria mediante un proceso de transporte que requiere energía, tal como se describirá en el Capítulo 15. Sabemos empíricamente, que la reoxidación de 1 mol de NADH en la mitocondria genera aproximadamente 3 moles de ATP.

$$2\text{NADH} + 8\text{H}^+ + \text{O}_2 + 6\text{ADP} + 6\text{P}_i \longrightarrow 2\text{NAD}^+ + 8\text{H}_2\text{O} + 6\text{ATP}$$

Sumando estas dos últimas ecuaciones, puede observarse que la glucólisis que tiene lugar durante la respiración rinde 8 moles de ATP por mol de glucosa.

$$\text{Glucosa} + 8\text{ADP} + 6\text{H}^+ + 8\text{P}_i + \text{O}_2 \longrightarrow 2\ \text{piruvato} + 8\text{ATP} + 10\text{H}_2\text{O}$$

El metabolismo de la glucosa para dar lactato o etanol constituye un proceso no oxidativo, como puede observarse comparando las fórmulas empíricas de la glucosa ($C_6H_{12}O_6$) y del lactato ($C_3H_6O_3$). Evidentemente, no se produce ningún cambio del estado global de oxidación de los carbonos, ya que el número de hidrógenos y oxígenos ligados por átomo de carbono es idéntico en la glucosa y en el lactato. Lo mismo ocurre con el etanol más el CO_2, si se cuentan los átomos de ambos. Sin embargo, algunos de los átomos de carbono individuales del lactato y del etanol más el CO_2 sufren una oxidación, y otros una reducción. En cambio, el piruvato está mucho más oxidado que la glucosa, como puede apreciarse en su fórmula empírica ($C_3H_4O_3$).

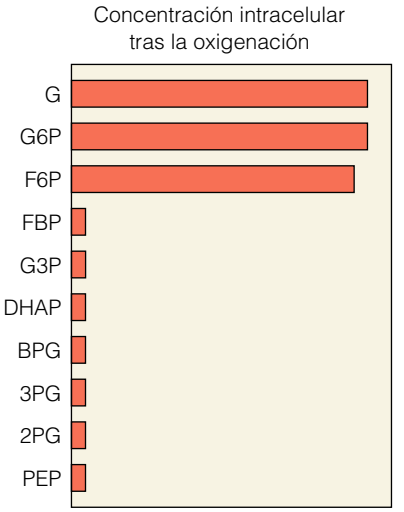
Obsérvese también que la glucólisis, tanto si es aerobia como si es anaerobia, libera tan sólo una pequeña fracción de la energía potencial que almacena la molécula de glucosa. Como se ha indicado antes (véanse los Capítulos 3 y 12), la combustión completa de la glucosa a CO_2 y H_2O libera 2870 kJ/mol de energía libre en condiciones estándar. Como se verá en el capítulo siguiente, se sintetizan unos 38 moles de ATP a partir de ADP por mol de glucosa que se procesa por completo a través de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico. La energía libre necesaria para impulsar la síntesis de estos 38 ATP representa sólo aproximadamente el 40% de la energía potencial que libera la combustión de la glucosa. Dado que el catabolismo de la glucosa a lactato o piruvato produce sólo 2 u 8 moles de ATP, respectivamente, es fácil observar que la mayor parte de la energía potencial que existe inicialmente en la glucosa continúa aún a la espera de liberarse tras la glucólisis. Por este motivo, el metabolismo aerobio es mucho más eficaz que el anaerobio, y los organismos aerobios, en general, prosperan y se diseminan más que los organismos anaerobios. La evolución inicial del metabolismo aerobio hizo posible la existencia actual de animales grandes y activos. No obstante, muchos animales grandes continúan obteniendo una parte importante de su energía metabólica mediante la glucólisis, en determinadas circunstancias fisiológicas. Un buen ejemplo de ello es el cocodrilo, aletargado (y aerobio) en gran parte de su vida, pero que, sin embargo, es capaz de explosiones cortas de movimiento muy rápido. En esta última circunstancia la glucólisis, acoplada con la degradación de las reservas energéticas de los hidratos de carbono, constituye una forma rápida, aunque poco eficaz, de movilizar la energía.

La glucólisis, que proporciona anaeróbicamente 2 ATP por glucosa y aeróbicamente 8 ATP, libera sólo una pequeña fracción de la energía de que dispone la glucosa.

Regulación de la glucólisis

La glucólisis está estrechamente coordinada con otras rutas importantes de generación y utilización de energía, en especial la síntesis y degradación del glucógeno (o del almidón), la gluconeogénesis, la ruta de las pentosas fosfato y el ciclo del ácido cítrico. Los factores metabólicos que controlan la glucólisis tienden a regular otras rutas de una manera coordinada. Así pues, es difícil considerar la regulación de la glucólisis aislada de estas otras rutas, y volveremos sobre este tema después de haber presentado las demás rutas importantes del metabolismo energético (véase el Capítulo 23). Sin embargo, es importante describir aquí dos enzimas glucolíticas clave que actúan como dianas reguladoras: la fosfofructoquinasa (el objetivo principal) y la piruvato quinasa. Obsérvese que la hexoquinasa cataliza también un paso regulado (véase la página 412 y la Figura 11.8). El control de la hexoquinasa por su producto, la glucosa-6-fosfato, también participa en otros procesos, como la síntesis de glucógeno y el mantenimiento de las concentraciones de glucosa en sangre.

La fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa son los principales lugares de control de la glucólisis.



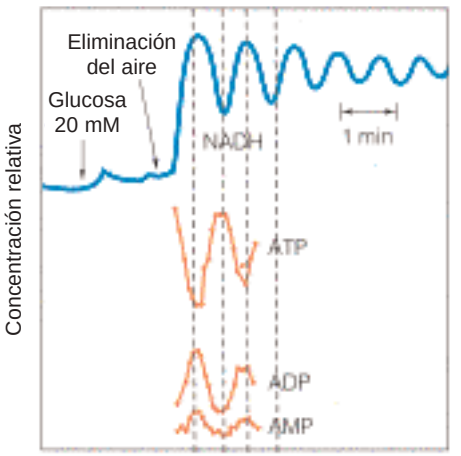


FIGURA **13.8**

Oscilaciones periódicas de las concentraciones de los intermediarios glucolíticos en células de levadura que realizan la glucólisis. En el punto indicado como "eliminación del aire" se pasó de unas condiciones de cultivo aerobias a unas condiciones anaerobias. El trazado superior (en azul) indica un registro continuo de la fluorescencia de la suspensión celular que está relacionada con la concentración intracelular de NADH. Se determinaron las concentraciones de nucleótido (naranja) en un experimento paralelo en el que se extrajeron muestras del cultivo en diversos momentos y se analizaron en cuanto a su contenido de ATP, ADP y AMP.

Adaptado con permiso de A. Betz y B. Chance, *Arch. Biochem. Biophys.* (1964) 109:586. © 1964 Academic Press.

EFECTO PASTEUR

La aceptación de que la glucólisis se controla fundamentalmente por la actividad de la fosfofructoquinasa se produjo en gran parte gracias a un descubrimiento realizado hace más de un siglo por Louis Pasteur. Cuando los cultivos anaerobios de levaduras que metabolizaban glucosa se exponían al aire, se reducía drásticamente la tasa de utilización de glucosa. Quedó claro que este fenómeno, el **efecto Pasteur**, comporta la inhibición de la glucólisis por el oxígeno. Este efecto tiene cierta lógica desde el punto de vista biológico, puesto que se obtiene mucha más energía a partir de la oxidación completa de la glucosa que sólo a partir de la glucólisis. ¿Cuál es el mecanismo de este efecto si el oxígeno no participa de forma activa en la glucólisis? La respuesta necesaria se obtuvo de los análisis del contenido intracelular de los intermediarios glucolíticos en las células aerobias y anaerobias. Estos análisis requerían técnicas para la interrupción rápida del metabolismo y la extracción de los metabolitos. Una de estas técnicas es el **pinzamiento por congelación** ("freeze-clamping"), en el que el tejido se comprime rápidamente entre unas placas de metal enfriadas a la temperatura del nitrógeno líquido. El tejido sólido puede pulverizarse y extraerse para los análisis.

Los experimentos de este tipo revelaron que cuando se introduce oxígeno en las células anaerobias, las concentraciones de todos los intermediarios glucolíticos, desde la fructosa-1,6-bisfosfato en adelante *disminuyen*, mientras que todos los productos intermediarios *anteriores* se acumulan a concentraciones más elevadas. Este hallazgo concuerda con el concepto de que el flujo metabólico a través de la fosfofructoquinasa se reduce de manera específica en presencia de O_2.

OSCILACIONES DE LOS INTERMEDIARIOS GLUCOLÍTICOS

Otras conclusiones importantes surgieron del descubrimiento de que las concentraciones intracelulares de los intermediarios glucolíticos no son constantes en muchas situaciones, sino que experimentan variaciones periódicas u oscilaciones, como se indica en la Figura 13.8. Estas variaciones pueden demostrarse con mayor facilidad mediante el seguimiento de la fluorescencia de una suspensión de células de levadura a 450 nm. El componente que contribuye en mayor medida a producir esta fluorescencia es el NADH, por lo que este tipo de experimento valora los cambios del NADH intracelular con el tiempo. Las oscilaciones son una característica común en los sistemas controlados mediante retroacción, y las variaciones cíclicas de las concentraciones de los intermediarios glucolíticos proporcionan claves importantes sobre los mecanismos reguladores que afectan a la glucólisis.

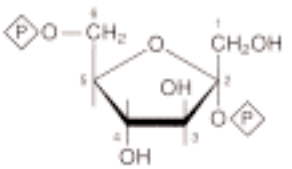
Durante el tiempo que la fluorescencia de una suspensión de células de levadura aumenta, se está acumulando NADH a través de la reducción del NAD^+ intracelular. En estas condiciones, la glucólisis está activada y el NADH se está produciendo por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa con una rapidez mucho mayor que la que puede usarse para reducir al piruvato. Presumiblemente, durante este período se acumulan también una o más sustancias reguladoras. Una vez se han acumulado en cantidad suficiente para inhibir la glucólisis, la concentración de NADH disminuye, hasta que el aporte de reguladores se agota, y en este momento la ruta se inhibe de nuevo. Este ciclo se produce de manera repetida.

Cuando los investigadores observaron que las concentraciones intracelulares de NADH variaban de manera periódica, empezaron a obtener muestras de extractos de las células oscilantes para analizar las concentraciones intracelula-

res de otros sustratos de las enzimas glucolíticas. Se observó que estos intermediarios también aumentaban y disminuían periódicamente. Obsérvese en la Figura 13.8 que las concentraciones de ADP y AMP aumentan y disminuyen precisamente con la misma fase que el NADH, mientras que la concentración de ATP presenta un desfase de 180°. Este patrón sugiere que la actividad de la glucólisis depende de algún modo de la carga energética de adenilato (véase el Capítulo 12): cuando la carga es elevada, la ruta está inactivada y cuando es baja, la ruta se activa. Éstas y otras observaciones sugirieron que el principal punto de regulación debía ser una enzima regulada por la carga energética. La fosfofructoquinasa es esta enzima.

REGULACIÓN ALOSTÉRICA DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA

La fosfofructoquinasa es una enzima compleja de múltiples subunidades. En el músculo se encuentra en forma de un homotetrámero con un M_r de aproximadamente 360 000 que experimenta una disociación reversible a una forma dimérica. Algunos de los activadores e inhibidores alostéricos de la enzima actúan influyendo sobre la interconversión del dímero y el tetrámero. Los *activadores* de la fosfofructoquinasa son el AMP, el ADP y un compuesto descubierto más recientemente, la **fructosa-2,6-bisfosfato**.



Fructosa-2,6-bisfosfato

Como se observa en la Figura 13.9a, una concentración muy baja de fructosa-2,6-bisfosfato activa la fosfofructoquinasa. Se considera a la fructosa-2,6-bisfosfato el principal regulador que controla el flujo de carbono a través de la glucólisis y la gluconeogénesis en el hígado. Su síntesis la cataliza otra forma de fosfofructoquinasa, denominada PFK-2. (La enzima glucolítica se denomina PFK-1.) La actividad de la PFK-2 se regula, a su vez, por una fosforilación y desfosforilación reversible, controlada en última instancia por el AMP cíclico, en respuesta a estímulos hormonales. Las características detalladas de estas interacciones se presentarán al comentar el control de la gluconeogénesis en el Capítulo 16.

Los *inhibidores* más significativos de la fosfofructoquinasa, desde un punto de vista biológico, son el ATP (Figura 13.9b) y el citrato. El efecto del ATP puede parecer anómalo, puesto que el ATP es un sustrato y, por tanto, resulta esencial para la reacción. Como inhibidor, el ATP se une a un lugar en la enzima separado del lugar catalítico y con menor afinidad. A concentraciones bajas de ATP, la curva de saturación del sustrato para la fructosa-6-fosfato es casi hiperbólica, ya que el lugar regulador no está ocupado, y la enzima está en su casi totalidad en el estado R (recuérdese el comentario sobre los estados R y T que se ha hecho en el Capítulo 11, página 449). A concentraciones elevadas de ATP, predomina el estado T, y ello hace que la curva se haga sigmoidea y se desplace mucho hacia la derecha (Figura 13.9b). Así pues, la inhibición se produce porque se reduce en gran manera la afinidad aparente por la fructosa-6-fosfato.

El control de la PFK por los nucleótidos de adenina es una forma de respuesta del metabolismo energético a la carga energética de adenilato. Con una carga energética elevada, la abundancia relativa de ATP es una señal que indica que la

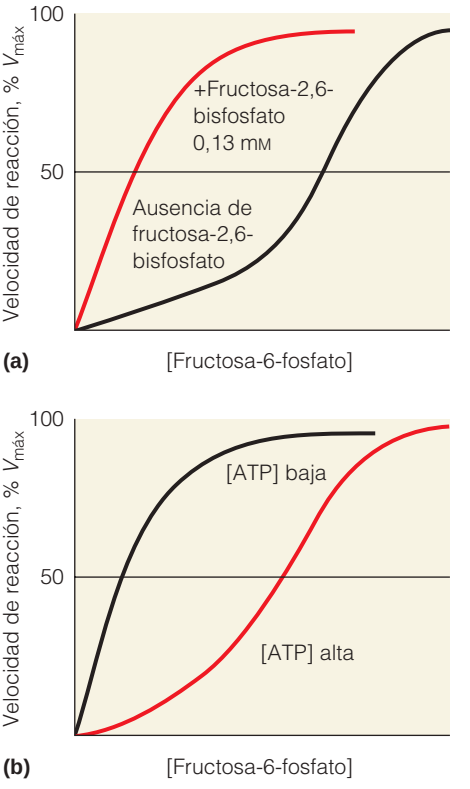


FIGURA **13.9**

Control alostérico de la fosfofructoquinasa hepática. **(a)** Activación por la fructosa-2,6-bisfosfato. **(b)** Aumento de la K_M aparente para el sustrato fructosa-6-fosfato por el ATP.

ruta glucolítica de producción de energía debe reducir su actividad; la señal comporta la inhibición de la PFK. Por el contrario, una concentración elevada de AMP o ADP indica que la carga energética es baja y que el flujo a través de la glucólisis debe aumentar. La inhibición por el citrato constituye otro sensor del nivel energético. Con una carga energética elevada, se reduce el flujo a través del ciclo del ácido cítrico mediante mecanismos que se considerarán en el Capítulo 14. En estas condiciones, se acumula el citrato y se transporta fuera de las mitocondrias. La interacción con la PFK en el citosol puede ser un indicador de que la generación de energía es suficiente y, por tanto, de que puede reducirse la producción de precursores del ciclo del ácido cítrico a través de la glucólisis.

CONTROL DE LA PIRUVATO QUINASA

Anteriormente se ha identificado la piruvato quinasa como un punto de control de la glucólisis. Al igual que la PFK, la piruvato quinasa es una enzima de múltiples subunidades que se inhibe por el ATP, de una forma similar desde el punto de vista cinético. Así, las concentraciones elevadas de ATP reducen la afinidad aparente de la piruvato quinasa por su otro sustrato, el fosfoenolpiruvato. Un segundo efecto alostérico es la **activación anterógrada** de la piruvato quinasa por la fructosa-1,6-bisfosfato. Este efecto, que es el inverso de la retroinhibición, garantiza que el carbono que supere el primer paso regulado de la ruta (PFK) podrá completar su paso por la glucólisis y que no se producirá una acumulación indeseable de intermediarios. Un tercer efecto de control por retroacción es la inhibición de la piruvato quinasa por la acetil-CoA, el principal producto de la oxidación de los ácidos grasos. Esta inhibición permite a la célula reducir el flujo glucolítico cuando se dispone de una cantidad abundante de sustratos procedentes de la degradación de las grasas.

La fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa regulan el flujo de intermediarios desde la glucosa-6-fosfato al piruvato. La glucólisis se regula también en los puntos de entrada de carbono a la ruta. Hemos mencionado ya la inhibición de la hexoquinasa por la glucosa-6-fosfato como uno de estos lugares de control. El otro punto de control importante, al menos en el metabolismo de los animales, es la degradación del glucógeno, catalizada por la *glucógeno fosforilasa*. Este proceso extraordinariamente importante se considera de manera detallada más adelante en este mismo capítulo.

LA GLUCÓLISIS COMO RUTA CATABÓLICA Y ANABÓLICA

¿Por qué debe la célula regular la glucólisis en más de un punto? Cualquier respuesta que se dé a esta pregunta debe tener en cuenta que la glucólisis no sólo genera ATP y proporciona piruvato para la oxidación en el ciclo del ácido cítrico, sino que también es una ruta de biosíntesis. Los intermediarios de la glucólisis son precursores de numerosos compuestos, en especial de lípidos y aminoácidos. Estos procesos se consideran a lo largo del libro. En este momento, conviene identificar, como se hace en la Figura 13.10, algunas de las principales funciones de biosíntesis de los intermediarios glucolíticos. Esta figura pone de manifiesto el motivo por el que se considera a la glucólisis una importante encrucijada metabólica. Hay muchas rutas que conducen a la glucólisis, y otras muchas que divergen a partir de ella, lo cual crea un flujo considerable a través de la ruta. Así, a pesar de que es considerable la cantidad de combustible para la degradación oxidativa, las demandas reguladoras que recibe la célula son demasiado complejas para poder realizarse con una única reacción que controle la velocidad. En la Figura 13.11 se resumen las relaciones reguladoras entre la glucólisis y otras rutas metabólicas.

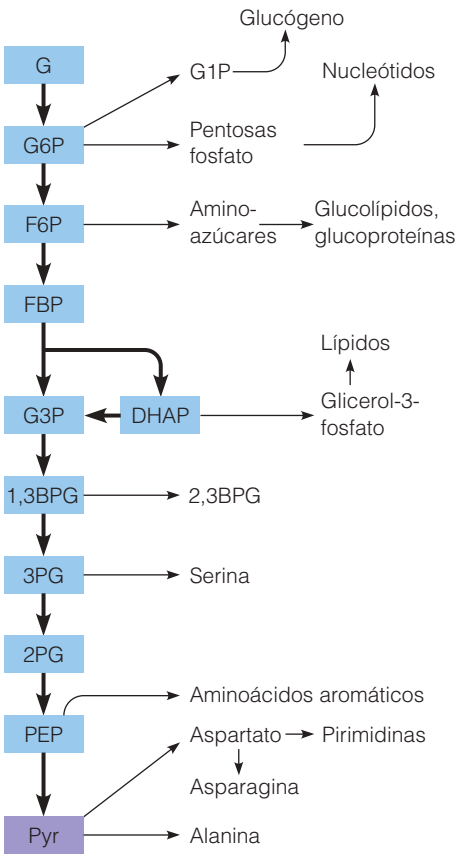


FIGURA **13.10**

Destinos alternativos de los intermediarios glucolíticos en las rutas de biosíntesis. G1P es la glucosa-1-fosfato.

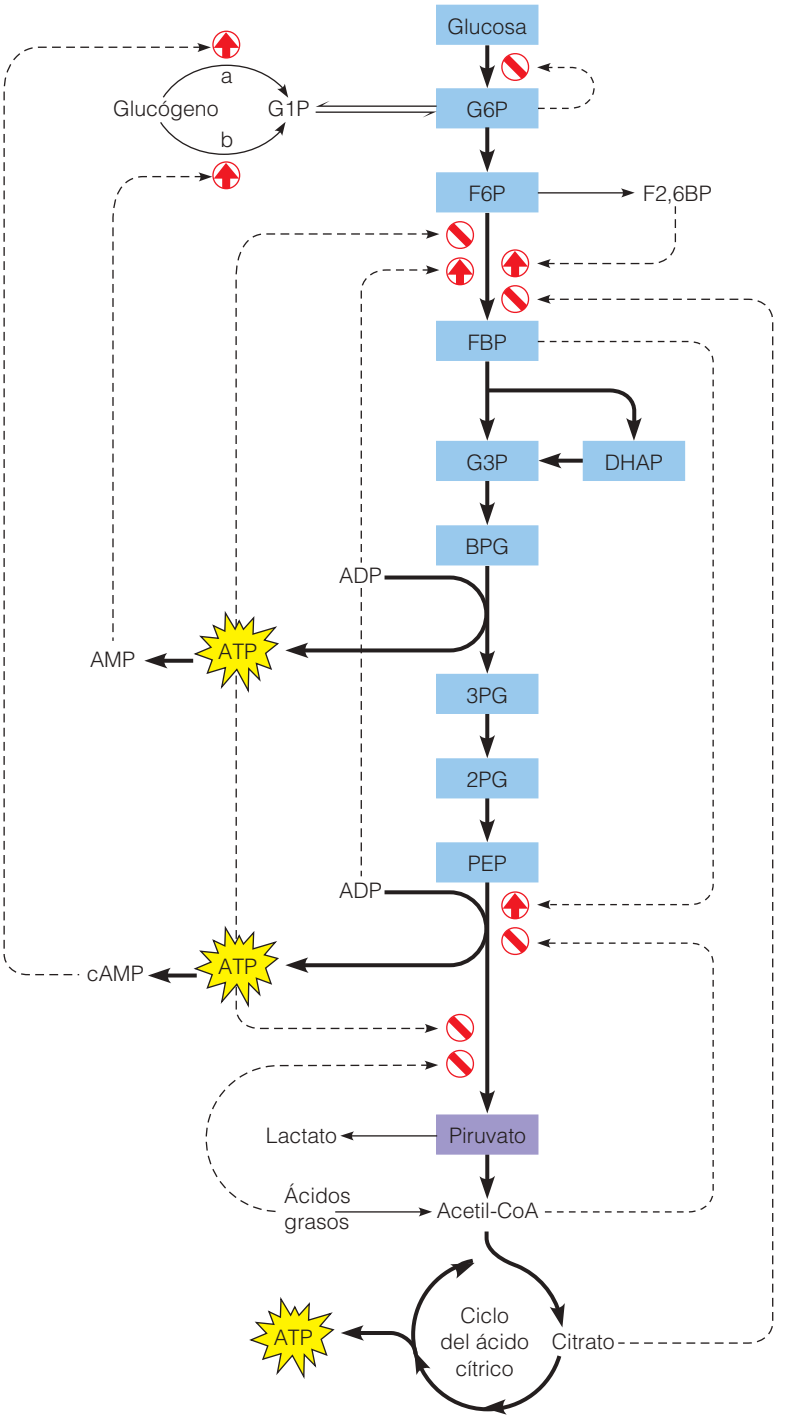


FIGURA **13.11**

Esquema general de la regulación de la glucólisis. En el esquema se indican los puntos de coordinación con otras rutas metabólicas. F2,6BP = fructosa-2,6-bisfosfato; las demás abreviaturas son las mismas que en la Tabla 13.1. Las flechas ascendentes rodeadas por un círculo identifican activación y las barras inclinadas descendentes rodeadas por un círculo corresponden a inhibición. El control de la degradación del glucógeno se expondrá más adelante en este mismo capítulo.

Entrada de otros azúcares en la ruta glucolítica

Hasta ahora nuestro análisis de la glucólisis se ha centrado en la glucosa como fuente de carbono para esta ruta. Existen otras muchas fuentes de energía de hidratos de carbono, ya sea a través de la digestión del alimento, ya sea por la utilización de metabolitos endógenos. En este apartado, nos centraremos en la utilización de monosacáridos distintos de la glucosa, de disacáridos y del glicerol procedente del metabolismo de las grasas. Estas rutas se resumen en la Figura 13.12.

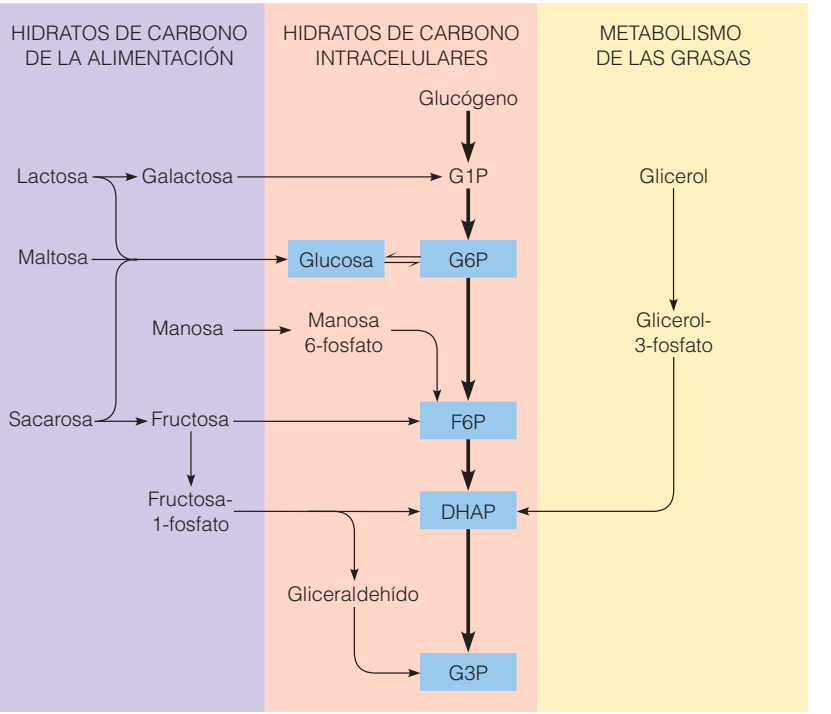


FIGURA **13.12**

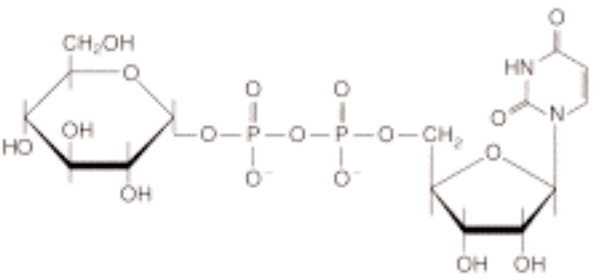
Rutas de utilización de los sustratos distintos de la glucosa en la glucólisis. En los animales, la mayor parte de los hidratos de carbono distintos de la glucosa y el glucógeno proceden de la alimentación, y la mayor parte del glicerol procede del catabolismo de los lípidos.

METABOLISMO DE LOS MONOSACÁRIDOS

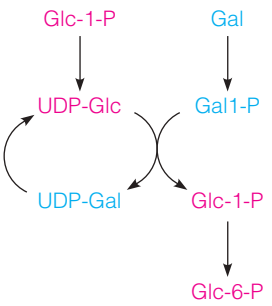
Como se ha indicado antes, la hexoquinasa tiene una especificidad amplia de sustrato. Así, puede participar en la utilización de otras hexosas diferentes de la glucosa, particularmente la fructosa y la manosa. Una enzima diferente, la galactoquinasa, convierte la galactosa en galactosa-1-fosfato.

Utilización de la galactosa

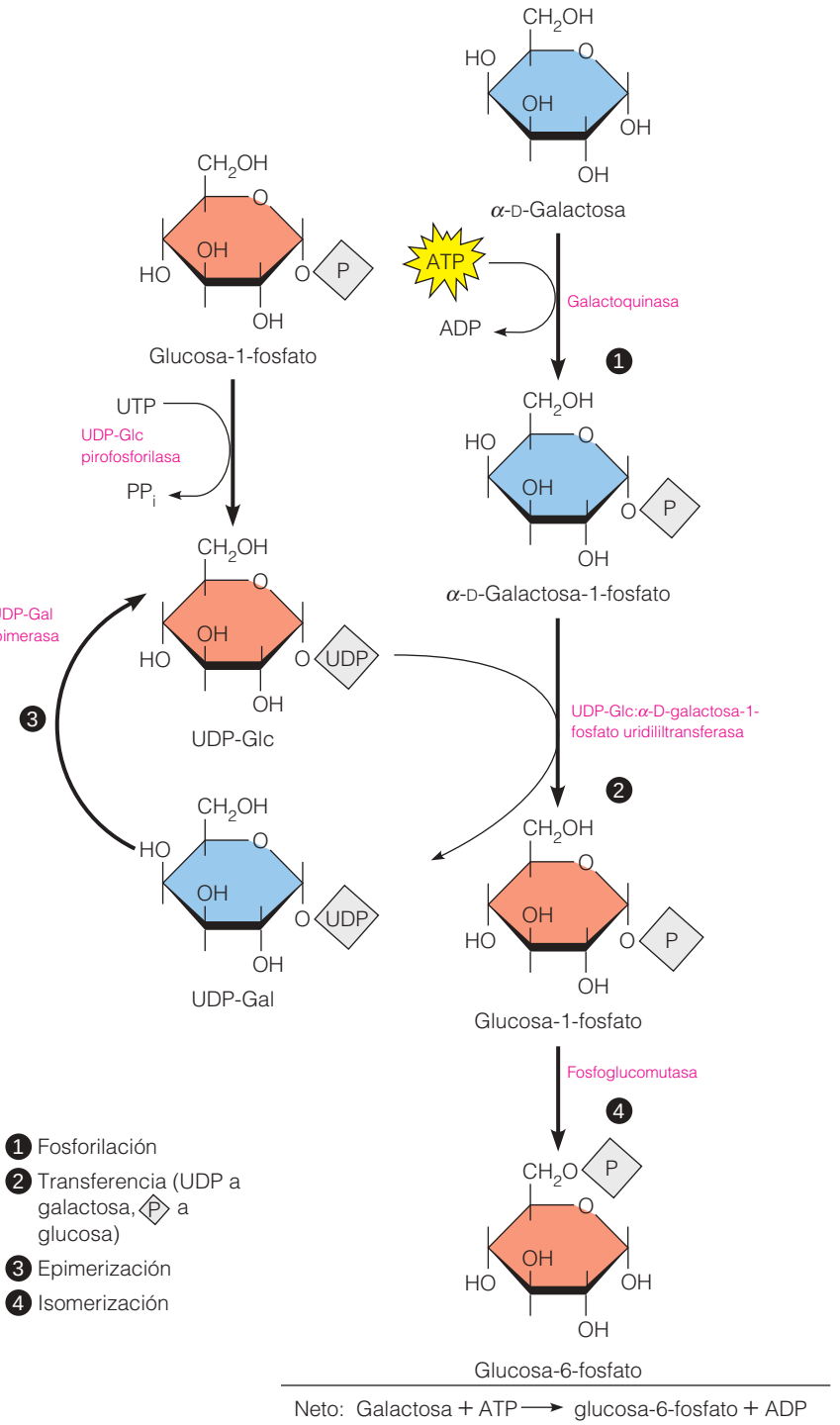
La D-galactosa procede principalmente de la hidrólisis del disacárido lactosa, que es especialmente abundante en la leche. Como se indica en la Figura 13.13 la principal ruta de utilización de la galactosa es la conversión a glucosa-6-fosfato. Esta ruta se inicia con una conversión de la galactosa en galactosa-1-fosfato, dependiente de ATP, catalizada por la **galactoquinasa** (Figura 13.13, reacción 1). La glucosa-1-fosfato, que también participa, se forma en gran medida a partir de la degradación del glucógeno (página 528). La transformación de la galactosa-1-fosfato en glucosa-1-fosfato comporta una epimerización en el carbono 4. Sin embargo, antes de que pueda producirse la epimerización, la galactosa-1-fosfato debe activarse metabólicamente (reacción 2) mediante una reacción de transferasa con un azúcar ligado a un nucleótido, la **uridina difosfato glucosa**, también llamada UDP-glucosa, UDP-Glc o UDPG. Esta reacción produce otro azúcar ligado a un nucleótido, la **uridina difosfato galactosa**, que se abrevia como UDP-galactosa o UDP-Gal.



Uridina difosfato glucosa



(a)



(b)

FIGURA **13.13**

Ruta de utilización de la galactosa mediante su conversión en glucosa-6-fosfato. **(a)** Visión general de la ruta y **(b)** diagrama detallado de la misma.

La enzima ligada al NAD^+, la **UDP-galactosa 4-epimerasa**, puede convertir entonces la UDP-Gal en UDP-Glc (reacción 3). En la Figura 13.14 se presenta con mayor detalle esta reacción de epimerización. Volviendo a la reacción 3 de la Figura 13.13, obsérvese que la UDP-Glc se forma a partir de la glucosa-1-fosfato y el UTP por la **UDP-Glc pirofosforilasa**. Esta enzima recibe su nombre por la reacción inversa, que comporta la ruptura del enlace anhídrido del ácido fosfórico en la UDP-Glc mediante la adición a lo largo de ese enlace de los ele-

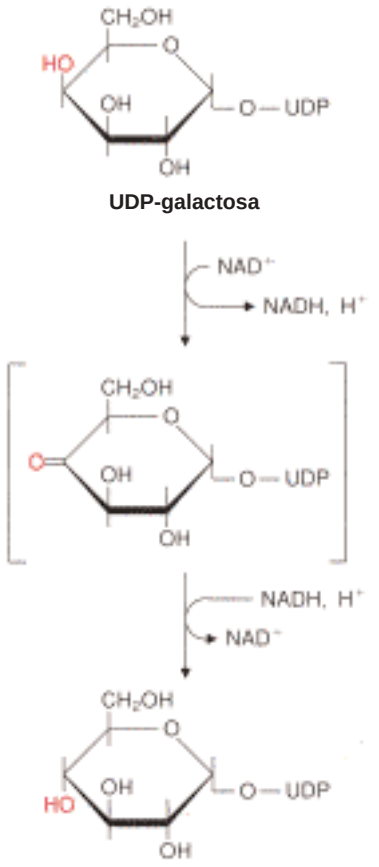


FIGURA **13.14**

Ruta de reacción de la UDP-galactosa 4-epimerasa. Esta presentación detallada de la reacción 3 de la Figura 13.13 muestra el papel catalítico del NAD^+ en la oxidación y posterior reducción del sustrato.

mentos del ácido pirofosfórico. La glucosa-1-fosfato formada en la reacción 2 se convierte entonces en glucosa-6-fosfato por la **fosfoglucomutasa** (reacción 4), una enzima que interviene también en la síntesis de glucógeno. En nuestra exposición de la biosíntesis del glucógeno en el Capítulo 16, veremos que los azúcares nucleósido difosfato como la UDP-Glc se utilizan mucho como intermediarios en la biosíntesis de los polisacáridos.

Las enzimas que se indican en la Figura 13.13 participan también en la glándula mamaria en la síntesis de la lactosa de la leche. La lactosa se forma a partir de la UDP-Gal y la glucosa, por la **lactosa sintasa**, en presencia de la proteína **α-lactalbúmina**. La síntesis endergónica de UDP-Gal en este tejido es lenta, dada su elevada tasa de conversión en lactosa. Como se considerará en los Capítulos 16 y 19, la UDP-Gal se utiliza también en la biosíntesis de glucoproteínas y glucolípidos.

En el ser humano existe una amplia gama de trastornos genéticos a los que se da el nombre genérico de **galactosemia**. Todos ellos comportan un fallo en el metabolismo de la galactosa, por lo que se acumula galactosa, galactosa-1-fosfato o ambas sustancias en la sangre y en los tejidos. Las consecuencias clínicas consisten en retraso mental, cataratas visuales y aumento de tamaño del hígado y de otros órganos. Estos trastornos se deben a un déficit hereditario de alguna de las tres enzimas que intervienen en la utilización de la galactosa. La forma más frecuente es la causada por un déficit de UDP-glucosa: α-D-galactosa-1-fosfato uridililtransferasa (véase la Figura 13.13). Otras formas más raras son las debidas al déficit de galactoquinasa o de UDP-galactosa 4-epimerasa. Dado que el origen principal de la galactosa en la alimentación es la lactosa de la leche, los síntomas suelen producirse en los lactantes. El trastorno puede aliviarse eliminando de la alimentación la leche y los productos lácteos.

Utilización de la fructosa

La fructosa está presente como azúcar libre en muchas frutas, y se obtiene también en la hidrólisis de la sacarosa (véase la Figura 13.12). La fosforilación de la fructosa en la mayor parte de los tejidos da lugar a fructosa-6-fosfato, un intermediario glucolítico. En el hígado de los vertebrados actúa una ruta distinta, en la que la enzima **fructoquinasa** fosforila la fructosa a **fructosa-1-fosfato** (F1P). Este intermediario se rompe posteriormente por una enzima específica, la **aldolasa B**. Los productos de la rotura son la dihidroxiacetona fosfato, un intermediario glucolítico, y el D-gliceraldehído. Este último se fosforila en una reacción dependiente de ATP para dar el intermediario glucolítico gliceraldehído-3-fosfato. Esta ruta de utilización evita la regulación de la fosfofructoquinasa y ello puede explicar la facilidad con la que la sacarosa de la alimentación se convierte en grasa (es decir, F1P→G3P+DHAP→glicerol-3-fosfato→triacilgliceroles; véase el Capítulo 18).

Utilización de la manosa

Finalmente, la última de las hexosas importantes, la manosa, procede de la digestión de alimentos que contienen determinados polisacáridos o glucoproteínas. La fosforilación, catalizada por la hexoquinasa, de la manosa a manosa-6-fosfato, va seguida de una isomerización de esta última a fructosa-6-fosfato (véase la Figura 13.12).

METABOLISMO DE LOS DISACÁRIDOS

Los tres disacáridos más abundantes en los alimentos son la maltosa, la lactosa y la sacarosa. La maltosa se aporta principalmente como edulcorante artificial que se obtiene del almidón, mientras que la lactosa y la sacarosa son productos naturales abundantes. En el metabolismo de los animales, estas sustancias se hi-

drolizan en las células que tapizan la pared interna del intestino delgado, para dar lugar a las hexosas que las forman:

$$\text{Maltosa} + H_2O \xrightarrow{\text{Maltasa}} 2\ \text{D-glucosa}$$

$$\text{Lactosa} + H_2O \xrightarrow{\text{Lactasa}} \text{D-galactosa} + \text{D-glucosa}$$

$$\text{Sacarosa} + H_2O \xrightarrow{\text{Sacarasa}} \text{D-fructosa} + \text{D-glucosa}$$

Las hexosas pasan al hígado a través de la vena porta, donde se catabolizan como se ha descrito en el apartado anterior.

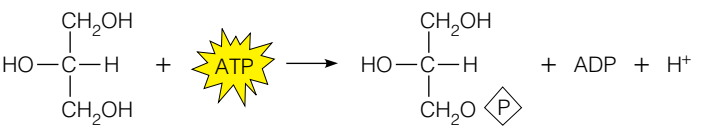
En muchas personas, la enzima lactasa desaparece de las células de la mucosa intestinal a partir de los 4 ó 6 años de edad, época en que generalmente suele reducirse el consumo de leche. Ello hace que se produzca **intolerancia a la lactosa**, una enfermedad en la que el consumo de leche o productos lácteos que contengan lactosa provoca molestias intestinales, debidas a la acción bacteriana sobre la lactosa acumulada.

Las plantas y los microorganismos tienen rutas distintas para metabolizar los disacáridos. Las bacterias metabolizan la sacarosa mediante la acción de la **sacarosa fosforilasa**:

$$\text{Sacarosa} + P_i \rightleftharpoons \text{D-glucosa-1-fosfato} + \text{D-fructosa}$$

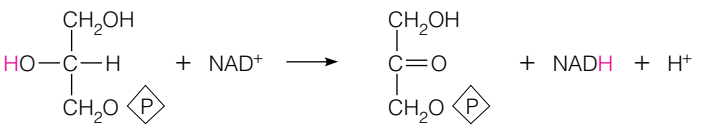
METABOLISMO DEL GLICEROL

La digestión de las grasas neutras (triacilgliceroles) y de la mayor parte de los fosfolípidos genera glicerol como uno de los productos. En los animales, el glicerol entra en la ruta glucolítica en primer lugar por la acción en el hígado de la **glicerol quinasa**.



Glicerol **Glicerol-3-fosfato**

El producto se oxida a continuación por la **glicerol-3-fosfato deshidrogenasa**, para dar dihidroxiacetona fosfato, que se cataboliza mediante la glucólisis (véase la Figura 13.12).



Glicerol-3-fosfato **Dihidroxiacetona fosfato**

Catabolismo de los polisacáridos

En el metabolismo animal, dos fuentes principales de glucosa proceden de los polisacáridos: (1) la digestión de los polisacáridos de la alimentación, principalmente el almidón de los vegetales y el glucógeno de la carne, y (2) la movilización de las reservas de glucógeno del propio animal. Recuérdese del Capítulo 9 que el almidón, el principal polisacárido nutriente de las plantas, está formado por el polímero de glucosa no ramificado, amilosa, y el polímero ramifica-

do, amilopectina. Los residuos de glucosa de ambos polímeros están unidos mediante enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$, pero la amilopectina posee también enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$, que proporcionan los puntos de ramificación en un polímero que por lo demás es lineal. El glucógeno es químicamente similar a la amilopectina, excepto que está más ramificado y tiene un peso molecular superior. Muchos microorganismos, al igual que los animales, almacenan los hidratos de carbono en forma de glucógeno.

RUPTURAS HIDROLÍTICA Y FOSFOROLÍTICA

Los polisacáridos de la alimentación se metabolizan mediante hidrólisis a los monosacáridos. Los depósitos intracelulares de hidratos de carbono, como el glucógeno, se movilizan mediante fosforólisis.

Tanto la digestión de los polisacáridos como la movilización del glucógeno comportan una ruptura secuencial de unidades de monosacáridos de los extremos no reductores de los polímeros de glucosa. El primero de estos procesos se produce mediante *hidrólisis* y el segundo mediante *fosforólisis*. Estos procesos son químicamente similares, como se ilustra en la Figura 13.15. La hidrólisis implica la ruptura de un enlace mediante la adición a través del mismo de los elementos del agua, y la ruptura fosforolítica se produce mediante la adición de los elementos del ácido fosfórico. Una enzima que cataliza la fosforólisis se denomina **fosforilasa**, para diferenciarla de una *fosfatasa* (o, más exactamente, una *fosfohidrolasa*), que cataliza la ruptura hidrolítica de un enlace éster fosfato.

Desde el punto de vista energético, la ventaja de un mecanismo fosforolítico es que la movilización del glucógeno produce la mayor parte de sus unidades monosacárido en forma de azúcares fosfato. Estas unidades pueden convertirse directamente en intermediarios glucolíticos, sin necesidad de una inversión adicional de ATP. En cambio, la digestión del almidón da lugar a glucosa y a algo de maltosa; para iniciar la degradación glucolítica de estos azúcares es necesario ATP y la reacción de la hexoquinasa.

No obstante, el mecanismo hidrolítico resulta útil para la digestión de los hidratos de carbono de la alimentación, que se produce en gran parte en el intestino. Los productos de la digestión deben absorberse y transportarse al hígado, donde se convierten en glucosa. Dado que los azúcares fosfato, como otros compuestos cargados, se transportan de manera poco eficaz a través de las membranas celulares, la digestión hidrolítica de los polisacáridos para producir hexosas parece razonable desde el punto de vista metabólico.

En el metabolismo de las plantas no se produce una digestión, puesto que, con pocas excepciones, las plantas sintetizan tanto monosacáridos como polisacáridos de almacenamiento de energía mediante la fotosíntesis. Sin embargo, se emplean los mismos mecanismos enzimáticos para movilizar los hidratos de carbono almacenados en el metabolismo de las plantas y de los animales: tanto la hidrólisis como la fosforólisis del almidón, con un predominio de la primera. En la fabricación de la cerveza, la germinación controlada de las semillas de cereales como la cebada produce enzimas hidrolíticas que rompen el almidón en monosacáridos y disacáridos para fermentarse posteriormente por las levaduras. Este proceso se denomina malteado.

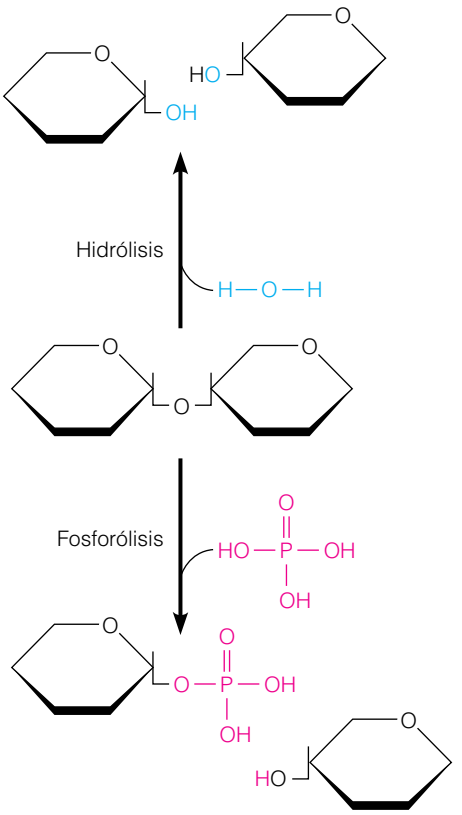


FIGURA **13.15**

Ruptura de un enlace glucosídico mediante hidrólisis o fosforólisis. Este diagrama formal muestra la manera en la que los elementos del agua o del ácido fosfórico, respectivamente, se añaden a través del enlace glucosídico.

DIGESTIÓN DEL ALMIDÓN Y DEL GLUCÓGENO

En los animales, la digestión del almidón y del glucógeno empieza en la boca, con la acción de la **α-amilasa** que se secreta en la saliva. Esta enzima rompe los enlaces internos $\alpha(1\rightarrow4)$ de ambos polímeros. En el intestino, la digestión continúa, facilitada por la α-amilasa secretada por el páncreas. Esta enzima degrada la amilosa a maltosa y un poco de glucosa. Sin embargo, sólo degrada parcialmente la amilopectina y el glucógeno, como se observa en la Figura 13.16, porque no es capaz de romper los enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ que se encuentran en los

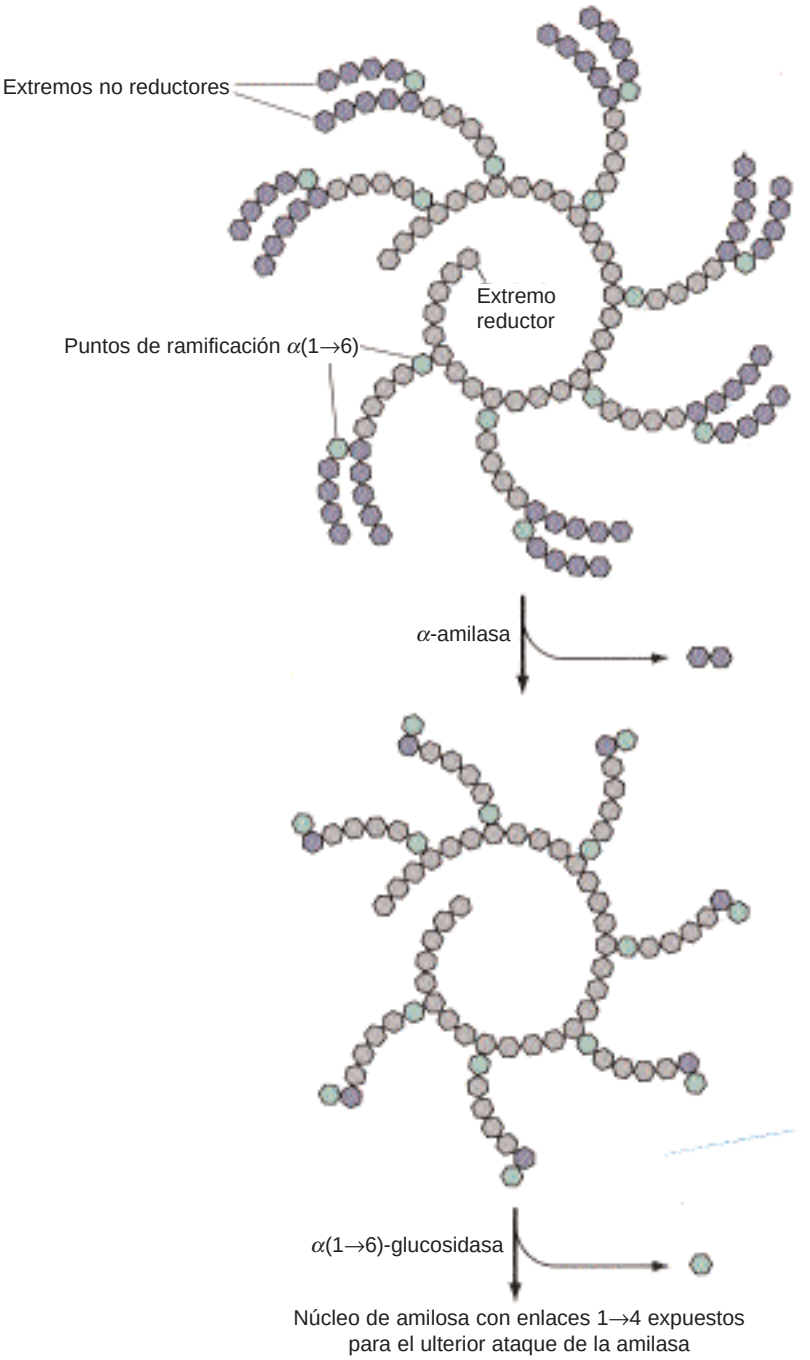


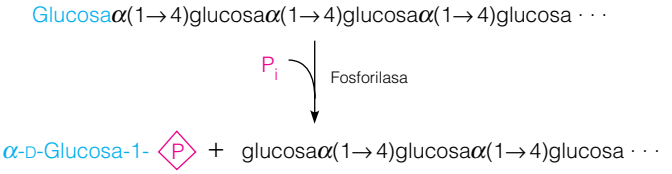
FIGURA **13.16**

Digestión secuencial de la amilopectina o del glucógeno por acción de la α-amilasa y la α(1→6)-glucosidasa. **(Arriba)** La α-amilasa de la saliva rompe los enlaces 1→4 entre las unidades de maltosa de la amilopectina (o del glucógeno). Sin embargo, no puede romper los enlaces glucosídicos 1→6 en el polímero ramificado, y se acumula una dextrina límite (en gris) salvo que haya α(1→6)-glucosidasa. **(Abajo)** La α(1→6)-glucosidasa del intestino rompe los puntos de ramificación, y expone el núcleo de amilosa a la ulterior digestión efectuada por la amilasa.

puntos de ramificación. El producto de la digestión exhaustiva de la amilopectina o del glucógeno por la α-amilasa se denomina una **dextrina límite**; para continuar su degradación es necesaria la acción de una "enzima desramificante", la **α(1→6)-glucosidasa** (también llamada isomaltasa). Esta acción expone un grupo nuevo de ramificaciones con enlaces α(1→4), que pueden ser atacadas por la α-amilasa, hasta alcanzar una nueva serie de ramificaciones con enlaces α(1→6). El resultado final de la acción secuencial de estas dos enzimas es la degradación completa del almidón o del glucógeno a maltosa y algo de glucosa. La maltosa se rompe hidrolíticamente por la **maltasa**, dando 2 moles de glucosa, que se absorbe a continuación al torrente sanguíneo y se transporta a los diversos tejidos para su utilización.

MOVILIZACIÓN DEL GLUCÓGENO

Las principales reservas de glucógeno de los vertebrados se encuentran en el músculo esquelético y en el hígado. La degradación de estas reservas en energía utilizable, o **movilización** del glucógeno, requiere las rupturas fosforolíticas secuenciales de los enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$, catalizadas por la **glucógeno fosforilasa.** En las plantas, el almidón se moviliza de manera similar por la acción de la **almidón fosforilasa**. Ambas reacciones liberan glucosa-1-fosfato a partir de los extremos no reductores del polímero de glucosa:



La reacción de ruptura está ligeramente desfavorecida en condiciones estándar ($\Delta G^{\circ\prime} = +3.1$ kJ/mol), pero las concentraciones intracelulares relativamente elevadas de fosfato inorgánico hacen que esta reacción opere in vivo casi exclusivamente en la dirección de degradación, en vez de en la dirección de síntesis. Obsérvese que la reacción se produce con retención de la configuración del carbono 1.

Al igual que la α-amilasa, las fosforilasas no son capaces de romper más allá de los puntos de ramificación $\alpha(1\rightarrow6)$. De hecho, la ruptura se detiene a los cuatro residuos de glucosa de un punto de ramificación. El proceso desramificador requiere la acción de una segunda enzima, como se indica en la Figura 13.17. Esta "enzima desramificante", la (**α1,4→α1,4)glucantransferasa**, cataliza dos reacciones. En primer lugar, está la actividad transferasa, en la que la enzima elimina tres de los residuos de glucosa restantes y transfiere este trisacárido intacto al extremo de alguna otra ramificación externa. A continuación, el residuo de glucosa que queda unido aún a la cadena por un enlace $\alpha(1\rightarrow6)$ se rompe por la actividad $\alpha(1\rightarrow6)$-glucosidasa, que posee la misma enzima desramificante, lo cual da lugar a una molécula de glucosa libre y una ramificación de tres residuos de glucosa con enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$. Esta ramificación que ha quedado ahora expuesta puede ser atacada por la fosforilasa. El resultado final de la acción de estas dos enzimas es la degradación completa del glucógeno a glucosa-1-fosfato (el producto principal) y glucosa.

En este punto podríamos preguntarnos por qué el esquema de la degradación del glucógeno ha evolucionado hasta incluir este complejo proceso de desramificación. La importancia de almacenar la energía de los hidratos de carbono en forma de un polímero muy ramificado puede radicar en la necesidad del animal de generar energía de manera muy rápida, tras los estímulos adecuados. La glucógeno fosforilasa ataca los enlaces *exoglucosídicos*, es decir, rompe de manera secuencial a partir de los extremos no reductores. Cuantos más extremos de este tipo existan en un polímero, con mayor rapidez puede movilizarse el polímero.

Para metabolizarse mediante la glucólisis, la glucosa-1-fosfato producida por la acción de la fosforilasa debe convertirse en glucosa-6-fosfato. Esta isomerización la lleva a cabo la fosfoglucomutasa. Esta reacción también es importante en la síntesis de glucógeno (Capítulo 16). Desde el punto de vista de su mecanismo, esta reacción es similar a la de la fosfoglicerato mutasa (página 512), excepto que en la fosfoglucomutasa un residuo de fosfoserina en la enzima reacciona con el sustrato en vez de la fosfohistidina:

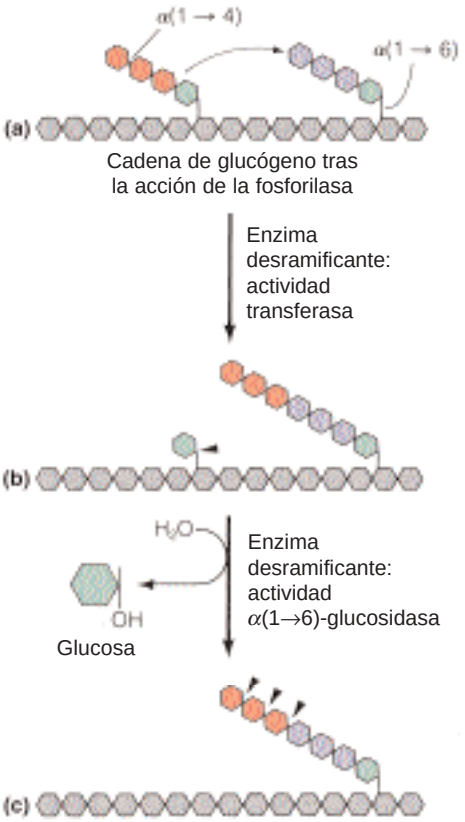


FIGURA **13.17**

Proceso de desramificación en el catabolismo del glucógeno. **(a)** Una cadena de glucógeno tras la actividad de la fosforilasa, que separa los residuos de glucosa hasta llegar a cuatro residuos del punto de ramificación. **(b)** Cadena de glucógeno tras la actividad transferasa de la enzima desramificante. Los tres residuos de glucosa restantes con enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ se han transferido a un extremo no reductor próximo. **(c)** Cadena de glucógeno tras la actividad $\alpha(1\rightarrow6)$-glucosidasa de la enzima desramificante, que ha eliminado el último residuo de glucosa que quedaba en la rama. La fosforilasa separará todas las unidades de glucosa de la nueva rama alargada hasta llegar a las cuatro últimas, y se iniciará de nuevo el proceso de desramificación. Se indican con puntas de flecha los nuevos puntos de ruptura.

Enzima-fosfato + glucosa-1-fosfato $\rightleftharpoons$ enzima + glucosa-1,6-bisfosfato

Glucosa-1,6-bisfosfato + enzima $\rightleftharpoons$ enzima-fosfato + glucosa-6-fosfato

Neto: Glucosa-1-fosfato $\rightleftharpoons$ glucosa-6-fosfato $\Delta G^{\circ\prime} = -7.3$ kJ/mol

El residuo de serina que lleva el grupo fosfato es excepcionalmente reactivo, como indica el hecho de que la fosfoglucomutasa, como la quimotripsina y otras proteasas de serina, se inhibe de forma irreversible por el diisopropilfluorofosfato. La inhibición, como la de la quimotripsina (véase el Capítulo 11), comporta una acilación tan sólo de la serina del lugar activo.

La mayor parte del glucógeno de los animales vertebrados se almacena en forma de gránulos en las células del hígado y del músculo esquelético. Una función importante del hígado es la de proporcionar glucosa para su metabolismo por otros tejidos. Esta función se realiza mediante la movilización del glucógeno y mediante la gluconeogénesis. Ambos procesos dan lugar a formas fosforiladas de la glucosa, que no pueden salir de las células hepáticas. La conversión en glucosa libre se realiza mediante la acción de la **glucosa-6-fosfatasa**, que hidroliza la glucosa-6-fosfato a glucosa y ortofosfato. Esta enzima está presente también en el riñón y en el intestino. En cambio, el glucógeno muscular se utiliza principalmente como fuente de glucosa-6-fosfato para el catabolismo en las células musculares. En consecuencia, en el músculo no hay glucosa-6-fosfatasa, como tampoco la hay en el cerebro, que depende casi exclusivamente de la glucosa de la sangre como principal fuente de energía. Esto garantiza que la glucosa-6-fosfato formada a partir del glucógeno no difunda hacia el exterior de estas células, puesto que, como se ha indicado antes, los azúcares fosfato no atraviesan con facilidad las membranas celulares.

REGULACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DEL GLUCÓGENO

En el Capítulo 11 hemos mencionado el control de la degradación del glucógeno, o glucogenólisis, como ejemplo especialmente bien conocido de una cascada reguladora, un proceso en el que la intensidad de una señal reguladora inicial se amplifica muchas veces mediante una serie de activaciones enzimáticas. Esta amplificación es especialmente importante en el caso de la glucogenólisis, puesto que, por ejemplo, el temor o la necesidad de capturar una presa, pueden desencadenar una necesidad instantánea de un aumento de la generación y utilización de energía. El glucógeno es la fuente de energía metabólica *a gran escala* que está disponible de manera más inmediata, y por tanto, es importante que los animales sean capaces de activar con rapidez la movilización del glucógeno. Además, la degradación del glucógeno es el proceso bajo control hormonal para el que se comprendió por primera vez la acción molecular de la hormona de manera detallada. Así pues, aunque el proceso se ha presentado en los Capítulos 11 y 12, lo describimos aquí de manera más detallada (Figura 13.18).

Estructura de la glucógeno fosforilasa

En el músculo esquelético, la glucógeno fosforilasa es un dímero que contiene dos cadenas polipeptídicas idénticas, de 97 400 dalton cada una. La enzima se encuentra en dos formas interconvertibles: la fosforilasa *a*, relativamente *activa*, y la fosforilasa *b*, relativamente *inactiva*. La fosforilación de la serina 14 convierte la fosforilasa *b* relativamente inactiva en la fosforilasa *a* activa. Como se observa en la Figura 13.18, la activación la cataliza una **fosforilasa *b* quinasa** específica, que transfiere el fosfato desde el ATP a los dos residuos de serina. La desactivación se produce mediante una **fosforilasa fosfatasa** específica.

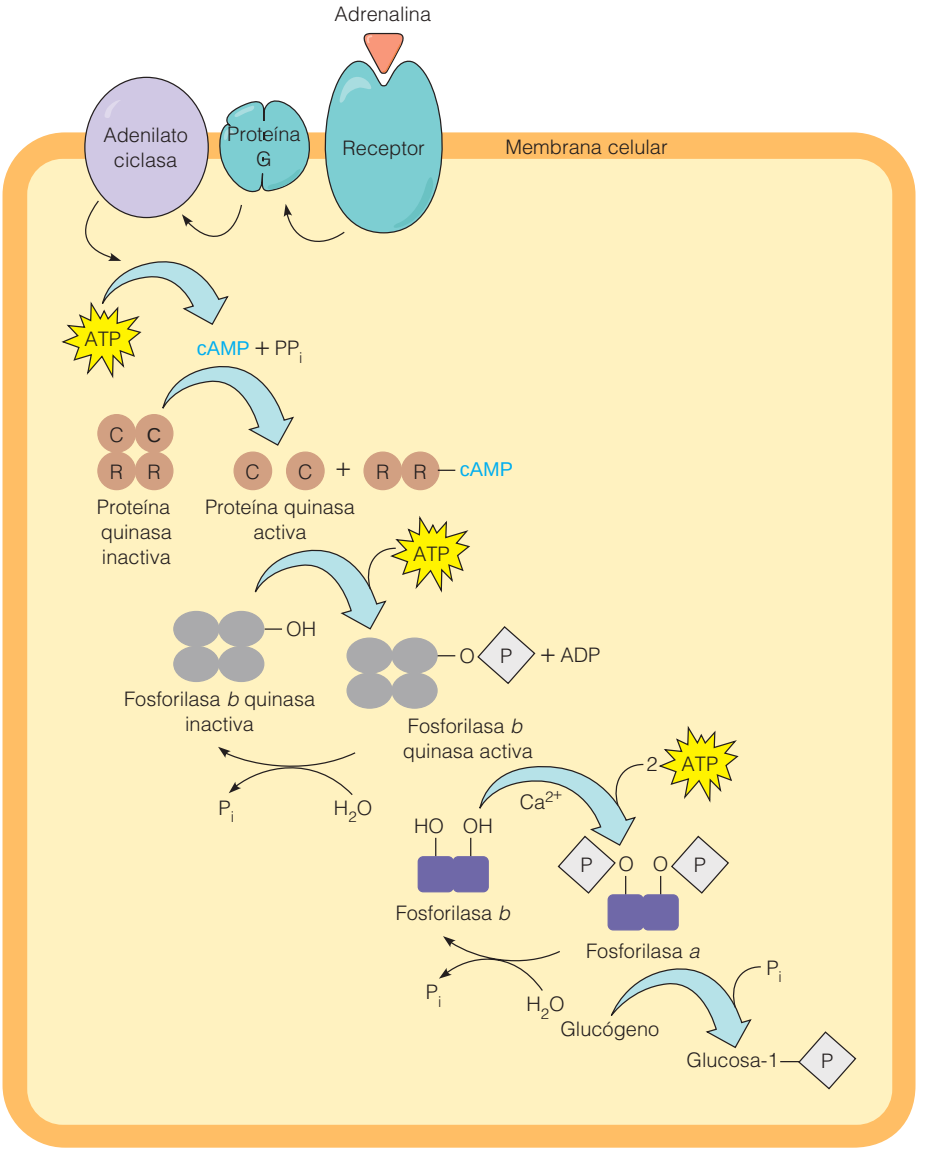


FIGURA **13.18**

Cascada reguladora que controla la degradación del glucógeno. Se muestra aquí la regulación hormonal de la degradación del glucógeno, tal como podría producirse en una célula muscular tras una estimulación con adrenalina. La unión de la hormona a su receptor desencadena la interacción con una proteína G, que a su vez interactúa con la adenilato ciclasa y la activa (véase la Figura 12.13). La unión del AMP cíclico a las subunidades R (reguladoras) de la proteína quinasa A tetramérica R_2C_2 produce su disociación de las subunidades C (catalíticas). El monómero activo C cataliza la fosforilación de residuos de serina específicos de la fosforilasa *b* quinasa inactiva, activando a la fosforilasa *b* en el proceso. La quinasa activa fosforila un residuo de serina en cada una de las dos subunidades de la fosforilasa *b* homodimérica, lo cual convierte a la fosforilasa *b* inactiva en la fosforilasa *a* activa, que posteriormente cataliza la degradación del glucógeno. Cada reacción de la cascada reguladora amplifica la señal hormonal, de manera que la unión de muy pocas moléculas de adrenalina a los receptores desencadena una liberación sustancial de glucosa-1-fosfato a partir de los depósitos intracelulares de glucógeno. La inactivación de la ruta implica las acciones de fosfatasas específicas, que eliminan los fosfatos de la fosforilasa *b* quinasa y la fosforilasa *a*. Las acciones de estas fosfatasas también están reguladas (véase el Capítulo 16).

La movilización del glucógeno se controla hormonalmente por una cascada metabólica que se activa por la formación de cAMP y que comporta una serie sucesiva de fosforilaciones de proteínas enzimáticas.

Control de la actividad fosforilasa

La fosforilasa *b* quinasa se activa también por la fosforilación de la enzima que pasa de una forma inactiva a una activa. Esta reacción la cataliza una proteína quinasa dependiente de AMP cíclico. Como se ha indicado en el Capítulo 12, el AMP cíclico (cAMP) desempeña numerosos papeles en la regulación del metabolismo, tanto en los eucariotas como en los procariotas. En los eucariotas, su función es la de un segundo mensajero, que recibe los mensajes hormonales que se originan en el exterior de la célula y los transmite al interior de la misma. Esta transmisión comporta la activación de algunos procesos metabólicos y la inhibición de otros. En la glucogenólisis, el AMP cíclico produce una activación rápida y eficaz. Al mismo tiempo, inhibe la síntesis de glucógeno a través de una cascada reguladora diferente, que se considera en el Capítulo 16.

La hormona principal que estimula la glucogenólisis en el músculo es la adrenalina, que secreta la médula suprarrenal y se une a receptores específicos situados en las membranas de las células musculares. La movilización del glucógeno hepático se estimula en gran parte por la hormona peptídica pancreática glucagón. En ambos casos, la unión de la hormona a la membrana estimula

la síntesis de AMP cíclico por la adenilato ciclasa unida a la membrana, mediante la acción de una proteína G, la G_s. El AMP cíclico activa a su vez la proteína quinasa, que cataliza la fosforilación de la fosforilasa *b* quinasa. Esta quinasa cataliza, a su vez, la fosforilación de la fosforilasa *b* a la *a*, y por tanto, la activación de la degradación del glucógeno, mediante la acción de la fosforilasa *a*. Estos sucesos explican cómo la secreción de relativamente pocas moléculas de una hormona como la adrenalina puede desencadenar, en pocos momentos, una conversión masiva de glucógeno en glucosa-1-fosfato.

La adrenalina es la principal hormona encargada de dirigir la respuesta de "lucha o huye" ante diversos estímulos. Además de estimular la glucogenólisis, la hormona desencadena diversos acontecimientos fisiológicos, como el aumento de la profundidad y la frecuencia de los latidos cardíacos. Estos efectos están también mediados por el AMP cíclico, como se comenta posteriormente en el Capítulo 23. El AMP cíclico regula también otros procesos metabólicos, como la estimulación de la degradación de las grasas y la inhibición de la síntesis de glucógeno. Volveremos sobre estos efectos al profundizar en el metabolismo.

Uno de los diversos componentes de la respuesta "lucha o huye" es la rápida movilización del glucógeno muscular que desencadena la adrenalina.

Proteínas de la cascada glucogenolítica

Nuestra presentación de la cascada glucogenolítica se inició con la reacción de la fosforilasa, y hemos ido retrocediendo luego hasta la señal hormonal inicial. Empecemos ahora con la hormona y vayamos hacia delante, poniendo especial atención en las proteínas participantes (véase nuevamente la Figura 13.18). La hormona se une a un receptor específico situado en la parte exterior de la membrana citoplasmática. Esta unión conduce a la activación de la adenilato ciclasa, que está unida a la parte interna de la membrana. La activación se produce a través de una proteína G, la G_s.

La proteína quinasa dependiente de AMP cíclico, denominada también proteína quinasa A, es un tetrámero formado por dos subunidades C *catalíticas* y dos subunidades R *reguladoras*. El tetrámero R_2C_2 es catalíticamente inactivo. Los análisis estructurales de la subunidad catalítica han demostrado una estructura central semejante en todas las proteína quinasas que se conocen. La Figura 13.19 presenta la estructura cristalina de la subunidad C complejada

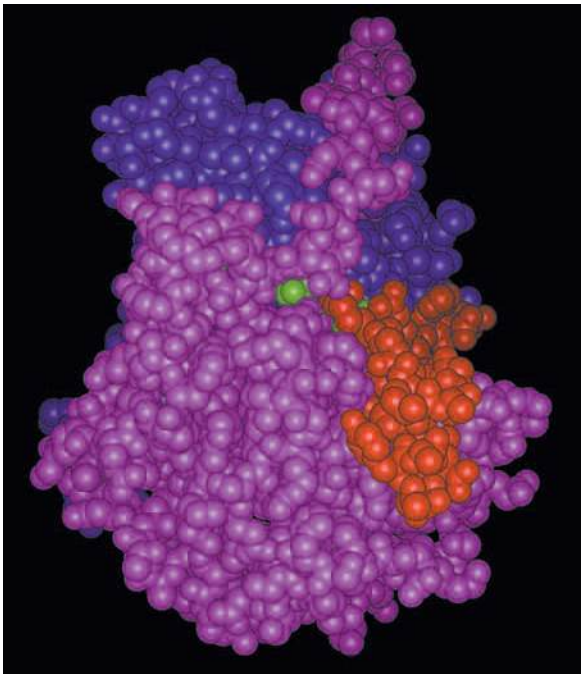


FIGURA **13.19**

Proteína quinasa A. Modelo de relleno espacial de la subunidad catalítica unida al ATP (se muestra en verde) y un péptido inhibidor similar al dominio inhibidor de la subunidad R (se muestra en rojo). En morado oscuro se muestra el extremo amino de la proteína.

Cortesía de E. Radzio-Andzeim y S. S. Taylor. Coordenadas obtenidas del complejo ternario de la Subunidad Catalítica: ATP:PKI (5-24). Reproducido con permiso de J. Zheng et al., *Biochem.* (1993) 32:2154, fig. 2, Protein Data Bank (Reference 1ATP). © American Chemical Society.

con el ATP y un péptido inhibidor que es similar al dominio inhibidor de la subunidad R. El mecanismo catalítico consiste en un ataque nucleófilo por un residuo de serina en el sustrato proteico sobre el fosfato γ del ATP. El efecto de la unión del inhibidor es aumentar en gran medida la afinidad por el ATP (que se presenta en la figura de verde), esencialmente enterrándolo e impidiendo el acceso al sustrato proteico.

La unión del AMP cíclico a las subunidades R hace que el tetrámero se disocie, dando lugar al monómero catalíticamente activo (C). Esta proteína cataliza ahora la fosforilación de la fosforilasa *b* quinasa. La fosforilasa *b* quinasa es una proteína compleja de múltiples subunidades, una de cuyas subunidades es una proteína denominada **calmodulina** o proteína moduladora del calcio. Se sabe desde hace tiempo que el ion calcio es un regulador fisiológico importante, en especial de procesos relacionados con la conducción nerviosa y la contracción muscular. La mayor parte de estos efectos se producen a través de la unión del Ca^{2+} a la calmodulina, la cual amplifica los pequeños cambios de la concentración intracelular de Ca^{2+}.

La calmodulina es una proteína pequeña (M_r ~17 000) con una secuencia de aminoácidos muy conservada. Contiene cuatro lugares de unión para el ion calcio (Figura 13.20). Cada lugar une el Ca^{2+} con una K_D de aproximadamente 10^{-6} M, que concuerda con las observaciones que indican que el calcio puede causar cambios metabólicos intracelulares con concentraciones de tan sólo 1 μM. La unión estimula un cambio conformacional importante en la proteína, dando lugar a una estructura más compacta y más helicoidal, que aumenta la afinidad de la calmodulina por diversas proteínas diana reguladoras. En el caso de la fosforilasa *b* quinasa, la calmodulina desempeña un papel es-

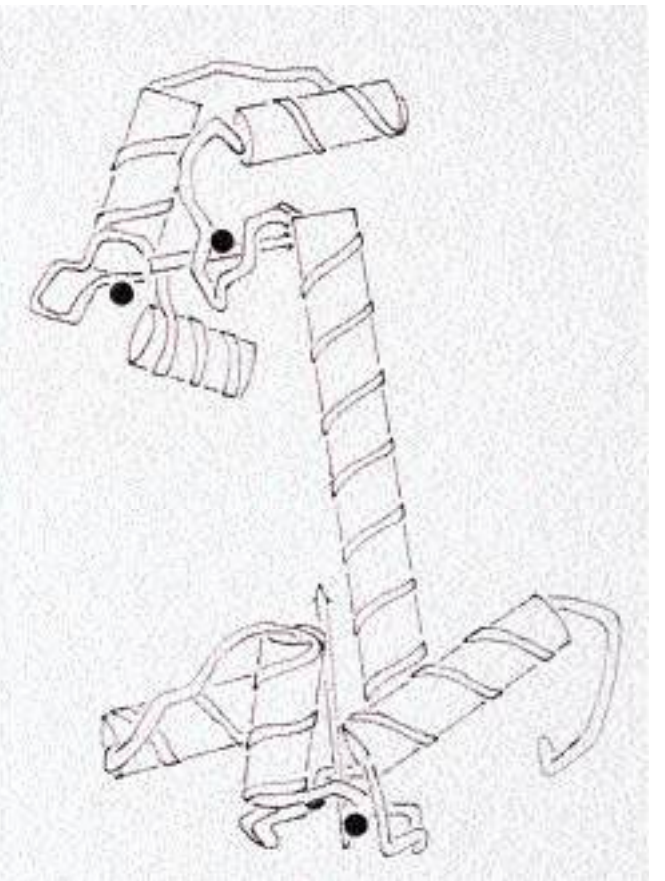


FIGURA **13.20**

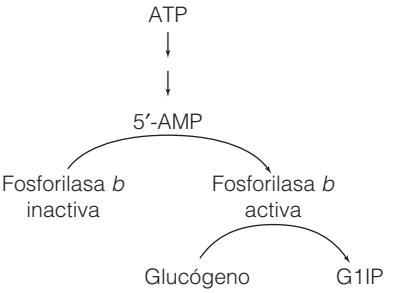
Calmodulina. Este modelo muestra la estructura de la calmodulina de cerebro de bovino, determinada mediante cristalografía de rayos X. Los cuatro lugares de unión del calcio se indican con círculos negros. Cada extremo de la molécula en forma de pesa está formado por tres regiones de hélice α y une dos iones Ca^{2+}. La hélice que junta los dos extremos experimenta probablemente cambios de longitud como consecuencia de la unión del calcio. Estos cambios conformacionales son responsables de los cambios de la afinidad de la calmodulina por los objetivos regulados por el calcio.

Reproducido de R. H. Kretsinger, S. E. Rudwick y L. J. Weissman, *J. Inorg. Chem.* (1986) 28:293. © 1986 Elsevier Press.

pecial como subunidad integral de la enzima. Así pues, la cascada de la glucogenólisis depende de la concentración intracelular de calcio, así como de las concentraciones de AMP cíclico. Esta dependencia es especialmente importante en el músculo, en donde la contracción se estimula por la liberación de calcio. Así pues, el Ca^{2+} desempeña un papel doble, en el aporte de sustratos energéticos necesarios para sustentar la contracción muscular y en la propia contracción.

Control no hormonal de la glucogenólisis

La degradación del glucógeno está bajo un control no hormonal, además del hormonal. Recuérdese que la fosforilasa *b* es relativamente inactiva. Esta forma de la enzima se activa alostéricamente por el 5′-AMP (pero no por el AMP cíclico). Generalmente, esta activación no se produce en la célula, ya que el ATP, que es mucho más abundante y no activa la fosforilasa *b*, compite con el AMP por la unión a la enzima. Sin embargo, en condiciones de privación de energía, puede acumularse AMP a costa de la degradación del ATP, hasta el punto de que se activa la fosforilasa *b* y, por tanto, la glucogenólisis. Los estudios cristalográficos recientes indican que los cambios estructurales inducidos en la fosforilasa *b* por el AMP son muy similares a los inducidos por la fosforilación de la fosforilasa *b* a la *a*, a pesar de que la unión del AMP y la fosforilación se produzcan en lugares muy distantes (Figura 13.21). En cualquier caso, la movilización de las reservas energéticas de glucógeno puede ponerse en marcha ya sea mediante una estimulación hormonal, como consecuencia de una necesidad fisiológica de aumento de la producción de ATP, ya sea por un mecanismo alostérico desencadenado cuando la cantidad de energía es insuficiente para el mantenimiento de las funciones normales. El mecanismo no hormonal, en el que no interviene una cascada metabólica, estimula la glucogenólisis en respuesta a una carga energética baja, mientras que la cascada inducida hormonalmente predomina cuando es necesario aumentar rápidamente la generación de energía. En ambos casos, se potencia la fosforólisis del glucógeno para dar lugar a glucosa-1-fosfato.



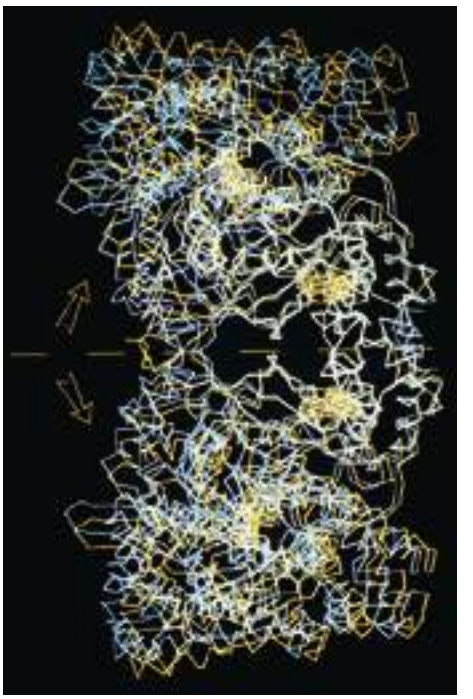


FIGURA **13.21**

Base estructural de la activación de la glucógeno fosforilasa. Los trazados de átomos de C_α representan las estructuras de las dos formas activas de la glucógeno fosforilasa: la fosforilasa *a* (azul) y la fosforilasa *b* activada por el AMP (amarillo). Las dos estructuras son casi superponibles e indican que se producen transiciones estructurales similares con la fosforilación de *b* a *a* y la activación de *b* con el AMP. Los lugares catalíticos y los lugares de unión del AMP se indican en amarillo. Las flechas indican la dirección del movimiento relativo de las subunidades del dímero con la activación.

Cortesía de S. R. Sprang, S. G. Withers, E. J. Goldsmith, R. J. Fletterick y N. B. Madsen, *Science* (1991) 254:1367-1371. © 1991 AAAS.

RESUMEN

La glucólisis es la ruta central mediante la cual se extrae energía de los hidratos de carbono. Se trata de una ruta formada por 10 pasos, que va de la glucosa al piruvato en las células con respiración. En los microorganismos anaerobios o en las células que presentan un deterioro de la respiración, el piruvato sufre reacciones de reducción, con lo que el conjunto de la ruta puede cursar sin un cambio neto del estado de oxidación. La glucólisis puede contemplarse como un proceso que transcurre en dos fases: en primer lugar, una fase de inversión de energía, en la que se utiliza ATP para sintetizar un azúcar fosfato de seis carbonos que se desdobla en dos triosas fosfato, y en segundo lugar, una fase de generación de energía, en la que la energía de dos compuestos de energía superelevada se utiliza para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP. La fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa son los dos lugares principales de control de la ruta. Gran parte del control está en relación con las necesidades energéticas de la célula, de tal manera, que las situaciones de baja carga energética estimulan la ruta y las situaciones de abundancia energética retardan la ruta. Las reservas de polisacáridos intracelulares en los animales se movilizan por una cascada metabólica bajo control hormonal, en la que el AMP cíclico transmite la señal hormonal y pone en marcha sucesos que activan la degradación del glucógeno a glucosa-1-fosfato.

BIBLIOGRAFÍA

Organización intracelular de las enzimas glucolíticas

Ovádi, J., ed. (1991) Physiological significance of metabolite channeling. *J. Theor. Biol.* 152:1-141. Un número especial de esta revista que contiene revisiones sobre la organización de las enzimas metabólicas, con un énfasis especial en la glucólisis.

Regulación del metabolismo de los hidratos de carbono

Beitner, R., ed. (1985) *Regulation of Carbohydrate Metabolism*, Vols. 1 y 2. CRC Press, Boca Raton, Fla. Incluye la revisión de capítulos relativos a la fructosa-2,6-bisfosfato como regulador biológico, la organización estructural de las enzimas glucolíticas, el control del metabolismo del glucógeno y el metabolismo aberrante de los hidratos de carbono en estados patológicos, entre otros temas.

Boyer, P. D. y E. G. Krebs, eds. (1986) *The Enzymes*, 3.ª ed., Vols. 17 y 18. Academic Press, Orlando, Fla. Se analizan los sistemas enzimáticos cuya actividad se controla por fosforilación, como las proteína quinasas, la glucógeno fosforilasa, la piruvato quinasa, las enzimas de la síntesis de fructosa-2,6-bisfosfato y las fosfoproteína fosfatasas.

Dell′Acqua, M. L. y J. D. Scott (1997) Protein kinase A anchoring. *J. Biol. Chem.* 272:12881-12884. Muchas señales hormonales utilizan la activación de la proteína quinasa A dependiente del cAMP, y la localización de la proteína quinasa dentro de la célula ayuda a establecer la especificidad de las rutas concretas de señalización.

Knighton, D. R., J. Zheng, L. F. TenEyck, V. A. Ashford, N. Xuong, S. S. Taylor y J. M. Sowadski (1991) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253:407-420. Presenta la base estructural de la activación de la proteína quinasa con la disociación en sus subunidades.

Lynd, L. R., J. H. Cushman, R. J. Nichols y C. E. Wyman (1991) Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science* 251:1318-1323. La optimización de la producción de combustible a partir de la biomasa requerirá un conocimiento detallado de los mecanismos de control glucolíticos.

McCoy, M. (1998) Biomass ethanol inches forward. *Chem. Eng. News* Diciembre 7:29-32. Un artículo de noticias que describe los procesos que se están diseñando para convertir los productos de desecho en etanol utilizable.

Meador, W. E., A. R. Means y F. A. Quiocho (1992) Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 Å structure of a calmodulin-peptide complex. *Science* 257:1251-1254. Un estudio cristalográfico de alta resolución de la acción de la calmodulina.

Pilkis, S. J., I. T. Weber, R. W. Harrison y G. I. Bell (1994) Glucokinase: Structural analysis of a protein involved in susceptibility to diabetes. *J. Biol. Chem.* 269:21925-21928. Una mini-revisión reciente.

Rhoads, R. y F. Friedberg (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. *Fed. Proc.* 11:331-340. Revisión de los procesos controlados por el calcio en los que media la calmodulina, con una consideración de la base estructural de las interacciones de las proteínas diana con la calmodulina.

Sirover, M. A. (1997) Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. *J. Cell Biochem.* 66:133-140. La G3P deshidrogenasa tiene un espectro sorprendente de funciones además de un papel catalítico en la glucólisis.

Sprang, S. R., S. G. Withers, E. J. Goldsmith, R. J. Fletterick y N. B. Madsen (1991) Structural basis for the activation of glycogen phosphorylase *b* by adenosine monophosphate. *Science* 254:1367-1371. Uno de una serie de artículos en los que se describe la estructura cristalina de la glucógeno fosforilasa en los estados activado e inactivado.

Su, Y., R. G. Dostmann, F. W. Herberg, K. Durick, N.-H. Xuong, L. Ten Eyck, S. S. Taylor y K. I. Varughese (1995) Regulatory subunit of protein kinase A: Structure of deletion mutant with cAMP binding domains. A structural analysis of the cyclic AMP binding site reveals its mode of cooperative binding to regulatory subunits. *Science* 269:807-813.

Análisis del metabolismo de los hidratos de carbono mediante RMN in Vivo

Chance, B. y K. Wasserman (1986) Anaerobiosis, lactate, and gas exchange during exercise, I and II. *Fed. Proc.* 45:2904-2957. Presentaciones de un simposio en el que se utilizaron las técnicas metabólicas modernas, incluyendo la RMN con ^{31}P para relacionar el ejercicio muscular con el control del metabolismo de los hidratos de carbono.

Shulman, R. G. (1988) High resolution NMR in vivo. *Trends Biochem. Sci.* 13:37-39. Una mini-revisión que resume la forma en la que los estudios de RMN han modificado algunos de nuestros conceptos acerca del metabolismo energético y su regulación.

Oscilaciones de los intermediarios glucolíticos

Bier, M., B. Teusink, B. N. Kholodenko y H. V. Westerhoff (1996) Control analysis of glycolytic oscillations. *Biophys. Chem.* 62:15-24. Modelo matemático de las oscilaciones que ayuda a entender el control de la glucólisis.

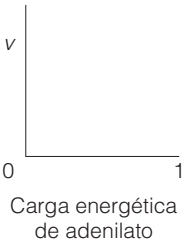
Richter, P. H. y J. Ross (1981) Concentration oscillations and efficiency: Glycolysis. *Science* 211:715-716. Un análisis teórico de las ventajas energéticas que aportan a un sistema vivo las oscilaciones observadas en las concentraciones de los intermediarios glucolíticos.

PROBLEMAS

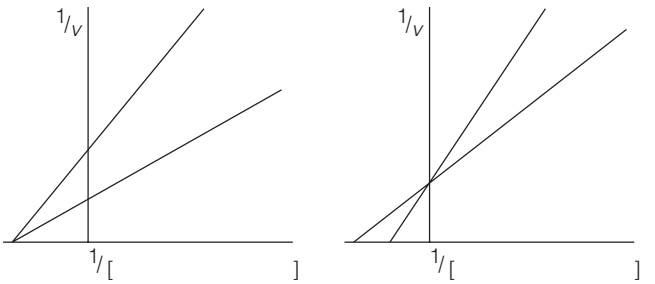
1. Las concentraciones intracelulares en el músculo en reposo son las siguientes: fructosa-6-fosfato, 1.0 mM; fructosa-1,6-bisfosfato, 10 mM; AMP, 0.1 mM; ADP, 0.5 mM, ATP, 5 mM, y P_i, 10 mM. ¿Es la reacción de la fosfofructoquinasa en el músculo *más* o *menos* exergónica que en condiciones estándar? ¿En qué grado?
2. El metanol es muy tóxico, no a causa de su propia actividad biológica, sino porque se convierte metabólicamente en formaldehído, mediante la acción de la alcohol deshidrogenasa. Parte del tratamiento médico de la intoxicación por metanol se basa en la administración de dosis altas de etanol. Explique por qué resulta eficaz este tratamiento.
3. Vea la Figura 13.6, que indica el $\Delta G'$ para cada reacción glucolítica en condiciones intracelulares. Supongamos que se inhibiera la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa con ácido yo-

doacético. ¿Qué intermediario glucolítico cabría prever que se acumulara con mayor rapidez, y por qué?

4. En distintos organismos, la sacarosa puede romperse mediante hidrólisis o mediante fosforólisis. Calcule el rendimiento de ATP por mol de sacarosa metabolizada mediante la glucólisis anaerobia partiendo de: (a) la ruptura hidrolítica y (b) la ruptura fosforolítica.
5. Supongamos que fuera posible marcar la glucosa con ^{14}C en cualquier posición o combinación de posiciones. Para las levaduras que fermentan la glucosa a etanol, ¿qué forma o formas de glucosa marcada serían las que darían lugar a la *máxima* radiactividad en el CO_2 y a la *mínima* en el etanol?
6. Escriba las ecuaciones químicas equilibradas para cada uno de los siguientes procesos: (a) glucólisis anaerobia de 1 mol de sacarosa, rota inicialmente por la sacarosa fosforilasa, (b) glucólisis aerobia de 1 mol de maltosa, y (c) fermentación de un residuo de glucosa del almidón a etanol, partiendo de la ruptura inicial con la α-amilasa.
7. Dada la posición del arsénico en la tabla periódica, el arsenato (AsO_4^{-3}) es químicamente similar al fosfato inorgánico y lo utilizan las enzimas que requieren fosfato como sustrato alternativo. Sin embargo, los arsenatos orgánicos son muy inestables y sufren una hidrólisis espontánea. Se sabe que el arsenato inhibe la producción de ATP en la glucólisis. Identifique la enzima diana y explique el mecanismo de inhibición.
8. Supongamos que ha elaborado un vino con un contenido alcohólico del 10% en peso/volumen (es decir, 10 g de etanol por 100 mL de vino). ¿Qué concentración molar de glucosa o su equivalente tendría que haber contenido la mezcla de fermentación inicial para generar esta cantidad de etanol? ¿Es probable que una mezcla de fermentación inicial contuviera esa cantidad de glucosa? ¿En qué otras formas podría aparecer el carbono fermentable?
9. Comente brevemente por qué cada una de las tres formas frecuentes de galactosemia implica un deterioro de la utilización de galactosa. ¿Qué proceso metabólico queda bloqueado en cada uno de los trastornos?
*10. No todas las bacterias anaerobias fermentan la glucosa a lactato o etanol. Algunas fermentan la glucosa a acetato, y otras la fermentan a propionato. Proponga una ruta sencilla que lleve del piruvato al acetato. La ruta no debe producir un cambio neto del estado de oxidación de la célula. Para ésta y para otras rutas de fermentación más complejas, consulte un libro de microbiología.
11. Escriba una ruta que vaya de la glucosa al lactato en la glándula mamaria y una ecuación equilibrada para el conjunto de dicha ruta.
12. Esquematice una curva que describiera el comportamiento esperado de la fosfofructoquinasa.



13. Explique el fundamento de la afirmación siguiente. La conversión eficaz de galactosa en glucosa-1-fosfato necesita sólo cantidades catalíticas de UDP-glucosa.
14. La isoenzima muscular de lactato deshidrogenasa se inhibe por el lactato. El análisis cinético de estado estacionario proporciona los datos siguientes, con el lactato ausente o presente a una concentración fija.



(a) El piruvato es el sustrato cuya concentración varía en una representación. El NADH es el otro. Identificar cada uno. Utilizar una flecha y la letra adecuada (*b*, *c*, *d* o *e*) para identificar cada uno de lo siguiente.
(b) Inversa de $V_{máx}$ para la enzima sin inhibir.
(c) La línea que representa los datos obtenidos en presencia de lactato actuando como inhibidor competitivo con respecto a la variable sustrato.
(d) La línea que representa los datos obtenidos en presencia de lactato actuando como inhibidor no competitivo con respecto a la variable sustrato.
(e) Inversa de K_M en presencia de lactato actuando como inhibidor competitivo.
(f) Si K_M para el NADH es 2×10^{-5} M, ¿cuál es la concentración de NADH más adecuada que debe usarse para determinar la K_M para el piruvato? 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M o 10^{-3} M.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 13A

Detección y análisis de las interacciones proteína-proteína

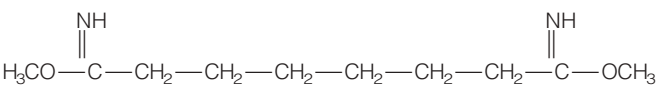
Las enzimas de la glucólisis se aíslan con facilidad en forma de proteínas solubles. Sin embargo, diversas clases de pruebas apoyan la idea de que dentro de las células vivas están asociadas físicamente. Durante años, a los estudiantes de bioquímica se les ha dicho: "Una célula no es un saco de enzimas", señalando que las enzimas se encuentran organizadas en las cé-

lulas intactas en unidades supramoleculares funcionales. Con frecuencia estas unidades organizadas están estabilizadas por fuerzas débiles no covalentes que se rompen fácilmente cuando las células se rompen y abren, como debe ocurrir cuando quieren aislarse y caracterizarse las enzimas de su interior. Aun cuando las células se lisen de forma suave, la mayoría de los procesos de extracción de proteínas diluyen los contenidos intracelulares varios órdenes de magnitud y eso sólo puede romper las asociaciones que en gran medida dependen de la concentración. Los bioquímicos están tratando de definir la forma en que la organización de las enzimas relacionadas funcionalmente facilita el flujo de metabolitos y el control y coordinación de las rutas metabólicas.

Una primera indicación de que las enzimas glucolíticas podrían interaccionar dentro de las células surgió a partir de las observaciones de que las concentraciones molares intracelulares de los intermediarios glucolíticos eran realmente menores que las concentraciones de las enzimas que actuaban sobre esos intermediarios. Este hecho sugirió que la mayor parte de los intermediarios están unidos a las enzimas dentro de las células y esto, a su vez, condujo a la idea de que los intermediarios pasan directamente de una enzima a otra, sin liberarse al medio, igual que si las enzimas glucolíticas operasen como parte de un complejo multienzimático. Si un complejo de este tipo pudiera aislarse intacto, sus propiedades podrían explorarse mediante los métodos de determinación del peso molecular descritos en Herramientas de la Bioquímica 6B. Sin embargo, debido a las dificultades encontradas para aislar los complejos enzimáticos que se mantienen unidos por fuerzas efímeras, los científicos normalmente utilizan diversos planteamientos para demostrar y caracterizar las interacciones proteína-proteína. Aquí se describen algunas de estas técnicas.

Reactivos bifuncionales de entrecruzamiento

Son reactivos que contienen dos grupos funcionales capaces de formar enlaces covalentes con residuos de aminoácidos específicos en las proteínas estrechamente asociadas. Por ejemplo, el *dimetilsuberimidato* reacciona con los grupos ε-amino de la lisina y los grupos amino N-terminales, uniendo dos proteínas de la forma



que puede detectarse mediante electroforesis en gel debido al aumento del peso molecular. Algunos reactivos tienen entrecruzamientos que pueden romperse, como los enlaces disulfuro que pueden romperse por reducción, lo cual permite el análisis por separado de los componentes del par entrecruzados. Aunque la técnica puede proporcionar mucha información, con frecuencia se requiere la experimentación con muchos reactivos para encontrar la combinación correcta de los grupos funcionales y la distancia entre las parejas reactivas para que se produzca la reacción de entrecruzamiento en una cuantía medible. También debe tenerse cuidado en la interpretación, ya que aún los contactos transitorios entre las moléculas, que pueden producirse de forma inespecífica, conducen a veces a un entrecruzamiento.

Cromatografía de afinidad

En esta técnica se inmoviliza una proteína sobre un soporte cromatográfico y se pasa una mezcla de proteínas por una columna de este material. Tras la elución pueden identificarse las proteínas retenidas por su actividad biológica o por técnicas electroforéticas, como la inmunotransferencia o el análisis mediante electroforesis bidimensional. Las principales limitaciones de esta técnica son la necesidad de disponer de forma pura de una de las proteínas para la inmovilización y el hecho de que las interacciones se producen en un ambiente algo artificial. De nuevo, son esenciales los controles, debido a la retención inespecífica de algunas proteínas en las columnas de afinidad.

Inmunoprecipitación

Puede añadirse un anticuerpo contra una proteína purificada a una mezcla de proteínas, con frecuencia con la inmunoprecipitación tanto de la proteína antigénica como de cualquier proteína interactiva unida a ella. Aunque esta técnica es cualitativa, como los planteamientos descritos más arriba, es simple de realizar y sólo necesita pequeñas cantidades de sustancia. Debido a que deben realizarse varios análisis simultáneamente, la inmunoprecipitación puede utilizarse, por ejemplo, para estudiar los efectos de la unión de moléculas pequeñas (sustrato o efectores) sobre las asociaciones proteicas.

Análisis cinéticos

Si las enzimas que catalizan las reacciones secuenciales interaccionan, las interacciones pueden facilitar el flujo de metabolitos a través de las rutas con múltiples pasos (canalización metabólica), lo cual puede detectarse in vitro de varias formas. Generalmente, una ruta canalizada exhibirá alguna de las siguientes características: (1) un *tiempo de tránsito*, esto es el intervalo tras el comienzo de la ruta necesario para que la formación del producto final alcance la velocidad máxima, reducido; (2) concentraciones de los intermediarios en el estado estacionario mucho menores que las esperadas si hubieran de buscar a la siguiente enzima que actúa sobre ellos por difusión en lugar de por transferencia directa o facilitada a una molécula de la enzima cercana; y (3) una capacidad restringida de un intermediario exógeno para equilibrarse con el mismo intermediario en una ruta canalizada, tal y como se determina normalmente mediante experimentos radioisotópicos.

Polarización de fluorescencia

Como se señala en Herramientas de la Bioquímica 6A, la rotación de una macromolécula tiende a despolarizar la luz fluorescente emitida cuando la fluorescencia de esa macromolé-

cula se excita por la luz polarizada plana, y la velocidad de despolarización depende de la velocidad de rotación. Dado que un complejo proteína-proteína es más grande, y con frecuencia más asimétrico, que las moléculas de proteína individuales, la formación de complejos enlentece la rotación, lo cual puede medirse por la velocidad a la que se despolariza la luz fluorescente. En la práctica, esto implica la medida durante cortos períodos de tiempo de la intensidad de la luz fluorescente en planos paralelos y perpendiculares al plano de la luz incidente.

Métodos que emplean bibliotecas

Se trata de métodos que permiten el escrutinio de un gran número, o biblioteca, de genes clonados (véase el Capítulo 25). Estos métodos permiten la posible identificación de parejas que interactúen sin el requerimiento previo de la purificación y la identificación de un componente de la pareja. Un método popular denominado sistema de dos híbridos utiliza un sistema de activación de la transcripción en levaduras que requiere la interacción de dos proteínas para que se inicie la transcripción en un lugar génico adecuado (véase el Capítulo 28). Una de estas proteínas se une en el lugar del DNA y la otra activa la transcripción. Se generan mediante técnicas de DNA recombinante dos proteínas híbridas o de fusión (véase el Capítulo 25); el gen de una de las proteínas que se analiza (X) se fusiona con el gen de la proteína de unión al DNA, y el gen de otra de las proteínas que se analiza (Y) o una biblioteca de genes clonados se fusiona con el gen del dominio de activación de la transcripción. Los genes recombinantes se transfieren a células de levaduras, donde la interacción de las proteínas X e Y puede formar un activador de la transcripción completamente funcional (suponiendo que los dominios funcionales de las proteínas de fusión se pliegan como lo hacen en su estado nativo). La transcripción del gen diana se valora mediante el análisis de la actividad de un gen indicador, un gen clonado más abajo del promotor y cuya actividad biológica pueda medirse fácilmente. Una vez detectada una asociación proteica específica, se hace esencial aislar la pareja que interactúa en forma de proteínas completas y asegurar que las interacciones detectadas por este método algo cualitativo son realmente significativas desde el punto de vista biológico.

Análisis con biosensores

En los últimos años, se ha desarrollado una clase nueva de instrumentos que permiten el análisis cualitativo y cuantitativo de las interacciones proteína-proteína, utilizando cantidades muy pequeñas de proteínas purificadas. Uno de estos instrumentos, el BIACORE, mide una propiedad óptica denominada *resonancia de plasmón superficial*, que está relacionada con cambios mínimos del índice de refracción que se producen cuando una proteína en disolución interacciona con una proteína inmovilizada sobre un chip. La señal medida es proporcional a la concentración total de la proteína en un amplio margen. De esta forma, puede valorarse la cinética de la asociación de una proteína siguiendo el aumento de la señal al pasar una proteína en disolución sobre un chip que contiene la proteína inmovilizada. La cantidad de proteína unida en equilibrio proporciona la constante de afinidad de la interacción y la cinética de disociación puede seguirse luego haciendo pasar un amortiguador sobre el chip y midiendo el descenso de la señal, tal y como se indica en la Figura 13A.1. Entre las limitaciones de esta técnica muy útil, que pueden controlarse, se encuentran la posibilidad de que la inmovilización altere la proteína de forma que afecte a la interacción, y el hecho de que las dos proteínas interactuantes estén en fases diferentes (sólida o inmovilizada y líquida).

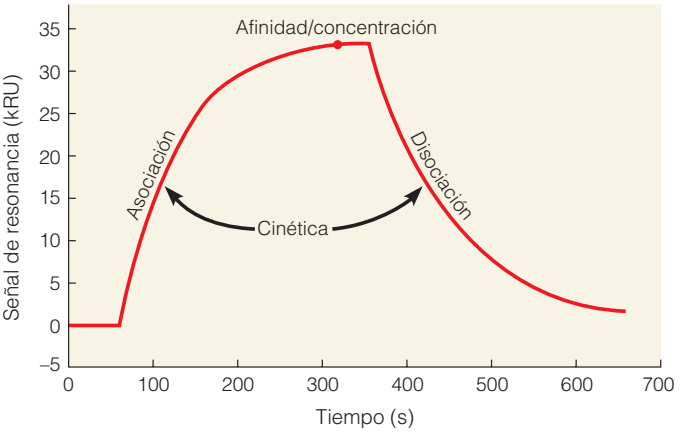


FIGURA **13A.1**

Análisis BIACORE de una asociación proteína-proteína. La proteína que se estudia fluye sobre la proteína inmovilizada en la fase de asociación y es reemplazada por el amortiguador en la fase de disociación. La altura de la meseta de respuesta, comparada con la del estándar, está relacionada con la estequiometría de la asociación.

Cortesía de Biacore.

Bibliografía

Phizicky, E. M. y S. Fields (1995) Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* 59:94-123. Una revisión completa por el inventor de la técnica muy utilizada de los dos híbridos.

Szabo, A., L. Stolz y R. Granzow (1995) Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705.

CAPÍTULO 14

Procesos oxidativos: ciclo del ácido cítrico y ruta de las pentosas fosfato

En el Capítulo 13 hemos analizado la fase anaerobia inicial de la degradación de los hidratos de carbono. Seguiremos ahora con las reacciones aerobias posteriores mediante las que se oxidan finalmente los hidratos de carbono a dióxido de carbono y agua (Figura 14.1). Sin embargo, este capítulo no está dedicado fundamentalmente al metabolismo de los hidratos de carbono. Ello se debe a que la ruta en cuestión, el ciclo del ácido cítrico, es la ruta oxidativa central de la respiración, el proceso mediante el cual se catabolizan *todos* los combustibles metabólicos (hidratos de carbono, lípidos y proteínas), en los organismos y tejidos aerobios.

El ciclo del ácido cítrico es una ruta de oxidación de todos los combustibles metabólicos.

Aunque la respiración y la glucólisis conservan ambas alrededor del 40% de la energía liberada en forma de ATP, en la glucólisis se genera una energía total mucho menor, por mol de sustrato catabolizado, que en la respiración. El lactato, como otros productos terminales del catabolismo anaerobio de los hidratos de carbono, tiene el mismo grado de oxidación que la sustancia de partida, la glucosa. En consecuencia, es relativamente poca la energía potencial almacenada en la molécula de glucosa que se libera mediante su conversión en lactato.

Se genera mucha más energía en las reacciones posteriores, en las que el lactato o el piruvato se oxidan por completo hasta CO_2. Esa liberación de energía implica reacciones de deshidrogenación que generan transportadores electrónicos reducidos, principalmente NADH. Estos transportadores se reoxidan posteriormente en la cadena respiratoria mitocondrial (de transporte de electrones). Tales reacciones aportan la energía que impulsa la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa. Los electrones liberados se transfieren finalmente al oxígeno, que se reduce a agua. Este capítulo está dedicado a los destinos que tienen en el organismo los sustratos oxidables, y el capítulo siguiente se centra en la cadena de transportadores electrónicos y la síntesis de ATP. En pocas palabras, si examinamos los productos terminales de la respiración (CO_2, H_2O y ATP), en este capítulo hacemos hincapié en la generación de CO_2, y en el Capítulo 15 en la generación de H_2O y ATP.

La mayor parte del rendimiento energético de la oxidación del sustrato en el ciclo del ácido cítrico procede de la posterior reoxidación de los transportadores electrónicos reducidos.

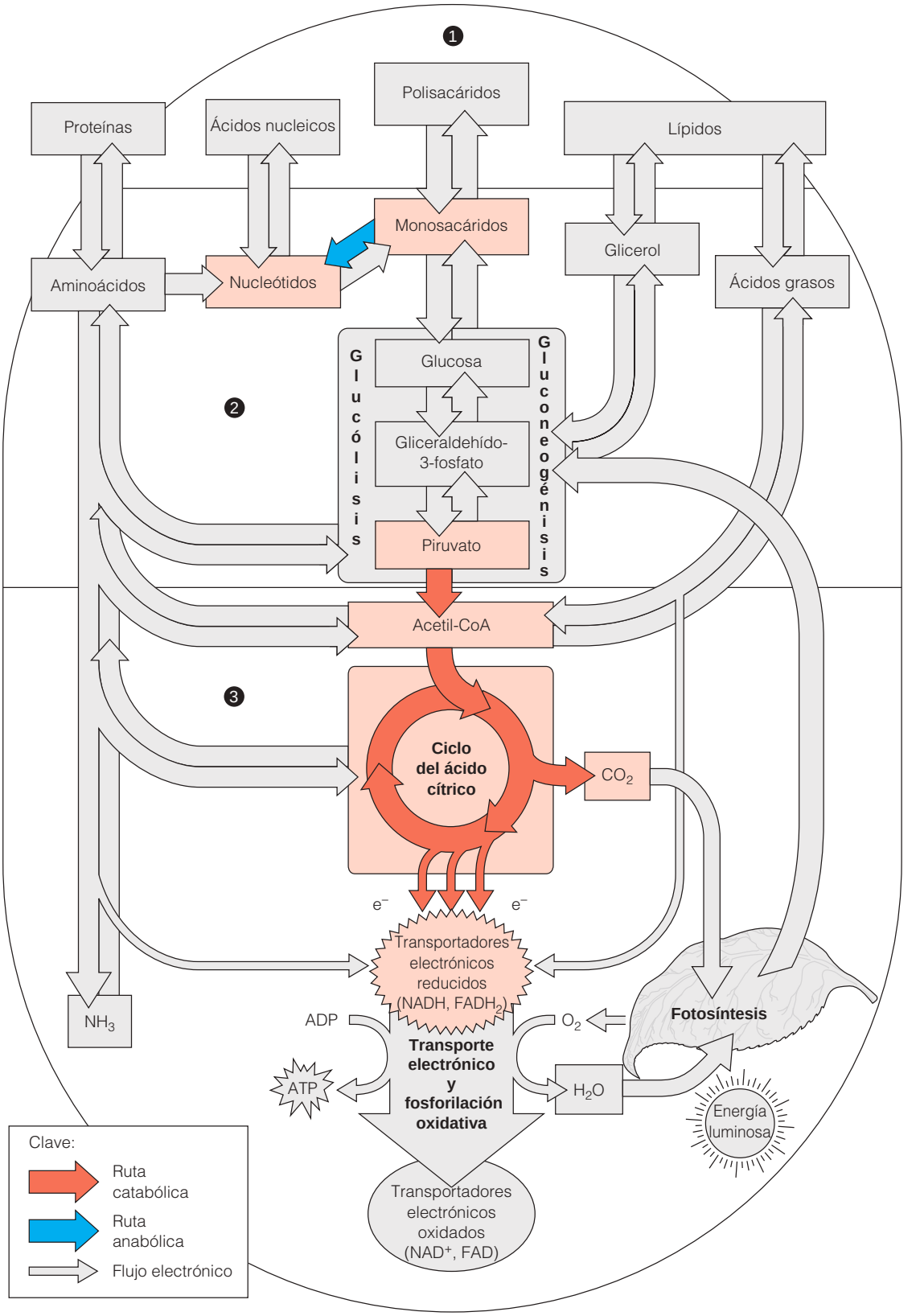


FIGURA **14.1**

Procesos oxidativos en la generación de la energía metabólica. Esta visión general del metabolismo intermediario resalta el ciclo del ácido cítrico y las rutas que aportan combustibles al ciclo para la oxidación. La ruta de las pentosas fosfato, una ruta alternativa para la oxidación de los hidratos de carbono que se considera en este capítulo, es necesaria para la síntesis de nucleótidos.

Visión general de la oxidación del piruvato y del ciclo del ácido cítrico

LAS TRES ETAPAS DE LA RESPIRACIÓN

Es adecuado considerar la oxidación metabólica de los sustratos orgánicos como un proceso de tres etapas, tal como se indica en el esquema de la Figura 14.2. La etapa 1 consiste en la generación de un fragmento activado de dos carbonos, el grupo acetilo de la **acetil-coenzima A** o **acetil-CoA**. (Recuérdese del Capítulo 12 que la coenzima A activa y transfiere grupos acilo; puede consultarse más información sobre este tema en las páginas 553-554.) La etapa 2 es la

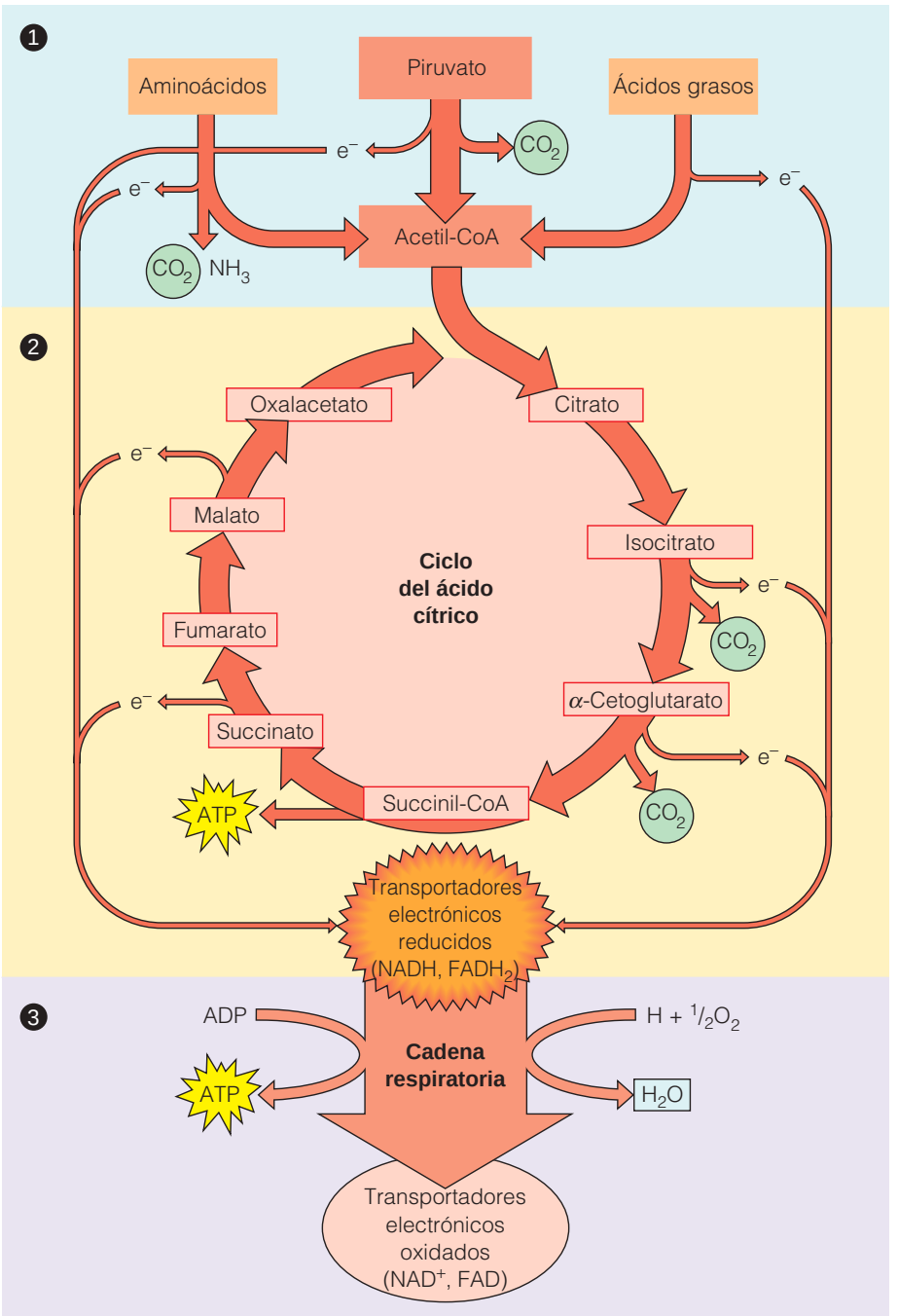


FIGURA **14.2**

Las tres etapas de la respiración. En la etapa 1, el carbono de los combustibles metabólicos se incorpora a la acetil-CoA. En la etapa 2, el ciclo del ácido cítrico, la oxidación del carbono produce CO_2, transportadores electrónicos reducidos y una pequeña cantidad de ATP. En la etapa 3, los transportadores electrónicos reducidos se reoxidan, aportando energía para la síntesis de más ATP.

oxidación de esos dos átomos de carbono en el ciclo del ácido cítrico. La etapa 3 es el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa, en donde los transportadores electrónicos reducidos que se generan en el ciclo del ácido cítrico vuelven a oxidarse, junto con la síntesis concomitante de ATP. La etapa 1 está formada por una familia de rutas, que actúan por separado sobre los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas. El carbono procedente de los hidratos de carbono entra en la etapa 1 en forma de piruvato, cuya oxidación a acetil-CoA se describe en este capítulo. La degradación de las grasas genera acetil-CoA, principalmente mediante la β-oxidación de los ácidos grasos (véase el Capítulo 18), mientras que varias rutas distintas generan acetil-CoA e intermediarios del ciclo del ácido cítrico a partir del catabolismo de los aminoácidos (véase el Capítulo 21).

Las reacciones de las dos primeras etapas de la respiración tienen lugar en la matriz interior de la mitocondria, semejante a un gel, y el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa están catalizadas por las enzimas ligadas a la membrana en las **crestas**, proyecciones de la membrana mitocondrial interna que se extienden, muy apiladas y plegadas, en el interior de la matriz. Estas relaciones estructurales y bioquímicas se considerarán con mayor detalle al analizar la tercera etapa de la respiración en el Capítulo 15.

ESTRATEGIA DEL CICLO DEL ÁCIDO CÍTRICO

Dado el papel central que desempeña el ciclo del ácido cítrico en el metabolismo energético, haremos una presentación preliminar de esta ruta de la etapa 2 antes de describir el proceso de la etapa 1, a través del cual entra en el ciclo el carbono procedente del piruvato. Dado que la función del ciclo del ácido cítrico es oxidar los metabolitos orgánicos, revisaremos brevemente primero la oxidación y reducción de los compuestos orgánicos, y describiremos la base de la denominación de las enzimas que participan. Los aspectos cuantitativos de las oxidaciones biológicas se presentarán en el Capítulo 15.

Como ya sabemos, la oxidación comporta la pérdida de electrones de un sustrato; este sustrato es el donador de los electrones, que se transfieren a un aceptor electrónico, que queda así reducido. Los átomos de carbono se oxidan, ya sea a través de la pérdida de hidrógeno, ya sea mediante la combinación con el oxígeno. Este último proceso elimina electrones de la capa alrededor de un núcleo de carbono, ya que la electronegatividad del oxígeno atrae los electrones compartidos hacia su propio núcleo. De forma análoga, cuando un compuesto orgánico pierde hidrógeno, pierde el electrón asociado con ese hidrógeno. Así pues, ambos procesos comportan una pérdida de electrones del átomo de carbono que sufre la oxidación. Los dos procesos son formalmente equivalentes.

Las deshidrogenasas catalizan oxidaciones del sustrato. Las oxidasas catalizan el subgrupo de oxidaciones en las que el aceptor electrónico es el O_2.

Existe una posibilidad de confusión al denominar las enzimas que catalizan las reacciones de oxidación. No pueden existir electrones libres, de forma que los electrones que se liberan en una oxidación han de tranferirse a un aceptor electrónico. Dado que la mayor parte de las oxidaciones metabólicas comportan la pérdida de hidrógeno por parte del donador de electrones, a las enzimas que catalizan esas reacciones las denominamos **deshidrogenasas**. El término *oxidasa* se reserva para las enzimas en las que el aceptor de electrones es el propio oxígeno molecular. Si el oxígeno se combina directamente con el sustrato que se oxida, la enzima se denomina **oxigenasa**. Las oxidasas y las oxigenasas catalizan tan sólo la pequeña parte de las reacciones de oxidación en las que el O_2 participa de manera directa. En el Capítulo 15 se presentará un análisis de esta cuestión y se dan ejemplos.

Por lo que respecta a la Figura 14.3, examinemos brevemente el ciclo del ácido cítrico, centrándonos en los destinos metabólicos de los dos carbonos que

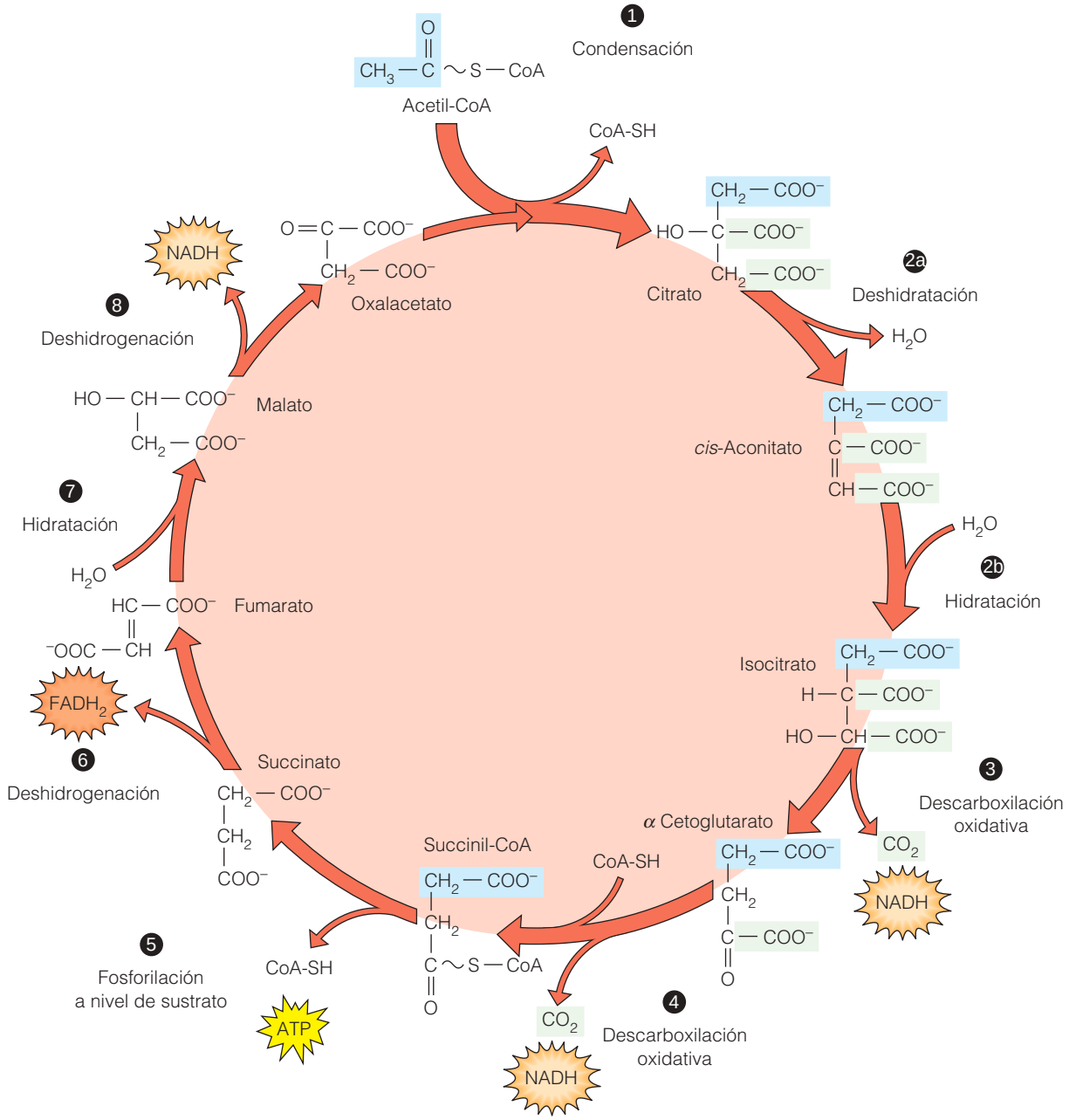


FIGURA **14.3**

Destino de los átomos de carbono en el ciclo del ácido cítrico. La acetil-CoA que se incorpora al ciclo del ácido cítrico está resaltada (en azul) para indicar el destino de sus dos carbonos a través de la reacción 4. Tras la reacción 5, los átomos de carbono que han entrado más recientemente ya no se resaltan, ya que el succinato es una molécula simétrica. Los grupos carboxilo que abandonan el ciclo como CO_2 en las reacciones 3 y 4 se muestran en verde. Obsérvese que estos grupos que salen contienen carbonos incorporados como acetil-CoA en las primeras vueltas del ciclo.

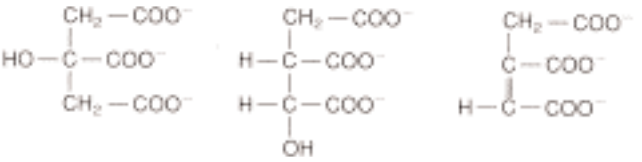
entran en el ciclo. Estos carbonos, el grupo acetilo de la acetil-coenzima A, se transfieren a un ácido orgánico de cuatro carbonos, el **oxalacetato**, para dar un ácido tricarboxílico de seis carbonos, el citrato. El citrato entra en una serie de siete reacciones durante las cuales se liberan dos carbonos en forma de CO_2 y los cuatro carbonos restantes se regeneran en forma de oxalacetato, que puede iniciar de nuevo el proceso. De ahí la naturaleza cíclica de la ruta: el oxalacetato está presente al inicio, para reaccionar con un fragmento activado de dos carbonos, y está presente al final, después de que se hayan oxidado los dos carbonos hasta CO_2. Obsérvese también que, de las ocho reacciones que se muestran en la Figura 14.3, cuatro son deshidrogenaciones, que generan conjuntamente cofactores reducidos: NADH y una coenzima de flavina reducida.

De la misma forma que consideramos dos fases en la glucólisis, también conviene considerar dos fases diferenciadas en el ciclo del ácido cítrico. La primera

fase (reacciones 1 a 4) se emplea fundamentalmente para oxidar los dos carbonos a CO_2, mientras que la segunda fase (reacciones 5 a 8) sirve fundamentalmente para regenerar el oxalacetato.

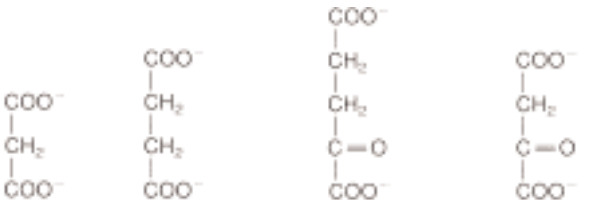
DESCUBRIMIENTO DEL CICLO DEL ÁCIDO CÍTRICO

La idea de que los combustibles orgánicos se oxidan a través de una ruta cíclica fue propuesta en 1937 por Hans Krebs, basándose en los estudios que le valieron posteriormente el Premio Nobel, compartido con Fritz Lipmann (el descubridor de la coenzima A). Krebs estaba estudiando el consumo de oxígeno en el músculo pectoral de paloma troceado, un tejido que presenta una tasa muy elevada de respiración, y realizó varias observaciones fundamentales. En primer lugar, los aniones de tres ácidos tricarboxílicos, que son el citrato, el isocitrato y el *cis*-aconitato, estimulaban tanto el consumo de oxígeno como la oxidación del piruvato de manera desproporcionada respecto a las cantidades añadidas, lo que sugería que estaban actuando, de alguna manera, de forma catalítica más que como sustratos de una ruta lineal.



Citrato **Isocitrato** ***cis*-Aconitato**

En segundo lugar, el malonato, un análogo del succinato, y un inhibidor conocido de la succinato deshidrogenasa, bloqueaba la oxidación del piruvato, lo que indicaba que la succinato deshidrogenasa desempeñaba una función en la oxidación del piruvato. En tercer lugar, las células inhibidas por el malonato acumulaban citrato, α-cetoglutarato y succinato, lo que sugería que el citrato y el α-cetoglutarato eran ambos precursores normales del succinato. Por último, la adición de piruvato y oxalacetato a esta preparación de músculo troceado daba lugar a la acumulación de citrato en el medio, lo cual sugería que estos dos ácidos son precursores del citrato.



Malonato **Succinato** **α-Cetoglutarato** **Oxalacetato**

A partir de estas observaciones y del conocimiento de las estructuras y reactividades de los ácidos orgánicos que podían estimular la respiración, Krebs propuso la secuencia de reacciones implicadas y la naturaleza cíclica de la ruta. Su propuesta fue que una secuencia cíclica podía producirse a partir de una reacción entre piruvato y oxalacetato para dar citrato y CO_2. Actualmente sabemos que el piruvato debe oxidarse primero y que la acetil-CoA es la molécula que reacciona posteriormente con el oxalacetato. Conocemos también un intermediario activado del succinato, la **succinil-CoA**. Excepto por estos cambios, la ruta propuesta por Krebs era correcta. Las reacciones se indican en la Figura 14.3.

El ciclo del ácido cítrico recibe también otros nombres: ciclo de Krebs en honor de su descubridor, y ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), puesto que se

identificó a partir de los ácidos tricarboxílicos que actúan como intermediarios. Sólo más tarde se comprobó que el citrato era uno de esos intermediarios.

Oxidación del piruvato: ruta de entrada principal del carbono en el ciclo del ácido cítrico

Como se ha indicado antes, el piruvato procedente de la oxidación de los hidratos de carbono es tan sólo uno de los principales suministradores de acetil-CoA para la oxidación en el ciclo del ácido cítrico. Los Capítulos 18 y 20 tratarán la oxidación de los ácidos grasos y los aminoácidos, respectivamente, para dar este metabolito central. La conversión de piruvato en acetil-CoA, catalizada por la **piruvato deshidrogenasa**, es una descarboxilación oxidativa. En la reacción global, el grupo carboxilo del piruvato se pierde como CO_2, mientras que los dos carbonos restantes forman la porción acetilo de la acetil-CoA.

$$CH_3{-}C(=O){-}COO^- + NAD^+ + \text{coenzima A} \longrightarrow CH_3{-}C(=O){-}\text{coenzima A} + NADH + CO_2$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -33.5 \text{ kJ/mol}$$

Aunque la reacción global puede parecer sencilla, es bastante complicada, puesto que comporta la generación de un transportador electrónico reducido (NADH), la descarboxilación del piruvato y la activación metabólica de los dos carbonos restantes del piruvato. La reacción es muy exergónica e, in vivo, es básicamente irreversible. Intervienen en ella tres enzimas, junto con cinco coenzimas, que incluyen las dos coenzimas, NAD^+ y coenzima A, que aparecen en la reacción global. Las tres enzimas que participan se ensamblan en un complejo multienzimático muy organizado, denominado **complejo piruvato deshidrogenasa**. En la Figura 14.4 se presenta un esquema de las reacciones catalizadas por las tres enzimas individuales, **piruvato deshidrogenasa** (E_1), **dihidrolipoamida transacetilasa** (E_2) y **dihidrolipoamida deshidrogenasa** (E_3).

En la Figura 14.5 se presenta una fotografía de microscopia electrónica del complejo purificado a partir de *E. coli*, y un modelo del complejo de *Azotobacter* basado en los análisis cristalográficos de rayos X de uno de sus componentes. El complejo contiene 24 cadenas polipeptídicas de E_1, 24 cadenas de E_2 y 12 cadenas de E_3. A E_1 está unida la coenzima **pirofosfato tiamina** (**TPP**), E_2 contiene *ácido lipoico* fuertemente unido, y E_3 contiene el *dinucleótido de flavina y adenina (FAD)*.

El complejo piruvato deshidrogenasa aislado a partir de *E. coli* tiene una masa de unos 4.6 millones de dalton, ligeramente mayor que un ribosoma. En las mitocondrias de los mamíferos, el complejo tiene un tamaño aproximadamente del doble. En los eucariotas, el complejo contiene pequeñas cantidades de dos enzimas reguladoras, una quinasa que fosforila tres residuos de serina de E_1 y una fosfatasa que elimina esos fosfatos. La regulación de las actividades del complejo se analizará más adelante en este mismo capítulo.

Para comprender de qué forma interactúan las tres enzimas del complejo piruvato deshidrogenasa, debemos conocer las funciones de las cinco coenzimas.

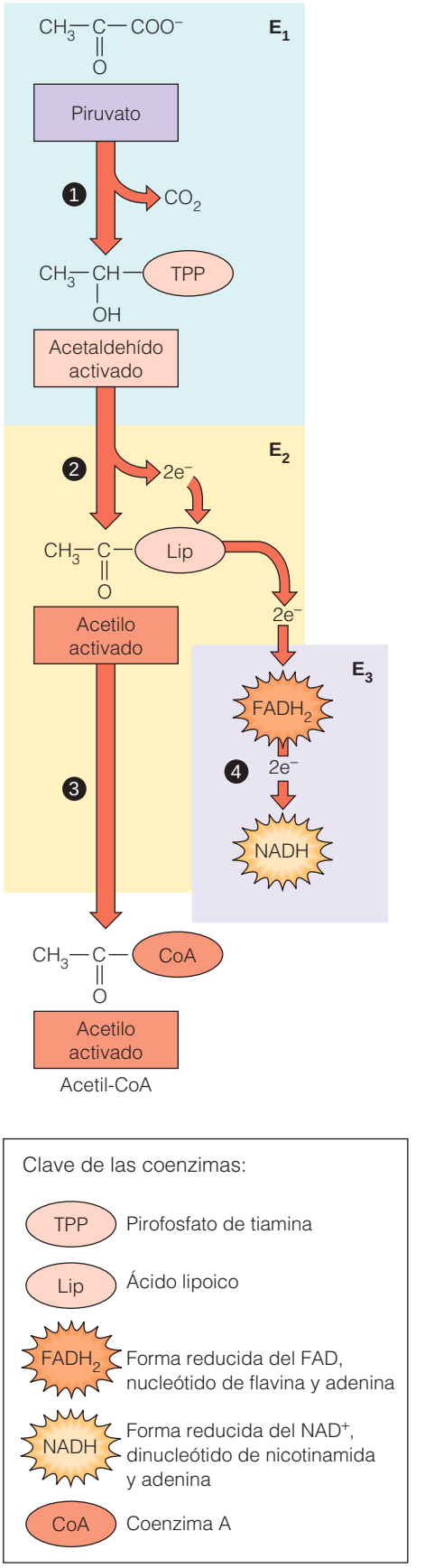
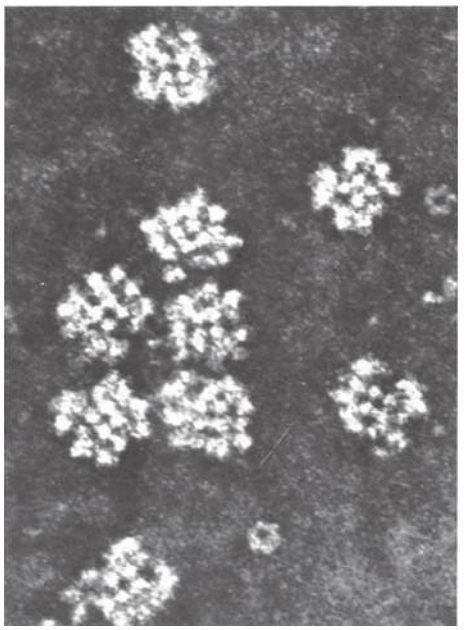
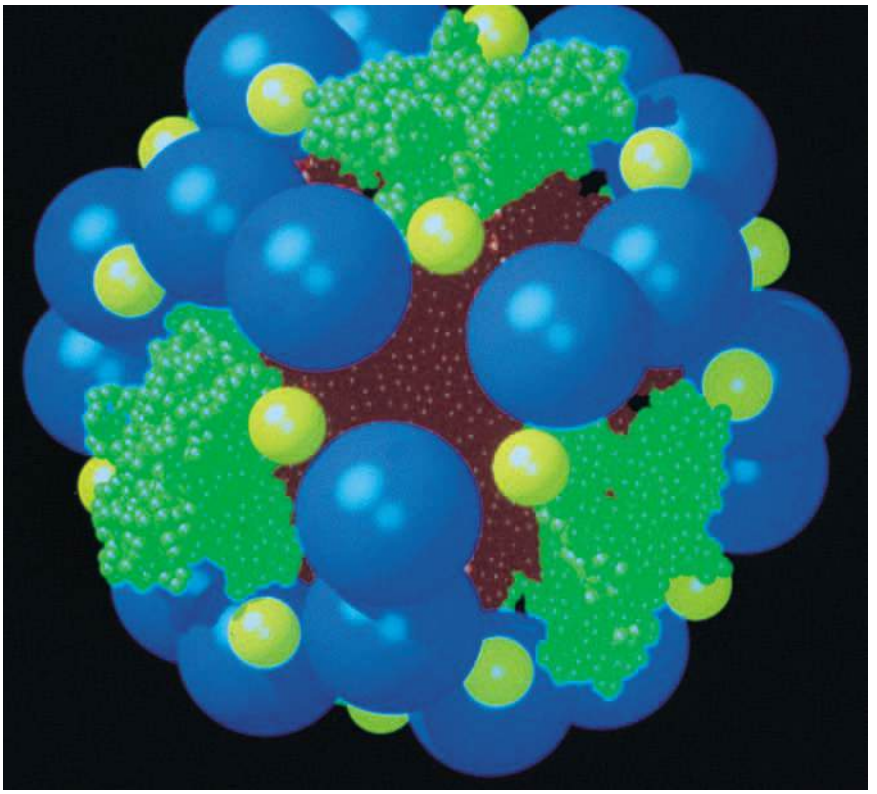


FIGURA **14.4**

Visión general de las reacciones del complejo piruvato deshidrogenasa. Este diagrama simplificado muestra la oxidación del piruvato a acetil-CoA por el complejo piruvato deshidrogenasa. En la oxidación intervienen tres enzimas y cinco coenzimas. Tres de estas coenzimas (TPP, FAD y ácido lipoico) están unidas a las enzimas del complejo.



(a)



(b)

FIGURA **14.5**

Estructura del complejo piruvato deshidrogenasa. **(a)** Fotografía de microscopia electrónica del complejo piruvato deshidrogenasa purificado de *E. coli*. **(b)** Modelo del complejo basado en la estructura cristalina de E_2 de *Azotobacter vinelandii*. El complejo se observa a lo largo de un eje ternario. E_2 y E_3 se muestran en púrpura y verde, respectivamente. E_1 se muestra en azul, y cada lugar de unión del brazo oscilante de la lipoamida (véase la página 554) se muestra en amarillo.

(a) R. M. Oliver y L. J. Reed, en *Electron Microscopy of Proteins*, Vol. 2, editado por J. R. Harris (Orlando, Fla.: Academic Press, 1982); **(b)** cortesía de Mattevi et al., *Science* (1992) 255:1544-1550. Fotografía cortesía de Wim Hol.

La oxidación del piruvato a acetil-CoA es una reacción prácticamente irreversible en la que intervienen tres enzimas y cinco coenzimas.

Aunque hemos descrito las cinco coenzimas en el Capítulo 11, tan sólo hemos comentado de manera detallada los nucleótidos de nicotinamida. Detendremos, pues, momentáneamente la presentación para describir las reacciones de las otras cuatro coenzimas.

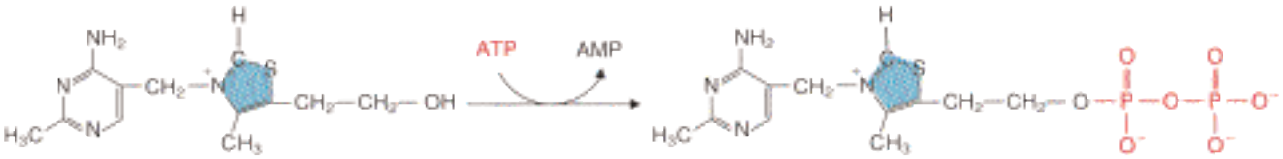
Coenzimas que intervienen en la oxidación del piruvato y en el ciclo del ácido cítrico

La historia de estas coenzimas es, en gran parte, la historia de las vitaminas de las que proceden. Se inició con las observaciones realizadas en Asia, hace un siglo, respecto a la enfermedad paralítica *beriberi*. El arroz refinado (al que se ha eliminado la cáscara) constituía un alimento básico en esta región. Se observó que las cáscaras o salvado del arroz contenían una sustancia que aliviaba la parálisis. Casimir Funk, un bioquímico polaco, pensó que el beriberi y otras tres enfermedades nutricionales, la *pelagra*, el *raquitismo* y el *escorbuto*, se debían a la carencia en la alimentación de una sustancia a la que denominó vitamina (literalmente, amina de la vida). Esto condujo a la adopción del término genérico **vitamina**.

La idea de que las vitaminas podían evitar la enfermedad no fue aceptada de manera general, debido al predominio de la idea de Pasteur de que las enfermedades las producían únicamente las infecciones. Sin embargo, en la actualidad sabemos de la existencia de alrededor de una docena de vitaminas. El primer ejemplo conocido es la tiamina, el componente del salvado del arroz cuyo déficit ocasiona el beriberi. Posteriormente, se identificaron las carencias vitamínicas asociadas con la pelagra, el raquitismo y el escorbuto, que se deben a las vitaminas B_6, D y C, respectivamente.

PIROFOSFATO DE TIAMINA

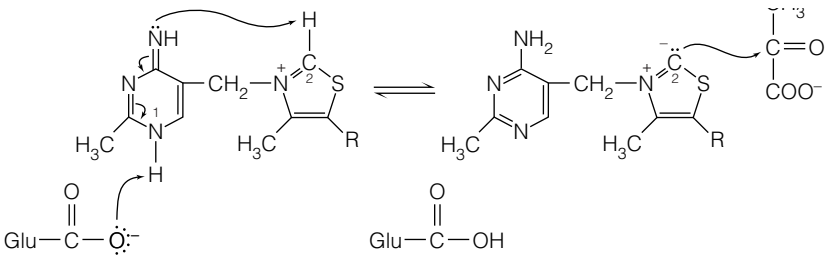
Dado que la tiamina fue la primera de las vitaminas B que se identificó, se la denomina también vitamina B_1. La vitamina es estructuralmente compleja, pero su conversión en la forma de coenzima, el pirofosfato de tiamina, o TPP, comporta simplemente una pirofosforilación dependiente de ATP.



Tiamina **Pirofosfato de tiamina**

El pirofosfato de tiamina es la coenzima de todas las descarboxilaciones de los α-cetoácidos. El mecanismo que se muestra en la Figura 14.6 para la descarboxilación del piruvato interviene en todas estas reacciones. Obsérvese que el TPP contiene dos anillos heterocíclicos: una pirimidina sustituida y un tiazol. Los estudios recientes de RMN han demostrado que ambos anillos participan en la formación de un carbanión reactivo en el C-2 del anillo de tiazol, el átomo de carbono entre el nitrógeno y el azufre. Como se presenta en el diagrama siguiente, un grupo carboxilo de glutamato de la enzima atrae a un protón ligado al N-1 de la pirimidina, el cual a su vez aumenta la basicidad del grupo amino y facilita la desprotonación del C-2 del anillo de tiazol.

El anillo de tiazol del TPP es la parte funcional de la coenzima, que la permiten unir y transferir aldehídos activados.



Este carbono forma un carbanión (paso 1 de la Figura 14.6), que a su vez puede atacar al carbono carbonílico de los α-cetoácidos, como el piruvato, dando un compuesto de adición (paso 2). El compuesto de adición experimenta una descarboxilación no oxidativa (paso 3), en la que el anillo de tiazol actúa como sumidero de electrones al formar una eneamina estabilizada por resonancia. La protonación (paso 4) da lugar a una especie molecular denominada **acetaldehído activo** o, más exactamente, **hidroxietil-TPP**. En la fermentación de la glucosa a etanol en las levaduras (paso 5), este intermediario experimenta una reacción de eliminación para dar acetaldehído y el carbanión TPP. En la reacción de la piruvato deshidrogenasa (que no se muestra aquí), el fragmento activado de dos carbonos se oxida simultáneamente y se transfiere a otra enzima, como se comentará con más detalle en breve. Así pues, en términos generales, el TPP interviene en la generación de una especie aldehído activada, que puede experimentar o no una oxidación cuando se transfiere a un aceptor.

ÁCIDO LIPOICO (LIPOAMIDA)

En la oxidación del piruvato, el siguiente aceptor del aldehído generado por el TPP es el **ácido lipoico**, que es el disulfuro interno del ácido 6,8-ditiooctanoico. La coenzima se une a su apoenzima a través de un enlace amida que liga el

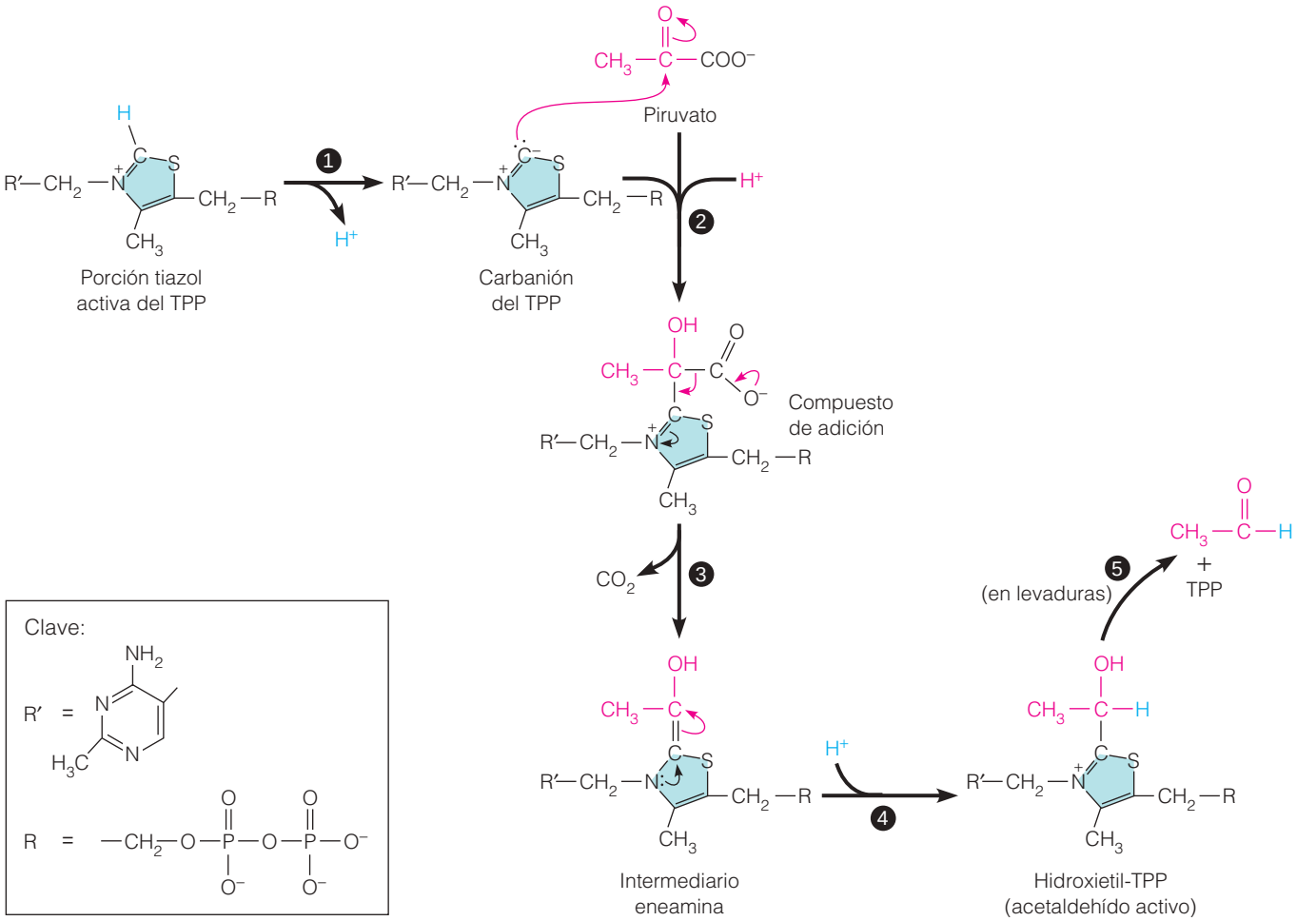
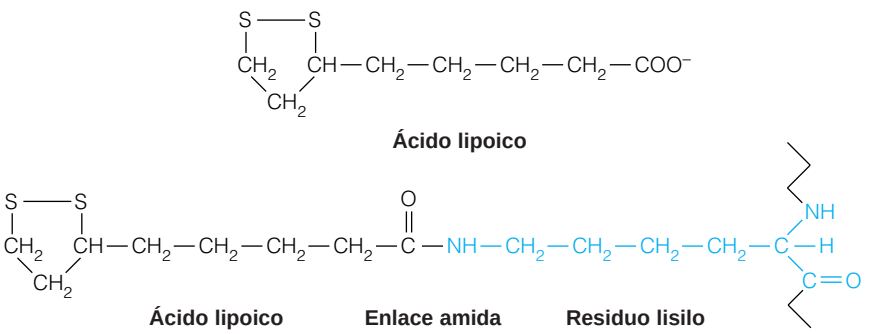


FIGURA **14.6**

El pirofosfato de tiamina en la reacción de la piruvato deshidrogenasa. El pirofosfato de tiamina (TPP) es la coenzima de la reacción de la piruvato deshidrogenasa y otras descarboxilaciones no oxidativas de α-cetoácidos. La reacción clave (paso 2) es el ataque por el carbanión del TPP sobre el carbono carbonilo del piruvato, y va seguida de la descarboxilación no oxidativa del piruvato unido a la coenzima (paso 3); el par de electrones permanece en el nitrógeno del anillo. En el paso 4, el fragmento de dos carbonos (rojo) unido al TPP extrae un protón de la piruvato descarboxilasa (no mostrado), generando un grupo hidroxietilo. Este fragmento permanece en el nivel de oxidación aldehído. En la fermentación de la glucosa a etanol, el hidroxietil-TPP se convierte en acetaldehído y TPP por acción de la piruvato descarboxilasa de la levadura (paso 5).

grupo carboxilo del ácido lipoico a un grupo ε-amino de lisina. Así pues, la especie reactiva es una amida, denominada **lipoamida**.



La transferencia de la porción aldehído activa desde el TPP al azufre del carbono 6 de la lipoamida comporta la oxidación simultánea del aldehído, acoplada a la reducción del disulfuro. Ello genera un grupo acilo que, en la piruvato

deshidrogenasa, se transfiere posteriormente a la coenzima A. Así pues, la lipoamida es a la vez un transportador electrónico y un transportador de grupos acilo.

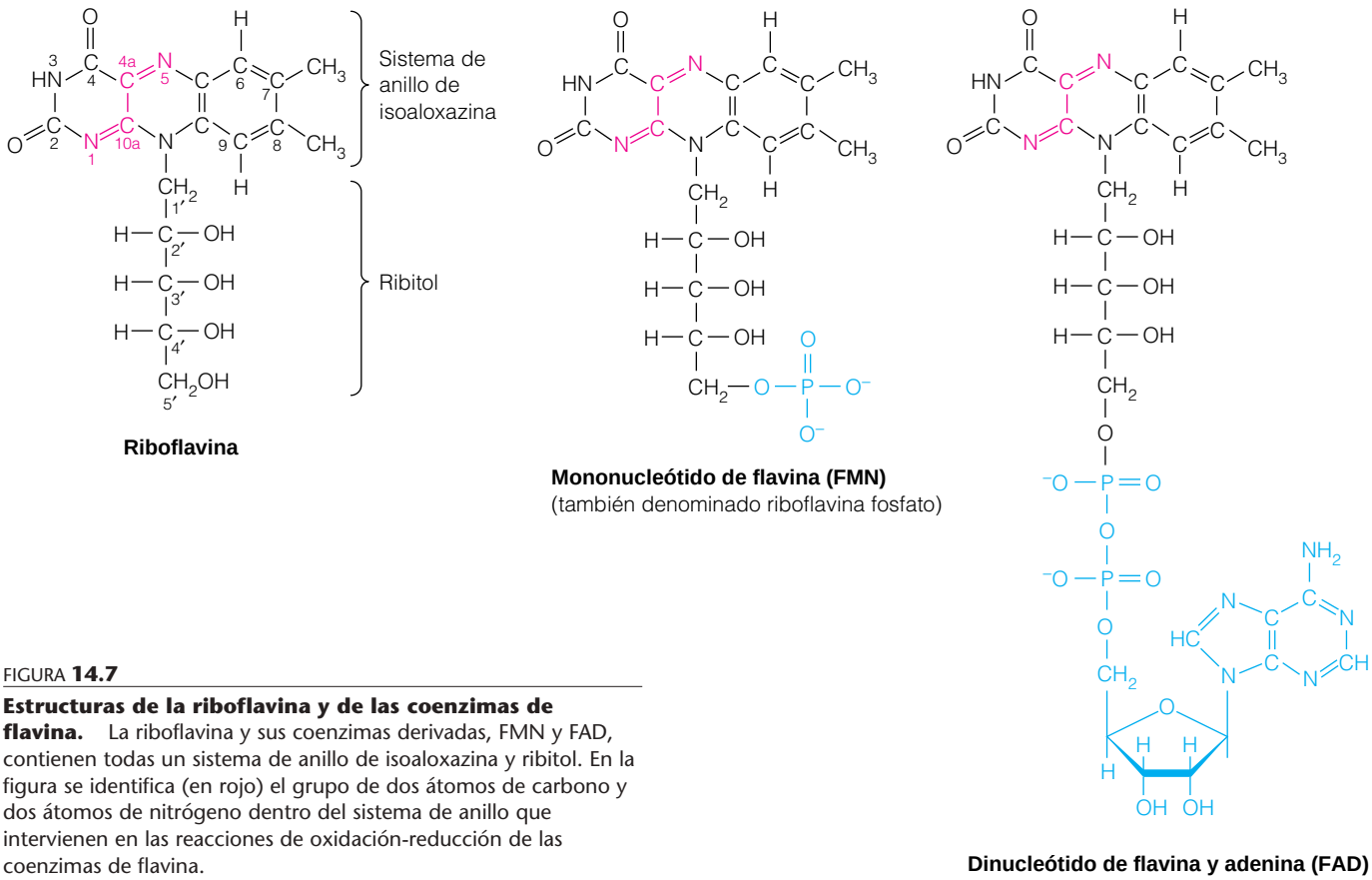
La lipoamida es un transportador de electrones y de grupos acilo.

COENZIMAS DE FLAVINA

El **dinucleótido de flavina y adenina**, o **FAD**, es una de las dos coenzimas derivadas de la vitamina B_2 o **riboflavina**. La otra es la más sencilla **mononucleótido de flavina** (**FMN**), o riboflavina fosfato (Figura 14.7). La parte funcional de ambas coenzimas es el sistema del **anillo de isoaloxazina**, que actúa como aceptor de dos electrones. Los compuestos que contienen un anillo de este tipo se denominan **flavinas**. En la riboflavina y sus derivados, el sistema de anillo está unido al **ribitol**, una versión de cadena abierta de la ribosa, con el carbono aldehído reducido a nivel de alcohol. El carbono 5′ del ribitol está ligado al fosfato en el FMN, y el FAD es un derivado adenililado del FMN. Así pues, estos compuestos son análogos en cierta medida al mononucleótido de nicotinamida y al NAD^+, respectivamente.

Las enzimas que utilizan una coenzima de flavina se denominan **flavoproteínas**. El FMN y el FAD experimentan reacciones de transferencia de electrones prácticamente idénticas. Las enzimas flavoproteicas se unen preferentemente al FMN o al FAD. En unos pocos casos, esa unión es covalente. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, la flavina está unida de forma ajustada aunque no covalente, de modo que la coenzima puede disociarse reversiblemente de la holoenzima.

Como las coenzimas de nicotinamida, las flavinas experimentan reacciones de oxidación y reducción de dos electrones. Sin embargo, las flavinas se di-



Riboflavina

Mononucleótido de flavina (FMN)
(también denominado riboflavina fosfato)

Dinucleótido de flavina y adenina (FAD)

FIGURA **14.7**

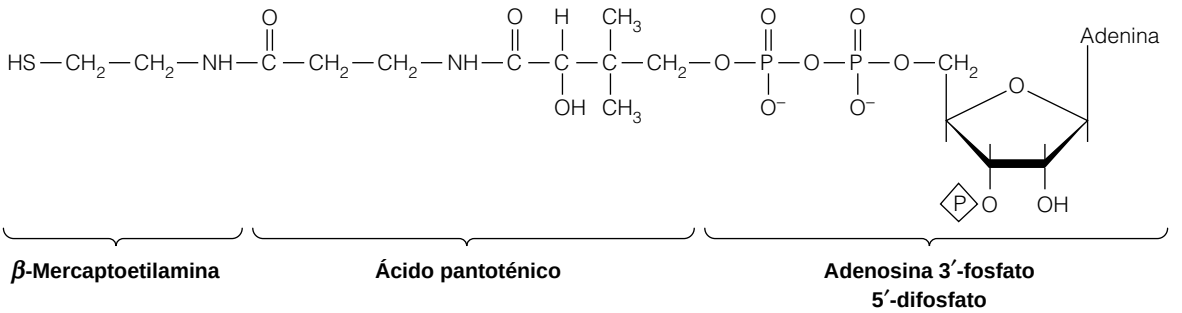
Estructuras de la riboflavina y de las coenzimas de flavina. La riboflavina y sus coenzimas derivadas, FMN y FAD, contienen todas un sistema de anillo de isoaloxazina y ribitol. En la figura se identifica (en rojo) el grupo de dos átomos de carbono y dos átomos de nitrógeno dentro del sistema de anillo que intervienen en las reacciones de oxidación-reducción de las coenzimas de flavina.

Las coenzimas de flavina participan en reacciones de oxidorreducción de dos electrones, que pueden producirse en 2 pasos de un electrón.

ferencian por tener una especie estable reducida de un electrón, un radical libre de **semiquinona**, como se muestra en la Figura 14.8. Este radical libre puede detectarse espectrofotométricamente; mientras que el FAD y el FMN oxidados son de color amarillo brillante, y las flavinas completamente reducidas son incoloras, el intermediario semiquinona es rojo o azul, según el pH. La estabilidad del intermediario da a las flavinas una versatilidad catalítica que no comparten las coenzimas de nicotinamida, por cuanto las flavinas pueden interaccionar con pares donador-aceptor de dos electrones o de un electrón. Además, las flavoproteínas pueden interaccionar directamente con el oxígeno. Así pues, algunas de las flavoproteínas, aunque no todas, son oxidasas.

COENZIMA A Y ACTIVACIÓN DE GRUPOS ACILO

La coenzima A (A por acilo) participa en la activación de grupos acilo en general, entre ellos el grupo acetilo procedente del piruvato. La coenzima deriva metabólicamente del ATP, la vitamina **ácido pantoténico** y la β-mercaptoetilamina.



Un tiol libre en la porción β-mercaptoetilamina es la parte de la molécula de coenzima que tiene actividad funcional; el resto de la molécula aporta lugares de unión de enzimas. En los derivados acilados, como la acetil-coenzima

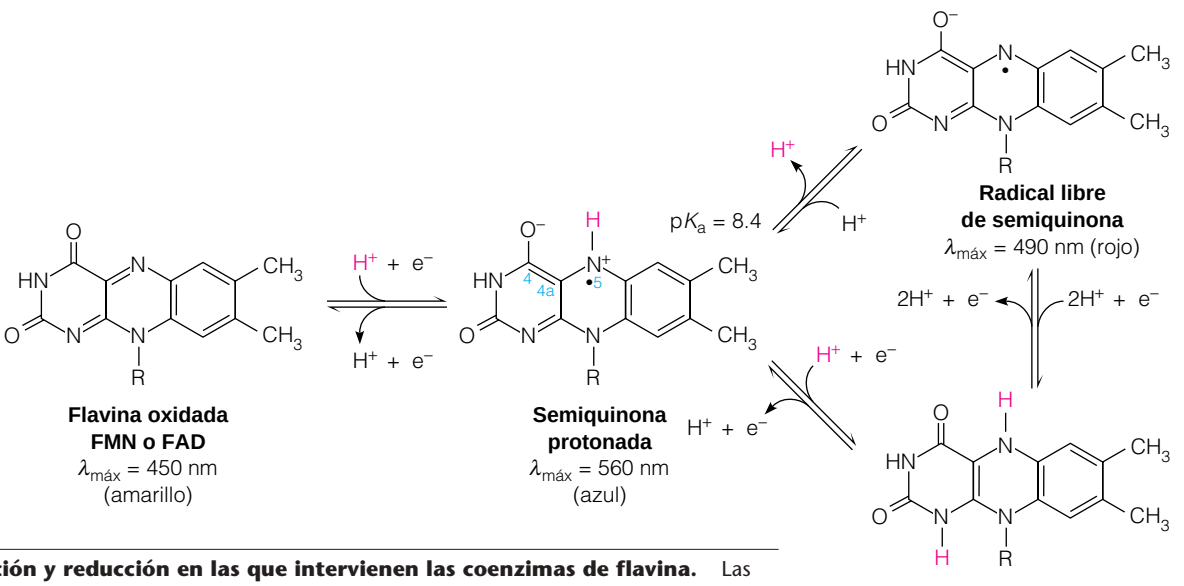
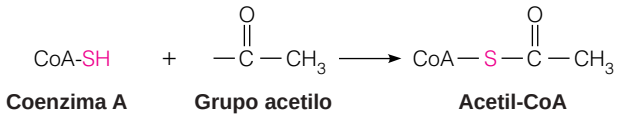


FIGURA **14.8**

Reacciones de oxidación y reducción en las que intervienen las coenzimas de flavina. Las flavinas participan en reacciones de dos electrones, pero la existencia del radical libre intermediario semiquinona permite que estas reacciones se produzcan con un electrón cada vez. Así pues, las flavinas reducidas pueden oxidarse con facilidad por aceptores de un electrón. Se indican los máximos espectrales ($\lambda_{máx}$) para la flavina oxidada y las formas protonadas y desprotonadas del intermediario semiquinona. En ambas formas de semiquinona el electrón desapareado está deslocalizado entre N-5 y C-4a.

A, el grupo acilo está ligado al grupo tiol para formar un tioéster de energía elevada.



Designaremos a las formas aciladas de la coenzima A como R—C(=O)—S—CoA, o acil-CoA, y a la forma sin acilo como CoA-SH.

El carácter de energía elevada de los tioésteres, en comparación con los ésteres ordinarios, se debe principalmente a la estabilización por resonancia (Figura 14.9). La mayor parte de los ésteres tienen dos formas de resonancia (Figura 14.9). La estabilización implica un solapamiento de electrones π, dando un carácter de doble enlace parcial al enlace C—O. En los tioésteres, el mayor tamaño atómico de S (en comparación con el O) reduce el solapamiento de electrones π entre el C y el S, con lo que la estructura C—S no contribuye de manera significativa a la estabilización por resonancia. Así pues, el tioéster está *desestabilizado* en comparación con un éster, de forma que su ΔG de hidrólisis está aumentado.

El hecho de que el enlace C—S de la acil-CoA no tenga un carácter de doble enlace hace que sea más débil que el correspondiente enlace C—O en los ésteres ordinarios, lo que implica a su vez que el ion tioalcóxido ($R—S^-$) sea un buen grupo de salida para las reacciones de desplazamiento nucleófilas. Así pues, el grupo acilo se transfiere con facilidad a otros metabolitos, como ocurre, de hecho, en la primera reacción del ciclo del ácido cítrico.

Los tioésteres como la acetil-CoA son compuestos de energía elevada ya que el enlace C—S la desestabiliza con relación a un enlace C—O.

Acción del complejo piruvato deshidrogenasa

Como se ha indicado antes, en la oxidación del piruvato para dar acetil-CoA intervienen las coenzimas TPP, ácido lipoico, FAD, NAD^+ y CoA-SH, que actúan de manera concertada con las tres enzimas del complejo piruvato deshidrogenasa. Ahora estamos ya en disposición de ver cómo actúan todos estos componentes de manera conjunta para producir la conversión del piruvato en acetil-

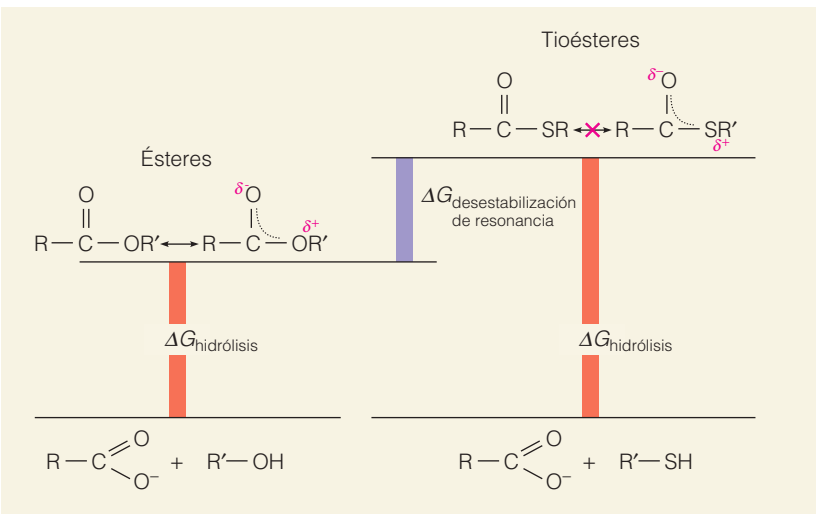


FIGURA **14.9**

Comparación de las energías libres de hidrólisis de los tioésteres y otros ésteres. La ausencia de estabilización por resonancia (indicada mediante la X roja sobre la flecha de resonancia) es la base del mayor ΔG de la hidrólisis de los tioésteres, con relación al de los ésteres ordinarios. Las energías libres de los productos de hidrólisis son similares para las dos clases de compuestos.

CoA. Se muestran a continuación las reacciones catalizadas por cada enzima, y en la Figura 14.10 se presenta el conjunto del proceso.

1. Piruvato + TPP + H^+ $\xrightarrow{E_1}$ hidroxietil-TPP + CO_2

2. Hidroxietil-TPP + Lip_1(S,S) $\xrightarrow{E_1}$ TPP + Lip_1(S-acetil, SH)

3. Lip_1(S-acetil, SH) + Lip_2(S,S) $\xrightarrow{E_2}$ Lip_1(S,S) + Lip_2(S-acetil, SH)

4. Lip_2(S-acetil, SH) + CoA-SH $\xrightarrow{E_2}$ acetil-CoA + Lip_2(SH, SH)

5. Lip_2(SH, SH) + FAD $\xrightarrow{E_3}$ Lip_2(S,S) + $FADH_2$

6. $FADH_2$ + NAD^+ $\xrightarrow{E_3}$ FAD + NADH + H^+

Suma: Piruvato + CoA-SH + NAD^+ ⟶ acetil-CoA + CO_2 + NADH

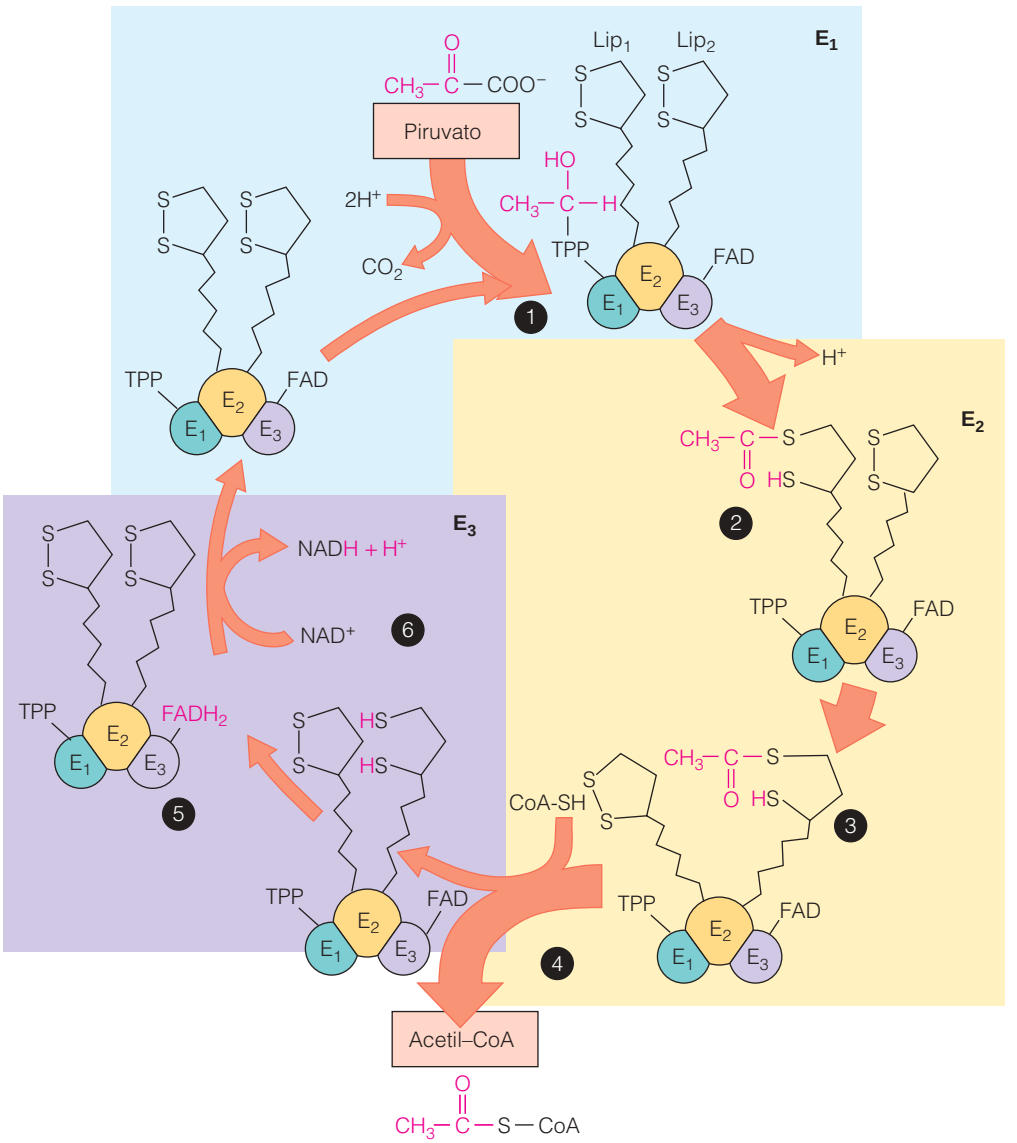
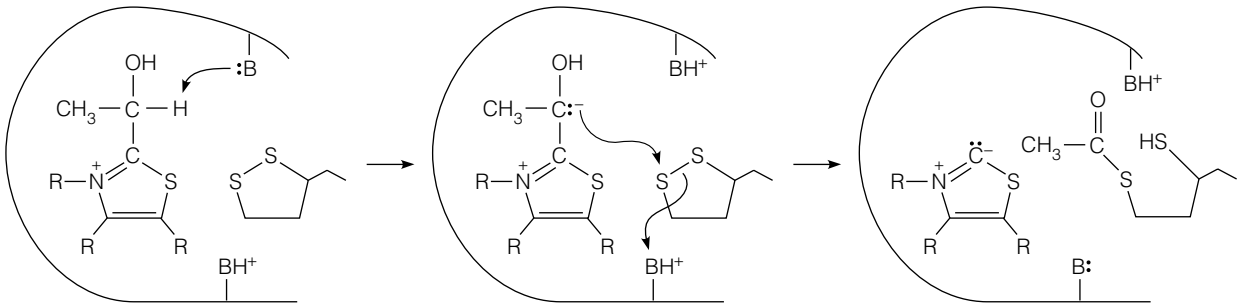


FIGURA **14.10**

Mecanismos del complejo piruvato deshidrogenasa. Este diagrama detallado de la oxidación del piruvato a acetil-CoA muestra la función que desempeñan los brazos oscilantes de la lipoamida en el funcionamiento del complejo piruvato deshidrogenasa. El número que identifica cada reacción es del mismo color que la enzima que la cataliza. **Reacción 1:** E_1 acepta un grupo aldehído de dos carbonos procedente del piruvato y lo une al TPP, formando hidroxietil-TPP. **Reacción 2:** El grupo aldehído se transfiere por E_1 al primer brazo oscilante de lipoamida en E_2 y se oxida simultáneamente a un grupo acetilo. **Reacción 3:** El grupo acetilo se transfiere al segundo brazo de oscilación, que le coloca en la situación adecuada para la transferencia a la CoA-SH. **Reacción 4:** El grupo acetilo se transfiere a la CoA-SH, produciendo acetil-CoA. **Reacción 5:** E_3 oxida el brazo de oscilación de la lipoamida reducida mediante la transferencia de dos hidrógenos al FAD. **Reacción 6:** La flavina reducida ($FADH_2$) se oxida por el NAD^+. E_1: piruvato deshidrogenasa. E_2: dihidrolipoamida transacetilasa. E_3: dihidrolipoamida deshidrogenasa.

Una característica crucial de esta secuencia de reacciones es la interacción de dos porciones de lipoamida en E_2, primero con el hidroxietil-TPP unido a E_1, a continuación con la CoA-SH en E_2 para producir acetil-CoA, y finalmente con el FAD unido a E_3 para regenerar la especie disulfuro de la lipoamida. La transferencia y la oxidación acompañante del grupo hidroxietilo se producen probablemente de la siguiente forma, donde B indica residuos básicos en la proteína E_1:



La lipoamida está enganchada a una enzima (E_2) en el complejo piruvato deshidrogenasa, pero interactúa con las tres enzimas a través de un brazo oscilante flexible.

La unión de la cadena de ácido lipoico de ocho carbonos con un residuo de lisina de seis carbonos da una cadena flexible que, cuando está totalmente extendida, tiene aproximadamente 1.4 nm de longitud. Sin embargo, los estudios estructurales indican que el TPP unido en E_1 está aproximadamente entre 4.5 y 6 nm de distancia del FAD unido a E_3. Así pues, un solo brazo de lipoamida en E_2 no puede desplazarse todo el trayecto existente entre los lugares de E_1 y E_3 que participan en la reacción. El problema se resuelve con la participación de al menos dos brazos de lipoamida en cada cadena E_2, con la transferencia del grupo acetilo desde un brazo al siguiente. Dado que cada brazo de 1.4 nm puede recorrer un arco de aproximadamente el doble de esa distancia, dos brazos pueden conectar grupos funcionales situados a una distancia de hasta 5.6 nm. En el diagrama de la Figura 14.10 se muestra la operación de estos brazos oscilantes. El primer brazo acepta el fragmento de dos carbonos procedente de E_1 y lo transfiere luego en forma de grupo acetilo al segundo brazo. De ahí se transfiere directamente a la coenzima A. El brazo de lipoamida reducido, con dos grupos tioles, se reoxida luego al disulfuro cíclico por E_3.

La yuxtaposición física de las enzimas del complejo permite que toda la reacción transcurra de manera suave, sin reacciones secundarias indeseadas ni difusión de los intermediarios desde los lugares catalíticos. El complejo piruvato deshidrogenasa constituye uno de los ejemplos mejor conocidos de la forma en que las células pueden conseguir una economía de función mediante la yuxtaposición de enzimas que catalizan reacciones secuenciales.

Ciclo del ácido cítrico

En la Figura 14.3 se ha presentado el ciclo completo del ácido cítrico, con la estructura de cada uno de los intermediarios. La importancia de esta ruta hace que valga la pena examinar con detalle cada una de sus reacciones. En primer lugar, recuérdese que el ciclo actúa en dos fases: (1) adición de una porción de dos carbonos (acetil-CoA) a un compuesto de cuatro carbonos (oxalacetato) para dar un anión orgánico de seis carbonos, el citrato, seguido de la pérdida de dos carbonos en forma de CO_2; y (2) regeneración del oxalacetato.

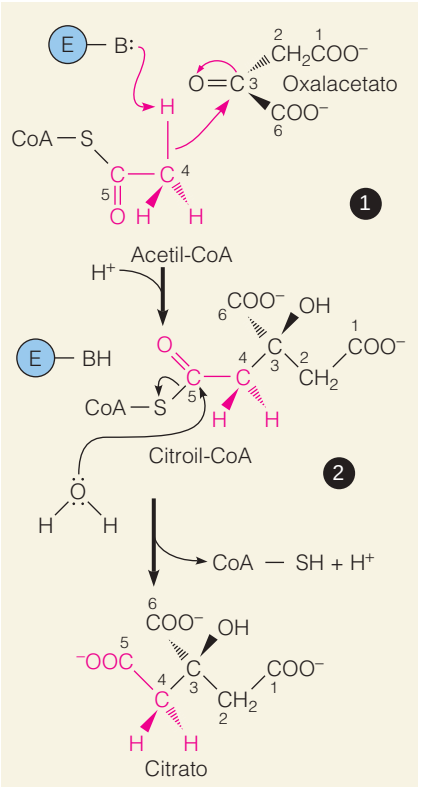


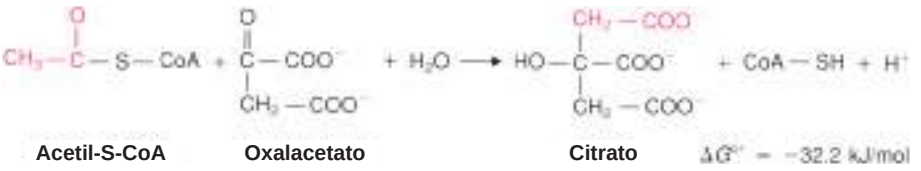
FIGURA **14.11**

Mecanismo de la reacción de la citrato sintasa. **Paso 1:** Un residuo básico (B:) de la enzima extrae un protón del grupo metilo de la acetil-CoA, creando un carbanión nucleófilo que ataca al carbono ceto del oxalacetato. **Paso 2:** La citroil-CoA formada en el paso 1 se hidroliza espontáneamente.

FASE 1: INTRODUCCIÓN Y PÉRDIDA DE DOS ÁTOMOS DE CARBONO

Paso 1: introducción de dos átomos de carbono en forma de acetil-CoA

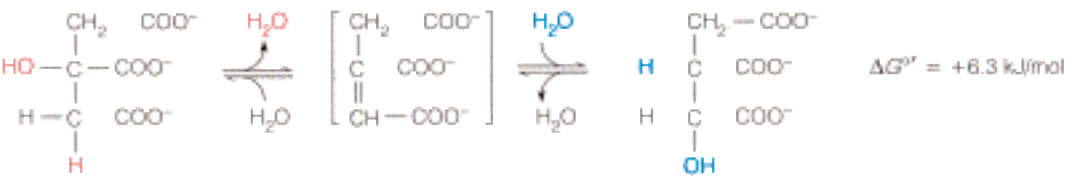
La reacción inicial, catalizada por la **citrato sintasa**, es semejante a una condensación aldólica.



Como se muestra en la Figura 14.11, el carbono metilo de la porción acetilo activada de la acetil-CoA pierde un protón, con un ataque nucleófilo del carbanión resultante en el carbono carbonílico del oxalacetato. Esta reacción genera el compuesto muy inestable **citroil-CoA**, que espontáneamente se hidroliza mientras está unido a la enzima para dar los productos. Como es de prever en el primer paso de entrada a una ruta, la reacción es muy exergónica y se ha considerado que constituye un lugar de regulación para el conjunto de la ruta (véase la página 563). Los análisis cristalográficos de la citrato sintasa (Figura 14.12) proporcionan una prueba excelente del modelo de ajuste inducido de la catálisis enzimática (véase el Capítulo 11).

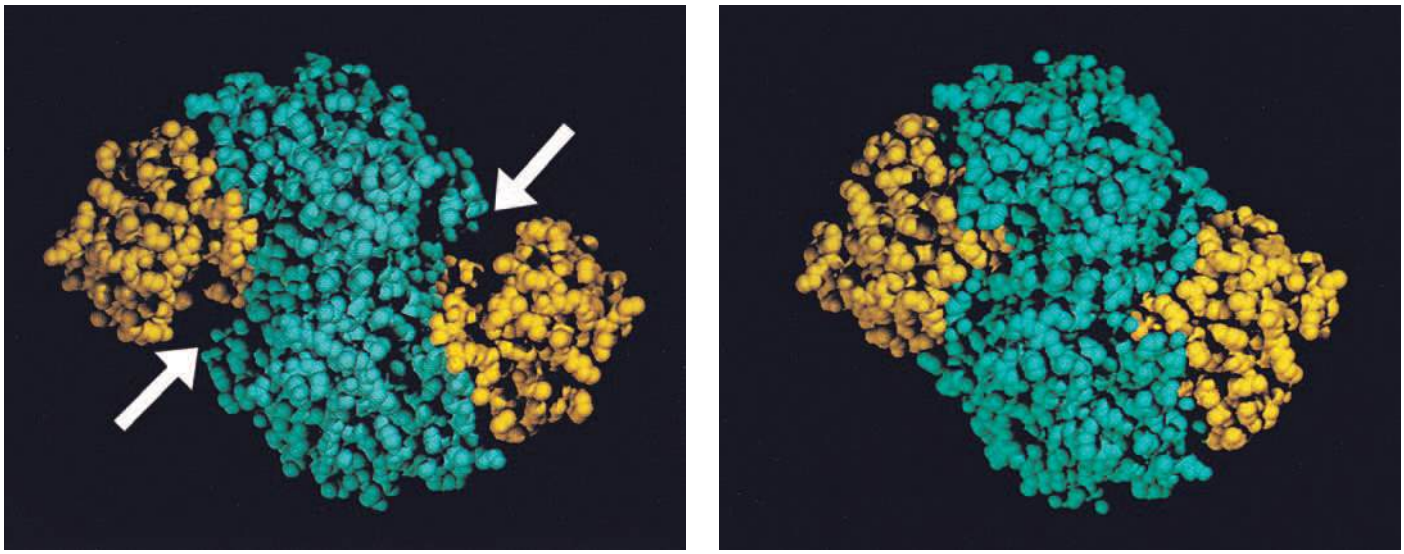
Paso 2: isomerización del citrato

Los sustratos de las reacciones de descarboxilación son generalmente α o β cetoácidos. El grupo hidroxilo alcohol terciario del citrato debe migrar para experimentar una oxidación a carbonilo. La isomerización, catalizada por la **aconitasa**, genera el compuesto alcohol secundario isocitrato, que puede oxidarse. La reacción comporta una deshidratación e hidratación sucesivas, a través del *cis*-aconitato como intermediario deshidratado, que se mantiene unido a la enzima.



Una mezcla en equilibrio de estos tres ácidos a 25°C contiene aproximadamente un 90% de citrato, un 4% de *cis*-aconitato y un 6% de isocitrato, pero el carácter exergónico de la siguiente reacción desplaza la reacción hacia la derecha, tal como está escrita. La enzima contiene hierro no hemo y azufre acidolábil en una agrupación denominada *centro hierro-azufre* 4Fe-4S, que normalmente se asocia a las oxidorreductasas (véase el Capítulo 15). En la aconitasa, el hierro forma un complejo con el citrato, a través de dos grupos carboxilo y un grupo hidroxilo en la molécula de citrato.

La aconitasa es el lugar de acción del efecto tóxico del **fluoroacetato**, un producto vegetal que se ha utilizado como pesticida. Su empleo por parte de los granjeros del Oeste de Estados Unidos para controlar las poblaciones de coyotes ha causado también la muerte de muchas águilas. El fluoroacetato bloquea el ciclo del ácido cítrico mediante su conversión metabólica en **fluorocitrato**, que es un potente inhibidor de la aconitasa. El fluoroacetato es un ejemplo de



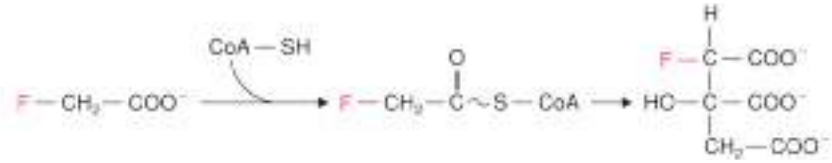
(a) (b)

FIGURA **14.12**

Estructura tridimensional de la citrato sintasa. Las dos formas de la citrato sintasa del corazón de cerdo que se muestran aquí se determinaron con métodos cristalográficos y confirman el modelo de ajuste inducido de la catálisis enzimática (véase el Capítulo 11). **(a)** En ausencia de los sustratos, la enzima cristaliza en una forma "abierta", con grandes hendiduras (en las flechas) en ambos dominios catalíticos de la proteína homodimérica. **(b)** La unión de los sustratos o de CoA-SH hace que la enzima adopte una conformación "cerrada" con las hendiduras prácticamente llenas.

Reproducido con permiso de G. Wiegand y S. J. Remington, *Annu. Rev. Biophys. & Biophys. Chem.*, Vol. 15. © 1986 Annual Reviews, Inc.

sustrato suicida. Como se ha indicado en el Capítulo 11, un sustrato suicida no es tóxico, de por sí, para las células, pero se asemeja hasta tal punto a un metabolito normal que experimenta una transformación metabólica, dando lugar a un producto que inhibe una enzima crucial. La célula "se suicida" al transformar el análogo en un producto tóxico. En este caso, el fluoroacetato se convierte en fluoroacetil-CoA, que actúa como sustrato de la citrato sintasa. Sin embargo, el fluorocitrato resultante no puede ser atacado por la aconitasa.



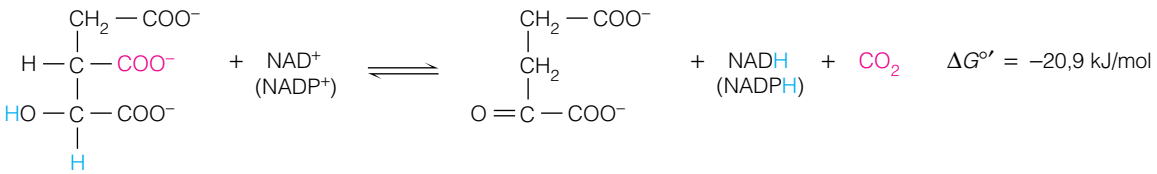
Fluoroacetato **Fluoroacetil-CoA** **Fluorocitrato**

El fluoroacetato actúa como un veneno al convertirse, a través de la citrato sintasa, en el inhibidor de la aconitasa fluorocitrato.

La reacción de la aconitasa es *estereoespecífica*: de los cuatro diastereómeros posibles del isocitrato, sólo se produce uno. La aconitasa es una de las primeras enzimas para las que se demostró y determinó la estereoespecificidad. Para describir estos avances, será preciso presentar antes la siguiente reacción del ciclo del ácido cítrico.

Paso 3: generación de CO_2 por una deshidrogenasa ligada al NAD^+

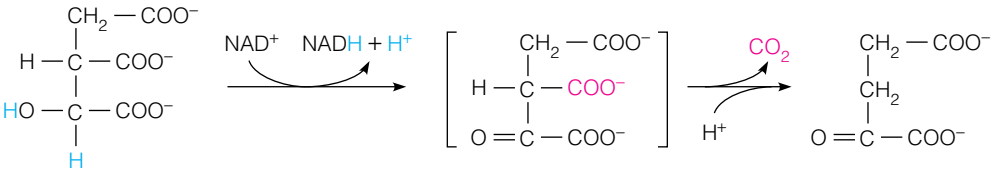
La primera de las dos descarboxilaciones oxidativas del ciclo la cataliza la **isocitrato deshidrogenasa**.



$\Delta G^{\circ\prime} = -20{,}9$ kJ/mol

Isocitrato **α-Cetoglutarato**

La reacción comporta la deshidrogenación a **oxalsuccinato**, un intermediario inestable unido a la enzima, que espontáneamente se descarboxila antes de liberar el producto.

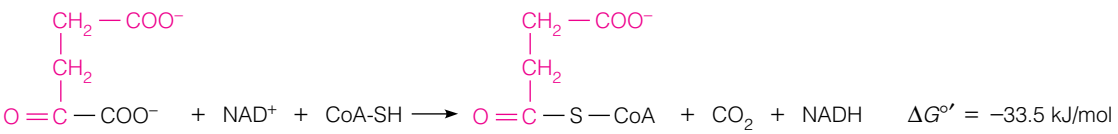


Isocitrato **Oxalsuccinato** **α-Cetoglutarato**

Una forma mitocondrial de la isocitrato deshidrogenasa que es específica para el NAD^+ es probablemente el principal protagonista del ciclo del ácido cítrico. Sin embargo, también existe una forma de la enzima con especificidad para el $NADP^+$ tanto en el citosol como en las mitocondrias.

Como se ha señalado antes, la estereoespecificidad de las interacciones enzima-sustrato se demostró por primera vez en un experimento realizado con la aconitasa. En ese experimento, llevado a cabo a finales de los años 1940, se puso en duda por primera vez que el citrato participara en el ciclo global. Se administró acetato marcado en el carboxilo a preparaciones de tejido animal; esto marca el citrato a través de la conversión del acetato en acetil-CoA. Dado que el citrato es un compuesto simétrico, se preveía que la aconitasa podría transferir el hidroxilo alcohol en las dos direcciones (Figura 14.13). Así pues, se esperaba que el α-cetoglutarato estuviera marcado por igual en ambos grupos carboxilo. Sin embargo, tan sólo se detectó la forma marcada γ, lo cual sugería que tan sólo los ácidos tricarboxílicos asimétricos podían participar en estos pasos iniciales del ciclo. Esta sugerencia descartaría la molécula simétrica de citrato. No obstante, Alexander Ogston señaló que si la enzima se unía al sustrato en tres puntos o más, el lugar de fijación era asimétrico y podía unir al sustrato tan sólo en una dirección (Figura 14.13). Así pues, el citrato fue la primera sustancia identificada como **proquiral**, o simétrica, pero que se hacía asimétrica tras la unión a la superficie asimétrica de una enzima, o tras un cambio similar en uno de los dos grupos equivalentes.

Paso 4: generación de un segundo CO_2 por un complejo multienzimático
La cuarta reacción del ciclo del ácido cítrico es una reacción de varios pasos totalmente comparable a la reacción de la piruvato deshidrogenasa. Un sustrato α-cetoácido experimenta una descarboxilación oxidativa, con formación simultánea de un acil-CoA.



α-Cetoglutarato **Succinil-CoA**

Esta reacción la cataliza el **complejo α-cetoglutarato deshidrogenasa**, una agrupación enzimática semejante al complejo piruvato deshidrogenasa, con tres actividades enzimáticas análogas y las mismas cinco coenzimas: TPP, NAD^+, FAD, ácido lipoico y CoA-SH. La primera reacción de la serie descarboxila el sustrato, como se indica en la Figura 14.14. La posterior transferencia de la unidad de cuatro carbonos restante al ácido lipoico y la oxidación mediante el FAD y el NAD^+ son análogas a las reacciones que se muestran en la Figura 14.10 para el complejo piruvato deshidrogenasa. Una diferencia importante entre estos dos complejos multienzimáticos es que las actividades reguladoras

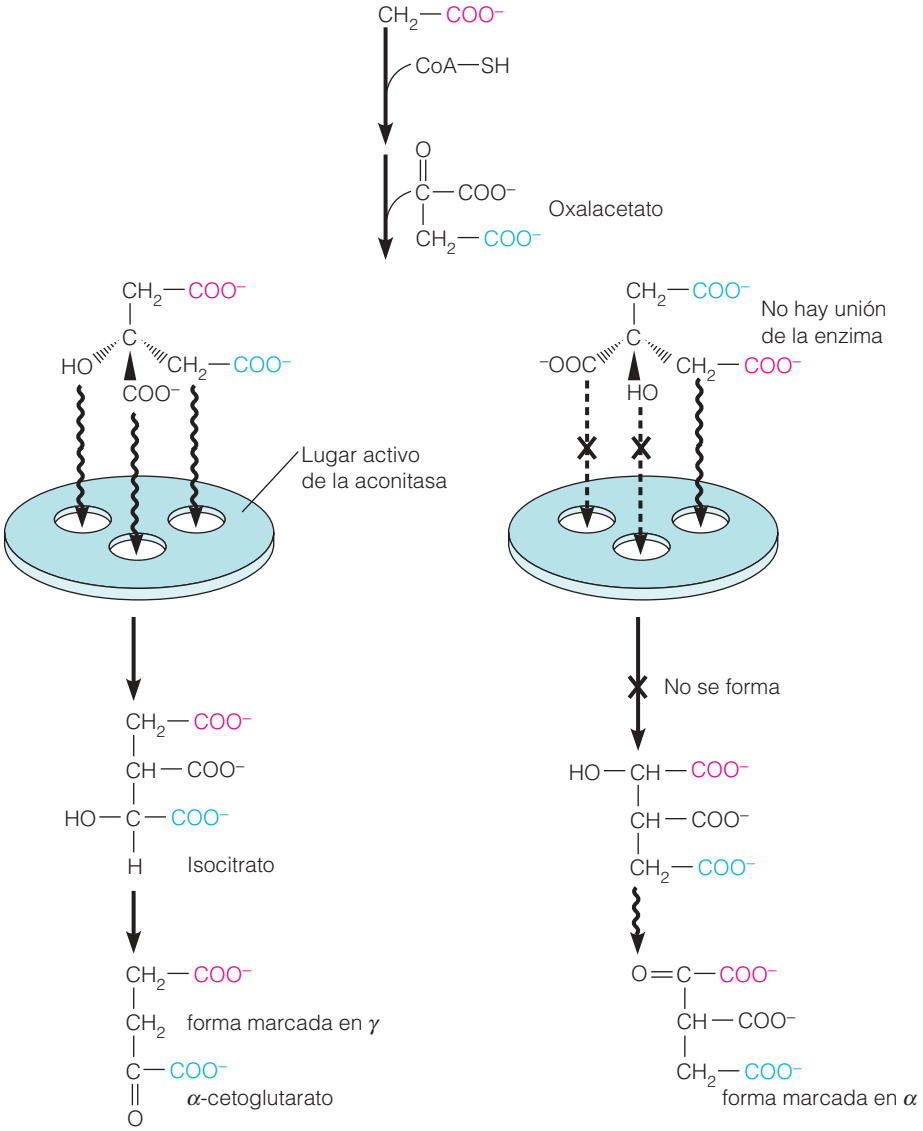


FIGURA **14.13**

Unión asimétrica del citrato al lugar activo de la aconitasa. El carboxilo marcado radiactivamente introducido como acetato se muestra en rojo. La unión del citrato a la aconitasa, en tres lugares o más, hace que no sean equivalentes los dos grupos carboxilo (azul y rojo), aunque el citrato es una molécula simétrica. De esta forma, sólo está permitida, de forma estereoquímica, la ruta señalada a la izquierda.

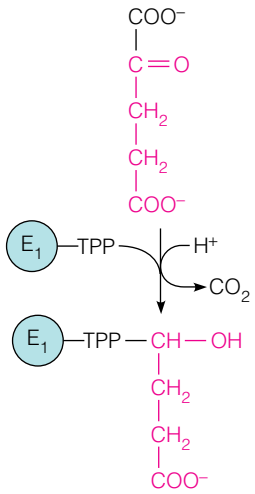


FIGURA **14.14**

Descarboxilación del α-cetoglutarato. La primera reacción que lleva a cabo el complejo α-cetoglutarato es una descarboxilación catalizada por una α-cetoglutarato descarboxilasa (E_1 del complejo).

asociadas con el complejo piruvato deshidrogenasa no se dan en el complejo α-cetoglutarato deshidrogenasa.

FASE 2: REGENERACIÓN DEL OXALACETATO

En este punto del ciclo, se han introducido dos átomos de carbono en forma de acetil-CoA (por la citrato sintasa) y se han perdido otros dos en forma de CO_2. Dada la estereoquímica de la reacción de la aconitasa, los dos átomos de carbono perdidos no son los mismos que los dos átomos de carbono introducidos al comienzo del ciclo. En las reacciones restantes, el intermediario de cuatro carbonos succinil-CoA se convierte en el producto de cuatro carbonos oxalacetato, mediante un proceso en el que dos de los cuatro pasos comportan reacciones de deshidrogenación.

Dos átomos de carbono entran en el ciclo del ácido cítrico en forma de acetil-CoA, y se pierden dos en forma de CO_2 en las reacciones 3 y 4 del ciclo.

Paso 5: una fosforilación a nivel de sustrato

La succinil-CoA es un compuesto de energía elevada, y su energía potencial se utiliza para impulsar la formación de un nucleósido trifosfato a partir de un difosfato. Esta reacción, catalizada por la **succinil-CoA sintetasa**, es comparable a

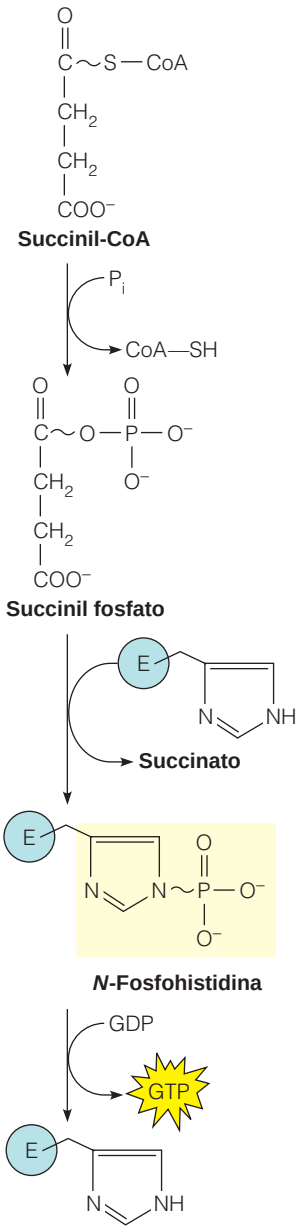


FIGURA **14.15**

Producción de nucleótidos de energía elevada por la reacción de la succinil-CoA sintetasa. En las células animales, un residuo de *N*-fosfohistidina de la succinil-CoA sintetasa actúa como intermediario en la producción de GTP. En las plantas y las bacterias, el nucleótido de energía elevada producido en este paso es el ATP.

las dos reacciones de fosforilación a nivel de sustrato que hemos visto en la glucólisis, excepto porque en las células animales el nucleótido producto de energía elevada no es siempre el ATP, sino que en algunos tejidos es el GTP.

$$\text{Succinil-CoA} + P_i + \underset{\text{o ADP}}{\text{GDP}} \rightleftharpoons \text{succinato} + \underset{\text{o ATP}}{\text{GTP}} + \text{CoA-SH} \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -2.9 \text{ kJ/mol}$$

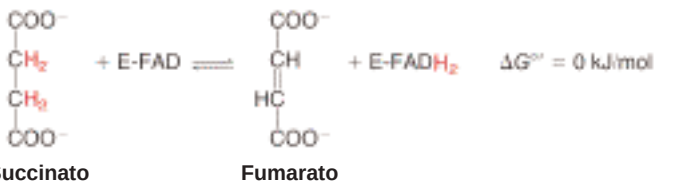
En los animales, las células hepáticas contienen principalmente la succinil-CoA sintetasa ligada al GTP, mientras que en el cerebro y el corazón predomina la enzima ligada al ATP. Gran parte del GTP formado impulsa la síntesis final de ATP, mediante la acción de la nucleósido difosfato quinasa.

$$\text{GTP} + \text{ADP} \rightleftharpoons \text{GDP} + \text{ATP} \qquad \Delta G^{\circ\prime} = 0.0 \text{ kJ/mol}$$

En las plantas y las bacterias, el ATP se forma directamente en el paso 5, como se muestra en la Figura 14.3, mediante la reacción de la succinil-CoA con el ADP. En ambos casos, el paso 5 comporta la formación del anhídrido succinil fosfato (Figura 14.15), que activa a continuación la succinil-CoA sintetasa mediante la fosforilación de un residuo de histidina específico. El residuo de *N*-fosfohistidina resultante transfiere a continuación su fosfato al sustrato nucleósido difosfato.

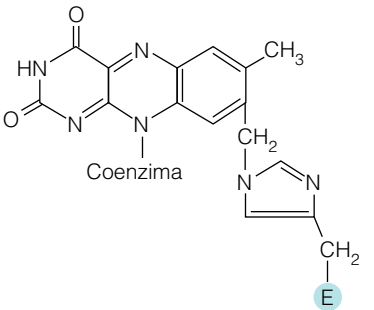
Paso 6: deshidrogenación dependiente de flavina

Para completar el ciclo se produce una conversión del succinato de cuatro carbonos en el oxalacetato de cuatro carbonos. La primera de las tres reacciones que intervienen, catalizada por la **succinato deshidrogenasa**, es la deshidrogenación dependiente del FAD de dos carbonos saturados a un doble enlace.



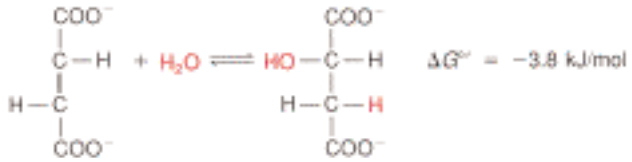
Esta reacción va seguida en los dos pasos siguientes por una hidratación de ese doble enlace y la deshidrogenación del α-hidroxiácido resultante al α-cetoácido oxalacetato.

Un enlace sencillo C—C es más difícil de oxidar que un enlace C—O. En consecuencia, la coenzima redox para la succinato deshidrogenasa no es el NAD^+ sino el más potente oxidante FAD, que a su vez transfiere sus electrones a un centro hierro-azufre en la molécula enzimática. El FAD está unido de forma covalente a la proteína enzimática, designada como E, a través de un residuo de histidina específico. La enzima está fuertemente unida a la membrana mitocondrial interna (véase el Capítulo 15). La importancia de esta unión radica en que la flavina reducida, que debe reoxidarse para que la enzima vuelva a actuar, lo hace a través de la interacción con el sistema de transporte electrónico mitocondrial, unido también a la membrana.



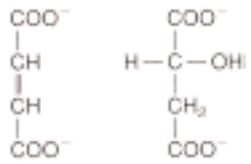
Obsérvese que la acción de la succinato deshidrogenasa es también estereoselectiva, y sólo se forma el isómero *trans*, el fumarato. El isómero *cis*, el maleato, no se forma.

Paso 7: hidratación de un doble enlace carbono-carbono
La hidratación *trans* estereoespecífica del doble enlace carbono-carbono la cataliza la **fumarato hidratasa**, denominada más comúnmente **fumarasa**.



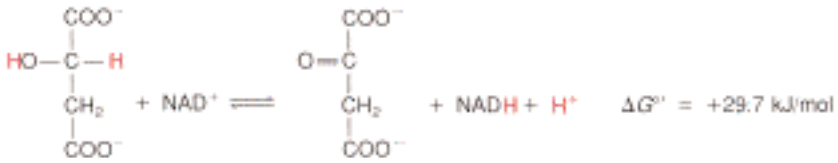
Fumarato **L-Malato**

El isómero *cis* del fumarato, que recibe el nombre de maleato, no es un sustrato de la reacción hacia adelante, y la enzima no puede actuar sobre el D-malato en la dirección contraria.



Maleato **D-Malato**

Paso 8: una deshidrogenación que regenera el oxalacetato
Finalmente, el ciclo se completa con la deshidrogenación, dependiente del NAD^+, del malato a oxalacetato, catalizada por la **malato deshidrogenasa**.



L-Malato **Oxalacetato**

Esta reacción muy endergónica se decanta hacia la derecha, tal como está escrita, debido a que la reacción de la citrato sintasa muy exergónica mantiene las concentraciones intramitocondriales de oxalacetato extremadamente bajas (inferiores a 10^{-6} M).

Estequiometría y energética del ciclo del ácido cítrico

Analicemos ahora lo que se ha conseguido con una vuelta del ciclo del ácido cítrico, tal como se resume en la Tabla 14.1. El ciclo se inició cuando un fragmento de dos carbonos (acetil-CoA) se combinó con un aceptor de cuatro carbonos (oxalacetato). Luego, se eliminaron dos carbonos en forma de CO_2 al metabolizarse posteriormente el citrato resultante. Se produjeron cuatro reacciones de oxidación durante el ciclo, en las que el NAD^+ actuó como coenzima en tres casos, y el FAD en el cuarto. Se generó fosfato de energía elevada directamente en una sola reacción (catalizada por la succinil-CoA sintetasa). Por último, se regeneró el oxalacetato que está preparado para volver a iniciar el ciclo de nuevo mediante la condensación con otra molécula de acetil-CoA.

Podemos escribir una ecuación química equilibrada que corresponda a la suma de las ocho reacciones que intervienen en una vuelta del ciclo:

$$\text{Acetil-CoA} + 2H_2O + 3NAD^+ + FAD + GDP + P_i \longrightarrow 2CO_2 + 3NADH + FADH_2 + \text{CoA-SH} + GTP$$

El GTP formado en la reacción de la succinil-CoA sintetasa en los animales es energéticamente equivalente al ATP, ya que la nucleósido difosfato quinasa puede convertir el GTP que se forma en ATP sin costo neto de energía libre. En consecuencia, en el tratamiento siguiente sustituiremos el GTP por el ATP.

Una vuelta del ciclo del ácido cítrico genera un fosfato de energía elevada a través de una fosforilación a nivel de sustrato, más tres NADH y un $FADH_2$ para la posterior reoxidación.

TABLA 14.1 Reacciones del ciclo del ácido cítrico

Reacción	Enzima	$\Delta G°'$ (kJ/mol)
1. Acetil-CoA + oxalacetato + H_2O → citrato + CoA-SH + H^+	Citrato sintasa	−32.2
2a. Citrato ⇌ *cis*-aconitato + H_2O	Aconitasa	+6.3
2b. *cis*-Aconitato + H_2O ⇌ isocitrato	Aconitasa	
3. Isocitrato + NAD^+ ⇌ α-cetoglutarato + CO_2 + NADH	Isocitrato deshidrogenasa	−20.9
4. α-Cetoglutarato + NAD^+ + CoA-SH ⇌ succinil-CoA + CO_2 + NADH	Complejo de la α-cetoglutarato deshidrogenasa	−33.5
5. Succinil-CoA + P_i + GDP ⇌ succinato + GTP + CoA-SH	Succinil-CoA sintetasa	−2.9
6. Succinato + FAD (ligado a enzima) ⇌ fumarato + $FADH_2$ (ligado a enzima)	Succinato deshidrogenasa	0
7. Fumarato + H_2O ⇌ L-malato	Fumarasa	−3.8
8. L-Malato + NAD^+ ⇌ oxalacetato + NADH + H^+	Malato deshidrogenasa	+29.7
	Neto	−57.3

Si tenemos en cuenta ahora la reacción de la piruvato deshidrogenasa, y si recordamos que cada molécula de glucosa genera dos moléculas de piruvato, podemos escribir la siguiente ecuación para el catabolismo de la glucosa a través de la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico.

$$\text{Glucosa} + 2H_2O + 10NAD^+ + 2FAD + 4ADP + 4P_i \longrightarrow 6CO_2 + 10NADH + 6H^+ + 2FADH_2 + 4ATP$$

Hasta aquí, la producción de ATP por mol de glucosa metabolizada no ha aumentado mucho respecto a la producción obtenida en la glucólisis: 2 moles de ATP por glucosa en la glucólisis sola, frente a 4 moles aquí. La mayor parte del ATP generado durante la oxidación de la glucosa no se forma directamente a partir de las reacciones de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico, sino que se forma a partir de la reoxidación de los transportadores electrónicos reducidos en la cadena respiratoria. Estos compuestos, NADH y $FADH_2$, son de por sí de gran energía, en el sentido de que su oxidación es muy exergónica. Cuando los electrones se transfieren desde estos transportadores reducidos hacia el oxígeno molecular de manera escalonada, se produce de manera acoplada la síntesis de ATP a partir de ADP, con la formación de alrededor de 3 moles de ATP por NADH reoxidado y de alrededor de 2 moles de ATP por mol de $FADH_2$ reoxidado. Como veremos en el Capítulo 15, esta síntesis acoplada genera alrededor de 38 moles de ATP por mol de glucosa oxidada a CO_2 y agua.

Regulación de la piruvato deshidrogenasa y del ciclo del ácido cítrico

Dado que el ciclo del ácido cítrico es una fuente de intermediarios biosintéticos, así como una ruta para la generación de energía metabólica, la regulación del ciclo es algo más compleja que si se tratara solamente de una ruta de generación de energía. Al igual que en la glucólisis, la regulación se produce a nivel de la en-

trada de combustible al ciclo, y a nivel del control de las reacciones clave dentro del ciclo. En la Figura 14.16 se resumen los principales factores que intervienen en la regulación a ambos niveles.

CONTROL DE LA OXIDACIÓN DEL PIRUVATO

El combustible entra en el ciclo principalmente en forma de acetil-CoA, que procede de los hidratos de carbono a través de la piruvato deshidrogenasa y de los lípidos, fundamentalmente mediante la β-oxidación de los ácidos grasos. Dado que la oxidación de los ácidos grasos se comentará en el Capítulo 18, nos centraremos aquí en el control de la piruvato deshidrogenasa. La actividad de este complejo está controlada por una inhibición alostérica y, como se ha indicado antes, por una modificación covalente que se controla, a su vez, por el estado energético de la célula. E_2, el componente transacetilasa (véase la Figura 14.10), se inhibe por la acetil-CoA y se activa por la CoA-SH. E_3, el componente dihidrolipoamida deshidrogenasa, se inhibe por el NADH y se activa por el NAD^+. El ATP es un inhibidor alostérico del complejo y el AMP es un activador. Así pues, la actividad de esta reacción clave está coordinada con la carga energética, la relación $[NAD^+]/[NADH]$, y la relación entre la forma de coenzima A acetilada y la libre.

En el complejo piruvato deshidrogenasa de los mamíferos, la regulación se produce también mediante una modificación covalente de E_1, el componente piruvato descarboxilasa del complejo. Como se indica en la Figura 14.17, esto implica una fosforilación y desfosforilación de los residuos de serina de E_1. Tanto el NADH como la acetil-CoA activan otro componente del complejo, la **piruvato deshidrogenasa quinasa**, que fosforila tres residuos específicos de serina de E_1, dando lugar a una pérdida de actividad piruvato deshidrogenasa. Una **piruvato deshidrogenasa fosfatasa** específica elimina hidrolíticamente el fosfato unido y reactiva el complejo. La fosfatasa se activa por el Ca^{2+} y el Mg^{2+}. Dado que el ATP une Mg^{2+} más fuertemente que el ADP, la concentración de Mg^{2+} libre refleja la relación ATP/ADP dentro de la mitocondria. Esto es, se acumula Mg^{2+} libre a relaciones [ATP]/[ADP] bajas. Así pues, la piruvato deshidrogenasa responde a las concentraciones de ATP quedando desactivada cuando el ATP es abundante y no es necesaria una mayor producción de energía. En los tejidos de los mamíferos en reposo, es mucho menos de la mitad de la can-

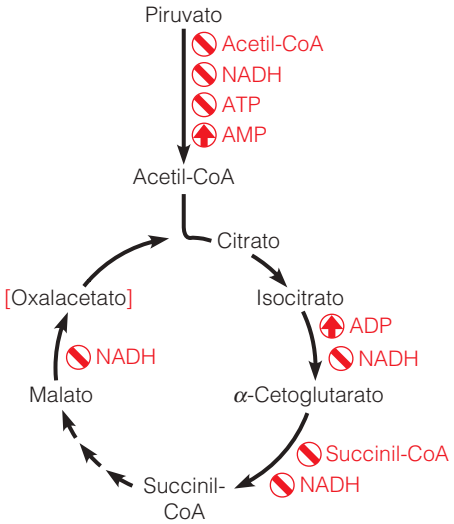


FIGURA **14.16**

Principales factores reguladores que controlan la piruvato deshidrogenasa y el ciclo del ácido cítrico. Los corchetes rojos indican la dependencia de la concentración. El NADH puede inhibir mediante interacciones alostéricas, pero la aparente inhibición por el NADH puede ser también un reflejo de una disponibilidad reducida de NAD^+.

La actividad del complejo piruvato deshidrogenasa se regula mediante la fosforilación y desfosforilación de la subunidad E_1.

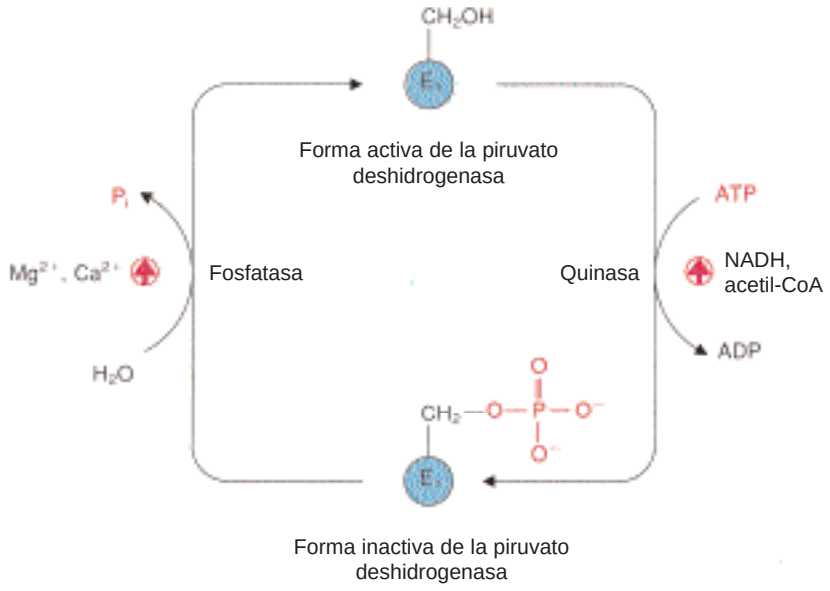


FIGURA **14.17**

Regulación del complejo piruvato deshidrogenasa mediante la modificación de E_1. Una quinasa y una fosfatasa inactivan y activan el primer componente (E_1) del complejo piruvato deshidrogenasa mediante la fosforilación y desfosforilación, respectivamente, de tres residuos específicos de serina (señalados como —CH_2OH).

tidad total de piruvato deshidrogenasa la que se encuentra en forma activa no fosforilada. El complejo puede activarse cuando las concentraciones bajas de ATP señalan la necesidad de generar más ATP. La proteína quinasa es parte integrante del complejo piruvato deshidrogenasa, mientras que la fosfatasa sólo está unida de forma laxa.

CONTROL DEL CICLO DEL ÁCIDO CÍTRICO

El flujo a través del ciclo del ácido cítrico se controla mediante interacciones alostéricas, no obstante las concentraciones de los sustratos desempeñan también un papel crucial. Aunque los detalles de la regulación difieren en distintas células y tejidos, los principales efectos son los que se resumen en la Figura 14.16.

El ciclo del ácido cítrico se controla fundamentalmente por las concentraciones intramitocondriales relativas de NAD^+ y NADH.

El factor más importante que controla la actividad del ciclo del ácido cítrico es la relación intramitocondrial del $[NAD^+]$ respecto al [NADH]. El NAD^+ es un sustrato de tres enzimas del ciclo (Figura 14.3), así como de la piruvato deshidrogenasa. En las condiciones en las que *disminuye* la relación de $[NAD^+]/[NADH]$, como por ejemplo en presencia de una limitación del aporte de oxígeno, la baja concentración de NAD^+ puede limitar las actividades de estas deshidrogenasas.

En algunos tejidos de mamíferos, y en especial en el hígado, las concentraciones de citrato varían en hasta 10 veces y, a concentraciones bajas, el flujo a través de la reacción de la citrato sintasa está limitado por la disponibilidad del sustrato. Recuérdese que en algunos tejidos animales el citrato es también un regulador clave del flujo a través de la *glucólisis* mediante la regulación alostérica de la fosfofructoquinasa (PFK). Esto no ocurre en todos los tejidos. Así, por ejemplo, las células cardíacas no pueden transportar el citrato fuera de las mitocondrias, por lo que probablemente no se produce una interacción importante con la PFK citosólica. Sin embargo, las concentraciones de citrato pueden controlar de todos modos el ciclo del ácido cítrico en el corazón.

Los lugares clave de la regulación alostérica son las reacciones catalizadas por la isocitrato deshidrogenasa y la α-cetoglutarato deshidrogenasa. En muchas células, la isocitrato deshidrogenasa se activa por el ADP y se inhibe directamente por el NADH. Este control se suma a la reducción indirecta de la actividad que se observa en presencia de una relación $[NAD^+]/[NADH]$ baja. La isocitrato deshidrogenasa también se inactiva por la fosforilación de un residuo de serina, lo cual impide la unión del isocitrato. La actividad de la α-cetoglutarato deshidrogenasa se inhibe por la succinil-CoA y por el NADH. Los mecanismos son comparables a los que permiten que las concentraciones de acetil-CoA y de NADH controlen la actividad de la piruvato deshidrogenasa.

Durante un tiempo se pensó que la citrato sintasa constituía otro punto de control alostérico. Esta enzima sufre la inhibición por el NADH, el NADPH o la succinil-CoA. Sin embargo, las medidas de las concentraciones intramitocondriales de oxalacetato, acetil-CoA y citrato indican que la enzima actúa cerca de las condiciones de equilibrio, es decir, la relación de [citrato] con respecto a ([acetil-CoA] $\times$ [oxalacetato]) está próxima a la K_{eq} para la reacción de la citrato sintasa. En cambio, es evidente que las concentraciones intramitocondriales de oxalacetato, que son bastante bajas, pueden ejercer un control a nivel de sustrato sobre el flujo de la citrato sintasa.

En resumen, el flujo a través del ciclo del ácido cítrico es sensible al estado energético de la célula, a través de una activación alostérica de la isocitrato deshidrogenasa por el ADP, al estado redox de la célula, a través de la limitación de la velocidad de flujo causada cuando desciende el $[NAD^+]$ intramitocondrial, y a la disponibilidad de compuestos de energía elevada, mediante la inhibición de enzimas relevantes por la acetil-CoA o la succinil-CoA.

Secuencias anapleróticas: necesidad de reponer los intermediarios del ciclo

Los intermediarios del ciclo del ácido cítrico utilizados en las rutas de biosíntesis deben reponerse para mantener el flujo a través del ciclo. Las rutas anapleróticas sirven para este fin.

Hasta el momento, nuestro análisis del ciclo del ácido cítrico se ha centrado en su papel en el catabolismo y la generación de energía. El ciclo actúa también como una fuente importante de intermediarios biosintéticos. En la Figura 14.18 se resumen las rutas anabólicas más importantes implicadas. Estas rutas tienden a extraer carbono del ciclo mediante la utilización de intermediarios del ciclo. La succinil-CoA se utiliza en la síntesis del hemo y de otras porfirinas. El oxalacetato y el α-cetoglutarato son los análogos cetoácidos de los aminoácidos aspartato y glutamato, respectivamente, y se utilizan en la síntesis de éstos y otros aminoácidos mediante transaminación (véase la página 567). En algunos tejidos, el citrato se transporta desde las mitocondrias al citosol, en donde se fragmenta para producir acetil-CoA para la biosíntesis de los ácidos grasos. Dado que éstas y otras reacciones tienden a causar una reducción de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, mediante la extracción de carbono, el funcionamiento del ciclo se iría deteriorando si no hubiera otros procesos que repusieran las reservas de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Estos procesos se denominan rutas **anapleróticas**, de una palabra griega que significa "rellenar". En la mayoría de las células, el flujo de salida del carbono del ciclo se equilibra mediante estas reacciones anapleróticas, de manera que las concentraciones intramito-

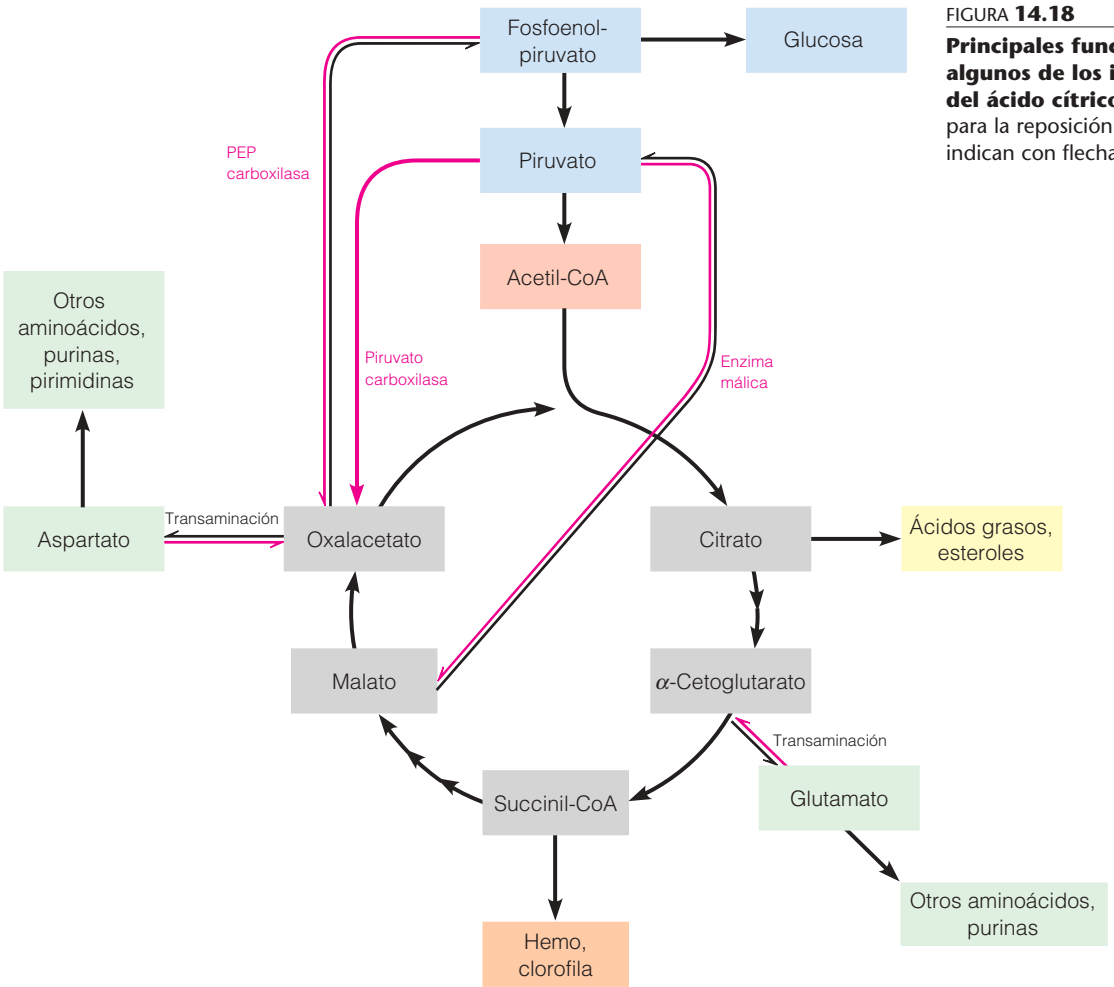


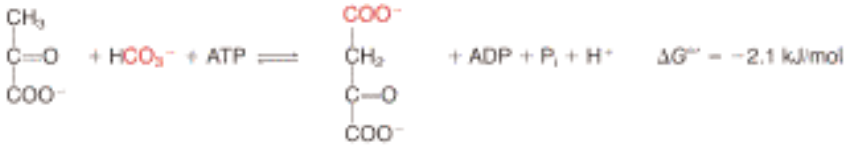
FIGURA **14.18**

Principales funciones biosintéticas de algunos de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Las rutas anapleróticas para la reposición de estos intermediarios se indican con flechas rojas.

condriales de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico se mantienen constantes a lo largo del tiempo. Los procesos anapleróticos se resumen también en la Figura 14.18.

REACCIONES QUE REPONEN OXALACETATO

En los animales, la reacción anaplerótica más importante, en especial en el hígado y el riñón, es la carboxilación reversible del piruvato dependiente del ATP, para dar oxalacetato. Esta reacción la cataliza la **piruvato carboxilasa**.

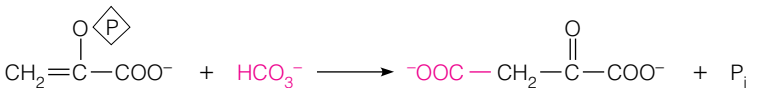


Piruvato **Oxalacetato**

La enzima se activa alostéricamente por la acetil-CoA; de hecho, es totalmente inactiva en ausencia de este efector. Este proceso constituye una activación favorecida por el aporte, puesto que el efecto de la acumulación de acetil-CoA es el de fomentar su propia utilización mediante la estimulación de la síntesis de oxalacetato. Este último compuesto reacciona, a su vez, con la acetil-CoA, a través de la reacción de la citrato sintasa. Por otro lado, el oxalacetato puede utilizarse para la síntesis de hidratos de carbono, a través de la gluconeogénesis, y la acumulación de acetil-CoA puede interpretarse como una señal de que existe el carbono suficiente disponible para que parte del mismo se almacene en forma de hidratos de carbono.

En el Capítulo 11 identificamos la biotina como un cofactor de la mayor parte de las reacciones de carboxilación en las que interviene el CO_2. La piruvato carboxilasa es una proteína tetramérica que lleva cuatro moléculas de biotina, cada una de las cuales está unida covalentemente a través de un enlace amida en el que participa el grupo ε-amino de un residuo de lisina. La piruvato carboxilasa actúa a través de un mecanismo de dos pasos (Figura 14.19), empezando con una carboxilación, dependiente de ATP, del cofactor, para dar *N*-carboxibiotina. Este derivado activado transfiere a continuación el grupo carboxilo directamente al piruvato.

En las plantas y las bacterias, una ruta alternativa conduce directamente desde el fosfoenolpiruvato al oxalacetato. Dado que el fosfoenolpiruvato es un compuesto de energía muy elevada, esta reacción, catalizada por la **fosfoenolpiruvato carboxilasa**, no requiere ni un cofactor energético ni biotina. Esta reacción es importante en la ruta C_4 de la fijación fotosintética de CO_2 (Capítulo 17).



Fosfoenolpiruvato **Oxalacetato**

Una enzima relacionada, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, convierte también el fosfoenolpiruvato en oxalacetato. Dado que la función principal de esta enzima es su papel en la gluconeogénesis, la consideraremos con detalle en el Capítulo 16.

ENZIMA MÁLICA

Además de la piruvato carboxilasa y la fosfoenolpiruvato carboxilasa, un tercer proceso anaplerótico es el que proporciona una enzima a la que se denomina

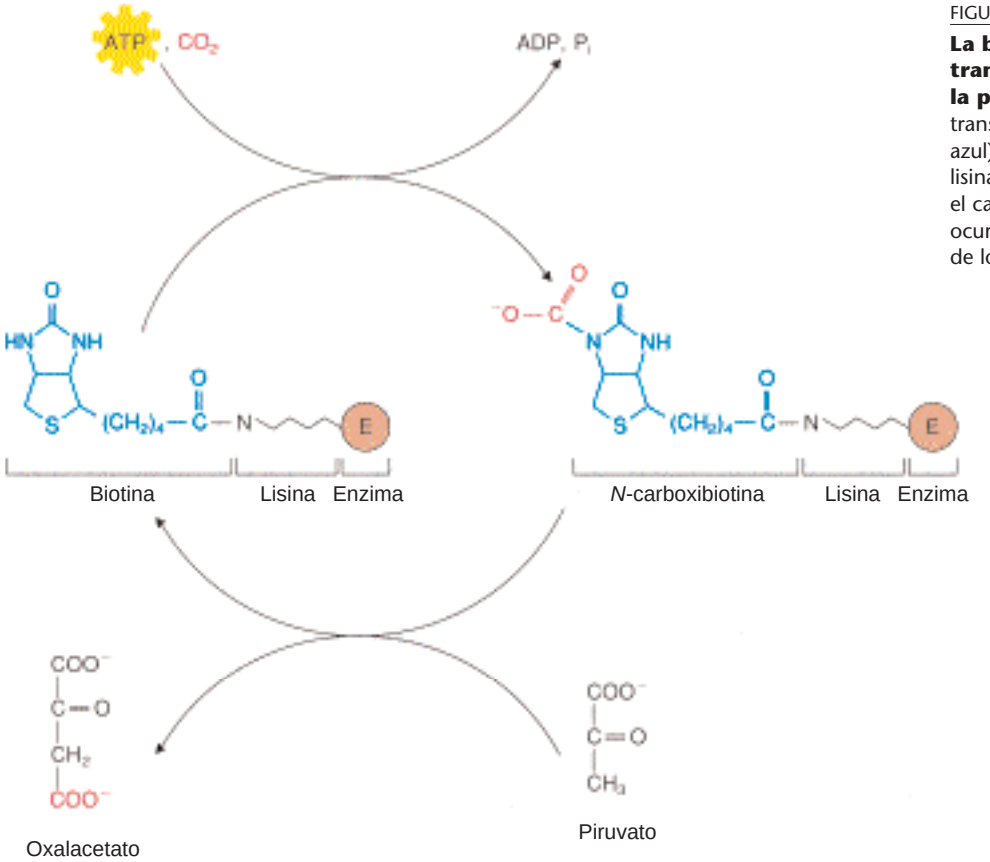


FIGURA **14.19**

La biotina ligada a una enzima, como transportador del CO_2 en la reacción de la piruvato carboxilasa. El CO_2 que se transfiere se indica de color rojo. La biotina (en azul) ligada al grupo ε-amino de un residuo de lisina actúa como brazo oscilante para transferir el carboxilo, de manera muy similar a lo que ocurre con los brazos oscilantes de lipoamida de los complejos α-cetoácido deshidrogenasa.

habitualmente enzima málica, pero cuyo nombre oficial es el de **malato deshidrogenasa** (**descarboxilante:NADP$^+$**). Esta enzima cataliza la carboxilación reductora del piruvato para dar malato.

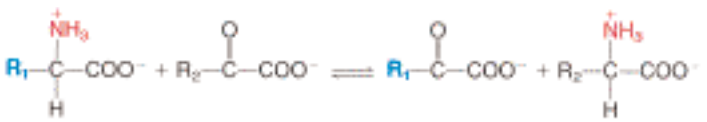


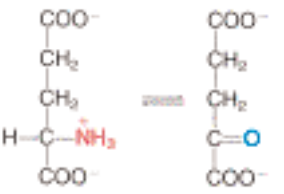
Piruvato **L-Malato**

Esta reacción es formalmente equivalente a la reacción de la isocitrato deshidrogenasa en sentido inverso, de tal manera que el piruvato y el malato son los análogos del α-cetoglutarato y del isocitrato, respectivamente.

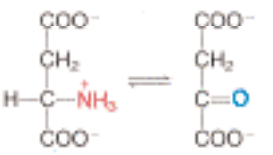
REACCIONES EN LAS QUE PARTICIPAN AMINOÁCIDOS

Aunque generalmente no se clasifican como rutas anapleróticas, las reacciones de **transaminación** pueden considerarse también así, puesto que son reacciones reversibles que pueden producir intermediarios del ciclo del ácido cítrico. En la transaminación, un aminoácido transfiere su grupo amino a un cetoácido y se convierte a su vez en otro cetoácido. El mecanismo se considerará en el Capítulo 20.





Glutamato **α-Cetoglutarato**



Aspartato **Oxalacetato**

El glutamato y el aspartato experimentan una transaminación para generar los intermediarios del ciclo del ácido cítrico α-cetoglutarato y oxalacetato, respectivamente. Así pues, las células que contienen aminoácidos en abundancia pueden convertirlos en intermediarios del ciclo del ácido cítrico mediante una transaminación. Otra enzima, la **glutamato deshidrogenasa**, proporciona una ruta adicional para la síntesis de α-cetoglutarato a partir de glutamato.

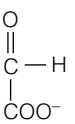
$$\text{Glutamato} + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \alpha\text{-cetoglutarato} + \text{NAD(P)H} + \text{NH}_4^+$$

La glutamato deshidrogenasa, que consideraremos con más detalle en el Capítulo 20, utiliza NAD^+ o $NADP^+$. Al ser reversibles, las transaminaciones y la reacción de la glutamato deshidrogenasa pueden utilizarse tanto para la síntesis de los aminoácidos como para la reposición de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, según las necesidades de la célula.

Por último, muchas plantas y bacterias pueden convertir fragmentos de dos carbonos en intermediarios del ciclo del ácido cítrico de cuatro carbonos, a través del ciclo del glioxilato, que se describe en la sección siguiente.

Ciclo del glioxilato: una variante anabólica del ciclo del ácido cítrico

Desde el punto de vista metabólico, las células vegetales y animales difieren en muchos aspectos importantes. Tiene especial interés aquí el que las células vegetales, junto con algunos microorganismos, puedan realizar la síntesis neta de hidratos de carbono a partir de las grasas. Esta conversión es esencial para el desarrollo de las semillas, en las que gran parte de la energía se almacena en forma de triacilgliceroles. (De hecho, la mayor parte de los aceites vegetales que se venden en los comercios de alimentación son mezclas de triacilgliceroles procedentes de semillas.) Cuando las semillas germinan, el triacilglicerol se degrada y se convierte en azúcares, que aportan la energía y las materias primas necesarias para el crecimiento de la planta. En cambio, las células animales no son capaces de realizar la síntesis neta de hidratos de carbono a partir de las grasas.



Glioxilato

Las plantas sintetizan los azúcares mediante el empleo del **ciclo del glioxilato**, que puede considerarse una variante anabólica del ciclo del ácido cítrico. Para comprender la importancia de este ciclo, consideraremos primero los dos destinos principales de la acetil-CoA en el metabolismo animal: la oxidación a través del ciclo del ácido cítrico y la síntesis de ácidos grasos. Dada la práctica irreversibilidad de la reacción de la piruvato deshidrogenasa, la acetil-CoA no puede experimentar una conversión neta en piruvato y, por tanto, no puede participar en la síntesis *neta* de hidratos de carbono. Ciertamente, los dos carbonos de la acetil-CoA pueden incorporarse al oxalacetato, que es un precursor gluconeogénico eficaz; sin embargo, puesto que se pierden dos carbonos en esta parte del ciclo del ácido cítrico, no se produce una acumulación neta de carbono en los hidratos de carbono. El ciclo del glioxilato permite la síntesis neta de oxalacetato.

El ciclo del glioxilato permite a las plantas y a las bacterias llevar a cabo la conversión neta de las grasas en hidratos de carbono, evitando las reacciones de generación de CO_2 del ciclo del ácido cítrico.

El ciclo del glioxilato (Figura 14.20) es una ruta cíclica que convierte dos unidades acetilo, en forma de acetil-CoA, en una molécula de succinato. La ruta emplea algunas de las enzimas del ciclo del ácido cítrico, pero evita las reacciones en las que se pierde carbono durante el ciclo del ácido cítrico. El segundo mol de acetil-CoA se introduce durante este cortocircuito (Figura 14.20). Así, cada vuelta del ciclo comporta la incorporación de 2 fragmentos de dos carbonos y da lugar a la síntesis neta de una molécula de cuatro carbonos. Este proceso tiene lugar en el **glioxisoma**, un orgánulo especializado que lleva a cabo

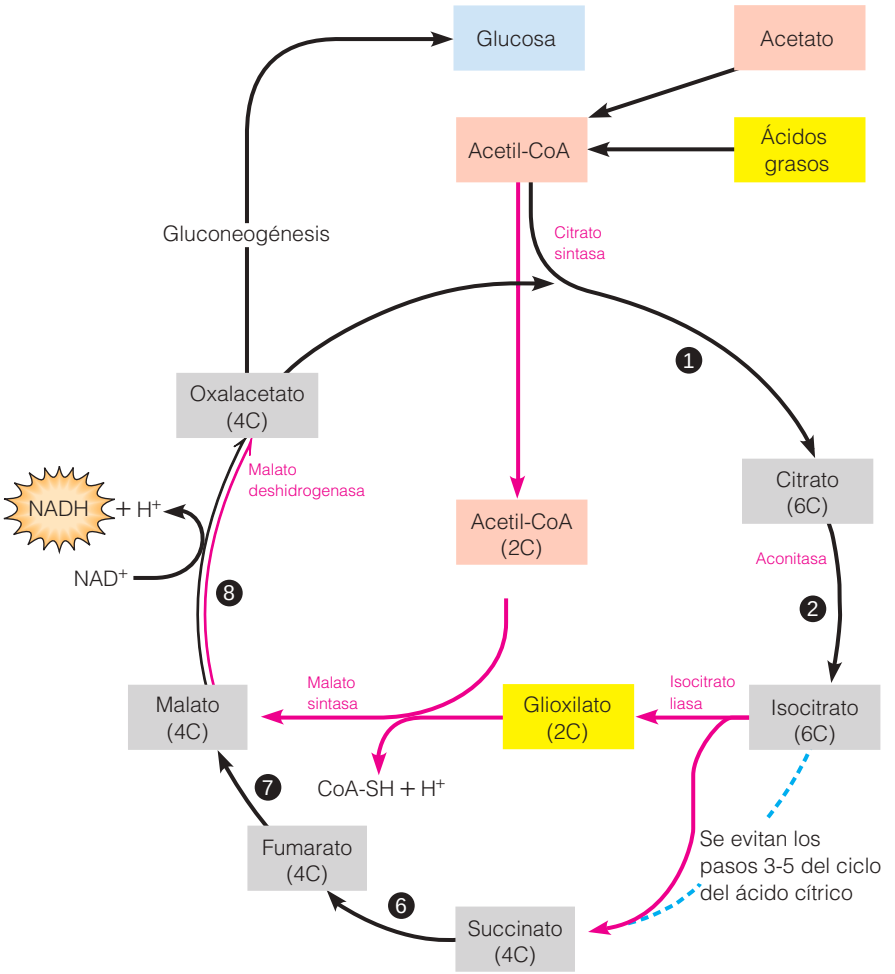


FIGURA **14.20**

Reacciones del ciclo del glioxilato. Las reacciones catalizadas por la isocitrato liasa y la malato sintasa (flechas rojas) evitan los tres pasos del ciclo del ácido cítrico entre el isocitrato y el succinato (flechas azules), de forma que los dos carbonos perdidos en el ciclo del ácido cítrico se salvan, resultando en la síntesis neta de oxalacetato.

tanto la β-oxidación de los ácidos grasos para producir acetil-CoA, como la utilización de esta acetil-CoA en el ciclo del glioxilato (Figura 14.21). El succinato generado se transporta desde el glioxisoma a la mitocondria, donde se convierte, a través de las reacciones 6, 7, y 8 del ciclo del ácido cítrico (véase la Figura 14.3), en oxalacetato. Este último se utiliza fácilmente para la síntesis de hidratos de carbono a través de la gluconeogénesis.

El ciclo del glioxilato permite también a muchos microorganismos metabolizar sustratos de dos carbonos, como el acetato. *E. coli*, por ejemplo, puede crecer en un medio que contenga acetato como única fuente de carbono, igual que pueden hacerlo muchos hongos, protozoos y algas. Estas células sintetizan acetil-CoA, que se utiliza tanto para producir energía, a través del ciclo del ácido cítrico, como para la síntesis de precursores gluconeogénicos, a través del ciclo del glioxilato.

Examinemos ahora las reacciones individuales del ciclo del glioxilato. Como se ha señalado, la acetil-CoA procede de la oxidación de los ácidos grasos. Otra posibilidad es que el propio acetato se convierta en acetil-CoA por la acción de la **acetato tioquinasa**.

$$\text{Acetato} + \text{CoA-SH} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{acetil-CoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

A continuación, la acetil-CoA se condensa con el oxalacetato para producir citrato, de la misma forma que en el ciclo del ácido cítrico, y el citrato reacciona con la aconitasa para dar isocitrato. En este punto, el ciclo del glioxilato di-

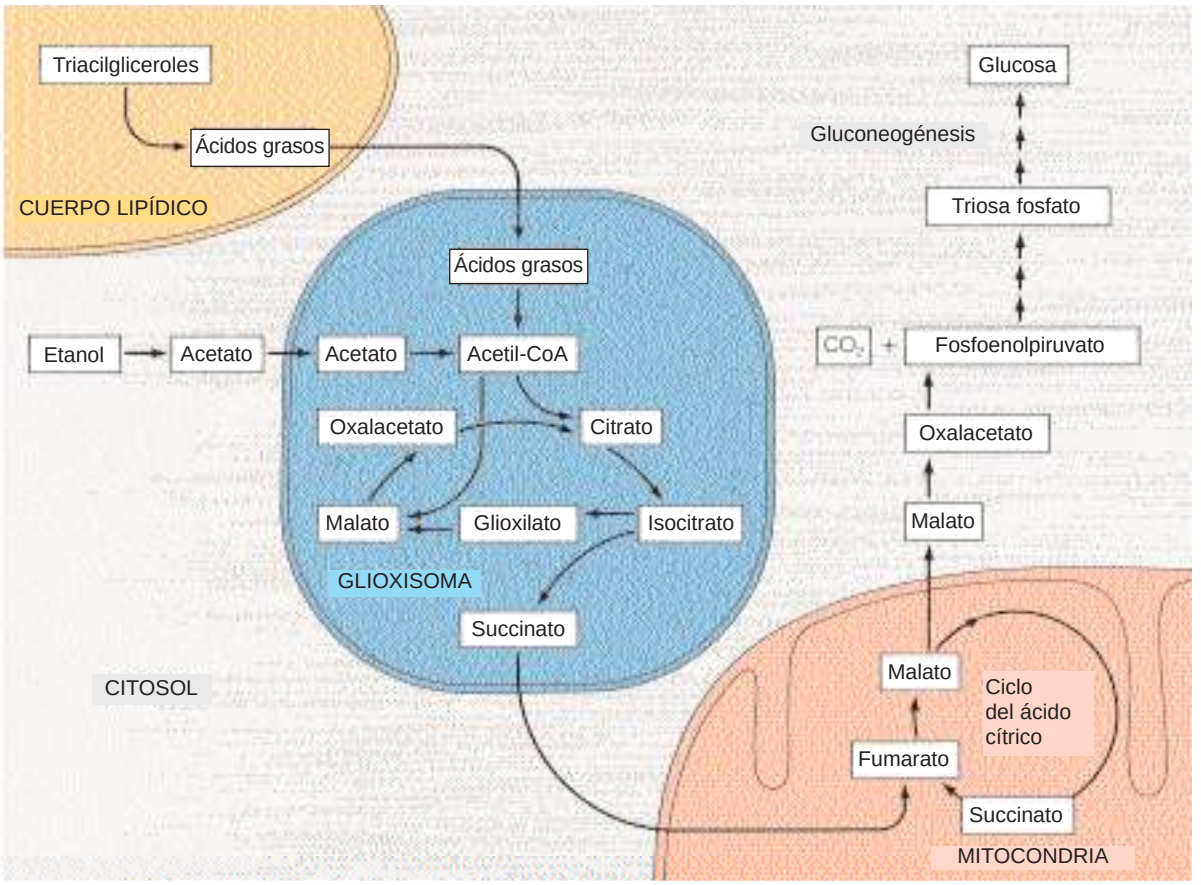
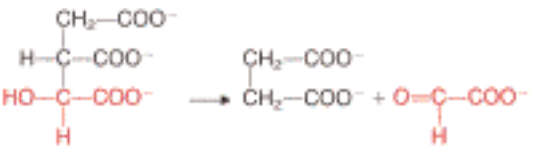


FIGURA **14.21**

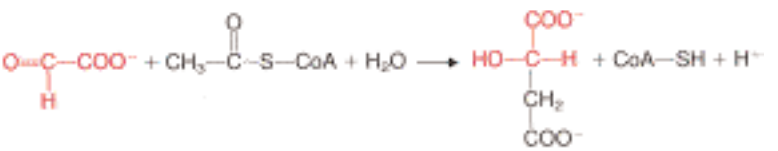
Relaciones intracelulares que afectan al ciclo del glioxilato en las células vegetales. Los ácidos grasos liberados en los cuerpos lipídicos se oxidan en los glioxisomas a acetil-CoA, que puede proceder también directamente del acetato. La acetil-CoA se convierte posteriormente en succinato en el ciclo del glioxilato, y el succinato se transporta a las mitocondrias. Allí se convierte, en el ciclo del ácido cítrico, en oxalacetato, que se convierte a su vez fácilmente en azúcares mediante la gluconeogénesis.

verge respecto al ciclo del ácido cítrico. La siguiente reacción, catalizada por la **isocitrato liasa**, fragmenta el isocitrato en glioxilato y succinato.



Isocitrato **Succinato** **Glioxilato**

A continuación, el glioxilato acepta acetato de otra acetil-CoA, en una reacción catalizada por la **malato sintasa**.



Glioxilato **Acetil-CoA** **Malato**

Desde el punto de vista del mecanismo, esta reacción es comparable a la que cataliza la citrato sintasa, que implica un ataque nucleófilo de la forma carbanión de la acetil-CoA sobre un carbono carbonílico, en este caso el carbono aldehído del glioxilato. El malato se deshidrogena a continuación para regenerar oxalacetato. La enzima que interviene en este proceso, la malato deshidrogenasa, se encuentra en los glioxisomas, y es distinta de la forma mitocondrial de la enzi-

ma, que participa en el ciclo del ácido cítrico. Lo mismo puede decirse de la citrato sintasa y de la aconitasa.

Como se ha señalado antes, el ciclo del glioxilato da lugar a la conversión neta de 2 fragmentos de dos carbonos, acetil-CoA, en un compuesto de cuatro carbonos, succinato, como se indica en la siguiente ecuación equilibrada.

$$2\ \text{Acetil-CoA} + \text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{succinato} + \text{NADH} + 3\text{H}^+ + 2\text{CoA-SH}$$

El destino principal del succinato es su entrada en la gluconeogénesis mediante su conversión en oxalacetato.

Una ruta de biosíntesis que oxida la glucosa: la ruta de las pentosas fosfato

La ruta predominante del catabolismo de la glucosa es la glucólisis para dar piruvato, seguida por la oxidación a CO_2 en el ciclo del ácido cítrico. Un proceso alternativo, la **ruta de las pentosas fosfato** es una ruta notable con varias finalidades que actúa en grados variables en diversas células y tejidos. La función de esta ruta es fundamentalmente anabólica más que catabólica, pero presentamos la ruta en este capítulo porque comporta la oxidación de la glucosa y en ciertos casos puede actuar para oxidar la glucosa por completo hasta CO_2 y agua. La ruta, que actúa exclusivamente en el citosol, se resume en la Figura 14.22.

La ruta de las pentosas fosfato tiene dos funciones principales: (1) proporcionar NADPH para la biosíntesis reductora, y (2) proporcionar ribosa-5-fosfato para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos. Además, la ruta actúa para metabolizar las pentosas del alimento, procedentes principalmente de la digestión de los ácidos nucleicos. En las plantas existe una variante de la ruta de

La ruta de las pentosas fosfato genera fundamentalmente NADPH para la biosíntesis reductora y ribosa-5-fosfato para la biosíntesis de nucleótidos.

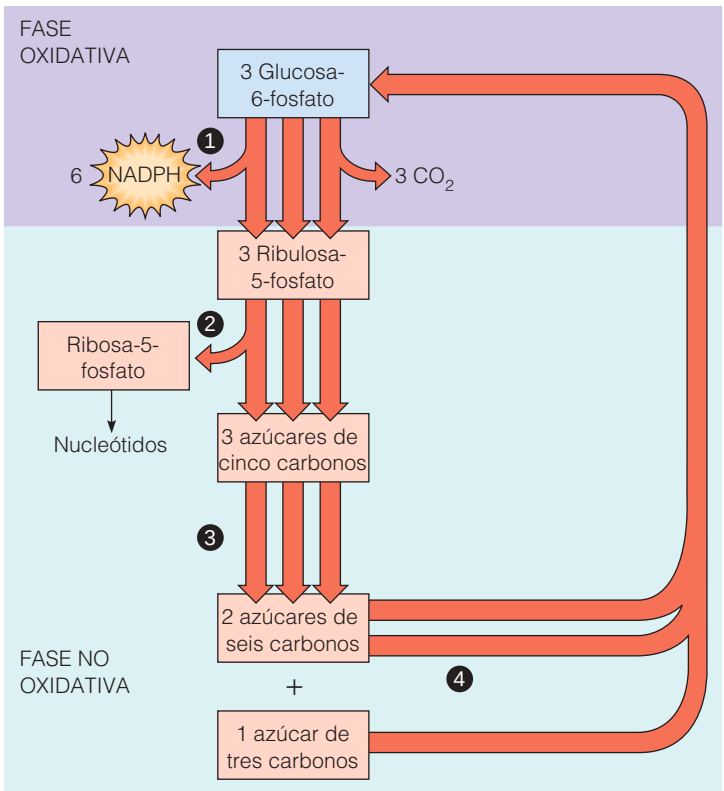


FIGURA **14.22**

Estrategia global de la ruta de las pentosas fosfato. La ruta de las pentosas fosfato convierte la glucosa en otros azúcares, que pueden utilizarse para la obtención de energía. Sin embargo, sus productos más importantes son el NADPH y la ribosa-5-fosfato. En el **paso 1**, la fase oxidativa, la glucosa-6-fosfato se oxida a ribulosa-5-fosfato y CO_2, con la producción de NADPH. (Las tres reacciones que intervienen en este paso se muestran en la Figura 14.23.) Los demás pasos constituyen la fase no oxidativa de la ruta. En el **paso 2**, parte de la ribulosa-5-fosfato se convierte en otros azúcares de cinco carbonos, incluyendo la ribosa-5-fosfato. La ribosa fosfato puede utilizarse en la síntesis de nucleótidos (su uso principal) o en el paso siguiente de la ruta de las pentosas fosfato. En el **paso 3**, una serie de reacciones convierten tres moléculas de azúcares de cinco carbonos en dos moléculas de un azúcar de seis carbonos y una de un azúcar de tres carbonos. En el **paso 4**, algunos de estos azúcares se convierten en glucosa-6-fosfato, y el ciclo se repite. La Figura 14.25 presenta una visión general más detallada de la ruta y muestra de qué forma varía bajo distintas condiciones metabólicas.

las pentosas fosfato que actúa en sentido inverso como parte del proceso de fijación del carbono de la fotosíntesis (véase el Capítulo 17).

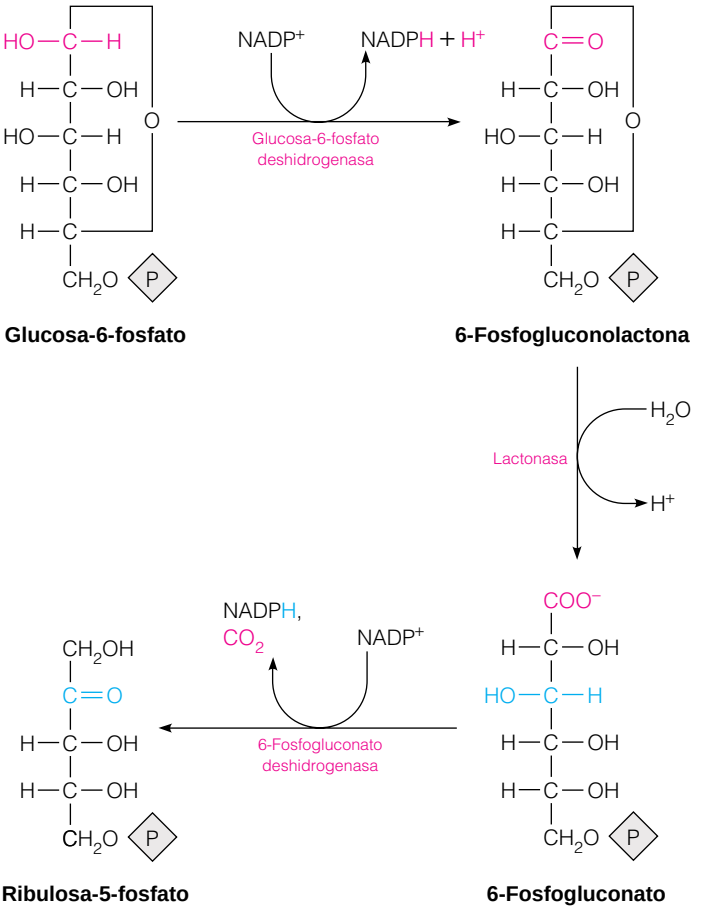
Recuérdese del Capítulo 12 que el $NADP^+$ es idéntico al NAD^+ excepto por el fosfato 2′ adicional en una de las fracciones de ribosa del $NADP^+$. Metabólicamente, la diferencia entre el NAD^+ y el $NADP^+$ es que las enzimas ligadas al nucleótido de nicotinamida, cuya función principal es *oxidar* sustratos, utilizan el par NAD^+/NADH, mientras que las enzimas que actúan fundamentalmente en una dirección *reductora* emplean el $NADP^+$ y el NADPH. Dado que el NADPH se utiliza para la biosíntesis de los ácidos grasos y los esteroides, algunos tejidos como las glándulas suprarrenales, el hígado, el tejido adiposo y la glándula mamaria tienen un contenido abundante de enzimas de la ruta de las pentosas fosfato. El NADPH constituye también la fuente última de electrones para la reducción de los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos para la síntesis de DNA, por lo que las células que proliferan rápidamente tienen generalmente una actividad elevada de las enzimas de la ruta de las pentosas fosfato, para la producción de NADPH y de ribosa-5-fosfato.

FASE OXIDATIVA: GENERACIÓN DE PODER REDUCTOR EN FORMA DE NADPH

Resulta útil considerar la ruta de las pentosas fosfato como un mecanismo que actúa en dos fases: oxidativa y no oxidativa. Dos de las tres primeras reacciones de esta ruta son oxidativas, y cada una de ellas comporta la reducción de un $NADP^+$ a NADPH. Como se muestra en la Figura 14.23, la primera reacción, catalizada por la **glucosa-6-fosfato deshidrogenasa**, oxida la glucosa-6-fosfato a 6-

FIGURA **14.23**

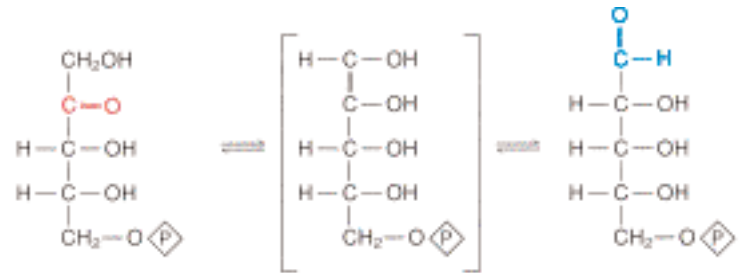
Fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato. Las tres reacciones de la fase oxidativa incluyen dos oxidaciones, que producen NADPH.



fosfogluconolactona, la correspondiente **lactona** (un éster interno que une los carbonos 1 y 5). La 6-fosfogluconolactona se hidroliza por una **lactonasa** específica a **6-fosfogluconato**, que experimenta una descarboxilación oxidativa, para dar CO_2, otro NADPH y **ribulosa-5-fosfato** (una pentosa fosfato). El resultado neto de la fase oxidativa es la generación de 2 moles de NADPH, la oxidación de un carbono a CO_2 y la síntesis de 1 mol de pentosa fosfato.

FASE NO OXIDATIVA: DESTINOS ALTERNATIVOS DE LAS PENTOSAS FOSFATO

En la fase no oxidativa, parte de la ribulosa-5-fosfato producida en la fase oxidativa se convierte en ribosa-5-fosfato por la **fosfopentosa isomerasa**.



Ribulosa-5-fosfato **Intermediario enediol** **Ribosa-5-fosfato**

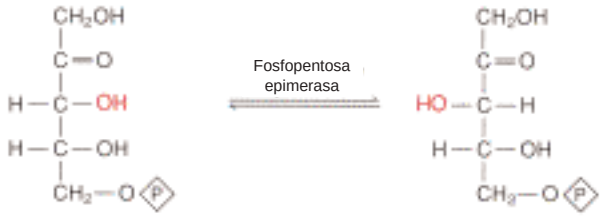
La reacción se produce a través de un intermediario enediol, igual que en dos reacciones diferentes de la glucólisis, las catalizadas por la triosa fosfato isomerasa (véase la página 510) y la fosfoglucoisomerasa (véase la página 508).

Producción de azúcares fosfato de seis carbonos y de tres carbonos
En esta fase, se han realizado ya las funciones principales de la ruta, es decir, la generación de NADPH y de ribosa-5-fosfato. Podemos escribir la siguiente ecuación equilibrada para lo que ha sucedido hasta ahora:

$$\text{Glucosa-6-fosfato} + 2\text{NADP}^+ \longrightarrow \text{ribosa-5-fosfato} + CO_2 + 2\text{NADPH} + 2H^+$$

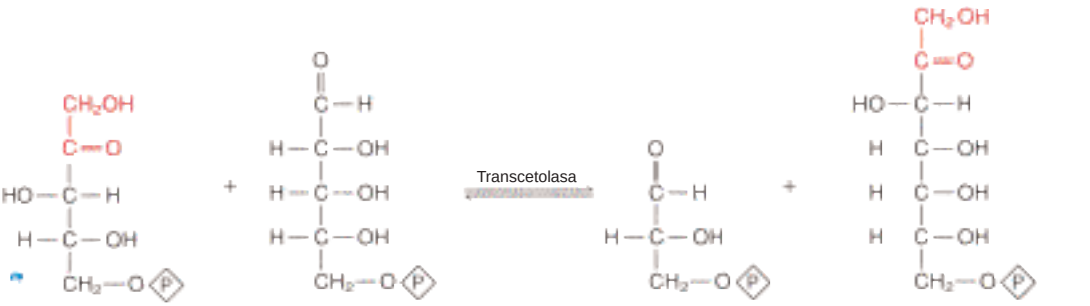
Muchas células necesitan el NADPH para la biosíntesis reductora, pero no necesitan la ribosa-5-fosfato en cantidades tan elevadas. ¿De qué manera se cataboliza, pues, esta ribosa-5-fosfato? El proceso implica una serie de transformaciones del azúcar fosfato que pueden parecer complicadas, pero que tienen un resultado sencillo. *La secuencia de reacción convierte 3 azúcares fosfato de cinco carbonos en 2 azúcares fosfato de seis carbonos y 1 azúcar fosfato de tres carbonos.* Las hexosas fosfato que se forman pueden catabolizarse, bien mediante su reciclado a través de la ruta de las pentosas fosfato, o bien mediante la glucólisis. La triosa fosfato es el gliceraldehído-3-fosfato, un intermediario glucolítico. Intervienen en el proceso tres enzimas: **fosfopentosa epimerasa**, **transcetolasa** y **transaldolasa**.

La ruta se inicia con la ribulosa-5-fosfato y la ribosa-5-fosfato, habiéndose formado esta última por la fosfopentosa isomerasa. La fosfopentosa epimerasa convierte la ribulosa-5-fosfato en su epímero, la xilulosa-5-fosfato.



Ribulosa-5-fosfato **Xilulosa-5-fosfato**

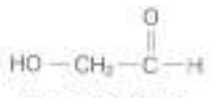
Un mol de xilulosa-5-fosfato reacciona a continuación con un mol de ribosa-5-fosfato. La reacción la cataliza la **transcetolasa**, que transfiere un fragmento de dos carbonos desde la xilulosa-5-fosfato a la ribosa-5-fosfato para dar una triosa fosfato, el gliceraldehído-3-fosfato, y un azúcar de siete carbonos, la **sedoheptulosa-7-fosfato**.



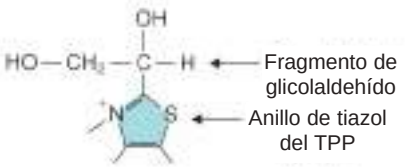
Xilulosa-5-fosfato **Ribosa-5-fosfato** **Gliceraldehído-3-fosfato** **Sedoheptulosa-7-fosfato**

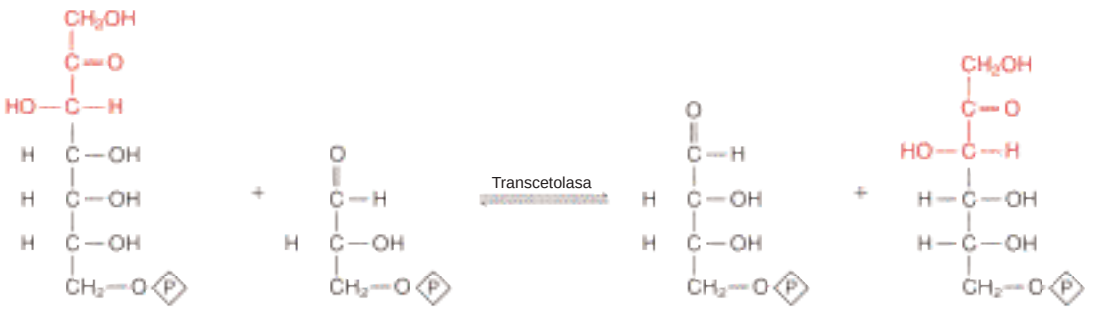
El fragmento de dos carbonos transferido es un fragmento **glicolaldehído** activado. Recuérdese que la piruvato deshidrogenasa transfiere un fragmento *acetaldehído* activo, con la ayuda del pirofosfato de tiamina (TPP). La transcetolasa necesita también TPP como cofactor, de manera que el fragmento de dos carbonos se une de forma transitoria al carbono 2 del anillo de tiazol del TPP. El mecanismo de activación y transferencia de los fragmentos de dos carbonos es muy similar en las reacciones catalizadas por estas dos enzimas.

A continuación, la transaldolasa actúa sobre los dos productos de la reacción de la transcetolasa, con la transferencia de una unidad **dihidroxiacetona** de tres carbonos, procedente del sustrato de siete carbonos, al sustrato de tres carbonos. Los productos son un azúcar fosfato de cuatro carbonos y un azúcar fosfato de seis carbonos: la **eritrosa-4-fosfato** y la fructosa-6-fosfato, respectivamente. Las acciones combinadas de la transcetolasa y la transaldolasa convierten 2 azúcares fosfato de cinco carbonos en un azúcar fosfato de cuatro carbonos y un azúcar fosfato de seis carbonos.



Glicolaldehído





Sedoheptulosa-7-fosfato **Gliceraldehído-3-fosfato** **Eritrosa-4-fosfato** **Fructosa-6-fosfato**

En la Figura 14.24 se muestra con mayor detalle la reacción de la transaldolasa. La enzima activa el sustrato cetosa mediante la formación de una base de Schiff con un residuo de lisina de la enzima (paso 1). La protonación de la base de Schiff conduce a la ruptura del enlace carbono-carbono, de forma muy parecida a lo que ocurre en la reacción de la fructosa-bisfosfato aldolasa de la glucólisis (véase la página 509), con la liberación de una aldosa fosfato de cuatro carbonos (paso 2). La unidad dihidroxiacetona permanece unida en forma

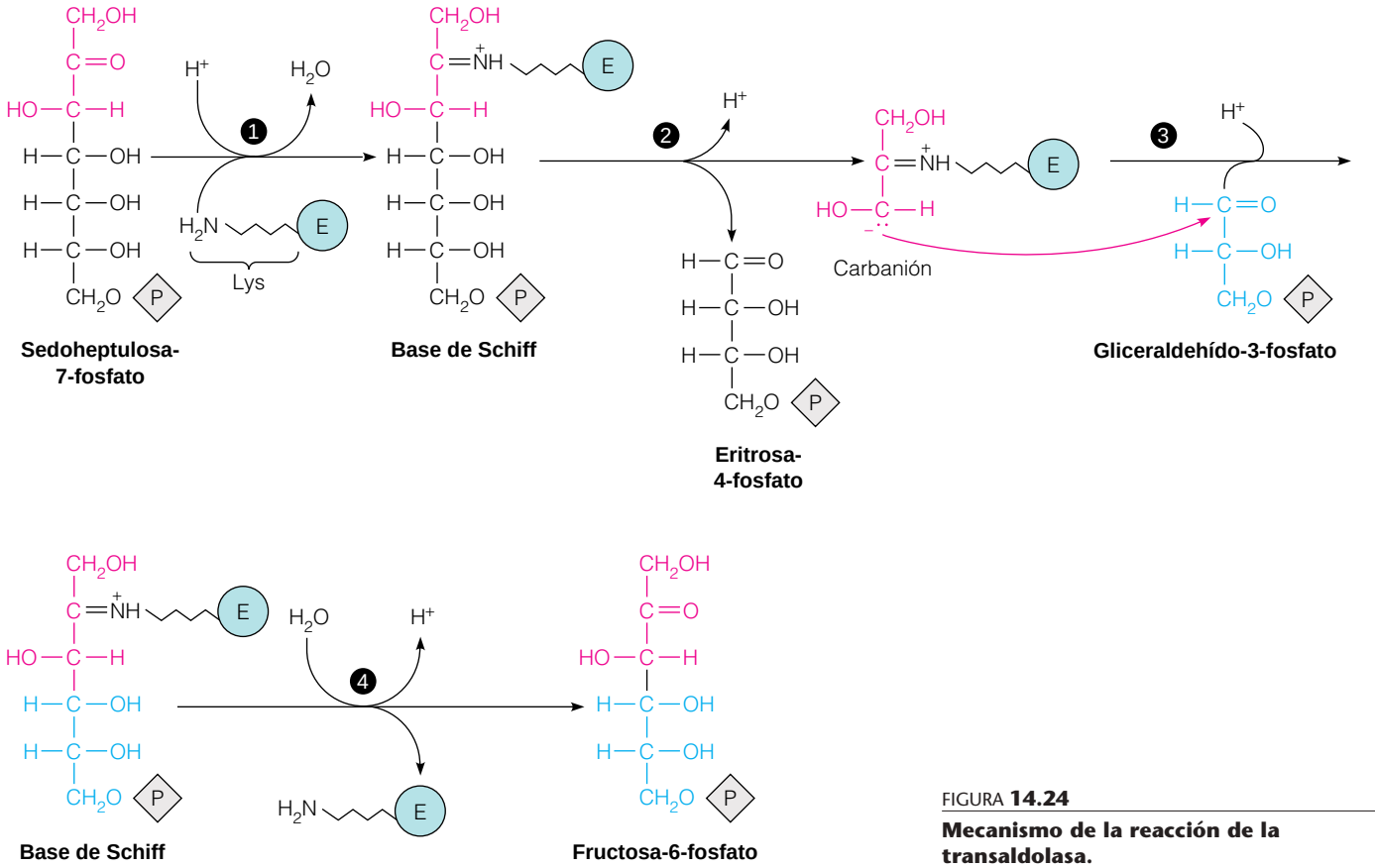
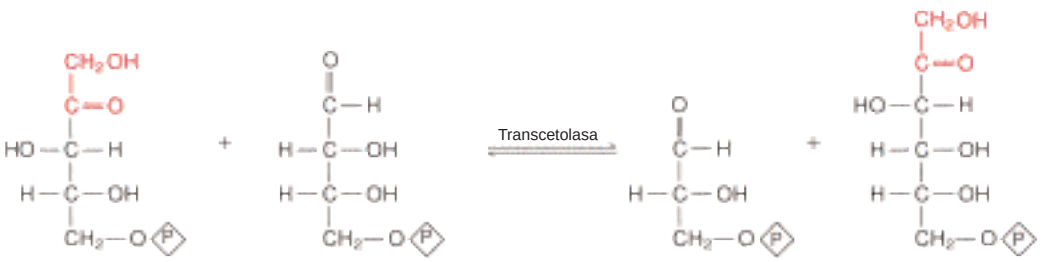


FIGURA **14.24**
Mecanismo de la reacción de la transaldolasa.

de carbanión estabilizado por resonancia, que ataca luego al carbono carbonílico del gliceraldehído-3-fosfato, en una reacción de condensación aldólica (paso 3). La hidrólisis de la base de Schiff da lugar al producto de seis carbonos fructosa-6-fosfato (paso 4). En la reacción final del catabolismo de las pentosas fosfato, la transcetolasa actúa sobre otra molécula de xilulosa-5-fosfato, transfiriendo un fragmento glicolaldehído a la eritrosa-4-fosfato y generando un producto de tres carbonos y un producto de seis carbonos, el gliceraldehído-3-fosfato y la fructosa-6-fosfato, respectivamente.



Hasta el momento, la ruta ha necesitado la entrada de tres moléculas de pentosa fosfato: dos para la primera reacción de la transcetolasa y una para la segunda. Así pues, para resumir la ruta hasta este punto, debemos considerar el paso de tres moléculas de glucosa-6-fosfato a través de la fase oxidativa.

$$3\ \text{Glucosa-6-fosfato} + 6\text{NADP}^+ + 3\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 3\ \text{pentosa-5-fosfato} + 6\text{NADPH} + 6\text{H}^+ + 3\text{CO}_2$$

Ahora, los reordenamientos de la fase no oxidativa dan lugar a la conversión de tres pentosas fosfato en 2 azúcares fosfato de seis carbonos y 1 de tres carbonos.



Así pues, podemos escribir una ecuación equilibrada de toda la ruta tal como sigue.



Ajuste de la ruta de las pentosas fosfato a las necesidades específicas

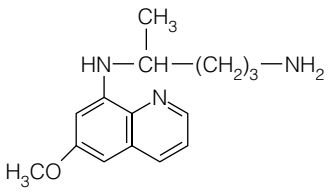
En la ecuación correspondiente a la reacción global, tres hexosas fosfato producen dos hexosas fosfato, una triosa fosfato y tres moléculas de CO_2, con una oxidación neta de tres carbonos a CO_2. Así pues, en un sentido formal, la ruta puede considerarse una forma de oxidar los seis carbonos de la glucosa-6-fosfato a CO_2, de la misma forma que ocurre en la glucólisis y en el ciclo del ácido cítrico.

Sin embargo, como se ha señalado antes, la ruta de las pentosas fosfato no es fundamentalmente una ruta de generación de energía. El destino real de los azúcares fosfato depende de las necesidades metabólicas de la célula en la que se está produciendo la ruta. Si la necesidad principal radica en la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, el principal producto es la ribosa-5-fosfato, y no se producen la mayor parte de los reordenamientos de la fase no oxidativa (Figura 14.25a). Si la necesidad principal es la generación de NADPH (para la síntesis de ácidos grasos o de esteroides), la fase no oxidativa genera compuestos que pueden reconvertirse con facilidad en glucosa-6-fosfato, para el paso posterior por la fase oxidativa (Figura 14.25b). En este modo, las vueltas repetidas del ciclo dan lugar finalmente a la oxidación completa de la glucosa-6-fosfato a CO_2 y agua, con la máxima generación de equivalentes reductores.

Por último, en una célula con unas necesidades moderadas de NADPH y de pentosas fosfato, la fructosa-6-fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato producidos en la fase no oxidativa pueden catabolizarse en mayor medida mediante la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico (Figura 14.25c). Dadas las múltiples necesidades metabólicas de una célula para la biosíntesis, es improbable que ninguno de estos tres modos de actuación se emplee de manera exclusiva en una determinada célula.

TRASTORNOS GENÉTICOS HUMANOS QUE AFECTAN A ENZIMAS DE LA RUTA DE LAS PENTOSAS FOSFATO

La ruta de las pentosas fosfato es especialmente activa en la generación de poder reductor en los eritrocitos de los vertebrados. La importancia de esta actividad se puso de manifiesto mediante la investigación de un trastorno genético humano bastante frecuente, el déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.



Primaquina

Durante la Segunda Guerra Mundial, se administró profilácticamente el fármaco antipalúdico primaquina a los miembros de las fuerzas armadas. Como consecuencia de ello, una parte importante de los militares, en los que posteriormente se comprobó que existía un déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, presentaron una anemia hemolítica grave (destrucción masiva de los eritrocitos). Estas personas eran sensibles también a diversos compuestos que, como la primaquina, generan un estrés oxidativo, que se manifiesta por la aparición de peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos en los eritrocitos. Posteriormente se vio que estas personas eran deficitarias de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

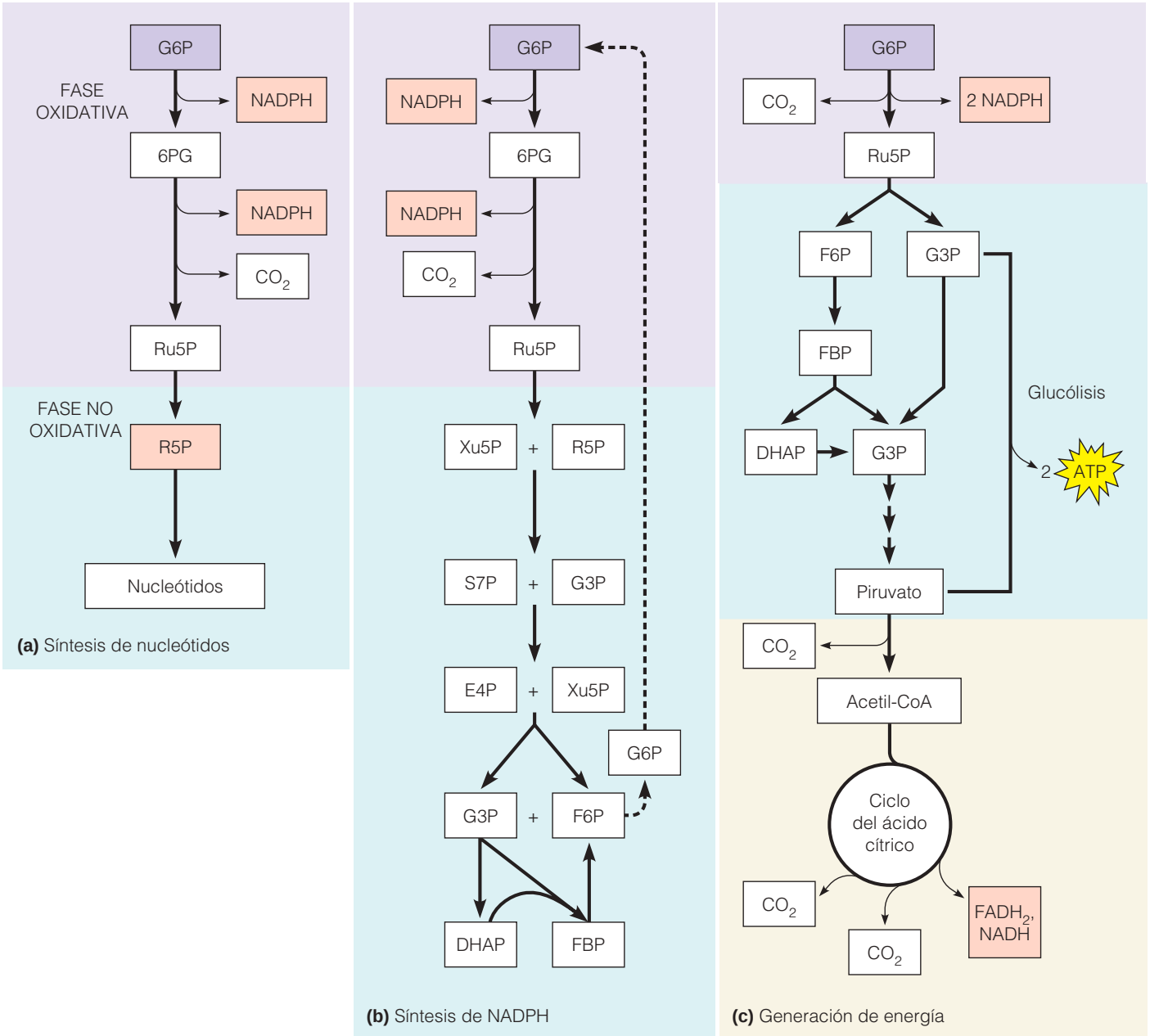
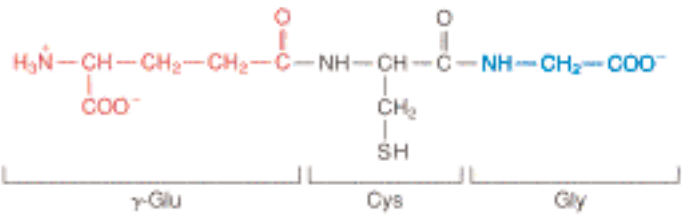


FIGURA **14.25**

Rutas alternativas de las pentosas fosfato. La ruta de las pentosas fosfato tiene diversos modos de funcionamiento para satisfacer diferentes necesidades metabólicas. **(a)** Cuando la necesidad principal es la biosíntesis de nucleótidos, el producto principal es la ribosa-5-fosfato. Los equivalentes reductores del NADPH se utilizan para reducir los ribonucleótidos a los desoxirribonucleótidos (Capítulo 22). **(b)** Cuando la necesidad principal es el poder reductor (NADPH), la fructosa fosfato se reconvierte en glucosa-6-fosfato para su reoxidación en la fase oxidativa. **(c)** Cuando tan sólo son necesarias cantidades moderadas de pentosas fosfato y NADPH, la ruta puede utilizarse también para el aporte de energía, de tal manera que los productos de la reacción se oxidan mediante la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico. Abreviaturas: G6P = glucosa-6-fosfato; 6PG = 6-fosfogluconato; R5P = ribosa-5-fosfato; Ru5P = ribulosa-5-fosfato; Xu5P = xilulosa-5-fosfato; S7P = sedoheptulosa-7-fosfato; G3P = gliceraldehído-3-fosfato; E4P = eritrosa-4-fosfato; F6P = fructosa-6-fosfato; DHAP = dihidroxiacetona fosfato; FBP = fructosa-1,6-bisfosfato.

La sensibilidad anormal a los fármacos contra el paludismo se debe a las mutaciones que afectan a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

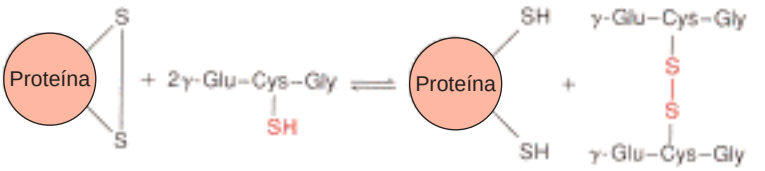
En condiciones normales, los peróxidos se inactivan a través de la reducción por el **glutatión**, que es el tripéptido γ-glutamilcisteinilglicina.



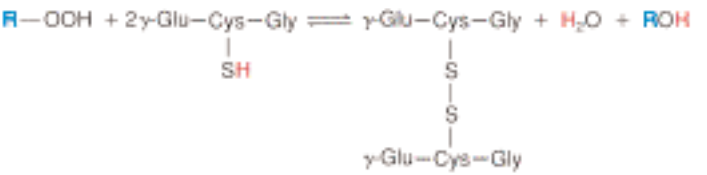
Glutatión

El glutatión, un tripéptido con un contenido tiólico abundante, es un importante reductor intracelular.

El glutatión es abundante en la mayoría de las células, y gracias a su grupo tiol libre, constituye un importante mecanismo de protección frente al estrés oxidativo. Así por ejemplo, el glutatión ayuda a mantener en el estado reducido los grupos tiol de las cisteínas de las proteínas. Si dos grupos tiol se oxidan, pueden reducirse sin intervención enzimática por el glutatión.



Y, como se ha indicado, el glutatión da lugar también a la reducción de los peróxidos; ésta es una reacción enzimática catalizada por la **glutatión peroxidasa** (véase la página 620).



El glutatión oxidado (GSSG) se reduce por la enzima **glutatión reductasa** dependiente del NADPH.

$$GSSG + NADPH + H^+ \longrightarrow 2GSH + NADP^+$$

Esta enzima, dependiente del FAD, actúa básicamente de manera unidireccional, por lo que la relación del glutatión reducido (GSH) respecto al glutatión oxidado en la mayoría de las células es de aproximadamente 500 a 1.

En el eritrocito, una función especialmente importante del glutatión es la de mantener la hemoglobina en el estado reducido (Fe^{2+}); recuérdese que la metahemoglobina (Fe^{3+}) no es funcional (véase la página 241). Así pues, el eritrocito es especialmente sensible al agotamiento del glutatión reducido; y puesto que la ruta de las pentosas fosfato es prácticamente la única ruta para la generación de NADPH, el eritrocito es particularmente vulnerable a las situaciones que deterioran el flujo a través de esta ruta y reducen, por tanto, las concentraciones intracelulares de NADPH. De este modo, las personas que eran deficitarias de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa eran las más sensibles a la primaquina.

En la mayor parte de los casos de déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la enzima de los eritrocitos no es totalmente inactiva, sino que presenta una reducción de la actividad de unas 10 veces. Las personas con este déficit son asintomáticas hasta que se ven sometidas a un estrés. Es decir, son asintomáticas hasta que la primaquina o un producto relacionado genera una cantidad de pe-

róxidos suficiente que agoten el GSH disponible. La reducción del GSSG resultante para producir de nuevo GSH se ve alterada, puesto que las concentraciones de NADPH son insuficientes para permitir la función de la glutatión reductasa. Ello hace que se acumule metahemoglobina (Fe^{3+}) a costa de la hemoglobina, lo que modifica la estructura de la célula, debilitando la membrana y haciéndola vulnerable a la ruptura o hemólisis.

Es interesante señalar que el déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, como el rasgo drepanocítico, confiere resistencia frente al paludismo causado por *Plasmodium falciparum* (véase el Capítulo 7). Así pues, el déficit constituye un valor positivo para la supervivencia en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, en las que el paludismo es frecuente. Ello explica la observación de que el déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se ve con mayor frecuencia en las personas de origen africano o mediterráneo.

Otro trastorno genético relacionado con la ruta de las pentosas fosfato es el **síndrome de Wernicke-Korsakoff**. Este trastorno mental se asocia con pérdida de la memoria y parálisis parcial, y se produce cuando las personas afectadas sufren un déficit moderado de tiamina. Los síntomas se manifiestan con frecuencia en los alcohólicos, cuya alimentación puede implicar un déficit vitamínico.

El fundamento del síndrome de Wernicke-Korsakoff es una alteración de la transcetolasa que reduce su afinidad por el pirofosfato de tiamina unas 10 veces. Otras enzimas dependientes de TPP, en especial la piruvato deshidrogenasa y la α-cetoglutarato deshidrogenasa, no se ven afectadas. Los síntomas de la enfermedad se manifiestan cuando las concentraciones de TPP descienden por debajo de los valores necesarios para saturar la transcetolasa anormal. Las personas normales contienen una transcetolasa que une el TPP con la fuerza suficiente para que no se produzca un cambio de la función enzimática como resultado de estos déficit de tiamina leves o moderados.

El déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y el síndrome de Wernicke-Korsakoff, como la drepanocitosis (Capítulo 7), ilustran la interdependencia de los factores genéticos y ambientales en la aparición de la enfermedad clínica. Los síntomas de la alteración hereditaria se manifiestan tan sólo después de que se produzca algún tipo de estrés moderado que no afecta a las personas normales.

Una mutación de la transcetolasa que incrementa su K_M para el TPP es responsable de las dificultades neurológicas del síndrome de Wernicke-Korsakoff.

RESUMEN

El ciclo del ácido cítrico es la ruta central de oxidación de los hidratos de carbono, los lípidos y las proteínas. Un participante principal de esta ruta cíclica es el piruvato producido en la glucólisis, que sufre una oxidación a acetil-CoA por el complejo piruvato deshidrogenasa. Este sistema que contiene tres enzimas utiliza cinco coenzimas: NAD^+, CoA-SH, FAD, lipoamida y pirofosfato de tiamina. Cada vuelta del ciclo del ácido cítrico comporta la entrada de dos carbonos en forma de grupo acetilo de la acetil-coenzima A y la pérdida de dos carbonos como CO_2. La acetil-CoA se condensa con el oxalacetato para formar citrato. Después de una vuelta del ciclo, el oxalacetato se regenera, iniciando de nuevo el proceso. Durante el ciclo se generan transportadores electrónicos reducidos, fundamentalmente NADH, y su reoxidación en las mitocondrias aporta la energía para la síntesis de ATP. Las reacciones anapleróticas reponen los intermediarios del ciclo del ácido cítrico que se consumen en las rutas de biosíntesis. En las plantas y las bacterias, el ciclo del glioxilato cortocircuita las reacciones de descarboxilación del ciclo del ácido cítrico, permitiendo que la acetil-CoA experimente una conversión neta en hidratos de carbono. Una ruta alternativa de oxidación de los hidratos de carbono, la ruta de las pentosas fosfato, genera NADPH para la biosíntesis reductora y pentosas fosfato para la biosíntesis de nucleótidos.

BIBLIOGRAFÍA

Regulación del ciclo del ácido cítrico

Atkinson, D. E. (1977) *Cellular Energy Metabolism and Its Regulation.* Academic Press, Nueva York. Comentarios provocadores de la persona que dio origen al concepto de carga energética de adenilato.

Hurley, J. H., A. M. Dean, J. L. Sohl, D. E. Koshland, Jr. y R. M. Stroud (1990) Regulation of an enzyme by phosphorilation at the active site. *Science* 249:1012-1046. La isocitrato deshidrogenasa cambia su estructura muy poco tras la fosforilación, pero el lugar activo se hace inaccesible para el sustrato.

McCormack, J. G. y R. M. Denton (1986) Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 11:258-262. Breve revisión de la relación entre las concentraciones intramitocondriales de calcio y las demandas de generación de energía.

Enzimas del ciclo del ácido cítrico y rutas relacionadas

Gruer, M. J., P. J. Artymiuk y J. R. Guest (1997) The aconitase family: Three structural variations on a common theme. *Trends Biochem. Sci.* 22:3-6. La proteína con hierro-azufre aconitasa tiene varios parientes evolutivos que participan en la catálisis y la regulación del metabolismo del hierro.

Kern, D., G. Kern, H. Neef, K. Tittmann, M. Killenberg-Jabs, C. Wilkner, G. Schneider y G. Hübner (1997) How thiamine diphosphate is activated in enzymes. *Science* 275:67-70. Este artículo describe experimentos de RMN que establecen cómo se forman los carbaniones reactivos en las reacciones que dependen del pirofosfato de tiamina.

Knowles, J. R. (1989) The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 58:195-221. Relaciones y mecanismos evolutivos, con especial referencia a la piruvato carboxilasa.

Mattevi, A., G. Obmolova, E. Schulze, K. H. Kalk, A. H. Westphal, A. de Kok y W. G. J. Hol (1992) Atomic structure of the cubic core of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Science* 255:1544-1550. Análisis cristalográfico de rayos X del componente E_2.

Patel, M. S. y T. E. Roche (1990) Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J.* 4:3224-3232. Análisis actual de la regulación de la oxidación del piruvato en relación con las estructuras de las enzimas del complejo.

Popják, G. (1970) Stereospecificity of enzymic reactions. En: *The Enzymes*, 3.ª ed., Vol. 2, editado por P. D. Boyer, pp. 115-215. Academic Press, Nueva York. Una revisión general de temas estereoquímicos con referencia especial a la aconitasa y otras enzimas del ciclo del ácido cítrico.

Velot, C., M. B. Mixon, M. Teige y P. A. Srere (1997) Model of a quinary structure between Krebs TCA cycle enzymes: A model for the metabolon. *Biochemistry* 36:14271-14276. Este artículo describe un planteamiento experimental nuevo para entender cómo interaccionan entre ellas las enzimas que catalizan reacciones secuenciales y así facilitar la catálisis de las rutas con varios pasos.

Fundamentos experimentales del ciclo del ácido cítrico

Krebs, H. A. (1970) The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14:154-170. Una descripción histórica, realizada por la persona a la que se debe la mayor parte de la historia.

Snell, E. E. (1993) From bacterial nutrition to enzyme structure: A personal odyssey. *Annu. Rev. Biochem.* 62:1-28. Memorias de uno de los científicos que intervinieron de manera más directa en los descubrimientos de las vitaminas y las coenzimas.

Ciclo del glioxilato

Tolbert, N. E. (1981) Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Annu. Rev. Biochem.* 50:133-158. Revisa la biología celular y la bioquímica del ciclo del glioxilato, fundamentalmente en las plantas.

Protección frente a la oxidación intracelular

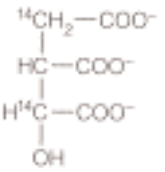
Meister, A. y M. E. Anderson (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52:711-760. Revisa la química y la bioquímica de este importante reductor biológico.

Ortiz de Montellano, P., ed. (1986) *Cytochrome P-450: Structure, Mechanism, and Biochemistry.* Plenum, Nueva York. Un tratado elaborado por varios autores sobre este grupo de enzimas diverso e importante.

PROBLEMAS

1. Diseñe un experimento con un trazador radiactivo que pueda permitirle determinar la proporción del catabolismo de la glucosa que en una determinada preparación tisular se produce a través de la ruta de las pentosas fosfato y la proporción que tiene lugar a través de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico. Suponga que puede sintetizar glucosa marcada con ^{14}C en cualquier posición o combinación de posiciones que se desee. Suponga también que puede capturar el CO_2 tras la administración de glucosa marcada y determinar su radiactividad.
2. Escriba una ecuación química equilibrada de la ruta de las pentosas fosfato en cada uno de los tres modos que se indican en la Figura 14.25: (a) cuando la síntesis de ribosa-5-fosfato es máxima, (b) cuando la producción de NADPH, mediante la conversión de los productos azúcar fosfato en glucosa-6-fosfato para la actuación repetida de la ruta, es máxima, y (c) cuando la fructosa-6-fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato que se generan en cada paso por la ruta se catabolizan mediante la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico.
3. Considere el destino del piruvato marcado con ^{14}C en cada una de las siguientes posiciones: carbono 1 (carboxilo), carbono 2 (carbonilo) y carbono 3 (metilo). Prediga el destino de cada carbono marcado durante una vuelta del ciclo del ácido cítrico.
4. Suponga que la aconitasa *no* se uniera asimétricamente a su sustrato. ¿Qué fracción de los átomos de carbono introducidos como acetil-CoA sería liberada en una vuelta del ciclo? ¿Y en dos vueltas?
5. Se administró [metil-^{14}C]piruvato a células hepáticas aisladas en presencia del malonato suficiente para bloquear por completo la succinato deshidrogenasa. Al cabo de un tiempo, se

aisló el isocitrato y se encontró que contenía el marcaje en el carbono 2 y en el carbono 5:



¿Cómo explica este resultado?

6. Teniendo en cuenta los datos que llevaron a Krebs a proponer una ruta cíclica para la oxidación del piruvato, comente el tipo de pruebas experimentales que podrían haber conducido a detectar la naturaleza cíclica de la ruta del glioxilato.
7. ¿Qué carbono o carbonos de la glucosa, si se metaboliza mediante la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico, se perderían más rápidamente como CO_2?

*8. Se incubó [1-^{14}C]ribosa-5-fosfato con una mezcla de transcetolasa, transaldolasa, fosfopentosa isomerasa, fosfopentosa epimerasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa purificadas. Prediga la distribución de la radiactividad en la eritrosa-4-fosfato y la fructosa-6-fosfato que se forman en esta mezcla.

9. ¿Prevería que el NAD^+ o la CoA-SH influyeran en la actividad de la piruvato deshidrogenasa quinasa? Explique brevemente su respuesta.

*10. Para establecer qué forma de isocitrato deshidrogenasa desempeña el papel más importante en el ciclo del ácido cítrico, la forma dependiente del NAD^+ o la dependiente del $NADP^+$, ¿qué tipo de información le resultaría útil?

11. En relación con la Figura 14.10, escriba una ecuación equilibrada para la reacción global catalizada por cada una de las tres enzimas del complejo piruvato deshidrogenasa (E_1, E_2, y E_3).
12. Describa brevemente la justificación biológica de cada uno de los siguientes fenómenos alostéricos: (a) la activación de la piruvato descarboxilasa por la acetil-CoA, (b) la activación de la piruvato deshidrogenasa quinasa por el NADH, (c) la inhibición de la isocitrato deshidrogenasa por el NADH, (d) la activación de la isocitrato deshidrogenasa por el ADP, (e) la inhibición de la α-cetoglutarato deshidrogenasa por la succinil-CoA, y (f) la activación del complejo piruvato deshidrogenasa por el AMP.
13. Dado que conoce la función del ciclo del glioxilato y la regulación del ciclo del ácido cítrico, proponga algunos mecanismos de control que podrían regular el ciclo del glioxilato.
14. Considere el experimento de marcaje descrito en la Figura 14.13; luego prediga el destino del acetato marcado en el carboxilo en el ciclo del glioxilato.
15. En la Figura 14.6, el producto del paso 3 se identifica como una enamina estabilizada por resonancia. Dibuje las estructuras de las dos formas de resonancia.
16. Escriba una ecuación equilibrada para la conversión en el ciclo del glioxilato de dos unidades acetilo, como acetil-CoA, en oxalacetato.
17. Como se considera en el Capítulo 15, el FAD es un oxidante más fuerte que el NAD^+; el FAD tiene un potencial de reducción estándar mayor que el NAD^+. Sin embargo, en la última reacción del complejo piruvato deshidrogenasa, el $FADH_2$ unido a E_3 se oxida por el NAD^+. Explique esta paradoja aparente.
18. La piruvato carboxilasa se supone activa al CO_2 por el ATP, a través de la formación como intermediario de carboxil fosfato. Proponga un mecanismo de formación de este intermediario.
19. Dado los papeles del NAD^+/NADH en las reacciones de deshidrogenación y del NADPH/$NADP^+$ en las reducciones, como se considera en las páginas 474-475, ¿esperaría que la relación intracelular de NAD^+ a NADH sea alta o baja? ¿Qué hay sobre la relación de $NADP^+$ a NADPH? Explique sus respuestas.

CAPÍTULO 15

Transporte electrónico, fosforilación oxidativa y metabolismo del oxígeno

EL SER HUMANO ADULTO PROMEDIO GENERA *CADA DÍA* LA ENERGÍA METABÓLICA suficiente para sintetizar su propio peso en ATP. ¿Cómo se moviliza esta cantidad masiva de energía? La glucólisis y el ciclo del ácido cítrico generan de por sí una cantidad relativamente baja de energía en forma de ATP. Sin embargo, seis pasos de deshidrogenación (uno en la glucólisis, otro en la reacción de la piruvato deshidrogenasa y cuatro más en el ciclo del ácido cítrico) reducen en total 10 moles de NAD^+ a NADH y 2 moles de FAD a $FADH_2$ por mol de glucosa. La reoxidación de estos transportadores electrónicos reducidos genera la mayor parte de la energía necesaria para la síntesis de ATP, el proceso que consideraremos en gran parte de este capítulo. Las células *anaerobias* mantienen un estado electrónico estacionario mediante la transferencia de electrones desde los transportadores reducidos a los aceptores electrónicos, como en la reducción del piruvato a lactato en la glucólisis anaerobia. En cambio, las células y los tejidos *aerobios* transfieren los electrones en un proceso escalonado, desde los transportadores reducidos hasta el oxígeno molecular.

El metabolismo aerobio del piruvato genera muchos más equivalentes reductores que el catabolismo anaerobio. En la respiración, estos equivalentes reductores adoptan la forma de NADH y $FADH_2$, que en las células eucariotas se reoxidan mediante las proteínas de transporte electrónico unidas a la membrana mitocondrial interna. Se produce una serie de reacciones de oxidación y reducción acopladas, con el paso de electrones a lo largo de una serie de transportadores: la cadena de transporte electrónico o cadena respiratoria (Figura 15.1). El último paso es la reducción del O_2 a agua. La secuencia global de transporte electrónico es bastante exergónica. Un par de equivalentes reductores, generados a partir de 1 mol de NADH basta para dar origen a la síntesis acoplada de unos 3 moles de ATP a partir de ADP y P_i mediante la fosforilación oxidativa. ¿Cómo se **acopla** la energía liberada por las reacciones oxidativas de la cadena respiratoria para que impulse la síntesis de ATP? El mecanismo de este acoplamiento se verá a lo largo de todo este capítulo. Además, analizaremos otras funciones metabólicas importantes que desempeña el oxígeno en las células aerobias.

La oxidación de 1 mol de NADH proporciona la energía suficiente para la síntesis de unos 3 moles de ATP a partir de ADP.

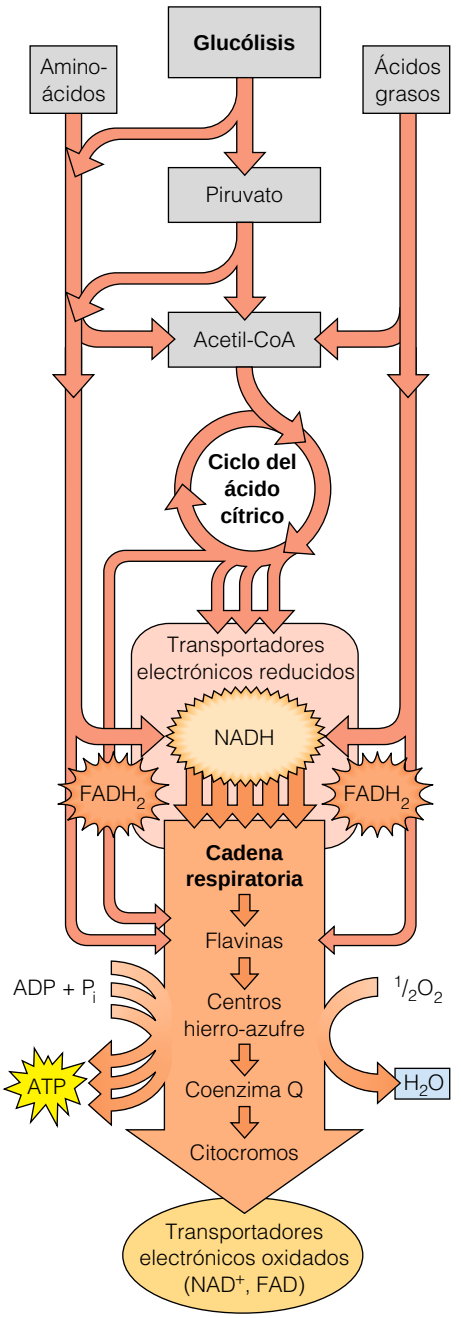


FIGURA **15.1**

Visión general de la generación oxidativa de energía.

La mitocondria: el escenario de la acción

Para comprender las oxidaciones biológicas, es necesario conocer tanto la química de las reacciones de oxidación-reducción como la biología celular de la mitocondria. Antes de revisar la química, describiremos los lugares intracelulares donde se producen estas reacciones. El metabolismo celular genera compuestos reducidos en todos los compartimientos principales de una célula eucariota. Como se ha indicado antes, la glucólisis tiene lugar en el citosol de las células eucariotas, mientras que la oxidación del piruvato, la β-oxidación de los ácidos grasos, la oxidación de los aminoácidos y el ciclo del ácido cítrico se producen en la matriz mitocondrial. Las distintas células presentan amplias diferencias en cuanto a la abundancia y estructura de sus mitocondrias. La mayor parte de las células de los vertebrados contienen varios cientos de mitocondrias, pero su número puede ser de tan sólo 1 o de hasta 100 000.

La mitocondria está formada por cuatro subregiones diferentes, que se indican en la Figura 15.2a y b: la membrana externa, la membrana interna, el espacio intermembrana y la matriz, situada dentro de la membrana interna. La membrana interna está muy plegada, formando **crestas** que se proyectan hacia el interior de la mitocondria y que, a menudo, llegan casi hasta el otro lado de la misma. Dado que las proteínas respiratorias están unidas a la membrana interna, la densidad de las crestas está relacionada con la actividad respiratoria de la célula. Así, por ejemplo, las células del músculo cardíaco, que tienen tasas de respiración elevadas, contienen mitocondrias con crestas apiladas densamente. En cambio, las células hepáticas tienen una tasa de respiración mucho menor y mitocondrias con crestas distribuidas de forma más dispersa.

Sea cual sea el compartimiento en el que se produzcan las oxidaciones biológicas, todos estos procesos generan transportadores electrónicos reducidos, fundamentalmente NADH. La mayor parte de este NADH se reoxida, con la producción simultánea de ATP, por las enzimas de la cadena respiratoria, que están firmemente embebidas en la membrana interna. Esta membrana está formada por aproximadamente un 70% de proteínas y un 30% de lípidos, lo cual hace que tal vez sea la membrana biológica con mayor abundancia de proteínas. Aproximadamente la mitad de las proteínas de la membrana interna de las mitocondrias del corazón de buey interviene directamente en el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa. La mayor parte de las demás proteínas interviene en el transporte de sustancias hacia el interior y el exterior de las mitocondrias. En cambio, un grupo de proteínas completamente diferentes están unidas a la membrana externa, entre las que se encuentran las enzimas de la oxidación de los aminoácidos, las de la elongación de los ácidos grasos, las de la biosíntesis de los fosfolípidos de membrana y las de las hidroxilaciones enzimáticas.

Embebidas en la membrana interna se encuentran las proteínas transportadoras, principalmente los citocromos, que forman la cadena respiratoria. Se ensamblan en cinco complejos multiproteicos, denominados I, II, III, IV y V (Figura 15.2b). El complejo I y el complejo II reciben electrones de la oxidación del NADH y del succinato, respectivamente, y los pasan a un transportador electrónico lipídico, la coenzima Q (véanse las páginas 592-593), que se desplaza libremente a través de la membrana. El complejo III oxida la forma reducida de la coenzima Q y reduce a su vez al citocromo *c*, un transportador electrónico proteico que también puede desplazarse por el interior de la membrana interna. Por último, el complejo IV acopla la oxidación del citocromo *c* con la reducción del O_2 a agua. La energía liberada por estas reacciones exergónicas crea un gradiente de protones a través de la membrana interna, al bombearse los protones hacia el espacio intermembrana. Los protones vuelven a entrar luego

en la membrana a través de un canal específico en el complejo V. La energía liberada por este proceso exergónico impulsa la síntesis endergónica de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. A lo largo de este capítulo presentaremos la base estructural y funcional de nuestro conocimiento de estos procesos de acoplamiento energético.

Para entender estos procesos fue esencial el aislamiento de mitocondrias fisiológicamente intactas, utilizando la centrifugación diferencial de los homogeneizados celulares. Este logro fue alcanzado, a finales de los años 1940, por Eugene Kennedy y Albert Lehninger, que demostraron que las mitocondrias aisladas podían sintetizar in vitro ATP a partir de ADP y P_i, pero sólo si se encontraba presente también un sustrato. Gran parte de nuestro conocimiento sobre la secuencia de transportadores electrónicos, y sobre la localización de las enzimas específicas en el interior de las mitocondrias procede del fraccionamiento y del análisis de los complejos que se han descrito anteriormente, que nos proporcionan instantáneas de partes concretas de la secuencia global de reacción del transporte electrónico y la fosforilación oxidativa.

La mayor parte de los transportadores electrónicos de la cadena respiratoria están embebidos en la membrana mitocondrial interna.

La situación en las células procariotas es comparable, aunque intervienen transportadores electrónicos diferentes. Sin embargo, dado que las células procariotas carecen de orgánulos, todos los transportadores electrónicos y las enzimas de la fosforilación oxidativa están unidas a la membrana interna de la superficie celular. En consecuencia, el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa se producen en la periferia celular. Como se comentará en el Capítulo 17, existen razones para pensar que las mitocondrias y los cloroplastos, que contienen ambos genes y mecanismos para su expresión, son descendientes de células procariotas primitivas que tuvieron en su origen una vida libre.

Oxidaciones y generación de energía

El transporte electrónico biológico consiste en una serie de oxidaciones y reducciones ligadas, o reacciones redox. Para comprender la lógica que subyace en la secuencia de reacciones de la cadena respiratoria, y los mecanismos mediante los cuales se genera energía metabólica a partir de estas reacciones, debe conocerse la forma de calcular la energía libre que puede obtenerse de una reacción redox. En la Figura 15.3 se identifican los principales transportadores electrónicos respiratorios; volveremos a ese esquema a lo largo de este capítulo. Aunque la química redox de estos transportadores electrónicos biológicos puede parecer más complicada que la que rige las reacciones inorgánicas simples, como la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+}, los principios básicos son idénticos.

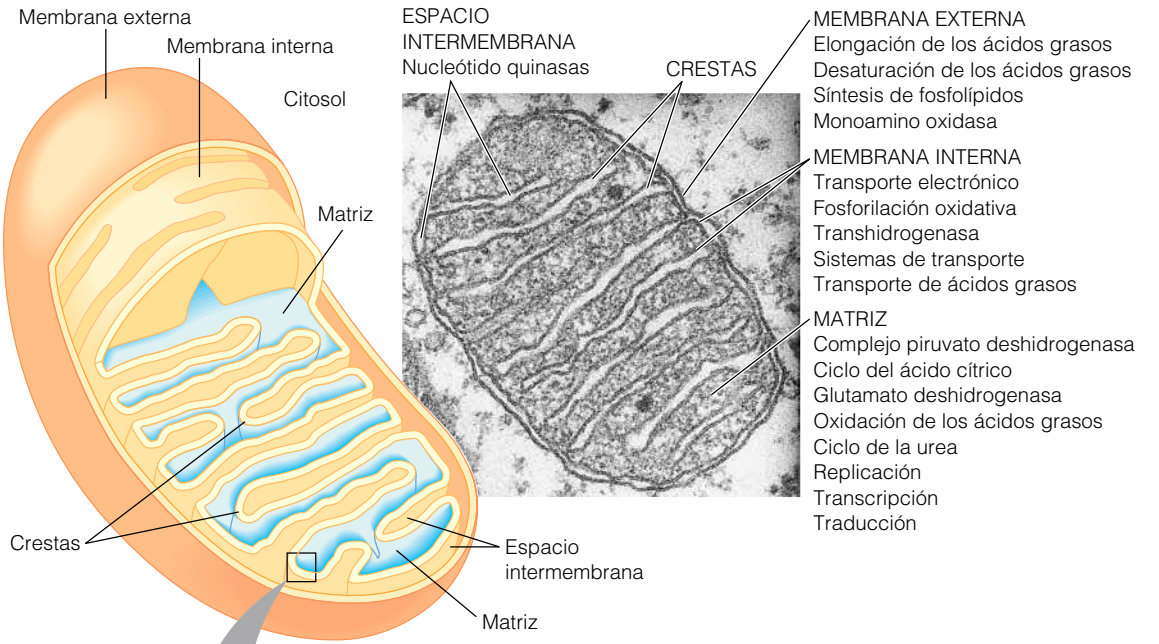
CUANTIFICACIÓN DEL PODER REDUCTOR: POTENCIAL DE REDUCCIÓN ESTÁNDAR

La química redox es comparable en muchos sentidos a la química ácido-base, que consideramos en el Capítulo 2. En un equilibrio protónico, tenemos un ácido y su base conjugada, que corresponden a un donador de protones y a un aceptor de protones, respectivamente.

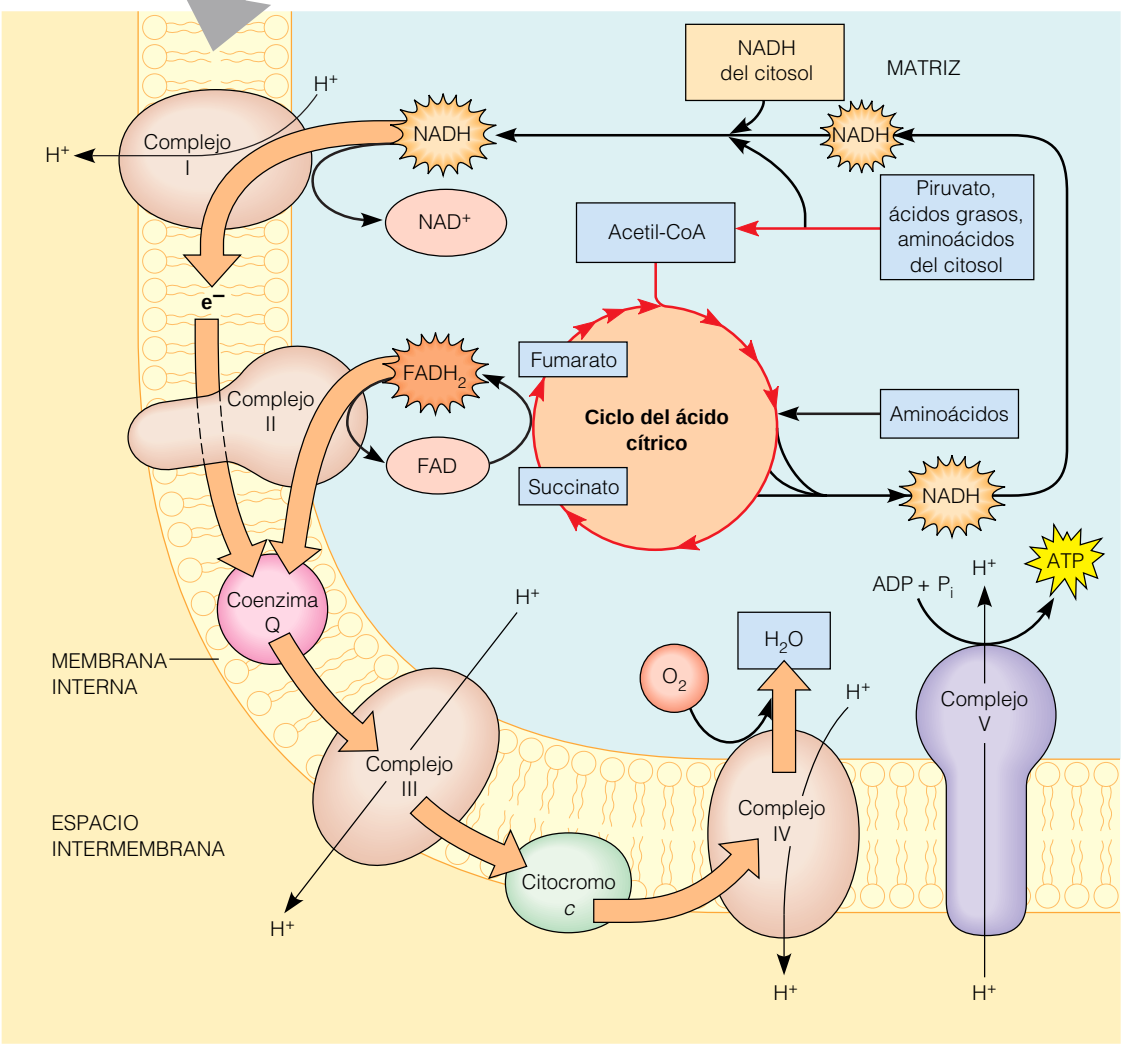
$$\text{Ácido (donador de protones)} \rightleftharpoons \text{base conjugada} + H^+ \quad \text{(p. ej., HOAc} \rightleftharpoons OAc^- + H^+\text{)}$$

De forma análoga, en una reacción redox tenemos un donador y un aceptor de *electrones*.

$$\text{Compuesto reducido (donador de } e^-\text{)} \rightleftharpoons \text{compuesto oxidado} + e^-$$
$$\text{(p. ej., } Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + e^-\text{)}$$


Membrana externa
Membrana interna
Citosol
Matriz
Crestas
Espacio intermembrana
Matriz
ESPACIO INTERMEMBRANA
Nucleótido quinasas
CRESTAS
MEMBRANA EXTERNA
Elongación de los ácidos grasos
Desaturación de los ácidos grasos
Síntesis de fosfolípidos
Monoamino oxidasa
MEMBRANA INTERNA
Transporte electrónico
Fosforilación oxidativa
Transhidrogenasa
Sistemas de transporte
Transporte de ácidos grasos
MATRIZ
Complejo piruvato deshidrogenasa
Ciclo del ácido cítrico
Glutamato deshidrogenasa
Oxidación de los ácidos grasos
Ciclo de la urea
Replicación
Transcripción
Traducción

(a)


NADH del citosol
MATRIZ
H+
Complejo I
NADH
NADH
NAD+
Acetil-CoA
Piruvato, ácidos grasos, aminoácidos del citosol
e−
FADH2
Fumarato
Complejo II
Ciclo del ácido cítrico
Aminoácidos
FAD
Succinato
NADH
ATP
ADP + Pi
H+
Coenzima Q
H+
H2O
O2
MEMBRANA INTERNA
Complejo III
H+
Complejo V
ESPACIO INTERMEMBRANA
Complejo IV
Citocromo c
H+
H+
H+
H+

(b)

FIGURA **15.2** (página anterior)

Localización de los procesos respiratorios en la mitocondria. **(a)** Mitocondria de una célula pancreática, mostrada en un corte fino con el microscopio electrónico. Se muestran los principales compartimientos intramitocondriales, junto con las principales enzimas y rutas localizadas en cada compartimiento. Aumentos, ×155 000. **(b)** Visión general de la fosforilación oxidativa. Los transportadores electrónicos reducidos, producidos por las deshidrogenasas citosólicas y las rutas oxidativas mitocondriales, vuelven a oxidarse por los complejos enzimáticos unidos en la membrana interna. Estos complejos bombean activamente protones hacia el exterior, creando un gradiente energético cuya descarga impulsa el complejo V hacia la síntesis de ATP.

(a) Fotografía cortesía de A. Tzagoloff, *Mitochondria* (Nueva York: Plenum, 1982).

Como ya sabe, los protones libres y los electrones libres se encuentran a unas concentraciones desdeñables en los medios acuosos, por lo que estas expresiones de equilibrio son simplemente semirreacciones de un equilibrio global ácido-base o redox. Una reacción redox completa debe mostrar como reactante un aceptor electrónico, que se reduce al ganar electrones. De los dos sustratos, el donador electrónico es el **reductor**, que se oxida mediante la transferencia de electrones al otro sustrato, el **oxidante**.

$$\text{Reductor} + \text{oxidante} \rightleftharpoons \text{reductor oxidado} + \text{oxidante reducido}$$

Un ejemplo sencillo es la oxidación del Cu^+ por el Fe^{3+}.

$$\underset{\textbf{Reductor}}{Cu^+} + \underset{\textbf{Oxidante}}{Fe^{3+}} \rightleftharpoons \underset{\textbf{Reductor oxidado}}{Cu^{2+}} + \underset{\textbf{Oxidante reducido}}{Fe^{2+}}$$

El Cu^+ es el reductor en esta reacción, ya que es el donador de electrones. El reductor es comparable, pues, al ácido en un equilibrio protónico.

Para comprender la química ácido-base es crucial el concepto de pK_a, que representa una medida cuantitativa de la tendencia de un ácido a perder un protón. En el mismo sentido, nuestro conocimiento de las oxidaciones biológicas requiere una medida comparable de la tendencia de un reductor a perder electrones (o de un oxidante a ganar electrones). Este índice lo proporciona el *potencial de reducción estándar*, o E_0. En el equilibrio ácido-base, definimos arbitrariamente el agua, con un pK_a de 7.0, como neutra. Todo aquello que tenga un valor de pK_a inferior a 7, que tiende a protonar el agua, se denomina ácido, y los compuestos que tienden a protonarse por el agua se denominan bases. La química redox utiliza también un estándar de referencia: el electrodo de hidrógeno estándar en una célula electroquímica.

Una célula electroquímica está formada por dos **semicélulas**, cada una de las cuales contiene un donador electrónico y su aceptor conjugado (véase el margen de la página siguiente). En el diagrama, el recipiente de la izquierda constituye la semicélula de referencia, un electrodo de hidrógeno estándar. El recipiente de la derecha contiene la semicélula de estudio, con la solución que contiene el donador de electrones en estudio y su aceptor conjugado, ambos a una concentración 1 M. En este ejemplo, la solución contiene Fe^{2+} y Fe^{3+}, ambos a concentración 1 M. La neutralidad eléctrica se mantiene con un puente salino en agar. El galvanómetro que conecta las dos semicélulas mide la **fuerza electromotriz**, o **fem**, en voltios. La fuerza electromotriz es una medida del potencial o de la "presión" que hace que los electrones fluyan desde una semicélula a la otra. Los electrones pueden desplazarse hacia la semicélula de referencia o en sentido contrario, en función de que sea el H_2 o el donador de electrones en estudio el que tenga una mayor tendencia a la pérdida de electrones. Dado que

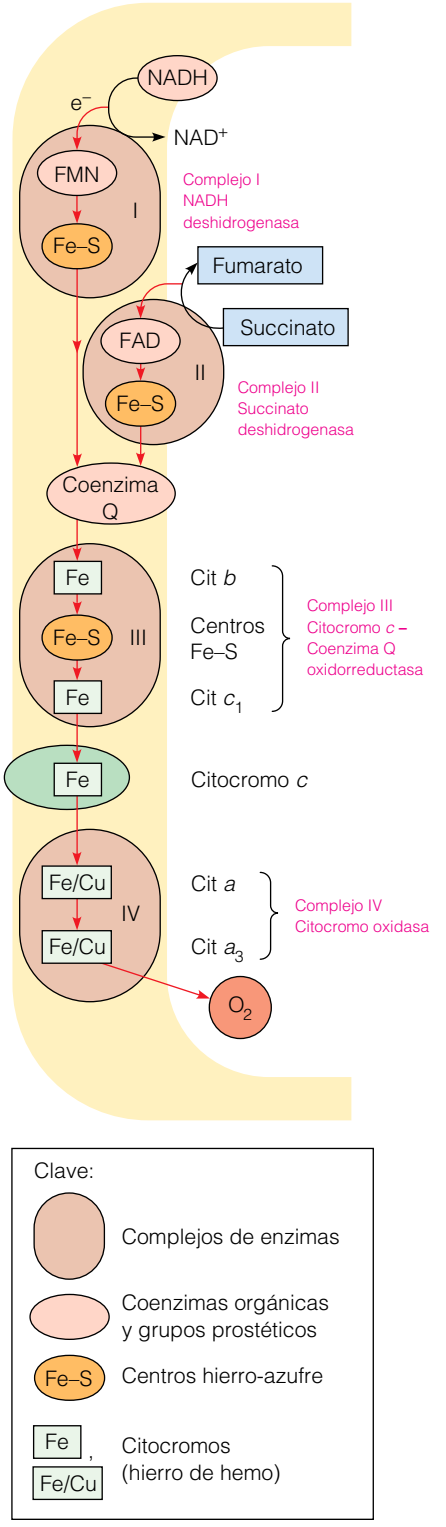
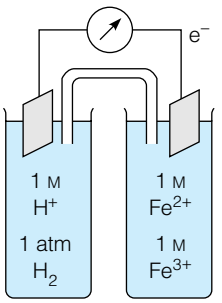


FIGURA **15.3**

Transportadores electrónicos respiratorios en la mitocondria. En esta figura se muestra la secuencia de los transportadores electrónicos que oxidan el succinato y los sustratos ligados al NAD^+ en la membrana interna.

E_0 es la tendencia de un reductor a perder un electrón, en el mismo sentido que el pK_a es la tendencia de un ácido a perder un protón.



Cuanto más alto es el potencial de reducción estándar, mayor es la tendencia del miembro oxidado de una pareja redox a atraer electrones.

el H_2 pierde los electrones con más facilidad que el Fe^{2+}, los electrones en nuestro ejemplo irán de la semicélula de referencia a la semicélula de estudio, oxidando el H_2, reduciendo el Fe^{3+} y haciendo que el galvanómetro registre una fem positiva. Sin embargo, si el donador de electrones en estudio pierde electrones con más facilidad que el H_2, los electrones se desplazarán en la dirección contraria, reduciendo el H^+ a H_2 en la semicélula de referencia y causando el registro de una fem negativa. El oxidante más potente, tanto si se trata del H^+ como si se trata del aceptor de electrones en estudio, atraerá los electrones alejándolos de la otra semicélula y quedando reducido.

La tendencia de un donador electrónico a reducir a su aceptor conjugado se denomina **potencial de reducción**, ***E***. En condiciones estándar (25°C, donador y aceptor a concentración 1 M), este término pasa a ser el **potencial de reducción estándar**, $\boldsymbol{E_0}$. La fem registrada en una célula electroquímica como la descrita antes es la *diferencia* entre los potenciales de reducción en las semicélulas de referencia y de estudio. Si ambas semicélulas se encuentran en condiciones estándar, medimos la diferencia en valores de E_0.

Por convenio, el valor de E_0 para el electrodo de hidrógeno se ajusta a 0.00 voltios. Cualquier pareja redox que tienda a donar electrones al electrodo de hidrógeno estándar tiene un valor de E_0 negativo, que puede determinarse directamente como la fem registrada en una semicélula ligada a una semicélula de hidrógeno estándar. Un valor de E_0 positivo significa que los electrones del H_2 fluyen hacia la célula en estudio y reducen al aceptor electrónico o, dicho con otras palabras, el aceptor en estudio oxida al H_2. *Cuanto mayor es el valor de E_0 para una pareja redox, más fuerte es como oxidante el aceptor electrónico de esa pareja.* Así, por ejemplo, la experiencia nos demuestra que el Fe^{3+} es un oxidante fuerte. Este hecho se pone de manifiesto cuando medimos el potencial de reducción de una semicélula estándar de Fe^{3+}/Fe^{2+} con referencia a una semicélula de hidrógeno estándar. Ese valor es +0.77 V. En cambio, un valor negativo elevado de E_0 indica una tendencia fácil a la pérdida de electrones y, por tanto, un poder reductor elevado.

Las condiciones estándar que utilizan los bioquímicos incluyen un valor de pH de 7.0, condición esta que no se da en el electrodo de hidrógeno estándar, que contiene H^+ a una concentración 1.0 M. En consecuencia, los bioquímicos emplean un término modificado, el $\boldsymbol{E'_0}$, que es el potencial de reducción estándar medido a pH 7 (H^+ 10^{-7} M). Éstos son los valores que se utilizan en este libro y en la mayor parte de las demás referencias bioquímicas. En la Tabla 15.1 se presentan los valores de E'_0 correspondientes a diversos pares redox con importancia bioquímica. Obsérvese que para el propio ion hidrógeno, el valor de E'_0 es de –0.42 V, cifra que difiere significativamente del valor estándar determinado a pH 0 (es decir, a H^+ 1 M). Debe tener presente que todos los valores de E'_0 de la Tabla 15.1 se registraron con referencia a un electrodo de hidrógeno estándar. El pH era de 7.0 en el electrodo *de estudio*, pero era de 0 en el electrodo *de referencia*. Así pues, el acoplamiento NADH + H^+/NAD^+, con un valor de E'_0 de –0.32 V, perderá electrones hacia un electrodo de hidrógeno *estándar* (en el que $[H^+] = 1$ M), pero tenderá a ganar electrones procedentes de un electrodo de hidrógeno a pH = 7 (en el que $[H^+] = 10^{-7}$ M). Esta observación ilustra de nuevo el principio de que, *en una reacción espontánea, los electrones pasan desde la semicélula de potencial más bajo a la semicélula de potencial más alto*. En relación con este hecho, la pareja O_2/H_2O, con un valor de E'_0 elevado de +0.82 V, posee una fuerte tendencia a oxidar otras sustancias. Y a la inversa, hay una baja tendencia del agua a ser oxidada a O_2, ya que ninguno de los oxidantes biológicos habituales tiene un valor de E'_0 superior al de O_2/H_2O. La fotosíntesis, que sí oxida el H_2O a O_2, requiere una considerable cantidad de

Electrodo de estudio	Electrodo de referencia	*E* medido
H^+/H_2 (pH 7) ($E'_0 = -0.42$)	H^+/H_2 (pH 0) ($E'_0 = 0$)	−0.42 V
NAD^+/NADH (pH 7) ($E'_0 = -0.32$)	H^+/H_2 (pH 0) ($E'_0 = 0$)	−0.32 V
NAD^+/NADH (pH 7) ($E'_0 = -0.32$)	H^+/H_2 (pH 7) ($E'_0 = -0.42$)	+0.10 V

TABLA 15.1 Potenciales de reducción estándar de interés en bioquímica

Oxidante	Reductor	n	E'_0, V
Acetato + CO_2 + $2H^+$	Piruvato + H_2O	2	−0.70
Succinato + CO_2 + $2H^+$	α-CetoglutaratO + H_2O	2	−0.67
Acetato + $3H^+$	Acetaldehído + H_2O	2	−0.60
O_2	O_2^-	1	−0.45
Ferredoxina (oxidada)	Ferredoxina (reducida)	1	−0.43
$2H^+$	H_2	2	−0.42
Acetoacetato + $2H^+$	β-Hidroxibutirato	2	−0.35
Piruvato + CO_2 + H^+	Malato	2	−0.33
NAD^+ + H^+	NADH	2	−0.32
$NADP^+$ + H^+	NADPH	2	−0.32
FMN (unido a la enzima) + $2H^+$	$FMNH_2$ (unido a la enzima)	2	−0.30
Lipoato (oxidado) + $2H^+$	Lipoato (reducido)	2	−0.29
1,3-Bisfosfoglicerato + $2H^+$	Gliceraldehído-3-fosfato + P_i	2	−0.29
Glutatión (oxidado) + $2H^+$	2 Glutatión (reducido)	2	−0.23
FAD + $2H^+$	$FADH_2$	2	−0.22
Acetaldehído + $2H^+$	Etanol	2	−0.20
Piruvato + $2H^+$	Lactato	2	−0.19
Oxalacetato + $2H^+$	Malato	2	−0.17
α-Cetoglutarato + NH_4^+ + $2H^+$	Glutamato + H_2O	2	−0.14
Azul de metileno (oxidado) + $2H^+$	Azul de metileno (reducido)	2	0.01
Fumarato + $2H^+$	Succinato	2	0.03
CoQ + $2H^+$	$CoQH_2$	2	0.04
Citocromo *b* (+3)	Citocromo *b* (+2)	1	0.07
Deshidroascorbato + $2H^+$	Ascorbato	2	0.08
Citocromo c_1 (+3)	Citocromo c_1 (+2)	1	0.23
Citocromo *c* (+3)	Citocromo *c* (+2)	1	0.25
Citocromo *a* (+3)	Citocromo *a* (+2)	1	0.29
$½O_2$ + H_2O	H_2O_2	2	0.30
Ferricianuro	Ferricianuro	2	0.36
Nitrato + $2H^+$	Nitrito + H_2O	1	0.42
Citocromo a_3 (+3)	Citocromo a_3 (+2)	1	0.55
Fe (+3)	Fe (+2)	1	0.77
$½O_2$ + $2H^+$	H_2O	2	0.82

Nota: E'_0 es el potencial de reducción estándar a pH 7 y 25°C, n es el número de electrones transferidos y cada potencial es para la reacción parcial escrita de la forma: oxidante + ne^- ⟶ reductor.

energía, en forma de luz, para conseguirlo. (Se presentará más información sobre este tema en el Capítulo 17.)

CAMBIOS DE ENERGÍA LIBRE EN LAS REACCIONES DE OXIDACIÓN-REDUCCIÓN

Recapitulando, cuanto más alto es el valor de E'_0 de una pareja redox, mayor es la tendencia de esa pareja a participar en la oxidación de otro sustrato. Podemos describir esta tendencia en términos cuantitativos, ya que los cambios de energía libre (Capítulo 3) están directamente relacionados con las diferencias del potencial de reducción:

$$\Delta G^{\circ\prime} = -nF\,\Delta E'_0 = -nF[E'_0\,(\text{aceptor}) - E'_0\,(\text{donador})] \qquad (15.1)$$

donde n es el número de electrones transferido en las semirreacciones, F es la constante de Faraday (96.5 kJ $mol^{-1}V^{-1}$) y $\Delta E'_0$ es la diferencia de los potenciales de reducción estándar de las dos parejas redox. Obsérvese que $\Delta E'_0$ es a ΔE_0

igual que $\Delta G°'$ es a $\Delta G°$; la "prima" tiene el mismo significado en ambos casos: cada reactante y producto (excepto H^+) a 1 M y un pH de 7.0.

Cambios de energía libre en condiciones estándar

Consideremos, como ejemplo, la oxidación del etanol catalizada por la alcohol deshidrogenasa:

$$\text{Etanol} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{acetaldehído} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Las dos semirreacciones son las siguientes, escritas ambas en la dirección de la reducción:

(a) $\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons \text{NADH} \qquad E'_0 = -0.320\ \text{V}$

(b) $\text{Acetaldehído} + 2\text{H}^+ + 2e^- \rightleftharpoons \text{etanol} \qquad E'_0 = -0.197\ \text{V}$

Pero, puesto que el etanol se oxida en la reacción, invertimos la segunda semirreacción *y* el signo de E'_0 para esta semirreacción.

(c) $\text{Etanol} \rightleftharpoons \text{acetaldehído} + 2\text{H}^+ + 2e^- \qquad E'_0 = +0.197\ \text{V}$

Ahora, la reacción global es la suma de las semirreacciones (a) y (c) y E'_0 es la suma de los dos valores individuales de E'_0:

$$\Delta E'_0 = -0.320\ \text{V} + 0.197\ \text{V} = -0.123\ \text{V} \tag{15.2}$$

Obsérvese que $\Delta E'_0$ calculado de esta forma es igual a E'_0(aceptor) – E'_0 (donador) como muestra la ecuación (15.1).

El cambio de energía libre estándar viene dado, pues, por

$$\Delta G°' = -nF\,\Delta E'_0 = -2(96.5)(-0.123)\ \text{kJ/mol} = +23.74\ \text{kJ/mol} \tag{15.3}$$

Obsérvese en este ejemplo que un valor negativo de $\Delta E'_0$ proporciona un valor positivo de $\Delta G°'$ y corresponde, por tanto, a una reacción que *no* está favorecida en la dirección en que se ha escrito. Obsérvese también que si calculáramos $\Delta G°'$ para la reacción inversa (reducción del acetaldehído por el NADH), E'_0(aceptor) – E'_0(donador) sería de +0.123 V, y $\Delta G°'$ tendría el mismo valor numérico pero con signo contrario.

Cambios de energía libre en condiciones no estándar

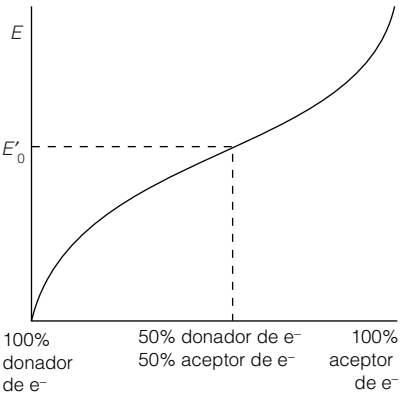
Los valores que se indican en la Tabla 15.1 permiten el cálculo de los cambios de energía libre tan sólo en condiciones estándar (incluyendo, por convenio, un pH de 7). Para calcular los potenciales de reducción en condiciones no estándar, utilizamos la *ecuación de Nernst*,

La ecuación de Nernst hace posible calcular los potenciales de reducción en condiciones no estándar.

$$E' = E'_0 + \frac{2.303RT}{nF} \log \frac{[\text{aceptor electrónico}]}{[\text{donador electrónico}]} \tag{15.4}$$

donde R es la constante de los gases (8.314 J K^{-1} mol^{-1}), T es la temperatura absoluta en Kelvin y 2.303 es el factor de conversión de los logaritmos neperianos a los decimales. A 25°C, el término 2.303 RT/nF tiene un valor de 0.059 para la transferencia de un electrón y de 0.0295 (que se redondea a 0.03) para la transferencia de dos electrones (donde $n = 2$). Así pues, para una transferencia de dos electrones podemos utilizar una versión simplificada de la ecuación (15.4):

$$E' = E'_0 + 0.03 \log \frac{[\text{aceptor electrónico}]}{[\text{donador electrónico}]} \tag{15.5}$$



Obsérvese que esta ecuación tiene la misma forma que la ecuación de Henderson-Hasselbalch: pH = pK_a + log ([aceptor de protones]/[donador de protones]). Así pues, de la misma forma que el valor de pK_a está definido por el punto medio de la curva de titulación de un ácido, E'_0 está definido por el punto medio de una titulación electroquímica en la que el aceptor electrónico y el donador electrónico están presentes en concentraciones iguales.

Cambios de energía libre en las oxidaciones biológicas

Cada una de las reacciones redox acopladas en el transporte electrónico biológico comporta la transferencia de electrones desde una pareja redox a otra pareja de potencial de reducción mayor. Así pues, cada reacción redox individual de la secuencia es exergónica en condiciones estándar. Para los electrones que entran en la cadena respiratoria en forma de NADH, la secuencia global de la reacción viene dada por la siguiente ecuación:

$$NADH + H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 \rightleftharpoons NAD^+ + H_2O$$

Esta secuencia es fuertemente exergónica:

$$\Delta G^{\circ\prime} = -nF\,\Delta E'_0 = -2(96.5)[0.82 - (-0.32)]\ \text{kJ/mol} = -220\ \text{kJ/mol} \qquad (15.6)$$

Como se considerará posteriormente en este capítulo, la oxidación de 1 mol de NADH en la cadena respiratoria se produce simultáneamente con la síntesis de unos 3 moles de ATP a partir de ADP y P_i. Dado que el valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ para la hidrólisis del ATP es de –31 kJ/mol, la síntesis de tres ATP requiere 93 kJ en condiciones estándar, con lo que se obtiene una eficacia de la fosforilación oxidativa de alrededor de un 40%. Sin embargo, el $\Delta G'$ de la hidrólisis del ATP en condiciones intracelulares es significativamente mayor (–40 kJ/mol o más), de forma que es probable que la eficacia intracelular sea algo mayor del 40%.

Transporte electrónico

TRANSPORTADORES ELECTRÓNICOS EN LA CADENA RESPIRATORIA

Si se compara la secuencia de los transportadores electrónicos respiratorios (Figura 15.3) con los potenciales de reducción estándar de esos transportadores (Tabla 15.1) puede observarse que el valor de E'_0 de cada transportador aumenta en el mismo orden que la secuencia de su uso en el transporte electrónico. Este orden sugiere que cada una de las reacciones de oxidorreducción del transporte electrónico es exergónica en condiciones estándar y que los electrones fluyen de manera continua desde los transportadores de potencial bajo a los transportadores de potencial alto. Muy atractivo, pero, ¿es esto real? Después de todo, hemos visto que la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico se producen con facilidad a pesar de la intervención de algunas reacciones con valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ positivos grandes. Exploraremos las diversas líneas de pruebas que han permitido determinar la ruta actualmente aceptada del transporte electrónico. Sin embargo, en primer lugar debemos conocer a los participantes: los transportadores electrónicos y las enzimas que intervienen en el proceso.

NADH y NADH deshidrogenasa

En la célula existen numerosas deshidrogenasas que generan NADH. Éste se oxida en el primer paso del transporte electrónico por el complejo mitocondrial I, o **NADH deshidrogenasa**, que contiene el mononucleótido de flavina (FMN)

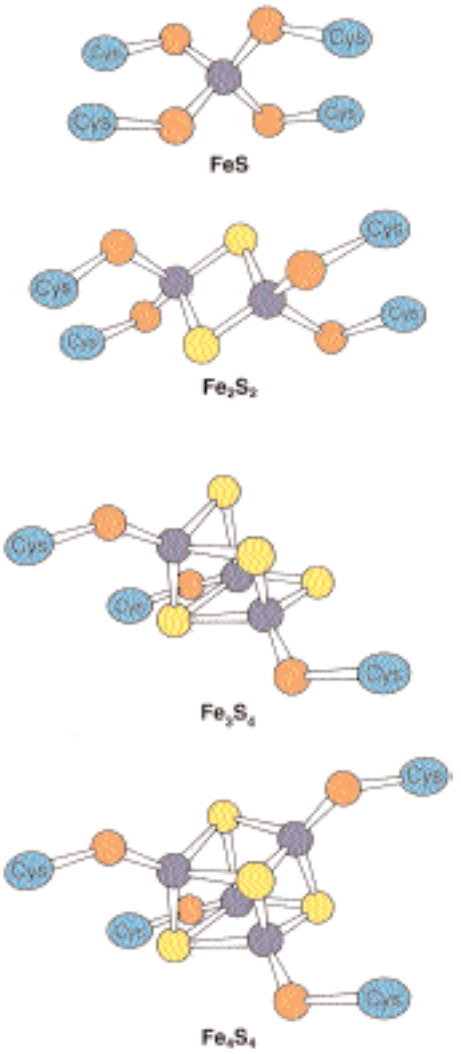


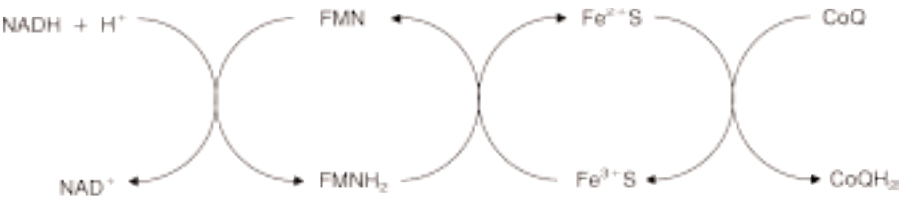
FIGURA **15.4**
Estructuras de los centros hierro-azufre.

Los transportadores electrónicos respiratorios comprenden el NAD^+, las flavinas, los centros hierro-azufre, la coenzima Q y los citocromos.

como grupo complementario estrechamente unido y cataliza la siguiente reacción.

$$NADH + H^+ + FMN \rightleftharpoons NAD^+ + FMNH_2$$

La NADH deshidrogenasa es un complejo grande formado por múltiples subunidades, que contiene unas 25 cadenas polipeptídicas distintas. El complejo también contiene algunos **centros hierro-azufre**, que transfieren los electrones desde la flavina reducida a otro transportador respiratorio, la coenzima Q. Los centros hierro-azufre están formados por un hierro no hemo que forma un complejo con azufre en cuatro formas conocidas (Figura 15.4). La forma más sencilla, denominada **FeS**, contiene un hierro que forma un complejo tetraédrico con los azufres tiólicos de cuatro residuos de cisteína. La segunda forma, denominada **Fe_2S_2**, contiene dos hierros, cada uno de los cuales forma un complejo con dos residuos de cisteína y dos sulfuros inorgánicos. La tercera forma, que es la más compleja (**Fe_4S_4**), contiene cuatro hierros, cuatro sulfuros y cuatro residuos de cisteína. La NADH deshidrogenasa contiene centros Fe_2S_2 y Fe_4S_4. Una cuarta forma, menos común, denominada Fe_3S_4 contiene tres hierros, cuatro sulfuros y cuatro residuos de cisteína en una estructura como un cubo al que le falta un vértice. En todos estos centros, el hierro puede experimentar una oxidorreducción cíclica entre los estados ferroso y férrico, como se muestra a continuación para el complejo NADH deshidrogenasa. Dado que los electrones se utilizan posteriormente para reducir la coenzima Q, una denominación más descriptiva de este complejo es **NADH-coenzima Q reductasa**.



Varias proteínas redox importantes contienen centros hierro-azufre, como los citocromos, que son otras proteínas que encontraremos en la cadena respiratoria. A este grupo se le denomina globalmente **proteínas hierro-azufre**. No todas las proteínas hierro-azufre participan en reacciones redox y, por ejemplo, la aconitasa (véase la página 556) posee un centro hierro-azufre que participa en la unión y activación del sustrato.

La NADH deshidrogenasa puede aceptar también electrones del NADPH, aunque de manera bastante poco eficaz. Una ruta que se utiliza de manera más amplia para la oxidación del NADPH, cuando resulta necesario, es la transferencia de dos equivalentes reductores desde el NADPH al NAD^+, a través de una enzima que se denomina **transhidrogenasa**:

$$NADPH + NAD^+ \rightleftharpoons NADP^+ + NADH$$

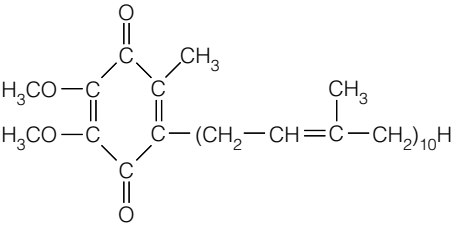
Coenzima Q

El transportador electrónico respiratorio coenzima Q se descubrió cuando se observó que el tratamiento de las mitocondrias aisladas con un disolvente orgánico como el isooctano abolía por completo la capacidad de las mitocondrias para oxidar sustratos. La adición del material extraído por el isooctano restablecía por completo la capacidad oxidativa de las mitocondrias, lo cual sugería la presencia de un transportador electrónico extremadamente lipófilo pero que estaba ligado a las proteínas de forma laxa. Se comprobó que este transportador era una benzoquinona ligada a diversas unidades de isopreno, generalmente 10

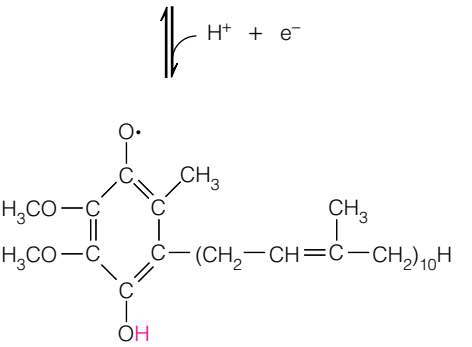
en las células de los mamíferos y 6 en las bacterias. Dado que la sustancia está presente de manera ubicua en las células vivas, un grupo de investigadores le dio el nombre de *ubiquinona*, mientras que otro grupo la denominó **coenzima Q** o **CoQ**. El término Q_{10} se utiliza para especificar la forma de CoQ que contiene 10 unidades de isopreno. La cola isoprenoide proporciona a la molécula su carácter apolar, que permite a la CoQ una difusión rápida a través de la membrana mitocondrial interna.

La CoQ lleva electrones hacia la cadena respiratoria, no sólo desde el NADH sino también desde el succinato, como se muestra en la Figura 15.3, y desde intermediarios de la oxidación de los ácidos grasos. La succinato deshidrogenasa utiliza una coenzima de FAD, como se ha indicado en el Capítulo 14. A diferencia de otras enzimas del ciclo del ácido cítrico, la succinato deshidrogenasa es una proteína de la membrana interna. La enzima puede transferir, pues, electrones directamente desde su $FADH_2$ unido a los otros transportadores respiratorios unidos a la membrana. Al igual que la NADH deshidrogenasa, la succinato deshidrogenasa transfiere los electrones a través de los centros hierro-azufre a la coenzima Q, y su nombre completo es **succinato-coenzima Q reductasa** (también se la denomina succinato deshidrogenasa o complejo II; véanse las Figuras 15.2 y 15.3). Otras deshidrogenasas flavoproteicas, como las que intervienen en la oxidación de los ácidos grasos (véase el Capítulo 18), transportan también electrones a los aceptores electrónicos a través de la CoQ.

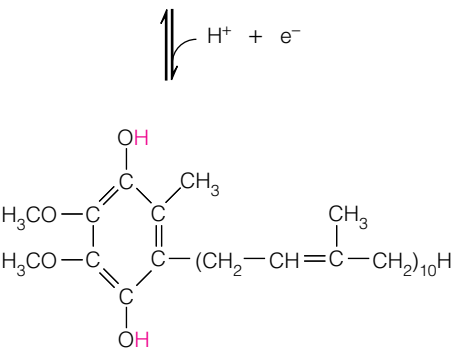
Dado que la CoQ se oxida posteriormente por los citocromos, puede considerarse un punto de recogida, que concentra los electrones desde varias deshidrogenasas flavoproteicas, y los pasa a los citocromos para su transporte final al O_2. Además, dado que la oxidorreducción de la CoQ afecta a un electrón cada vez, a través de un intermediario *semiquinona*, la CoQ proporciona una interfase de conexión entre los transportadores de dos electrones y los citocromos de un electrón.



Coenzima Q_{10} oxidada (CoQ)



Forma semiquinona de la coenzima Q



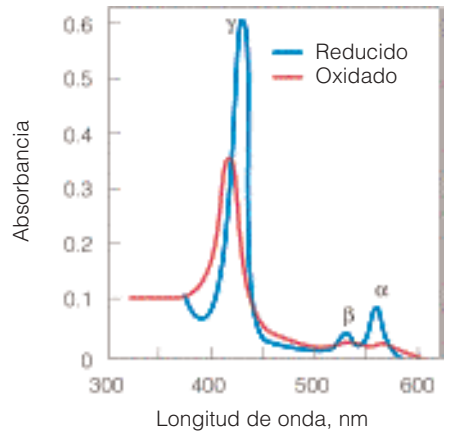
Coenzima Q_{10} reducida ($CoQH_2$)

Citocromos

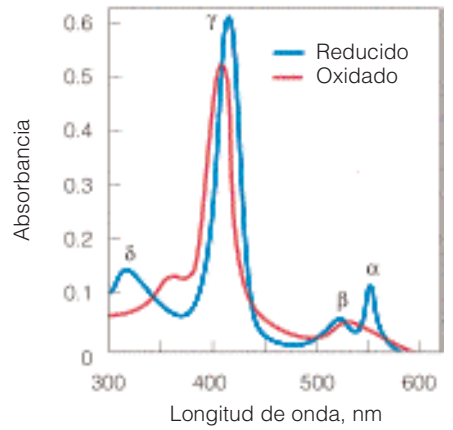
Llegamos, por último, a los citocromos, un grupo de hemoproteínas rojas o pardas que tienen unos espectros de luz visible característicos. Estas proteínas se caracterizaron por primera vez por el inglés David Keilin, que demostró su participación en la respiración. Con el empleo de un espectroscopio manual, Keilin observó pigmentos de color rojo-pardo en los músculos de vuelo de los insectos. Durante el ejercicio muscular (cuando una mosca inmovilizada intentaba liberarse), los espectros de estos pigmentos sufrían cambios importantes. Esta observación llevó a Keilin a proponer una función para estas sustancias en el transporte electrónico desde los combustibles biológicos al oxígeno.

Los principales citocromos respiratorios se clasifican como *b*, *c*, o *a*, según las longitudes de onda de los máximos de absorción espectral. En la Figura 15.5 se presentan las características espectrales de los citocromos de tipo *b*, *c* y *a* característicos. En cada clase (*b*, *c* o *a*), los citocromos se distinguen por diferencias espectrales menores. Así, por ejemplo, el citocromo c_1 tiene un espectro similar al del citocromo *c*, pero los picos de absorción α y γ están desplazados ligeramente hacia el rojo.

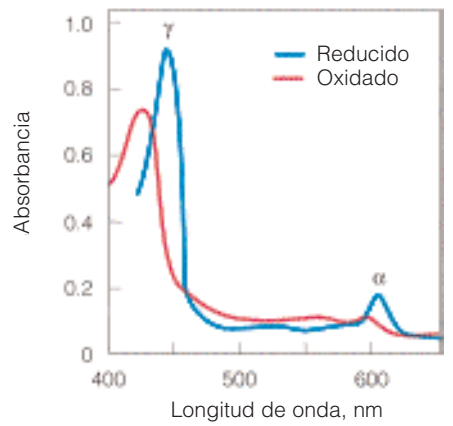
Entre los transportadores electrónicos respiratorios hay tres citocromos de tipo *b*, los citocromos *c* y c_1 y los citocromos *a* y a_3. Los citocromos *b*, *c* y c_1 contienen todos el mismo grupo hemo que se encuentra en la hemoglobina y la mioglobina, en el que el hierro forma un complejo con la protoporfirina IX. En los citocromos *c* y c_1, pero no en el *b*, este hemo está ligado de forma covalente al componente proteico, a través de enlaces tioéter formados entre dos de las cadenas laterales de vinilo y dos residuos de cisteína (Figura 15.6a). Los cito-



(a) Citocromo *b*



(b) Citocromo *c*

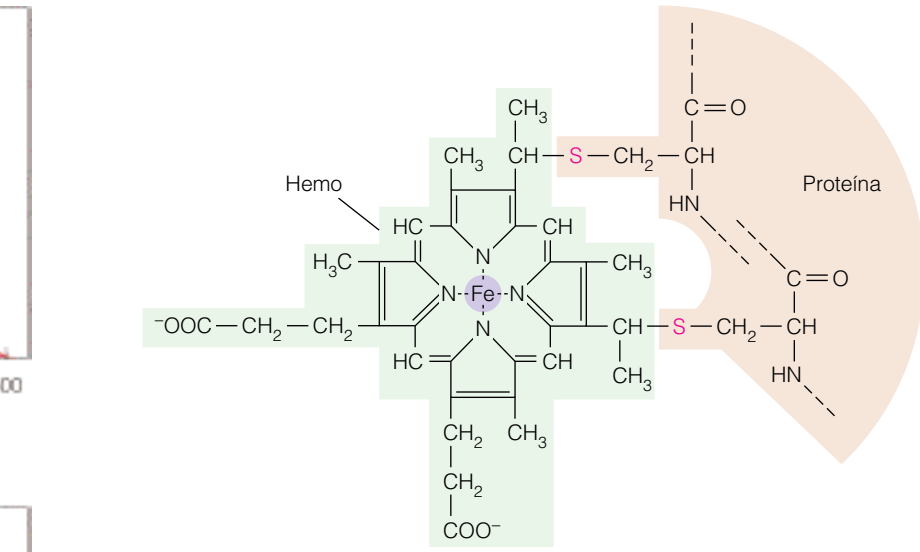


(c) Citocromos *a* y a_3

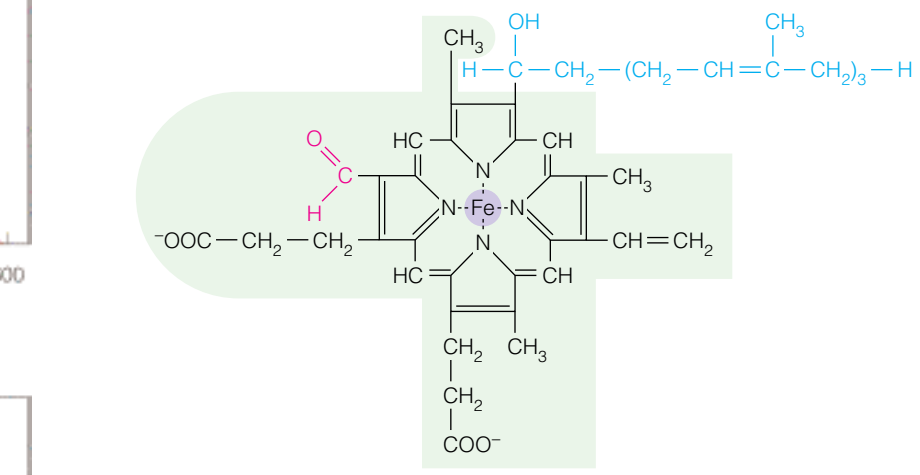
FIGURA **15.5**

Espectros de absorción de los citocromos. Las representaciones muestran los espectros de absorción de los citocromos *b*, *c* y *a* en sus estados oxidados (rojo) y reducidos (azul). **(a)** citocromo *b* de *Neurospora*, **(b)** citocromo *c* de corazón de caballo, **(c)** citocromo oxidasa de corazón bovino (que contiene ambos citocromos *a* y a_3).

Adaptado de A. Tzagoloff, *Mitochondria* (Nueva York: Plenum, 1982). Reproducido con permiso.



(a) Estructura general de los citocromos *c* y c_1



(b) Hemo A en los citocromos *a* y a_3

FIGURA **15.6**

Hemos que se encuentran en los citocromos. **(a)** Enlace covalente formado entre el hemo y el componente proteico en los citocromos *c* y c_1. Los grupos vinilo del hemo están ligados a los grupos tioles de dos residuos de cisteína (rojo). **(b)** Hemo A, que es la forma que se halla en los citocromos *a* y a_3. Obsérvense las cadenas laterales modificadas: un grupo formilo (rojo) y una cadena lateral de 17 carbonos (azul).

cromos *a* y a_3 contienen una forma de hemo modificada, que se denomina hemo A, en la que dos de las cadenas laterales están modificadas (Figura 15.6b). Los citocromos *a* y a_3 representan dos mitades idénticas del hemo A, unidas a la misma cadena polipeptídica, pero con distintos entornos en la membrana interna y, por tanto, con distintos potenciales de reducción. Cada uno de los hemo se asocia a un ion cobre, situado cerca del hierro hemo. Los citocromos experimentan una oxidorreducción a través del metal que forma el complejo en ellos, y que pasa por ciclos de estados +2 y +3 del hierro hemo y de estados +1 y +2 del cobre en los citocromos *a* y a_3. Así pues, los citocromos son transportadores de un electrón.

El citocromo *c* es una proteína pequeña (M_r = 13 000) que está asociado a la membrana interna pero que se extrae con facilidad de forma soluble. Dado que es pequeño y relativamente abundante, se han realizado estudios estructu-

rales detallados de esta proteína. La secuencia de aminoácidos del citocromo *c* se ha conservado mucho a lo largo de la evolución, de tal manera que existe una identidad de casi el 50% entre los residuos de las posiciones correspondientes de los citocromos *c* de organismos tan diversos como la levadura y el ser humano. Los demás citocromos son proteínas integrales de la membrana y resulta extraordinariamente difícil separarlos de ella. En consecuencia, sabemos menos de sus estructuras. Los citocromos *a* y a_3 forman parte del complejo mitocondrial IV (véanse las Figuras 15.2 y 15.3), un complejo multiproteico denominado también **citocromo oxidasa**. Este complejo cataliza el último paso del transporte electrónico, la reducción del oxígeno a agua. En las células eucariotas el complejo citocromo oxidasa contiene hasta 13 cadenas polipeptídicas, 3 de las cuales se sabe que están codificadas por el genoma mitocondrial y se sintetizan en el interior de la mitocondria. El resto están codificadas por genes nucleares.

DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE LOS TRANSPORTADORES ELECTRÓNICOS RESPIRATORIOS

Para comprender el mecanismo mediante el cual la energía de las oxidaciones biológicas se captura para impulsar la síntesis de ATP, debemos entender las reacciones de oxidación del transporte electrónico, tanto en lo que respecta a la secuencia con la que los electrones se transportan desde los sustratos reducidos hasta el oxígeno, como en lo relativo a las características energéticas de cada una de las reacciones. En la Figura 15.7 se indican los valores de E'_0 de los principales transportadores electrónicos respiratorios. Si esta figura representa de manera exacta la secuencia, podemos ver el transporte electrónico respiratorio como una serie de reacciones exergónicas acopladas en las que la energía total disponible de la oxidación del NADH por el O_2 se libera en una serie de pequeños pasos, algunos de los cuales son suficientemente exergónicos para generar los 31 kJ/mol necesarios para impulsar la síntesis de ATP.

Sin embargo, los datos de la Figura 15.7 corresponden a unas condiciones estándar, y estas condiciones son muy diferentes de las existentes en el interior de la mitocondria. En concreto, la naturaleza hidrófoba del entorno de la membrana modifica los valores de *E* en sentidos difíciles de predecir o de medir. Presentaremos aquí tres técnicas experimentales que se han utilizado para identificar el orden real de los transportadores electrónicos y las reacciones específicas que impulsan la síntesis de ATP. Nos centraremos primero en tres planteamientos utilizados para identificar el orden de los transportadores electrónicos: (1) técnicas espectrofotométricas para medir el estado redox de los transportadores electrónicos en las mitocondrias intactas; (2) uso de inhibidores respira-

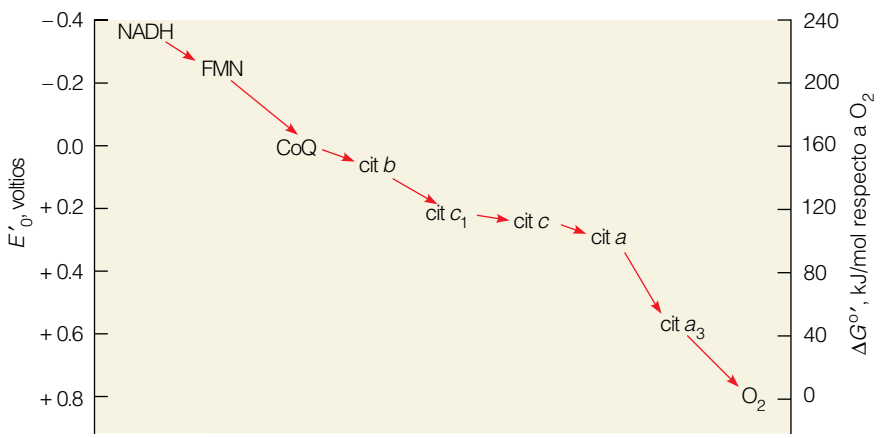
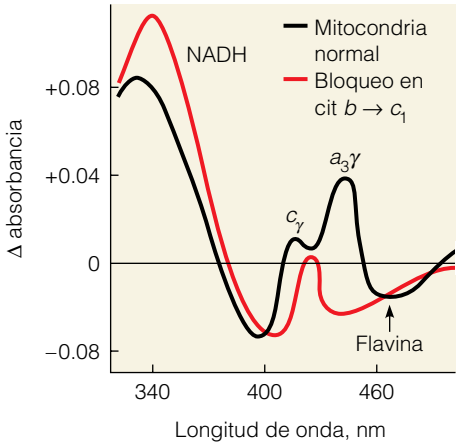
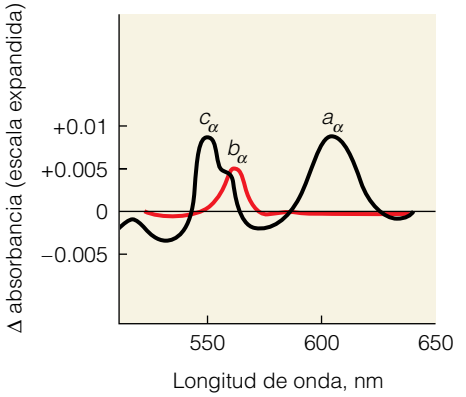


FIGURA **15.7**

Potenciales de reducción estándar de los principales transportadores electrónicos respiratorios. Tres reacciones de la cadena respiratoria tienen valores de $\Delta G°'$ superiores a 31 kJ/mol, que es el valor de $\Delta G°'$ para la hidrólisis del ATP: FMN ⟶ CoQ, cit *b* ⟶ cit c_1 y cit *a* ⟶ O_2.



(a) Espectros diferenciales para las longitudes de onda inferiores a 500 nm



(b) Espectros diferenciales continuos con escala extendida

FIGURA **15.8**

Espectros diferenciales de las mitocondrias. Estos espectros diferenciales de las mitocondrias de hígado de rata se registraron mediante un espectrofotómetro de doble haz. La línea negra indica el espectro diferencial de las mitocondrias totalmente reducidas en comparación con las totalmente oxidadas. Las mitocondrias reducidas con el sustrato en condiciones anaerobias estaban en la cámara de muestra y las mitocondrias oxigenadas en la cámara de referencia. Los máximos y los hombros corresponden a NADH, flavina y las bandas de absorción α y γ, según se indica, para los citocromos *a*, a_3, *b* y *c*. La línea roja indica el efecto de la adición de un inhibidor respiratorio, la antimicina A, que bloquea el flujo electrónico del citocromo *b* al c_1. El inhibidor hace que todos los transportadores posteriores al citocromo *b* queden totalmente oxidados, mientras que el NADH, la flavina y el citocromo *b* se encuentran en estado reducido. Obsérvese la escala de absorbancia ampliada a partir de 500 nm.

Adaptado de A. Tzagoloff, *Mitochondria* (Nueva York: Plenum, 1982). Reproducido con permiso.

torios específicos y aceptores de electrones artificiales; y (3) fraccionamiento de las mitocondrias en subensamblajes respiratorios, cada uno de los cuales es capaz de catalizar partes específicas de la secuencia global.

Espectros diferenciales

Para los nucleótidos de nicotinamida, los nucleótidos de flavina y los citocromos, el espectro de absorción del transportador reducido difiere del que posee el transportador oxidado. Deberíamos, pues, ser capaces de examinar el espectro de absorción de una mezcla de estos transportadores y determinar las proporciones de cada uno de ellos en los estados oxidado y reducido. La sensibilidad de la técnica se incrementa al obtener un **espectro diferencial**. En este caso, la cubeta de muestra contiene la mezcla de transportadores electrónicos que se estudia, y la cubeta de referencia no contiene un blanco, sino una mezcla equimolar de los transportadores en un estado conocido, por ejemplo, completamente oxidados. De esta forma, cualquier pequeño cambio de absorbancia, sea positivo o negativo, se deberá a la reducción de una parte de los transportadores en la muestra que se estudia.

Sin embargo, cuando estos transportadores están inmersos en la mitocondria, la tarea resulta bastante difícil. Las suspensiones mitocondriales son turbias y la dispersión de luz resultante hace imposible medir espectros diferenciales con los espectrofotómetros ordinarios. Britton Chance mejoró notablemente esta técnica al construir un espectrofotómetro de doble haz y longitud de onda dual, que le permitía obtener espectros diferenciales con mitocondrias intactas. En el ejemplo que se muestra mediante líneas negras en la Figura 15.8, la cubeta de referencia contiene mitocondrias saturadas con oxígeno, de tal manera que todos los transportadores están oxidados, mientras que la cubeta de muestra contiene mitocondrias anaerobias junto con un sustrato oxidable, de tal modo que todos los transportadores están reducidos. El espectro diferencial identifica longitudes de onda de diferencias de absorbancia máximas y mínimas. Las lecturas de absorbancia a estas longitudes de onda permiten la determinación de las concentraciones de formas reducidas y oxidadas de un transportador electrónico que absorbe luz en estos límites. Así, por ejemplo, cuanto mayor es la absorbancia a 340 nm, mayor es la proporción de la pareja NAD^+/NADH que está presente en forma de NADH; y cuanto menor es la absorbancia negativa a 460 nm, mayor es la proporción de nucleótido de flavina que se encuentra en la forma oxidada.

Poco después de la introducción de esta técnica a mediados de los años 1950 se realizaron dos observaciones importantes. En primer lugar, en las mitocondrias con respiración activa, el NADH predominaba sobre el NAD^+, mientras que el citocromo a_3 estaba en gran parte oxidado. Para los transportadores intermedios, la proporción del estado oxidado aumentaba en el mismo orden que en el que se suponía actuaban en la respiración. En segundo lugar, cuando se añadía oxígeno a mitocondrias anaerobias, y se obtenían los espectros diferenciales a intervalos regulares tras la adición del oxígeno, se podía determinar el orden en el que cada transportador pasaba del estado plenamente reducido al parcialmente oxidado. Ese orden era el mismo que el orden en que se suponía actuaban en la respiración.

Inhibidores y aceptores electrónicos artificiales

Se obtuvo más información con la espectrofotometría diferencial combinada con compuestos exógenos que actuaban como inhibidores respiratorios o como donadores o aceptores electrónicos artificiales. En la Figura 15.9 se muestran los lugares de acción de varios inhibidores importantes. Estos inhibidores son: (1) la **rotenona**, un producto vegetal de Sudamérica que se utiliza como insectici-

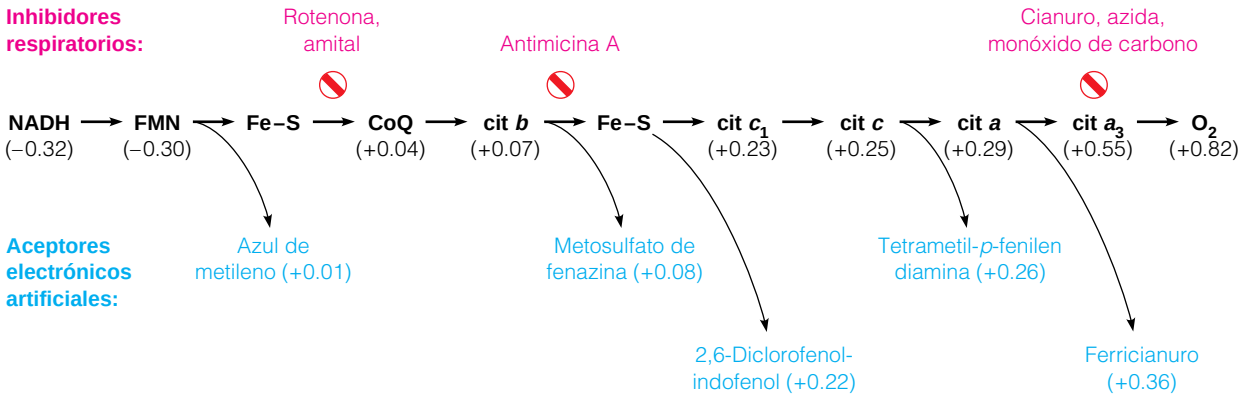


FIGURA **15.9**

Lugares de acción de algunos inhibidores respiratorios y aceptores electrónicos artificiales. Este esquema de la cadena respiratoria desde el NADH al O_2 indica los lugares de acción de algunos inhibidores útiles (rojo) y algunos aceptores electrónicos artificiales (azul). Cada aceptor está situado según su valor de E'_0 (entre paréntesis), identificando el lugar más probable en el que un aceptor retirará los electrones de la cadena respiratoria al añadirlo a las mitocondrias.

da y que bloquea el flujo electrónico desde el NADH a la coenzima Q; (2) el **amital**, un fármaco barbitúrico que actúa en el mismo lugar; (3) la **antimicina A**, un antibiótico de *Streptomyces* que bloquea el flujo electrónico desde el citocromo *b* al c_1; y (4) los inhibidores de la citocromo oxidasa, cianuro, azida y monóxido de carbono. El cianuro y la azida reaccionan con la forma oxidada del citocromo objetivo y el CO reacciona con la forma reducida.

Para ver la utilidad de los inhibidores de la respiración, consideremos lo que ocurre en las mitocondrias con respiración activa a las que se añade antimicina A (véanse las líneas rojas de la Figura 15.8). Dado que los electrones no pueden pasar del citocromo *b* al c_1, todos los transportadores previos al citocromo *b* quedan reducidos, mientras que todos los transportadores posteriores quedan totalmente oxidados, de forma análoga a la acumulación de agua en una presa de un río. Este lugar de inhibición se denomina **punto de entrecruzamiento**, un objetivo específico de inhibición cuando se bloquea toda una ruta. Los puntos de entrecruzamiento de la cadena respiratoria pueden detectarse mediante espectrofotometría de doble haz, que permite la identificación de todos los transportadores previos a un lugar de inhibición (NAD, flavina, CoQ y citocromo *b* tras el tratamiento con antimicina) y de todos los que siguen a este punto (citocromos c_1, *c*, *a* y a_3).

Los donadores y aceptores electrónicos artificiales son compuestos que pueden ceder o captar electrones de la cadena respiratoria en reacciones espontáneas no enzimáticas. Así, por ejemplo, el 2,6-diclorofenol-indofenol (DCIP) puede oxidar espontáneamente al citocromo *b*, pero probablemente no al c_1, dados los valores de E'_0 (véase la Figura 15.9). Esto demostró que el citocromo *b* se encuentra más allá del punto de entrada de los electrones procedentes del succinato, así como del NADH. La observación clave fue que la adición de DCIP a mitocondrias inhibidas con cianuro permite que estas mitocondrias oxiden tanto los sustratos ligados al NAD^+ como el succinato. En este sistema, los electrones fluyen desde el sustrato al citocromo *b* y luego al transportador electrónico exógeno DCIP, que queda reducido.

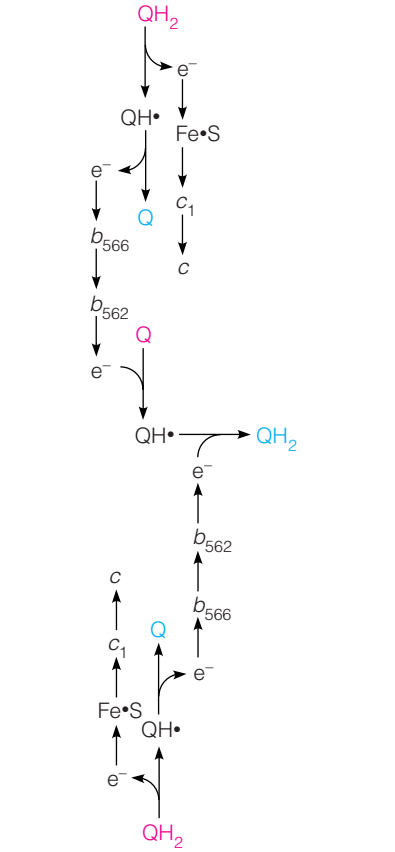
Complejos respiratorios

Las mitocondrias pueden romperse mediante tratamiento mecánico, como la oscilación sónica o mediante detergentes no iónicos como la *digitonina*, que solubiliza preferentemente la membrana externa mientras tiende a no desnaturalizar las enzimas. Mediante combinaciones de estas técnicas, es posible fraccionar las mitocondrias en cuatro complejos enzimáticos distintos (complejos I, II, III y IV; véase la Figura 15.2b), cada uno de los cuales contiene parte de toda la secuencia respiratoria, más un quinto componente (complejo V) que cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP. El análisis de cada complejo con respecto a la

La espectrofotometría diferencial, el análisis de inhibidores respiratorios y las propiedades de los complejos de membrana establecen el orden de acción de los transportadores electrónicos en la cadena respiratoria.

presencia de transportadores electrónicos, así como a las reacciones catalizadas, ha ayudado a establecer la secuencia de transportadores aceptada actualmente. En la Figura 15.10 se presenta una información más detallada acerca de la composición proteica y las actividades catalíticas de cada complejo. Como se ha indicado antes, los complejos I, II, III y IV aceptan electrones desde un transportador electrónico relativamente móvil (que no está estrechamente unido a la membrana) y pasan los electrones a otro transportador móvil. Estos transportadores móviles son el NADH, el succinato, la coenzima Q, el citocromo *c* y el oxígeno. La energía liberada por las acciones de los complejos I, III y IV impulsa la síntesis de ATP por el complejo V, que se denomina también complejo ATP sintasa.

La oxidación de la coenzima Q reducida por el complejo III es más complicada que lo que se señala en la Figura 15.10 porque en este punto, un donador de dos electrones, la $CoQH_2$, transfiere los electrones a los citocromos que son aceptores de un electrón. En este proceso, que se denomina **ciclo Q**, la $CoQH_2$ transfiere en primer lugar un electrón a un centro hierro-azufre, el cual se transfiere directamente al citocromo c_1 y luego al citocromo *c*. La semiquinona CoQ resultante transfiere a continuación otro electrón al hemo b_{566} componente del citocromo *b* (este hemo tiene un máximo de absorción de luz a 566 nm), y este electrón pasa a continuación al componente hemo b_{562} y luego reduce una molécula de CoQ oxidada a la semiquinona. Este proceso se repite con una segunda molécula de $CoQH_2$, pero esta vez el electrón del hemo b_{562} reduce a la semiquinona CoQ a $CoQH_2$ (véase el margen). El resultado es que dos



Ciclo Q

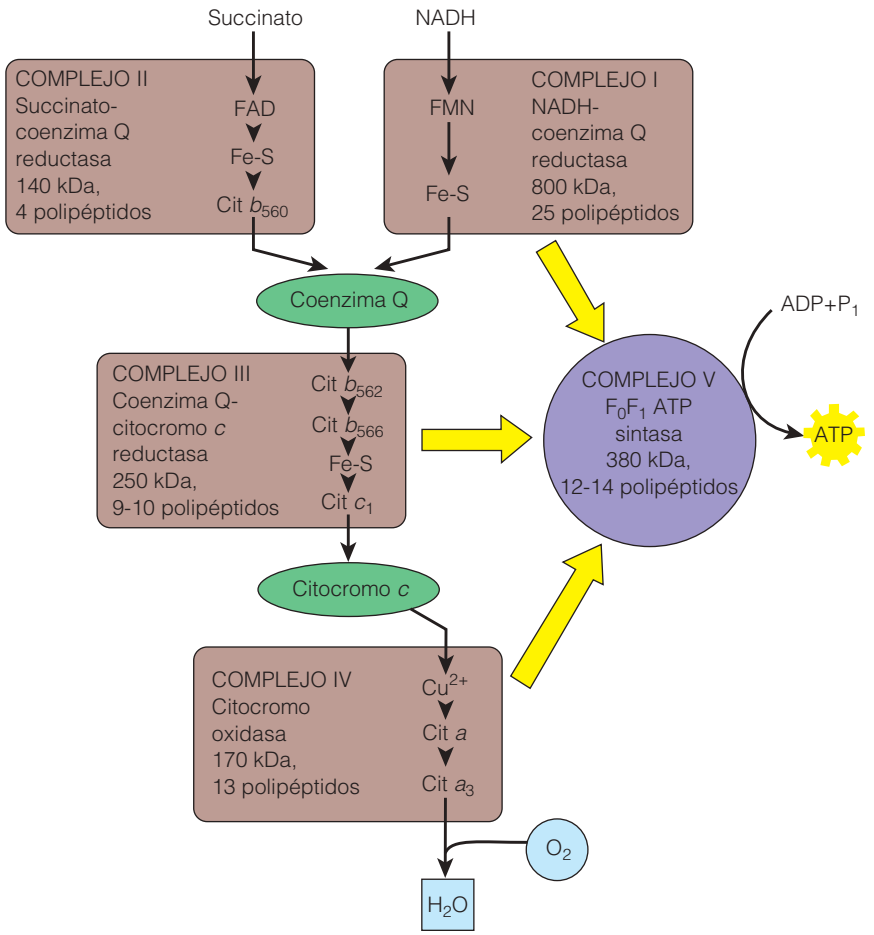


FIGURA **15.10**

Complejos multiproteicos en el ensamblaje respiratorio. Los subíndices para los citocromos *b* indican sus máximos espectrales. Los dos hemos *b* del complejo III, identificados como cit b_{562} y cit b_{566}, están unidos a la misma cadena polipeptídica.

moléculas de $CoQH_2$ se oxidan y una molécula de CoQ se reduce, para una transferencia neta de dos electrones que se emplean para reducir dos moléculas de citocromo *c*. Dado que las reacciones que consumen protones se producen dentro de la matriz, mientras que la liberación de protones tiene lugar en el espacio intermembrana, el ciclo Q ayuda a mantener el gradiente de protones necesario para impulsar la síntesis de ATP (véase la página 603).

TRANSFERENCIA DE LOS TRANSPORTADORES ELECTRÓNICOS A LAS MITOCONDRIAS

Los electrones se transportan a las mitocondrias mediante lanzaderas metabólicas.

Hasta ahora hemos considerado la oxidación del NADH en el interior de la mitocondria, sin describir de qué forma se generan allí los equivalentes reductores. Algo de NADH se genera dentro de la matriz mitocondrial por enzimas como la malato deshidrogenasa. Sin embargo, el NADH generado en la glucólisis y por otras deshidrogenasas citosólicas debe transferir los equivalentes reductores a la mitocondria, para su reoxidación por la cadena respiratoria. Son necesarios sistemas de transporte específicos, ya que el NADH generado por una enzima citosólica, como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, no puede atravesar por sí mismo la membrana mitocondrial para ser oxidado por la cadena respiratoria. En consecuencia, los equivalentes reductores deben *transferirse* a los ensamblajes respiratorios de la membrana mitocondrial interna, sin un movimiento físico de la coenzima. Este proceso comporta la reducción de un sustrato por el NADH en el citoplasma, el paso del sustrato reducido a la matriz mitocondrial a través de un sistema de transporte específico, la reoxidación de ese compuesto en el interior de la matriz y el paso del sustrato oxidado de vuelta hacia el citoplasma, en donde puede experimentar de nuevo el mismo ciclo.

El sistema más primitivo de lanzadera que se conoce es el de la dihidroxiacetona fosfato/glicerol-3-fosfato, que es especialmente activo en el cerebro (y en el músculo de vuelo de los insectos). Como se muestra en la Figura 15.11a, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) se reduce por el NADH en el citosol, tras lo cual se produce el paso del glicerol-3-fosfato resultante a la mitocondria, en donde se reoxida por una flavoproteína, la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, unida a la cara externa de la membrana interna. Este proceso comporta la reducción del FAD, seguida de la transferencia de un par de electrones desde el $FADH_2$ a la coenzima Q, de la misma manera que el NADH intramitocondrial transfiere los electrones a la CoQ. Una vez que la dihidroxiacetona fosfato ha regresado al citosol, el efecto neto ha sido la transferencia de dos equivalentes reductores desde el NADH citosólico al $FADH_2$ mitocondrial y de allí a la cadena respiratoria.

Otro sistema de lanzadera diferente, que es especialmente activo en el hígado y en el corazón, es el de la lanzadera malato/aspartato, que se muestra en la Figura 15.11b. En este caso, una isozima citosólica de la malato deshidrogenasa, junto con el NADH, reduce el oxalacetato a malato, que pasa a la matriz a través de un sistema de transporte activo específico de la membrana mitocondrial interna. El malato se reoxida a continuación por la malato deshidrogenasa del ciclo del ácido cítrico, que utiliza también NAD^+. Dado que el oxalacetato no puede atravesar la membrana interna, se transamina a aspartato, que se transporta posteriormente al exterior para la reconversión en oxalacetato, con objeto de iniciar de nuevo el ciclo. Dada la transaminación que se produce en este proceso, es necesario que el α-cetoglutarato se transporte continuamente al exterior de las mitocondrias y que el glutamato se transporte de manera continua al interior de las mismas.

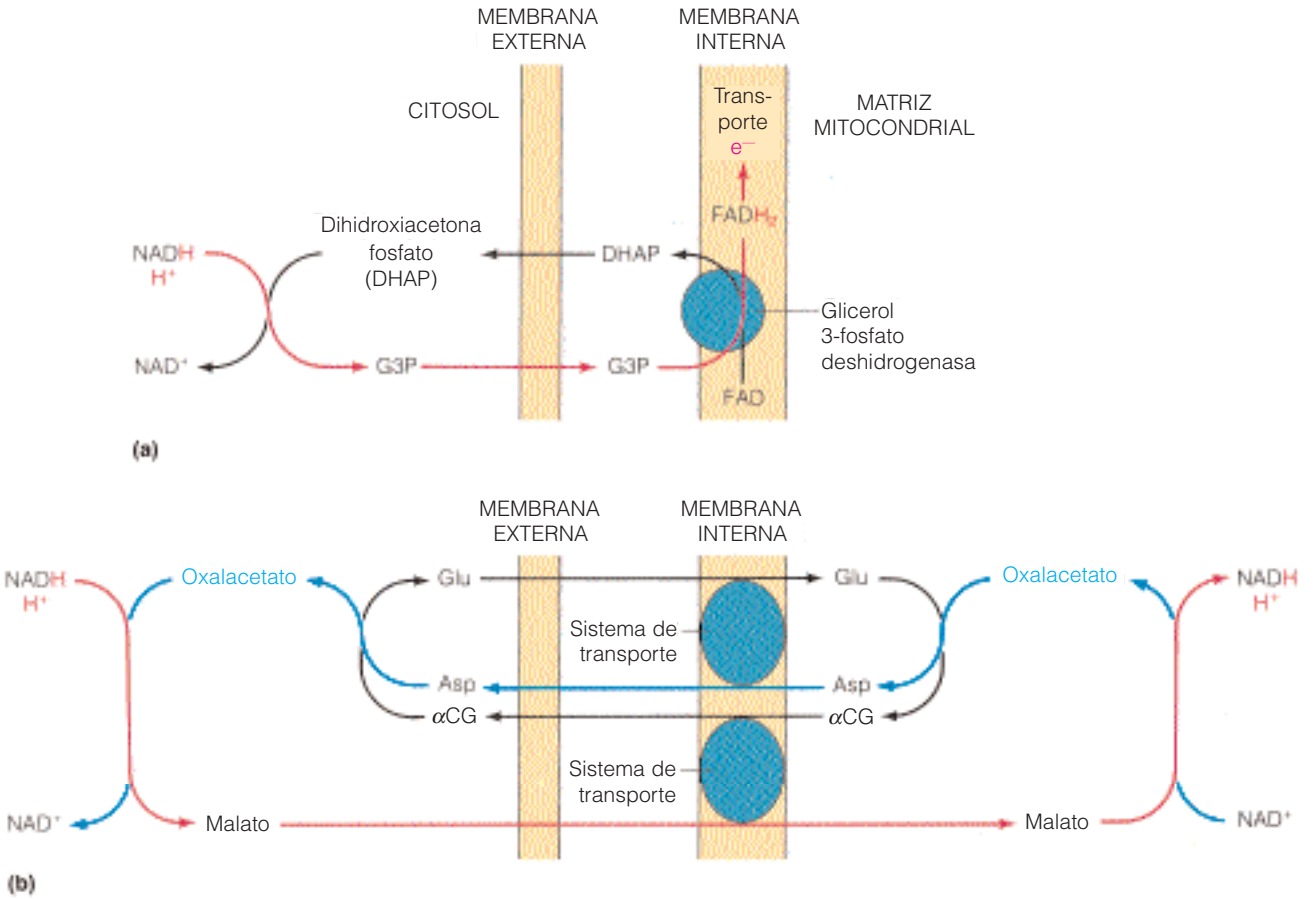


FIGURA **15.11**

Lanzaderas para la transferencia de equivalentes reductores desde el citosol a las mitocondrias. **(a)** Lanzadera dihidroxiacetona fosfato/glicerol-3-fosfato. **(b)** Lanzadera malato/aspartato. Glu = glutamato; Asp = aspartato; αCG = α-cetoglutarato.

Fosforilación oxidativa

Tras haber analizado de qué manera se genera la energía a partir de la oxidación mitocondrial de sustratos reducidos, pasaremos ahora a la cuestión de cómo se hace disponible esa energía para la síntesis de ATP, es decir, el mecanismo de la fosforilación oxidativa. Desde el punto de vista del mecanismo, la fosforilación oxidativa es mucho más compleja que las reacciones de fosforilación a nivel de sustrato de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico, y hasta hace poco este campo de estudio ha sido uno de los terrenos más discutidos de la investigación bioquímica. Como afirmó el difunto Efraim Racker, "quien no se sienta confundido con relación a la fosforilación oxidativa es que simplemente no comprende la situación". Como veremos, una parte importante de los conocimientos necesarios ha aparecido en las tres décadas desde que Racker escribió estas palabras.

LA RELACIÓN P/O: EFICACIA DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

Para medir la eficacia de la fosforilación oxidativa, debemos determinar la energía capturada en forma de ATP como una fracción de la energía total liberada en la oxidación de un sustrato. Esta medida fue posible cuando se pudo determinar la cantidad de ATP sintetizado por mol de sustrato oxidado en las mitocondrias aisladas. Lo que solemos normalmente medir es la **relación P/O**, que es el número de moléculas de ATP sintetizadas por par de electrones transportados a través del transporte electrónico. La síntesis de ATP se cuantifica como incorporación de fosfato al ATP, y los pares electrónicos se cuantifican como

captación de oxígeno en μátomos reducidos a agua (un μátomo de O_2 son 0.5 μmoles). La captación de oxígeno se determina con un electrodo de oxígeno de registro.

Hasta hace poco se aceptaba de manera general que la oxidación mitocondrial del NADH se produce con una relación P/O de 3 y, por tanto, cualquier sustrato metabolizado a través de la deshidrogenasa mitocondrial ligada al NAD^+ debe producir 3 moles de ATP por mol de NADH oxidado. Esta idea concordaba con otras teorías más antiguas de la fosforilación oxidativa que proponían un acoplamiento directo de la síntesis de ATP con una reacción exergónica, como se observa en las reacciones de fosforilación a nivel de sustrato de la glucólisis.

Sin embargo, en la actualidad parece claro que la fosforilación y la oxidación no están acopladas de manera directa. Como sugiere la Figura 15.2, el acoplamiento se produce de forma indirecta. Este mecanismo no requiere una relación estequiométrica entera entre los equivalentes reductores consumidos y el ATP sintetizado. Por otro lado, la mayoría de las medidas de la relación P/O dan valores cercanos a 3 para la oxidación de los sustratos ligados al NAD^+ y 2 para el succinato, y utilizaremos esos valores en nuestras exposiciones posteriores. Teniendo en cuenta esto, podemos escribir una ecuación equilibrada para la oxidación mitocondrial del NADH.

$$NADH + 4H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 + 3ADP + 3P_i \rightleftharpoons NAD^+ + 4H_2O + 3ATP$$

Como ya se ha comentado antes, la oxidación del NADH por el O_2 tiene un valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ de –220 kJ/mol. La inversión de la hidrólisis del ATP requiere 31 kJ/mol en condiciones estándar. En consecuencia, el acoplamiento de la síntesis de tres ATP con la oxidación de un NADH atrapa 93 kJ (3×31), es decir, aproximadamente un 42% de la energía liberada (en condiciones estándar).

REACCIONES OXIDATIVAS QUE IMPULSAN LA SÍNTESIS DE ATP

Una ojeada a las Figuras 15.3, 15.7, 15.9 o 15.10 revela que la transferencia de equivalentes reductores desde un sustrato oxidable por el NAD^+ hasta el O_2 comporta alrededor de una docena de reacciones de oxidorreducción ligadas consecutivas. ¿Cuál de estas reacciones impulsa realmente la síntesis de ATP? Esta pregunta fue la que más preocupó al inicio de la investigación bioenergética, cuando se pensaba que la síntesis de ATP estaba acoplada directamente con reacciones exergónicas individuales, como ocurre en la fosforilación a nivel de sustrato. La interpretación más fácil de la relación P/O de 3 observada para la oxidación del NADH es que tres de las reacciones individuales de la cadena respiratoria son lo suficientemente exergónicas como para impulsar la síntesis de una molécula de ATP cada una. De hecho, tres de estas reacciones tienen unos valores de $\Delta G^{\circ\prime}$ superiores a –31 kJ/mol, la barrera mínima que debe superarse (en condiciones estándar) para hacer que la síntesis de cada ATP sea exergónica (véase la Figura 15.7). Esas tres reacciones son la oxidación del $FMNH_2$ por la coenzima Q, la oxidación del citocromo *b* por el citocromo c_1 y la reacción de la citocromo oxidasa. Cada una de estas reacciones se consideró un **lugar de acoplamiento** para la síntesis de ATP; es decir, cada una de ellas se consideró una reacción en la que la síntesis de ATP se impulsa directamente por la energía liberada por esa reacción.

Tres reacciones de la cadena respiratoria son lo suficientemente exergónicas como para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP.

Dado que ahora sabemos que el acoplamiento entre la oxidación y la síntesis de ATP es indirecto, el concepto de lugares de acoplamiento constituye una simplificación excesiva. No obstante, este concepto resultó útil, ya que proporcionó un marco para la realización de experimentos de identificación de cada

una de las tres reacciones citadas como capaz de dar, por sí sola, energía a la membrana para la síntesis de ATP a pesar de que no actúe el conjunto de la cadena de transporte electrónico. Teniendo esto en cuenta, examinemos los datos existentes al respecto, que se resumen en la Figura 15.12.

En primer lugar, el succinato se oxida con una relación P/O de 2, no de 3, lo que sugiere la existencia de un lugar de acoplamiento asociado con la NADH deshidrogenasa. Este hecho se confirmó mediante el bloqueo del transporte electrónico después del citocromo *b* con antimicina A. Se añadió ferricianuro como aceptor electrónico artificial, de manera que pudiera continuar el flujo electrónico. En estas condiciones, los sustratos ligados al NAD^+, como el β-hidroxibutirato, se oxidan con una relación P/O de 1, lo cual confirmaba la existencia de un lugar previo al citocromo *b*.

Otro enfoque consistió en el empleo del donador electrónico artificial ascorbato. En presencia de otro aceptor electrónico, la tetrametil-*p*-fenilen diamina (TMPD; véase la Figura 15.9), podían introducirse los electrones en la cadena respiratoria a nivel del citocromo *c*. Estos transportadores electrónicos reducían al citocromo *c* de manera no enzimática, y su oxidación a través de la citocromo oxidasa se producía con una relación P/O de 1, con lo que se localizaba un lugar de acoplamiento más allá del citocromo *c*. Por último, el citocromo *c* purificado que se añade a las mitocondrias, puede actuar como un aceptor de electrones y retirarlos de la cadena de transporte electrónico. La adición posterior de un inhibidor de la citocromo oxidasa, como el cianuro, fuerza la salida de los electrones de la cadena respiratoria a la altura del citocromo *c*. En estas condiciones, el succinato se oxida con una relación P/O de 1, lo que localiza un lugar entre los citocromos *b* y *c*. En resumen, estos experimentos demuestran que los complejos I, III y IV son cada uno de ellos capaces de impulsar la síntesis de ATP, mientras que el complejo II no lo es.

EL SISTEMA ENZIMÁTICO PARA LA SÍNTESIS DE ATP

El hecho de que los complejos I, III y IV pueden impulsar individualmente la síntesis de ATP se confirmó mediante estudios de reconstitución en los que se utilizó el complejo V, que cataliza la síntesis real de ATP a partir de ADP. Revisemos ahora el descubrimiento y la naturaleza del complejo V, para pasar luego a tratar los experimentos de reconstitución.

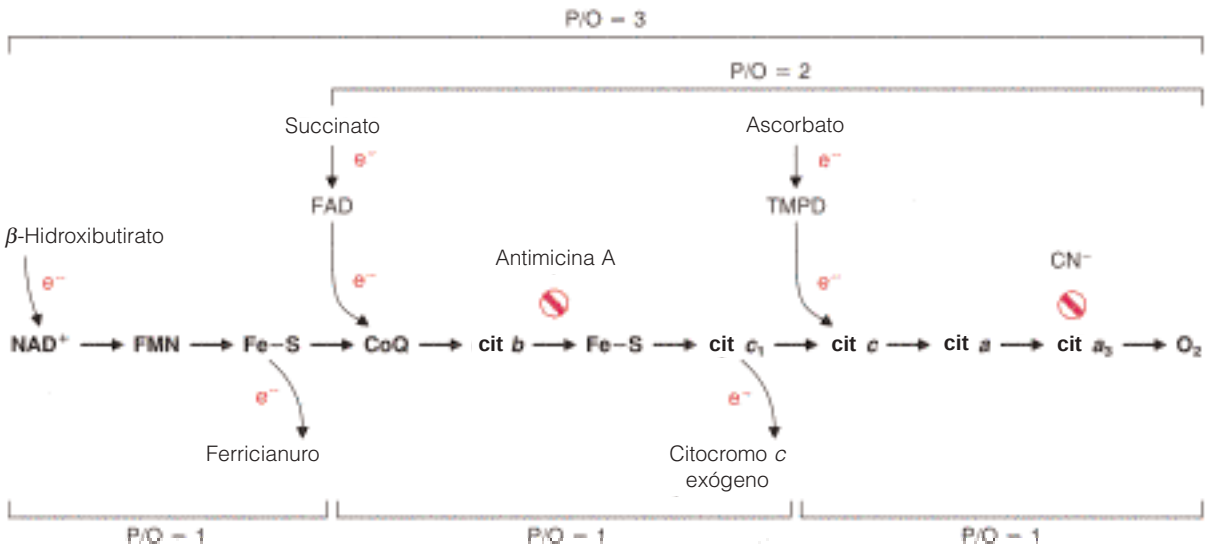


FIGURA **15.12**

Identificación experimental de los "lugares de acoplamiento". El transporte electrónico se limitó a determinadas partes de la cadena mediante el empleo de determinados donadores electrónicos, aceptores electrónicos e inhibidores respiratorios, según se indica. Para cada segmento de la cadena aislado de esta forma, se determinaron las relaciones P/O, como se muestra en la figura. Se añadió antimicina A en el experimento que identificó el primer lugar de acoplamiento para bloquear el flujo de electrones a partir del citocromo *b*.

Cuando se tiñen negativamente las mitocondrias con fosfotungstato, la microscopia electrónica muestra que las crestas están cubiertas por unas proyecciones en forma de nudos situadas en el lado de la matriz, unidas cada una de ellas a la membrana interna por un corto tallo (Figura 15.13). Los nudos se denominan **esferas F_1**. La rotura de las mitocondrias mediante oscilación sónica genera fragmentos de membrana interna que se vuelven a unir en forma de vesículas cerradas. La membrana se cierra sobre sí misma con la parte interna hacia fuera, de manera que las proyecciones en forma de nudos quedan en el exterior. Estas partículas submitocondriales respiran y sintetizan ATP, del mismo modo que lo hacen las mitocondrias intactas. Efraim Racker y sus colaboradores demostraron que el tratamiento de estas vesículas con tripsina o con urea hacía que los nudos se separaran de las vesículas. Tras la centrifugación para separar las vesículas "desnudas" de los nudos, las vesículas podían aún oxidar los sustratos y reducir el oxígeno, pero no se sintetizaba ATP. Cuando se volvían a añadir los nudos a las vesículas, se producía una reconstitución considerable de las partículas, que podían catalizar entonces la síntesis de ATP como resultado de la oxidación de los sustratos exógenos.

Dado que la readición de los nudos volvía a acoplar la síntesis de ATP al transporte electrónico, a estos nudos se les dio inicialmente el nombre de **factores de acoplamiento**. La purificación de los nudos unidos a los tallos subyacentes reveló un gran agregado multiproteico, formado por más de una docena de cadenas polipeptídicas, como se indica en la Figura 15.14. Esta estructura, denominada **complejo F_0F_1**, consta del nudo, el tallo al que está unido y un complejo unido que está embebido en la membrana interna. El nudo con tallo se denomina F_1 y la base se denomina F_0. El complejo F_1 consta de cinco proteínas denominadas $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ y ε con una estequiometría de las subunidades $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$. El complejo F_0 contiene al menos tres subunidades proteicas a, b, y c con una estequiometría ab_2c_{12}.

El complejo F_0F_1 completo tiene in vitro actividad ATPasa, igual que el factor F_1 solo. La actividad ATPasa se supone es la inversa de la verdadera actividad fisiológica que es la síntesis de ATP. Una de las proteínas del complejo F_0 es el lugar de unión de la **oligomicina** que inhibe la síntesis de ATP (se considerará más adelante en la página 606). Por esta razón, algunos investigadores llaman a esta estructura F_o (la letra *o* se refiere a la oligomicina) en lugar de F_0. La actividad de la ATPasa, la sensibilidad a la oligomicina y los resultados de los experimentos de reconstitución confirman que el cometido del complejo F_0F_1 (también denominado complejo V) es la síntesis de ATP. La acción de esta asombrosa estructura, una "máquina rotatoria" molecular, se presenta con mayor detalle en la página 610.

Continuando con los experimentos de reconstitución, Racker encontró que los complejos respiratorios submitocondriales aislados (I, II y otros) podían reconstituirse mediante oscilación sónica para formar membranas artificiales (liposomas) que contenían fosfolípidos purificados. Cuando se incluía el complejo F_0F_1 en la mezcla de sonicación, se incorporaba también a las vesículas. En este caso, cada preparación tenía las propiedades de transporte electrónico del complejo original, más una actividad de fosforilación. Para los complejos reconstituidos I, III y IV, la relación P/O era de 1 en cada caso. Así, por ejemplo, el complejo III reconstituido podía transferir electrones desde la coenzima Q al citocromo *c*, con la síntesis simultánea de 1 mol de ATP por par de equivalentes reductores. Este tipo de pruebas demostraron que los complejos respiratorios I, III y IV contienen cada uno un lugar de acoplamiento. En cambio, el complejo II (succinato deshidrogenasa) no mostraba síntesis de ATP, lo cual confirmaba la ausencia de un lugar de acoplamiento en este complejo.

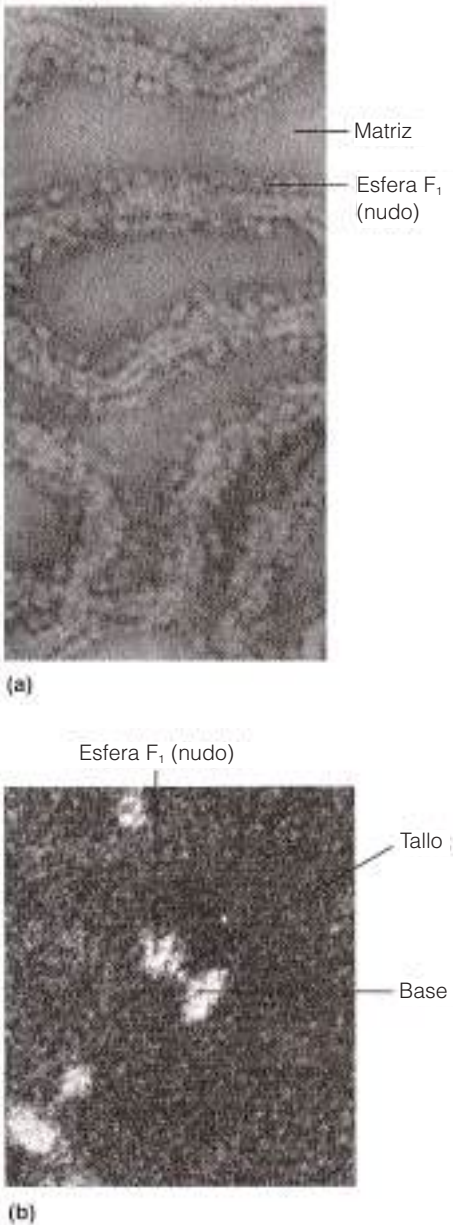


FIGURA **15.13**

Estructura fina de las crestas mitocondriales. Las preparaciones con tinción negativa de la membrana interna muestran las esferas F_1 en forma de "nudos" que se proyectan desde las crestas. **(a)** Parte de la membrana mitocondrial interna del corazón bovino, en la que se observan proyecciones en forma de nudos a lo largo del lado de la matriz de la membrana. **(b)** Preparaciones purificadas de nudos de mitocondrias de hígado de rata. El nudo está unido mediante un corto tallo a una base que está embebida en la membrana interna de la mitocondria intacta.

Cortesía de A. Tzagoloff, *Mitochondria* (Nueva York: Plenum, 1982).

El complejo F_0F_1 contiene un canal protónico y la enzima que sintetiza ATP.

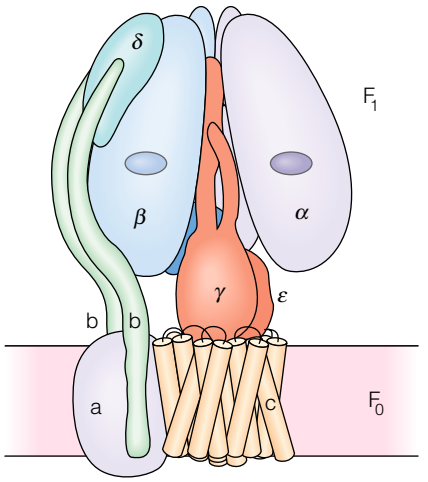


FIGURA **15.14**

Estructura del complejo F_0F_1. El complejo F_0F_1, también denominado ATP sintasa o complejo V, contiene un nudo F_1 que se proyecta en la matriz mitocondrial y está conectado mediante un tallo a la base F_0. El nudo F_1 contiene tres dímeros $\alpha\beta$ que forman como seis segmentos de una naranja espaciados alrededor del tallo, que está formado por proteínas γ y ε; δ está enganchada a la proteína b de la base F_0, que también contiene proteínas a y c, más otras. Este complejo abc se denomina un "estator", una estructura que se opone a la rotación del "rotor" $\alpha\beta\gamma\delta\varepsilon$. Este modelo se basa en la estructura cristalina del complejo F_1 mitocondrial de buey.

Reproducido con permiso de W. Junge, H. Lill y S. Engelbrecht, *Trends Biochem. Sci.* (1997) 22:420. © 1997 con permiso de Elsevier Science.

MECANISMO DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA: ACOPLAMIENTO QUIMIOSMÓTICO

¿Cuál es el mecanismo real mediante el que la energía liberada en la respiración se utiliza para impulsar la síntesis de ATP? A pesar de que la mayor parte de los bioquímicos están de acuerdo actualmente en las líneas generales de la respuesta, continúan existiendo algunas preguntas importantes.

El interés mecanístico inicial se centró en un mecanismo de **acoplamiento químico**, en el que la energía liberada se utilizaría directamente para la síntesis de un intermediario de energía elevada, como se observa en la fosforilación a nivel de sustrato. Sin embargo, estos intermediarios activados no se han identificado nunca en la fosforilación oxidativa.

Aunque se han considerado otros modelos, hoy en día se acepta de manera general un modelo que implica un **acoplamiento quimiosmótico**, propuesto en 1961 por el bioquímico británico Peter Mitchell. Aunque este modelo encontró inicialmente algunas resistencias, en la actualidad existen datos abrumadores que lo respaldan, y los logros de Mitchell le valieron el Premio Nobel en el año 1978. En su forma más básica, este modelo propone que la energía del transporte electrónico impulsa un sistema de transporte activo, que de alguna forma bombea protones fuera de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. Esta acción genera un gradiente electroquímico para los protones, con un valor de pH más bajo fuera de la membrana mitocondrial interna que dentro de ella. Los protones del exterior tienen una tendencia termodinámica a volver a pasar al interior, para igualar el pH a ambos lados de la membrana. Otra forma de decirlo es que debe gastarse energía libre para mantener el gradiente de protones. Cuando los protones vuelven a entrar en la matriz, esa energía se disipa y parte de ella se utiliza para impulsar la síntesis de ATP.

Para comprender con mayor detalle la teoría quimiosmótica, recordemos que algunas de las reacciones de transporte electrónico, aunque no todas, transfieren iones hidrógeno (protones) al igual que electrones. Estas reacciones incluyen las deshidrogenaciones del NADH, el $FMNH_2$, el $FADH_2$ y la coenzima Q reducida. Mitchell propuso que las enzimas que catalizan estas deshidrogenaciones están dispuestas de manera asimétrica en la membrana interna, de forma que los protones son captados siempre de dentro de la matriz y liberados en el espacio intermembrana. En la Figura 15.15 se muestra de qué forma podría producirse este proceso. Este **bombeo de protones** por las proteínas respirato-

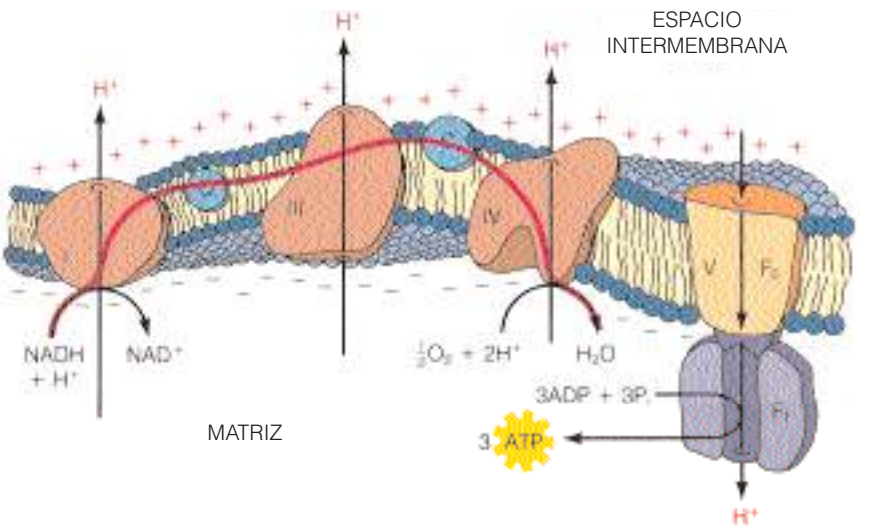


FIGURA **15.15**

Transporte vectorial de protones mediante los complejos de la cadena respiratoria. Este dibujo de los complejos proteicos de la membrana interna muestra la secuencia de transportadores electrónicos desde el NAD^+ hasta el O_2. No se incluye el complejo II. Los protones bombeados por los complejos I, III y IV no son probablemente los eliminados desde los transportadores electrónicos durante la oxidación. La reentrada de los protones en la matriz, a través del canal F_0 (complejo V), proporciona la energía necesaria para impulsar la síntesis de ATP. No se han establecido aún relaciones estequiométricas entre las reacciones de oxidación y el bombeo de protones.

rias da lugar a la conversión de la energía de la respiración en energía osmótica, en forma de un **gradiente electroquímico**, o gradiente de concentración química que establece un potencial eléctrico. La energía liberada por la descarga de este gradiente puede acoplarse con la fosforilación de ADP a ATP, de manera que no se forman intermediarios aislables. En este proceso interviene el complejo F_0F_1 (complejo V). La porción F_0 del complejo se extiende a través de la membrana interna y se cree que contiene un canal específico para el regreso de los protones a la matriz mitocondrial. La energía libre que se libera cuando el H^+ pasa por este canal para regresar a la matriz se aprovecha para impulsar la síntesis de ATP, catalizada por el componente F_1 del complejo.

UN EXAMEN MÁS DETALLADO DEL ACOPLAMIENTO QUIMIOSMÓTICO: PRUEBAS EXPERIMENTALES

El acoplamiento quimiosmótico indica el establecimiento de un gradiente de protones transmembrana para impulsar los procesos endergónicos.

Conviene que examinemos ahora con mayor detalle las pruebas experimentales del acoplamiento quimiosmótico, en parte por su importancia para comprender la fosforilación oxidativa y en parte porque nos proporcionan una perspectiva de otros procesos biológicos, como el transporte activo y la fotosíntesis.

Las membranas pueden establecer gradientes de protones

Cuando se pudieron medir los cambios de pH y de potencial eléctrico a través de las membranas mitocondriales, se puso de manifiesto que las mitocondrias pueden bombear protones desde la matriz hasta el espacio intermembrana. De hecho, el valor de pH en el exterior de una mitocondria con respiración activa es unas 1.4 unidades menor al de la matriz. El gradiente de pH genera también un potencial eléctrico de aproximadamente 0.14 V a través de la membrana debido al movimiento neto de protones con carga positiva hacia el exterior a través de la membrana interna. El gradiente de pH y el potencial de membrana contribuyen ambos a producir un *gradiente electroquímico de H^+* o **fuerza protón motriz** (**fpm**), como se muestra aquí y también en el Capítulo 10 [ecuación (10.2)].

$$\underset{\text{Gradiente electroquímico de } H^+}{\Delta\mu_H} = \underset{\text{Potencial de membrana}}{\Delta\psi} - \underset{\text{Gradiente de pH}}{2.3RT\,\Delta pH/F} \qquad (15.7)$$

A $\Delta\mu_H$ se le denomina también Δp, es decir fuerza protón motriz o fpm. ΔpH tiene un valor negativo (–1.4) ya que se mide de dentro a fuera. Así pues, la contribución del gradiente de pH es positiva: $-2.3RT\,(-1.4)/F$, que es igual a +0.084 V, y $\Delta\mu_H$ es 0.14 V + 0.084 V, es decir, +0.224 V. De la relación entre el potencial de reducción estándar y $\Delta G^{\circ\prime}$ (véase la ecuación (15.1)) vemos que este valor corresponde a un cambio de energía libre estándar de aproximadamente 21 kJ por mol de protones, que generaría aproximadamente 42 kJ por par de equivalentes reductores. Esta cantidad de energía es de una magnitud adecuada para impulsar la síntesis de 1 mol de ATP, aunque no es un hecho universalmente aceptado que tan sólo se bombeen dos protones en cada lugar de acoplamiento. De hecho, algunos datos recientes sugieren que el número de protones translocados por par de equivalentes reductores es de hasta 12.

Otros experimentos comparables han demostrado que los gradientes protónicos electroquímicos se utilizan en transacciones energéticas distintas de la fosforilación oxidativa. Las membranas bacterianas utilizan el bombeo de protones para transducir energía tanto para la fosforilación oxidativa como para impulsar los motores flagelados que permiten el movimiento de la célula. El

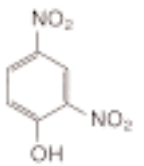
bombeo de protones a través de la membrana tilacoide del cloroplasto impulsa la síntesis de ATP en la fotofosforilación (véase el Capítulo 17). Los gradientes de protones impulsan también el transporte activo (véase el Capítulo 10), así como la producción de calor y la síntesis de NADPH por la transhidrogenasa.

La fosforilación oxidativa requiere una membrana interna indemne

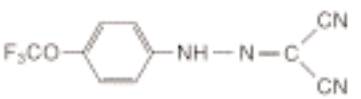
Cuando se interrumpe la continuidad física de la membrana, por ejemplo mediante la oscilación sónica, las partículas resultantes pueden llevar a cabo el transporte electrónico, pero no la síntesis de ATP. La necesidad de una membrana estructuralmente intacta para el mantenimiento de un potencial de membrana concuerda con la idea de que es esencial un gradiente de protones para la fosforilación oxidativa.

Las proteínas de transporte electrónico claves se extienden de un lado a otro de la membrana interna

Si las proteínas respiratorias han de actuar como bombas de protones, los transportadores electrónicos que transportan protones, como la NADH deshidrogenasa, deben estar en contacto tanto con la cara interna como con la cara externa de la membrana. Además, estos transportadores deben estar situados de manera asimétrica en la membrana, con objeto de facilitar el transporte en una dirección, hacia fuera. La localización asimétrica se ha demostrado mediante el empleo de agentes que reaccionan con las proteínas respiratorias pero que no son capaces de atravesar ellos mismos la membrana, como ocurre con los anticuerpos, las enzimas proteolíticas o los reactivos de marcaje. El tratamiento de las mitocondrias intactas con estos reactivos permite la detección de las proteínas situadas en la superficie externa de la membrana interna, mientras que la reacción con vesículas de membrana permite el acceso al lado interno, es decir a la matriz. Estos estudios han demostrado, por ejemplo, que el complejo de la citocromo oxidasa (complejo IV) se une al citocromo *c* sólo en el lado citosólico. Además, 9 de las 13 subunidades del complejo pueden marcarse tan sólo desde un lado o desde el otro, lo cual indica una colocación asimétrica del complejo en la membrana. Actualmente, se han realizado hallazgos semejantes para las proteínas de los complejos I, II y III.



2,4-Dinitrofenol (DNP)



Trifluorocarbonilcianuro fenilhidrazona (FCCP)

Los desacopladores actúan disipando el gradiente protónico

Un grupo de compuestos, entre los que se encuentran el **2,4-dinitrofenol** (**DNP**) y la **trifluorocarbonilcianuro fenilhidrazona** (**FCCP**), se denominan agentes desacoplantes, o **desacopladores**. Los agentes desacoplantes, cuando se añaden a las mitocondrias, bloquean la síntesis de ATP, al tiempo que permiten que continúe el transporte electrónico a lo largo de la cadena respiratoria hasta el O_2. El pK_a del grupo hidroxilo fenólico del DNP es tal que está normalmente disociado al pH intracelular. Sin embargo, una molécula de DNP que se aproxime a la membrana interna desde el exterior se protona, debido al pH más bajo existente en esta zona. Esta protonación aumenta la hidrofobicidad del DNP, lo cual permite que difunda en la membrana y que la atraviese por acción de masa. Una vez dentro de la matriz, el pH más alto hace que el hidroxilo fenólico se desprotone. Así pues, el desacoplador tiene el efecto de transporte de H^+ de vuelta hacia la matriz, evitando el canal protónico F_0 y, por tanto, sin síntesis de ATP.

La acción de los desacopladores proporciona un respaldo claro al acoplamiento quimiosmótico.

Otro inhibidor de la fosforilación, el antibiótico **oligomicina**, actúa de manera muy diferente. Al unirse a una proteína específica del complejo F_0, bloquea el flujo de protones a través del canal protónico F_0 e inhibe, por tanto, la fosforilación oxidativa de manera directa. El bombeo de protones por los transportadores respiratorios se inhibe también, pero es una consecuencia secundaria de la inhibición de la síntesis de ATP.

En resumen, un inhibidor como el DNP disipa el gradiente protónico al transportar los protones al interior de las mitocondrias a través de lugares distintos del canal protónico F_0, mientras que la oligomicina bloquea el canal F_0 con lo que el gradiente de pH no puede disiparse en absoluto.

Existen muchos datos sobre el transporte de iones distintos del H^+ que confirman que es esencial una membrana funcionalmente intacta para la fosforilación oxidativa. El antibiótico *valinomicina* (véase la página 379 en el Capítulo 10) es un ejemplo de un **ionóforo** ("transportador de iones"). Este compuesto liposoluble forma un complejo específico con el ion potasio. Dado que el complejo es lipófilo y puede difundir dentro de la membrana, igual que lo hace el DNP protonado, la valinomicina realiza el transporte de K^+ a través de la membrana interna de una forma parecida a la que utiliza el DNP para el transporte de protones. La valinomicina actúa reduciendo el componente $\Delta\psi$ (potencial de membrana) de la fpm, sin un efecto directo sobre el gradiente de pH. Otro antibiótico, la **nigericina**, actúa como **antiporte** K^+/H^+ y transporta el H^+ en una dirección, acoplado con el transporte inverso de K^+. Así pues, la nigericina disipa el componente ΔpH de la fpm con un efecto escaso sobre $\Delta\psi$. Ninguno de estos dos compuestos resulta especialmente eficaz por sí solo como desacoplador de la fosforilación oxidativa, pero de forma combinada colapsan ambos elementos de la fpm e inhiben de manera eficaz la síntesis de ATP.

Los antibióticos como la valinomicina y la nigericina interfieren sobre la fosforilación oxidativa o sobre el mantenimiento del gradiente protónico.

La generación de un gradiente protónico permite la síntesis de ATP sin el transporte electrónico

Andre Jagendorf, mientras estudiaba la producción fotosintética de ATP, aportó pruebas importantes del acoplamiento quimiosmótico en el cloroplasto. Como se presentará en el Capítulo 17, el cloroplasto acopla la energía luminosa con la síntesis de ATP. Jagendorf demostró que la síntesis de ATP podía producirse en el cloroplasto sin que hubiera transporte electrónico, siempre y cuando existiera un gradiente protónico. Se incubaron cloroplastos a pH 4 durante varias horas y luego se transfirieron rápidamente a un amortiguador de pH 8. De este modo, como en la situación que se da en las células intactas, el interior del orgánulo estaba a un pH más bajo que el exterior (las membranas de los cloroplastos bombean protones *hacia dentro*, no hacia fuera). La adición de ADP y P_i a estos cloroplastos generó una explosión de síntesis de ATP, de manera simultánea con la disipación del gradiente de pH. Se han observado resultados semejantes con las mitocondrias. Estos experimentos indican que el establecimiento de un gradiente protónico, incluso sin un aporte energético correspondiente, basta para impulsar la síntesis de ATP.

Los cloroplastos utilizan la energía de la luz para impulsar los protones hacia adentro, estableciendo un gradiente protónico para la síntesis de ATP.

Una modificación muy notable del experimento de Jagendorf fue la realizada con una proteína de membrana, la *bacteriorrodopsina*, procedente de la bacteria fotosintética *Halobacterium halobium*. La bacteriorrodopsina bombea protones cuando se aplica luz a las bacterias. Se aisló bacteriorrodopsina en una forma sin membranas y se incorporó posteriormente a vesículas sintéticas, junto con ATPasa F_0F_1 aislada de mitocondrias hepáticas en la orientación correcta. Al iluminar estas vesículas, se produjo la síntesis de ATP, lo cual indicaba que la fosforilación puede producirse como consecuencia directa de la formación de un gradiente protónico.

PERSPECTIVAS ESTRUCTURALES EN LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

Sobre la mitad de la década de los años 1990 se vieron tres logros notables de la cristalografía de rayos X que expandieron enormemente la comprensión mecanística del transporte electrónico y la fosforilación oxidativa. Éstos fueron las estructuras de los complejos III, IV y V de las mitocondrias de corazón de

buey. La estructura del complejo III (11 subunidades, 248 kDa) proporcionó un gran soporte al modelo del ciclo Q que se presentó en la página 597. Como se muestra en la Figura 15.16, uno de los dos hemos del citocromo *b* (b_L en la figura, idéntico a b_{566}) se encuentra lo suficientemente cerca del centro hierro-azufre que la unión de $CoQH_2$ entre ambos lugares puede conducir a su transferencia de un electrón a cada uno de los dos transportadores. Una vez que b_L ha pasado su electrón a la cercanía de b_H (idéntico a b_{562}), una molécula de CoQ puede unirse a un segundo lugar y reducirse por el b_H.

En 1996 se describió la estructura del complejo IV (citocromo oxidasa) bovino. Este complejo de 200 kDa con 13 subunidades, cuyo modelo se presenta en la Figura 15.17, está formado en gran medida por hélices transmembrana. Los dos hemos, *a* y a_3, se encuentran cercanos en el interior de la membrana, asociados con cobres (Cu_A y Cu_B). Los dos cobres y los hierros del hemo experimentan una oxidación y reducción cíclica durante el paso de los electrones desde el citocromo *c* al oxígeno. La oxidación inicial del citocromo *c* la lleva a cabo el Cu_A, que transfiere el electrón al hemo *a*, y luego a Cu_B y el hierro del hemo a_3, que están tan cerca (0.5 nm) que constituyen un "centro binuclear", que opera como una única unidad en la transferencia electrónica. En este lugar, el O_2 sufre su reducción a agua. El proceso global catalizado por el complejo IV es como sigue.

$$4 \text{ cit } c\text{–}Fe^{2+} + 8H^+ \text{ (dentro)} + O_2 \longrightarrow 4 \text{ cit } c\text{–}Fe^{3+} + 2H_2O + 4H^+ \text{ (fuera)}$$

De forma clara, la cuestión fundamental sobre la función de este complejo es el mecanismo mediante el cual se bombean desde la matriz al espacio intermembrana cuatro protones por molécula de oxígeno reducida. Al menos parecen intervenir dos procesos. Un análisis reciente del complejo IV en ambas formas oxidada y reducida proporciona una pista a uno de estos procesos al revelar un

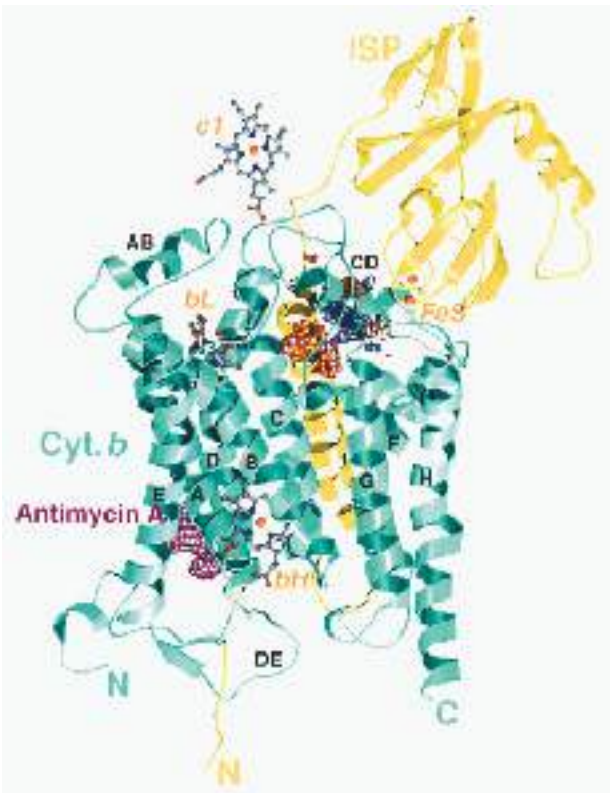


FIGURA **15.16**

Estructura de los componentes redox del complejo III-citocromo *b*, la proteína de hierro y azufre (ISP) y el hemo del citocromo c_1. La figura presenta un monómero de un complejo dimérico. Las hélices transmembrana del citocromo *b* (verde) están identificadas con letras de la A a la H, y también están marcados algunos de los lazos de conexión (p. ej. AB). La unión de $CoQH_2$ que experimenta la oxidación inicial se produce entre b_L y el centro hierro-azufre (FeS) en la ISP (dorado). En el complejo, el citocromo c_1, que acepta los electrones de FeS, se une cerca de la cara citosólica. No se muestra la conexión entre la hélice transmembrana ISP y el citocromo *b* del segundo monómero. En púrpura se muestra el lugar de unión de la antimicina A.

Cortesía de J. Deisenhofer de H. Kim, D. Xia y J. Deisenhofer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1995) 95:8026-8033, con permiso de PNAS.

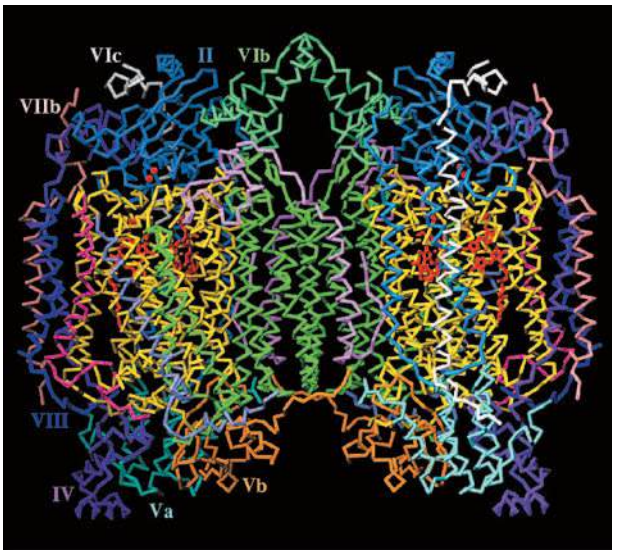


FIGURA **15.17**

Traza del esqueleto Cα de un dímero de citocromo oxidasa de corazón de buey. Se muestra cada subunidad con un color diferente. Los dos hemos, con cobres asociados, se presentan en rojo.

Cortesía de S. Yoshikawa de T. Tsukihara et al., *Science* (1996) 272:1136, con permiso de *Science*.

movimiento significativo de un residuo de aspartato, el D51, que acompaña a la oxidación. Como se esquematiza en la Figura 15.18, la situación final de eyección de un protón al espacio intermembrana (parte superior de la figura) implica la rotación del grupo carboxilo protonado de D51 y su desprotonación, concomitante con la unión de una molécula de agua, producida por la reducción de O_2, a las serinas 202 y 205. La liberación de ese agua hace que el carboxilo del aspartato rote hacia atrás y sufra la protonación de una tirosina, la Y54, que es también parte de la red de transferencia del protón.

En 1994 la publicación por el grupo de John Walker de la estructura cristalina del componente F_1 de 371 kDa del complejo V clarificó el mecanismo mediante el cual el paso de protones a través del complejo F_0F_1 impulsa la síntesis de ATP. Como se sugirió en la Figura 15.14, el nudo del complejo F_1 contiene tres dímeros idénticos $\alpha\beta$. Sin embargo, la estructura cristalina mostraba diferencias estructurales significativas entre los tres y más significativo era que el lugar de unión del nucleótido de uno contenía ADP, mientras que otro contenía AMP-PNP (un análogo no hidrolizable del ATP que se añadía durante la cristalización), y el tercero estaba vacío.

Las regiones N-terminales de cada dímero formaban barriles β cuya relación con la subunidad γ interior sugerían cojinetes de una máquina rotatoria. Todo esto apoyaba un mecanismo propuesto por Paul Boyer varios años antes, en el que la rotación de la subunidad γ produce cambios conformaciones secuenciales de los ensamblajes $\alpha\beta$. Como se presenta en la Figura 15.19, las tres conformaciones del lugar de unión del nucleótido son laxa (L), compacta (T) y abierta (O). En este modelo, el ATP se forma espontáneamente por condensación de

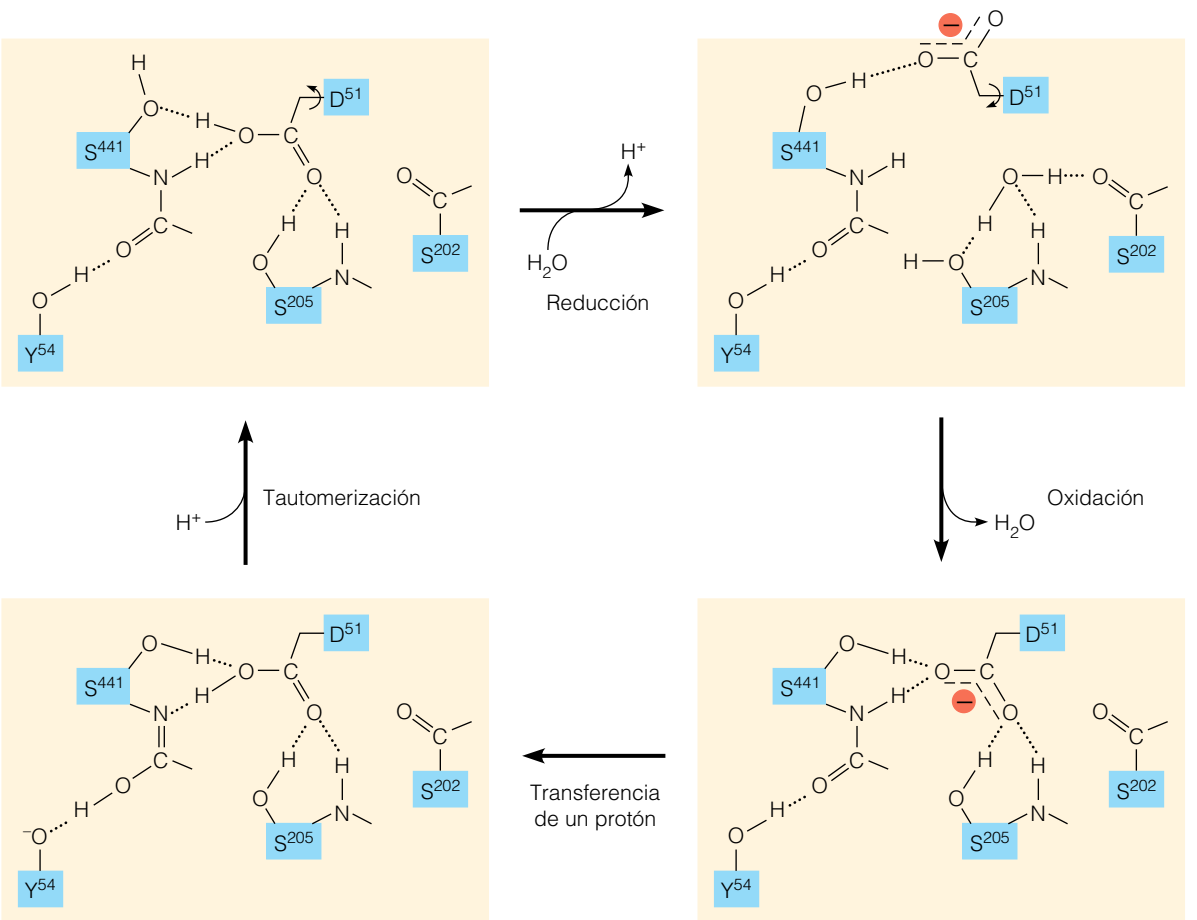


FIGURA **15.18**

Modelo de las fases finales del bombeo de protones por la citocromo oxidasa. Este modelo es consecuencia de los análisis estructurales de la citocromo oxidasa reducida y oxidada. Para más detalles, véase el texto.

Tomado de S. Yoshikawa et al., *Science* (1998) 280:1727, fig. 4. Reproducido con permiso. © 1998 AAAS.

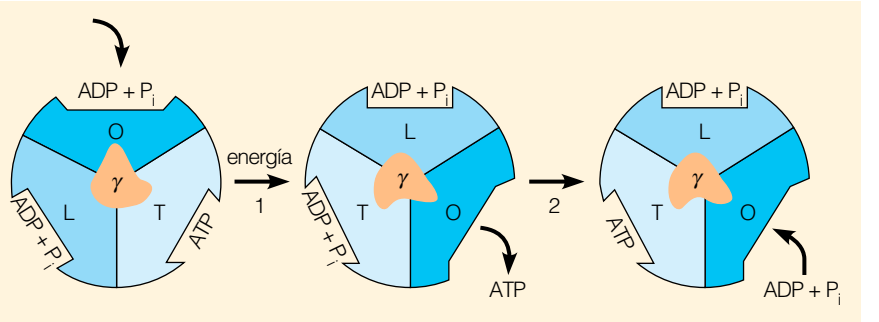


FIGURA **15.19**

La ATP sintasa F_1 como motor rotatorio que impulsa la síntesis de ATP. Para los detalles, véase el texto.

Tomado de Y. Zhou, T. M. Duncan y R. L. Cross, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94:10583. Reproducido con permiso de PNAS.

ADP y P_i. El paso dependiente de energía no es la *síntesis* de ATP sino su *liberación* de un lugar de unión compacta. Esta liberación se produce por la rotación de γ que requiere energía, que impulsa los cambios conformacionales de los ensamblajes $\alpha\beta$. Esta liberación se produce simultáneamente con la unión del ADP y el P_i a otro ensamblaje. De esta forma, en el paso 1 de la Figura 15.19 la rotación de 120° de γ, propulsada por el paso de los protones a través de los canales de F_0 abre el lugar T, y se produce la liberación de ATP, mientras el ADP y el P_i se unen a un lugar abierto. En el paso 2, una rotación adicional de 120° hace que el ADP + P_i, que se habían unido previamente, se unan a un lugar T para experimentar una conversión espontánea a ATP, mientras que el lugar O, del que se liberó el ATP, une otro ADP y P_i para empezar de nuevo el proceso. La determinación estructural del complejo F_0F_1 y el mecanismo de la síntesis de ATP que sugiere esa estructura condujo al reconocimiento de Walker y Boyer como receptores del Premio Nobel de Química de 1997.

¿Es realmente F_1 una máquina rotatoria, como implica el modelo de la Figura 15.19? Varios planteamientos experimentales indican que lo es. Los más gráficos son los experimentos en los que se inmovilizan subunidades β y se engancha un filamento de actina fluorescente a la proteína γ (véase la Figura 15.20). Cuando se observó esta estructura con un microscopio de fluorescencia, la adición de ATP podía verse que estimulaba la rotación de la sonda fluorescente. Los análisis señalaban que la rotación era en contra de las agujas del reloj (cuando se observaba desde la membrana) y se producía en pasos de 120°, tal como predecía el modelo. Por el contrario, cuando el complejo funcionaba como lo hace in vivo, en la dirección de la síntesis de ATP, la rotación era en la dirección opuesta (a favor de las agujas del reloj).

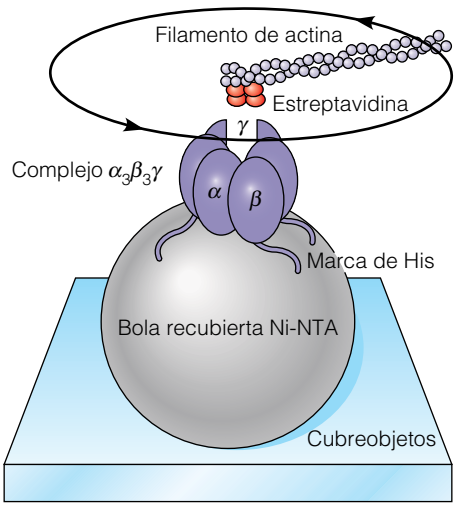


FIGURA **15.20**

Sistema experimental que permite la observación de la rotación en el componente F_1 de la ATP sintasa F_0F_1. El gen clonado que codifica la subunidad β de F_1 se modificó con la adición de una secuencia que codifica una secuencia de oligohistidina que se une a una bola recubierta de níquel ("bola recubierta Ni-NTA") en la conformación que se presenta. De esta forma, el complejo F_1 se inmovilizó sobre la bola. La estreptavidina es una proteína que se utiliza para acoplar actina marcada con fluorescencia a la subunidad γ. La observación al microscopio de fluorescencia mostró que la molécula de actina estaba rotando, lo que demostró que la propia subunidad γ estaba rotando tras la adición de ATP y su consiguiente hidrólisis.

Reproducido con permiso de R. Yasuda et al., *Cell* (1998) 93:1118.

Obsérvese que la estructura cristalina que apoya el mecanismo de la Figura 15.19 se determinó con F_1 unido a un análogo no hidrolizable del ATP para impedir la hidrólisis del ATP durante la cristalización. Más recientemente, se ha cristalizado el complejo F_1 de hígado de rata en presencia de ATP, pero sin Mg^{2+} de forma que no se produzca la hidrólisis del ATP. Esta estructura modificó el modelo anterior de alguna forma, al mostrar que cada uno de los ensamblajes $\alpha\beta$ une un nucleótido en cada una de las tres fases de 120° de una rotación completa. De esta forma, la liberación del ATP va seguida de inmediato por la unión del ADP, antes de que la subunidad γ haya rotado al lugar siguiente.

ESTADOS RESPIRATORIOS Y CONTROL RESPIRATORIO

Al igual que cualquier otro proceso metabólico, la fosforilación oxidativa sólo puede producirse en presencia de cantidades adecuadas de sus sustratos. Se controla no por mecanismos alostéricos, sino simplemente por la disponibilidad del sustrato. Esos sustratos incluyen el ADP, el P_i y el O_2, y un metabolito oxi-

dable que puede generar transportadores electrónicos reducidos, NADH y/o $FADH_2$. En diferentes situaciones metabólicas, cualquiera de estos cuatro sustratos puede limitar la velocidad de la fosforilación oxidativa.

La tasa del transporte electrónico está limitada por la disponibilidad de ADP para su conversión en ATP.

La dependencia de la fosforilación oxidativa del ADP revela una característica general importante de este proceso: *la respiración está estrechamente acoplada con la síntesis de ATP*. No sólo existe una dependencia absoluta de la síntesis de ATP con respecto al flujo continuo de electrones de los sustratos hasta el oxígeno, sino que el flujo electrónico en las mitocondrias normales se produce tan sólo cuando se sintetiza también ATP. Este fenómeno regulador, denominado **control respiratorio**, tiene sentido desde el punto de vista biológico, puesto que asegura que los sustratos no se oxiden de manera inútil. Su utilización está controlada por la necesidad fisiológica de ATP.

En la mayor parte de las células aerobias, la concentración de ATP supera a la de ADP entre 4 y 10 veces. Así pues, resulta útil interpretar el control respiratorio como una dependencia de la respiración del ADP como sustrato para la fosforilación. Si las demandas energéticas de una célula hacen que se consuma el ATP de manera rápida, la acumulación resultante de ADP estimulará la respiración, con la consiguiente activación de la resíntesis de ATP. Y a la inversa, en una célula relajada y bien nutrida, el ATP se acumula a costa del ADP, y el agotamiento de ADP limita la tasa de funcionamiento del transporte electrónico y de su propia fosforilación a ATP. Así pues, la capacidad de generación de energía de la célula está estrechamente armonizada con sus demandas energéticas. El estado energético de la célula tiene también profundos efectos sobre la estructura de la mitocondria. En las mitocondrias con una respiración activa, la membrana interna parece plegarse sobre sí misma, dejando un espacio intermembrana muy aumentado (Figura 15.21).

Experimentalmente, el control respiratorio se demuestra valorando la utilización de oxígeno en las mitocondrias aisladas (Figura 15.22). En ausencia de una adición de sustrato o ADP, la captación de oxígeno causada por la oxidación de los sustratos endógenos es lenta. La adición de un sustrato oxidable, como el glutamato o el malato, sólo tiene un efecto pequeño sobre la tasa de respiración. Sin embargo, si se añade ADP, la captación de oxígeno se produce con una velocidad muy superior, hasta que todo el ADP añadido se ha convertido en ATP, con lo que la captación de oxígeno vuelve a la situación basal. Esta estimulación

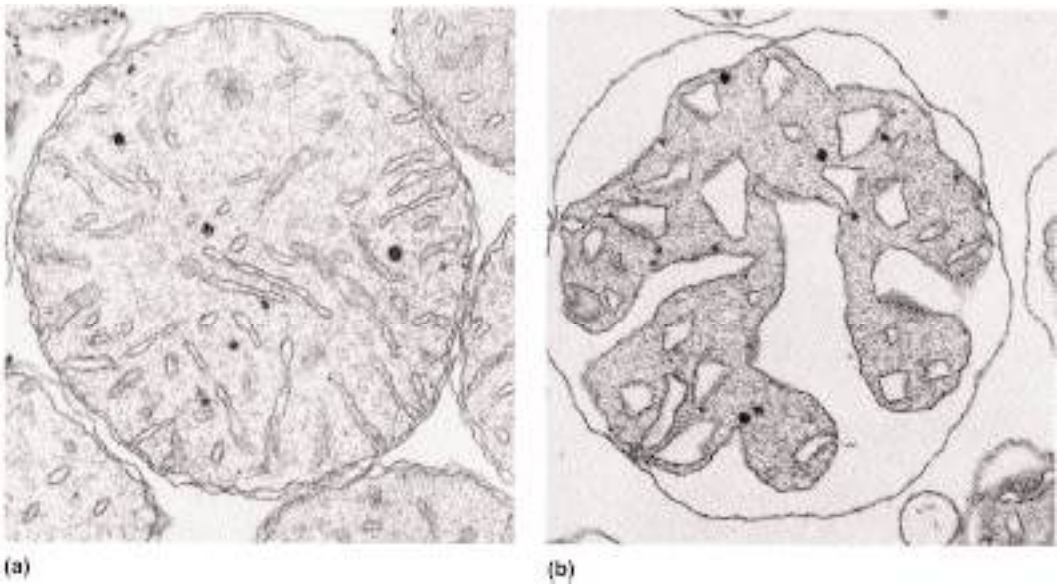


FIGURA **15.21**

Diferencias morfológicas entre las mitocondrias en reposo y las mitocondrias activas. Estas fotografías de microscopia electrónica muestran los cambios morfológicos que se producen en las mitocondrias de hígado de rata cuando pasan del estado de reposo al de respiración activa. **(a)** En las mitocondrias en reposo la mayor parte del espacio interno está ocupado por la matriz. **(b)** En el estado de energía elevada, el espacio intermembrana se expande al disminuir el volumen de la matriz.

Cortesía de A. Tzagoloff, *Mitochondria* (Nueva York: Plenum, 1982).

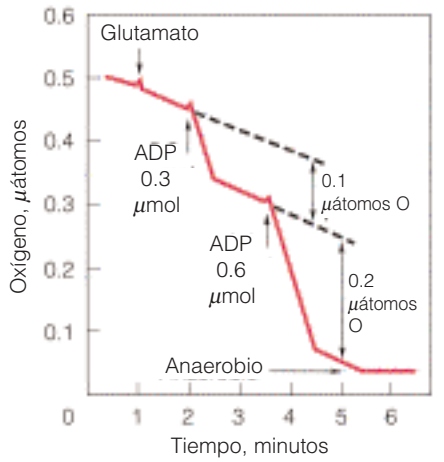


FIGURA **15.22**

Demostración experimental del control respiratorio. Se registra la captación de oxígeno en mitocondrias cuidadosamente preparadas. La adición de un sustrato exógeno oxidable (glutamato) estimula la respiración tan sólo ligeramente, a no ser que se añada también ADP. Las dos adiciones de ADP corresponden a cantidades limitantes; la segunda adición es del doble de cantidad que la primera, para mostrar que la magnitud de la captación de oxígeno es estequiométrica. La captación lenta de oxígeno al comienzo se debe a los sustratos endógenos de la mitocondria. El ADP estimula la respiración únicamente hasta que todo el ADP se ha convertido en ATP. La captación de oxígeno se registra en *μ*átomos, ya que un par de electrones reduce un átomo de O y no una molécula de O_2.

de la respiración es estequiométrica, es decir, la adición del doble de ADP hace que aumente al doble la cantidad de captación de oxígeno a la velocidad aumentada. Si hay un exceso de ADP en vez de sustrato oxidable, la adición del sustrato en cantidades limitantes estimulará la captación de oxígeno hasta que se agote el sustrato.

El mantenimiento del control respiratorio depende de la integridad estructural de la mitocondria. La ruptura del orgánulo hace que el transporte electrónico se desacople de la síntesis de ATP. En estas condiciones, la captación de oxígeno se produce con una velocidad elevada, incluso en ausencia de adición de ADP. La síntesis de ATP está inhibida, a pesar de que los electrones pasen por la cadena respiratoria y se utilicen para reducir el O_2 a agua. Antes de realizar experimentos con mitocondrias recién aisladas, los bioquímicos suelen cerciorarse de que las mitocondrias que van a utilizar están estrechamente **acopladas**, mediante la determinación de la captación de oxígeno en presencia y en ausencia de ADP añadido. En las mitocondrias preparadas con cuidado, el cociente de estas dos velocidades de captación de O_2 puede ser de hasta 10. En cambio, las mitocondrias envejecidas o rotas pueden dar cocientes de tan sólo 1, indicativos de una ausencia de acoplamiento. El desacoplamiento de la respiración respecto a la fosforilación puede conseguirse también químicamente. Como se ha indicado antes, los desacopladores como el DNP o la FCCP actúan disipando el gradiente protónico. La adición de un desacoplador a las mitocondrias estimula la utilización del oxígeno incluso en ausencia de adición de ADP. No se produce fosforilación en estas condiciones, ya que no hay ADP que pueda fosforilarse.

Otro grupo de compuestos, entre los que se encuentra la oligomicina, actúan como inhibidores de la fosforilación oxidativa. La adición de oligomicina a las mitocondrias bien acopladas y con una respiración activa inhibe la captación de oxígeno y la síntesis de ATP, como se muestra en la Figura 15.23. Sin embargo, no se produce una inhibición directa del transporte electrónico, como demuestra el hecho de que la adición posterior de un desacoplador como el DNP estimula en gran manera la captación de oxígeno. Como se ha indicado antes, la oligomicina actúa mediante una inhibición directa de la ATP sintasa F_0F_1.

En determinadas condiciones naturales, la capacidad de desacoplar la respiración de la fosforilación es muy deseable. Muchos mamíferos, en especial los que nacen sin pelo, los que hibernan y los que están adaptados al frío, tienen unas necesidades especiales de mantenimiento de la temperatura corporal. Estos animales poseen un tejido especial, denominado grasa parda, en el cuello y en la parte alta de la espalda. Las mitocondrias de este tejido están especializadas en la generación de calor a partir de la oxidación de la grasa, de forma desacoplada de la fosforilación. Estas mitocondrias tienen especialmente abundantes transportadores electrónicos respiratorios, en particular los citocromos, que dan al tejido su color pardo. Se observa un fenómeno comparable en las plantas, en especies que crecen a comienzos de la primavera, a menudo cuando el suelo está todavía cubierto de nieve. La espiga de la col es un ejemplo notable; este tejido puede mantener una temperatura entre 10° y 25° por encima de la temperatura ambiente, mediante el desacoplamiento de la oxidación de la fosforilación.

SISTEMAS DE TRANSPORTE MITOCONDRIALES

Mientras que la membrana externa de las mitocondrias es libremente permeable para muchas sustancias, la permeabilidad de la membrana interna es muy limitada. La importancia de esta permeabilidad selectiva debiera deducirse cla-

ramente de las consideraciones que hemos hecho sobre los gradientes electroquímicos y los sistemas de lanzadera que se utilizan para el transporte de equivalentes reductores a la mitocondria. Debemos considerar también el transporte de sustratos, incluyendo el transporte hacia el interior de intermediarios para la oxidación en el ciclo del ácido cítrico, el transporte hacia el exterior de los intermediarios que se utilizan para la biosíntesis en otros compartimientos celulares y la salida del ATP recién sintetizado. Las propiedades de los principales sistemas de transporte se resumen en la Figura 15.24. (Nota: Existen otros sistemas de transporte adicionales que llevan los ácidos grasos y los aminoácidos a las mitocondrias para su posterior oxidación.)

Consideremos en primer lugar el ATP, el ADP y el P_i, que son los participantes en la fosforilación oxidativa. Intervienen dos sistemas, una **nucleótido de adenina translocasa** y una **fosfato translocasa**.

La nucleótido de adenina translocasa se extiende de un lado al otro de la membrana interna y une ADP en un lugar específico de la superficie externa de

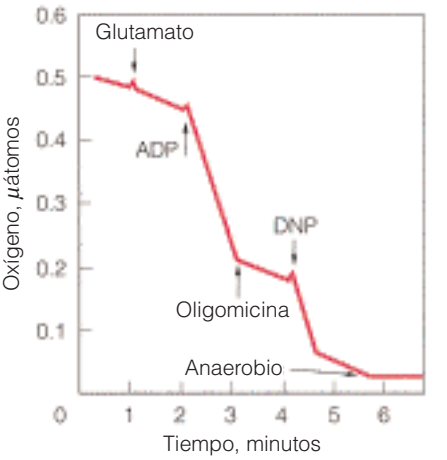


FIGURA **15.23**

Efectos de un inhibidor y un desacoplador sobre la captación de oxígeno. La representación indica el resultado de un experimento en el que se añadió un inhibidor y un desacoplador de la fosforilación oxidativa a una mezcla de mitocondrias aisladas, un sustrato oxidable (glutamato) y un exceso de ADP. La adición de oligomicina inhibe la fosforilación y, consecuentemente, lentifica la respiración. El dinitrofenol (DNP) desacopla la respiración de la fosforilación, con lo que se estimula la captación de O_2, incluso en presencia de oligomicina.

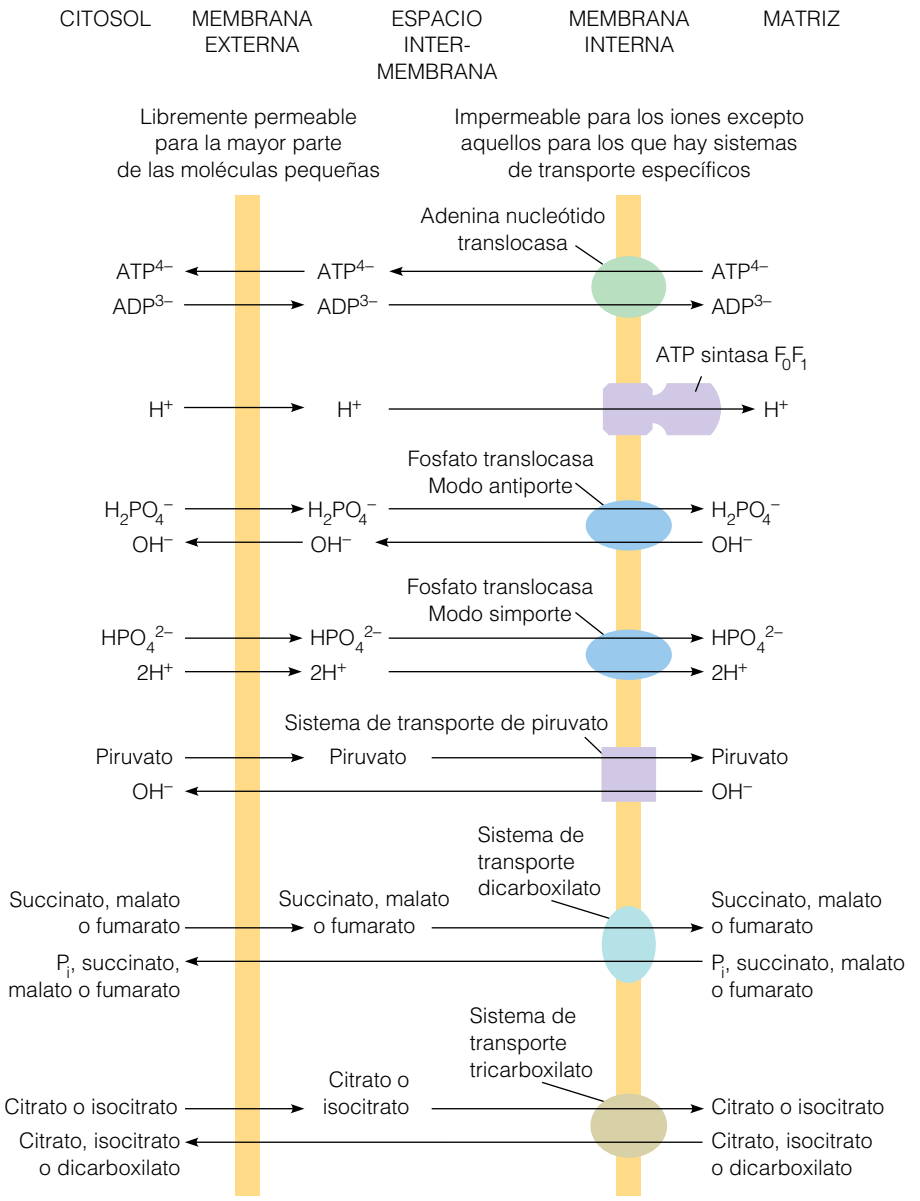


FIGURA **15.24**

Principales sistemas transportadores de la membrana interna para los sustratos y productos de la respiración. La adenina nucleótido translocasa y la fosfato translocasa desplazan los sustratos de la fosforilación oxidativa (ADP y P_i) al interior de la mitocondria, y los productos (ATP) al exterior. Otros sistemas transportadores desplazan los sustratos y productos de la oxidación del ciclo del ácido cítrico dentro o fuera de la matriz, según las necesidades metabólicas de la célula.

la membrana interna. La proteína acopla el flujo de salida de ATP desde la matriz con el flujo de entrada de una cantidad equivalente de ADP desde el espacio intermembrana. Dado que este sistema intercambia ATP, con una carga de –4, por ADP, con una carga de –3, su acción es impulsada por el gradiente protónico establecido a través de la acción de la ATP sintasa F_0F_1. En general, es cierto para todos los sistemas de transporte mitocondriales que al menos uno de los participantes se desplaza siguiendo un gradiente de concentración, por lo que no se requiere otra fuente de energía.

La fosfato translocasa actúa en modo *antiporte* o *simporte* (véase el Capítulo 10). Como sustancia de acción antiporte, transporta $H_2PO_4^-$ a la matriz, acoplado a la salida de un ion hidroxilo. En el modo simporte alternativo, transporta HPO_4^{2-} a la matriz, junto con dos protones. Ambos modos de transporte mantienen la neutralidad eléctrica. El efecto neto de los sistemas de transporte de nucleótidos de adenina y de fosfato es acoplar el transporte hacia el interior de los sustratos de la fosforilación oxidativa, el ADP y el P_i, con la salida del producto, el ATP.

Consideremos ahora los sustratos de la oxidación. El principal sustrato del catabolismo de los hidratos de carbono es el piruvato que, como el fosfato, se intercambia por OH^-. Los sustratos ácidos dicarboxílicos, es decir, succinato, fumarato y malato, pueden intercambiarse entre sí o por ortofosfato en el sistema de transporte de dicarboxilato. De forma análoga, el sistema de transporte de tricarboxilato lleva el citrato o el isocitrato, acoplados entre sí o con un ácido dicarboxílico. La entrada de ácidos grasos para la β-oxidación implica un sistema de transporte adicional, que se presentará en el Capítulo 18.

Además de los sistemas de transporte que se muestran en la Figura 15.24, existe un sistema de transporte importante para el ion calcio. El Ca^{2+} regula numerosos procesos metabólicos en el citosol y su liberación desde las reservas mitocondriales puede representar una forma de modificar la concentración citosólica de Ca^{2+} (véase el Capítulo 23). El calcio se transporta hacia el interior por el potencial de membrana, que es más negativo en el interior. Su salida al exterior se realiza mediante el intercambio con H^+ procedente de fuera o, en las mitocondrias cardíacas, mediante el intercambio con los H^+ citosólicos.

Rendimientos energéticos del metabolismo oxidativo

Gran parte de los tres capítulos anteriores se han dedicado a las rutas mediante las cuales se oxidan los hidratos de carbono a CO_2 y agua. Finalmente, estamos en disposición de calcular el rendimiento energético total y la eficacia metabólica de estas rutas combinadas. Revisemos cuánta energía se recupera en forma de ATP mediante el catabolismo oxidativo completo de la glucosa. En primer lugar, presentamos una ecuación equilibrada para cada una de las tres rutas que intervienen en el proceso, y calculamos luego la cantidad de ATP que puede obtenerse mediante la fosforilación oxidativa a partir de los transportadores electrónicos reducidos.

Glucólisis:

$$\text{Glucosa} + 2\text{ADP} + 2P_i + 2\text{NAD}^+ \longrightarrow 2\ \text{piruvato} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2H_2O + 4H^+$$

Complejo piruvato deshidrogenasa:

$$2\ \text{Piruvato} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{CoA-SH} \longrightarrow 2\ \text{acetil-CoA} + 2\text{NADH} + 2CO_2$$

Ciclo del ácido cítrico (incluyendo la conversión de GTP en ATP):

$$2\ \text{Acetil-CoA} + 6H_2O + 6\text{NAD}^+ + 2\text{FAD} + 2\text{ADP} + 2P_i \longrightarrow 4CO_2 + 6\text{NADH} + 2\text{FADH}_2 + 2\text{CoA-SH} + 2\text{ATP}$$

Neto:

$$\text{Glucosa} + 10\text{NAD}^+ + 2\text{FAD} + 4H_2O + 4\text{ADP} + 4P_i \longrightarrow 6CO_2 + 10\text{NADH} + 4H^+ + 2\text{FADH}_2 + 4\text{ATP}$$

Estos tres procesos generan 4 moles de ATP directamente, más 10 moles de NADH y 2 moles de $FADH_2$. Aunque, como se ha señalado antes, las relaciones P/O para la oxidación del NADH y el $FADH_2$ pueden no tener valores enteros, utilizaremos los valores 3 y 2, respectivamente. En consecuencia, el rendimiento total de ATP que puede alcanzarse es de unos 38 por mol de glucosa oxidada [$(4 + (3 \times 10) + (2 \times 2)$]. En los procariotas y en las células que utilizan la lanzadera malato/aspartato (véase la Figura 15.11b), estos equivalentes reductores se transportan a las mitocondrias, sin coste energético. Sin embargo, las células que utilizan la lanzadera del glicerol fosfato (véase la Figura 15.11a) deben pagar un coste energético. Como se describió en la página 598, los electrones del NADH citosólico entran en la cadena respiratoria en forma de $FADH_2$. En consecuencia, el rendimiento de ATP a partir de cada uno de estos dos NADH es 2, y no 3. Esto reduce el rendimiento global de ATP a 36 por mol de glucosa. Para el tratamiento que sigue, utilizaremos 38 como el mejor cálculo de los moles totales de ATP que se obtienen por mol de glucosa oxidada. Recuérdese que el $\Delta G^{\circ\prime}$ para la oxidación de la glucosa es –2870 kJ/mol (véase la página 471) y para la hidrólisis del ATP es –31 kJ/mol. Mediante estos datos podemos calcular la eficacia del funcionamiento de esta máquina bioquímica: $(38 \times 31)/2870$, es decir, un 40%, en condiciones estándar. Como se ha señalado antes, la eficacia in vivo es probablemente superior.

La oxidación completa de 1 mol de glucosa genera unos 38 moles de ATP sintetizados a partir de ADP.

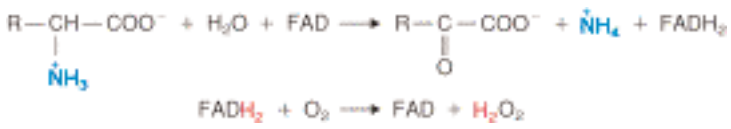
El oxígeno como sustrato para otras reacciones metabólicas

En la mayor parte de las células, al menos un 90% del oxígeno molecular consumido se utiliza para la fosforilación oxidativa. El resto del O_2 se emplea en una amplia gama de reacciones metabólicas especializadas. Existen al menos 200 enzimas conocidas que utilizan O_2 como sustrato. Dado que el O_2 es poco reactivo, prácticamente la totalidad de estas 200 enzimas utiliza un ion metálico para potenciar la reactividad del oxígeno, como ocurre en el caso de la citocromo oxidasa. En este apartado clasificamos brevemente estas enzimas y consideramos el metabolismo de las formas de oxígeno parcialmente reducidas, que se forman continuamente en todas las células y que son muy tóxicas debido a su gran reactividad.

OXIDASAS Y OXIGENASAS

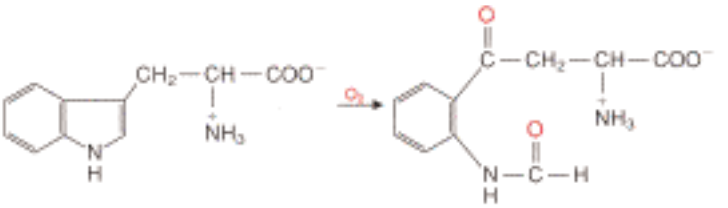
El término **oxidasa** se aplica a las enzimas que catalizan la oxidación de un sustrato sin incorporar el oxígeno del O_2 al producto. Generalmente, se produce una oxidación de dos electrones, con lo que el oxígeno se convierte en H_2O_2. La mayoría de las oxidasas utilizan un metal o una coenzima de flavina. Así, por ejemplo, las D-aminoácido oxidasas utilizan como cofactor el FAD.

Las oxidasas y las oxigenasas son enzimas que utilizan O_2 como sustrato.



Las **oxigenasas** son enzimas que incorporan átomos de oxígeno del O_2 a los productos oxidados; existen dos clases, las monooxigenasas y las dioxigenasas. Las **dioxigenasas**, que incorporan ambos átomos de O_2 en un sustrato, tienen una distribución limitada. Un ejemplo es la triptófano 2,3-dioxigenasa, que

contiene un cofactor hemo y cataliza la primera reacción del catabolismo del triptófano:



Mucho más amplia es la distribución de las **monooxigenasas**, que incorporan un átomo procedente del O_2 en un producto y reducen el otro átomo a agua. Una monooxigenasa tiene un sustrato que acepta el oxígeno y otro que aporta los dos átomos de H que reducen el otro oxígeno a agua. Dado que se oxidan dos sustratos, las enzimas de esta clase se denominan también **oxidasas de función mixta**. La reacción general catalizada por estas enzimas es la siguiente:

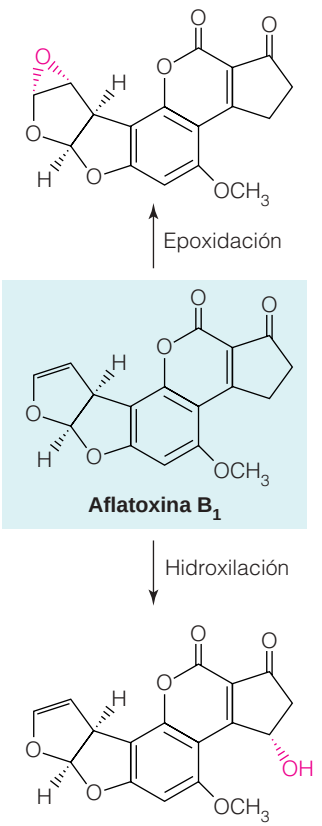
$$AH + BH_2 + O{=}O \longrightarrow A{-}OH + B + H_2O$$

Dado que el sustrato AH se hidroxila generalmente por esta clase de enzimas, se utiliza también el término **hidroxilasa**. Un ejemplo de este tipo de reacción es la hidroxilación de los esteroides. En este caso, el NADPH es el cofactor reductor BH_2.

$$RH + NADPH + H^+ + O_2 \longrightarrow R{-}OH + NADP^+ + H_2O$$

Varios compuestos distintos del NADPH actúan como BH_2 en las reacciones de monooxigenasa, como el α-cetoglutarato, en la hidroxilación de los residuos de prolina del colágeno a hidroxiprolina. Éste y otros ejemplos se considerarán en el Capítulo 21.

Los citocromos P450 catalizan hidroxilaciones de numerosos sustratos arreactivos, haciéndolos más fácilmente metabolizables.



CITOCROMO P450

Las reacciones de hidroxilación más numerosas son las que corresponden a una familia de hemoproteínas a las que se denomina globalmente **citocromo P450**. La mayor parte de los genomas de los vertebrados contienen más de 40 genes estructurales diferentes para los citocromos P450, lo cual hace que esta familia de proteínas sea amplia y diversa. Estas proteínas se parecen a la citocromo oxidasa mitocondrial puesto que son capaces de unir tanto el O_2 como el monóxido de carbono. Sin embargo, los citocromos P450 se diferencian en que la forma reducida del hemo, cuando forma complejos con el monóxido de carbono, absorbe intensamente la luz a 450 nm. Una característica estructural común de los citocromos P450 es un ion tiolato de cisteína, en el que el azufre ocupa una de las seis posiciones de coordinación con el hierro del hemo. Los otros ligandos son los cuatro nitrógenos pirrólicos de la protoporfirina IX en el hemo y el oxígeno unido. Sin embargo, no todas las proteínas con la configuración cisteinil-hemo se clasifican como citocromo P450. Este mismo motivo estructural se utiliza, por ejemplo, por la tromboxano sintasa (página 784) y la óxido nítrico sintasa (página 838). Los citocromos P450 suelen encontrarse en el retículo endoplásmico de las células eucariotas, y no en las mitocondrias.

Los citocromos P450 intervienen en la hidroxilación de una amplia variedad de compuestos. Estas reacciones incluyen las reacciones de hidroxilación de la

biosíntesis de las hormonas esteroideas (véase el Capítulo 19) y la síntesis de ácidos grasos hidroxilados y epóxidos de ácidos grasos. Además, los citocromos P450 actúan sobre miles de productos **xenobióticos** (compuestos que no son propios), como pueden ser fármacos como el fenobarbital y sustancias cancerígenas ambientales como el benzopireno que forma parte del humo del tabaco o la aflatoxina B, un compuesto cancerígeno producido por un hongo y que se encuentra en los cacahuetes que no se han seleccionado adecuadamente. La hidroxilación de sustancias extrañas aumenta generalmente su solubilidad y constituye un paso para la anulación de su capacidad tóxica, su metabolismo y su excreción. Sin embargo, algunas de estas reacciones producen la activación de sustancias potencialmente cancerígenas para dar lugar a especies más reactivas, como lo demuestra la aflatoxina B_1 que se convierte en especies más reactivas bien por hidroxilación o epoxidación (véase el margen de la página anterior).

Una de las claves de la reactividad del citocromo P450 es su capacidad de fragmentar el O_2, de manera que un átomo de oxígeno se une al hierro del hemo del citocromo. Este enlace forma un **ion perferrilo**, que puede representarse como FeO^{3+}. Este grupo muy reactivo puede captar un átomo de hidrógeno, incluso de un sustrato poco reactivo como un hidrocarburo. En una hidroxilación de este tipo, es característico que se transfieran equivalentes reductores al citocromo desde el NADPH, el donador habitual de electrones en las reacciones de hidroxilación. En la Figura 15.25 se muestra un mecanismo general. En este mecanismo, la unión del sustrato va seguida por la unión del O_2. La transferencia de dos electrones reduce un átomo de oxígeno, de tal manera

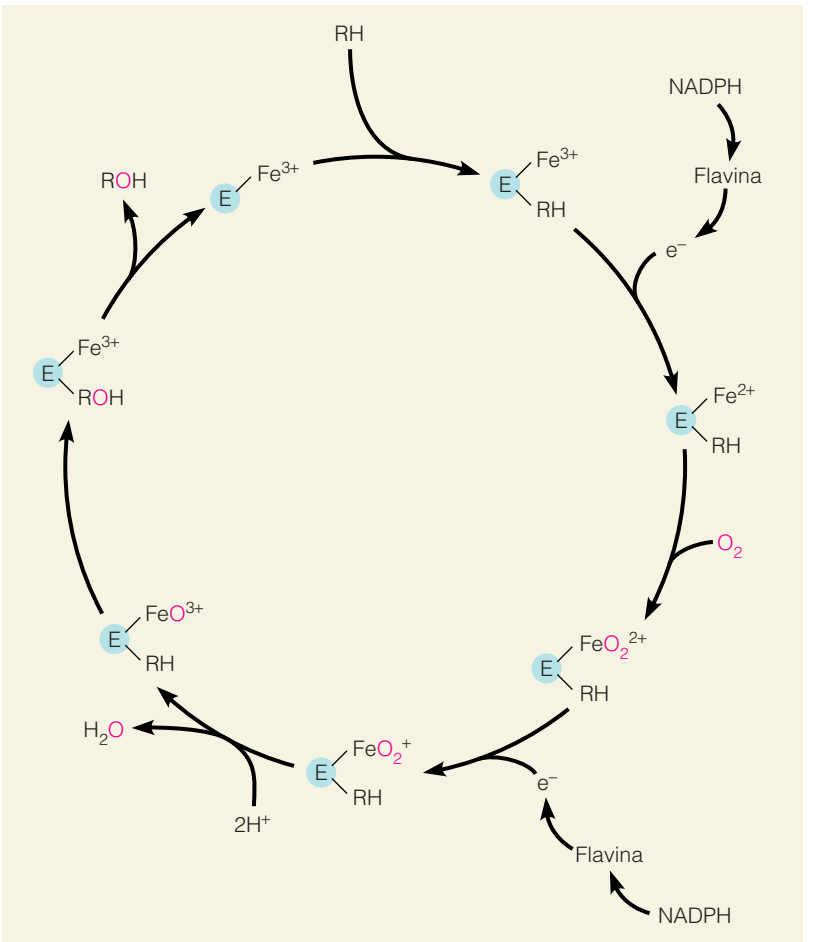


FIGURA **15.25**

Hidroxilación enzimática con intervención de NADPH y citocromo P450. En este esquema de un mecanismo de hidroxilación, el sustrato (RH) se convierte en el producto hidroxilado (ROH) por el citocromo P450 (E). Una enzima flavoproteica (flavina) cede electrones de uno en uno desde el NADPH para las dos reducciones de un solo electrón que se indican.

que la fragmentación de la molécula de oxígeno genera agua más el ion perferrilo, que luego oxigena al sustrato.

Los sistemas de citocromos P450 participan en una amplia gama de reacciones de otro tipo, como epoxidación, peroxigenación, desulfuración, desalquilación, desaminación y deshalogenación. Estas reacciones son especialmente activas en el hígado en donde hay varios citocromos P450 inducibles; es decir, citocromos cuya síntesis se estimula por sustratos que se metabolizan por estas enzimas. Entre los inductores se encuentran fármacos como el fenobarbital y otros barbitúricos.

Las especies moleculares de oxígeno parcialmente reducidas (superóxido, peróxido y radical hidroxilo) son muy tóxicas. Su toxicidad se contrarresta por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos.

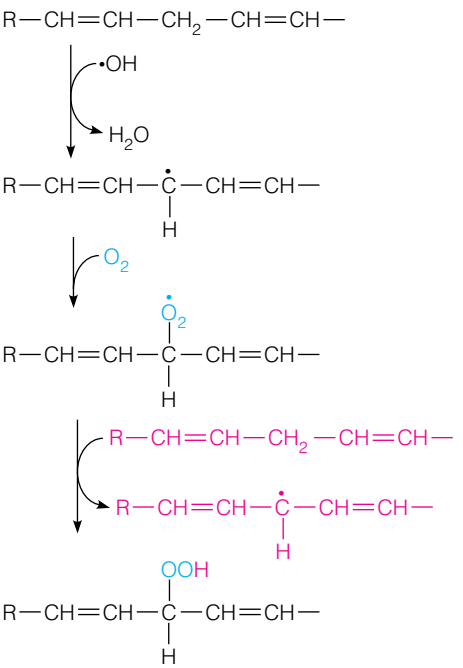
ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVAS, DEFENSAS ANTIOXIDANTES Y ENFERMEDAD HUMANA

Formación de especies de oxígeno reactivas

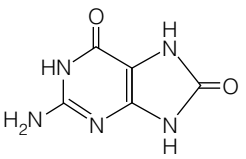
Como hemos visto, el último paso en el transporte electrónico es la reducción de cuatro electrones del O_2 a agua. La citocromo oxidasa como la mayoría de las oxidasas, transfiere electrones al oxígeno desde los iones metálicos que cambian sus estados de valencia con un electrón cada vez, como el hierro del hemo y el cobre en la citocromo oxidasa. Debido a que las interacciones de los transportadores de un electrón con los transportadores de dos electrones no suelen tener una eficacia del 100%, las oxidasas generan a menudo especies de oxígeno reducidas de forma incompleta: **superóxido** ($O_2\cdot^-$), que se forma a partir de una reducción de un electrón del O_2; peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que se forma a partir de una reducción de dos electrones; y **radical hidroxilo** (OH·), que se forma por una reducción de tres electrones. Además, algunas enzimas, como la xantina oxidasa (Capítulo 22) y las aminoácido oxidasas (página 615), generan peróxido de hidrógeno como producto de su acción. El superóxido, el peróxido y el radical hidroxilo son todos más reactivos que el O_2 y se denominan de forma colectiva **especies de oxígeno reactivas** (ROS). El radical hidroxilo es particularmente reactivo y es responsable del daño de otras moléculas biológicas. El radical hidroxilo daña a las proteínas de varias formas y daña a las membranas iniciando la oxidación de los ácidos grasos en los lípidos de la membrana en un proceso denominado **peroxidación lipídica**. Como se presenta en el margen, la peroxidación lipídica es una reacción en cadena, ya que cada resto ácido graso que sufre la peroxidación genera un radical que puede iniciar otra reacción de peroxidación. El radical hidroxilo también daña a los ácidos nucleicos, produciendo la ruptura de la cadena de polinucleótidos (las roturas de la doble cadena del DNA son letales) y cambiando la estructura de las bases del DNA. Se conocen unos 20 cambios de base diferentes, o lesiones del DNA, que son consecuencia de las reacciones del radical hidroxilo con el DNA. Algunas lesiones son mutágenas, debido a que la base alterada que se crea (como la **8-oxoguanina** del margen) no forma apareamientos de bases de Watson-Crick durante la replicación del DNA. Otras lesiones, como las de la **timina glicol** son potencialmente letales, ya que, a no ser que se repare la lesión (Capítulo 25), su aparición en el DNA bloquea la replicación a partir de ese lugar. El radical hidroxilo se produce como resultado de la radiación ionizante y representa el mutágeno más activo que deriva de la radiación ionizante. El radical hidroxilo se produce también en la reacción de Fenton a partir del H_2O_2:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \text{ (o } Cu^{+}\text{)} \longrightarrow Fe^{3+} \text{ (o } Cu^{2+}\text{)} + OH\cdot + OH^-$$

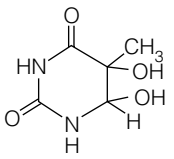
El superóxido de por sí es relativamente atóxico. Sin embargo, como contiene un electrón desapareado, se combina con facilidad con otro radical libre, el **óxido nítrico** (NO·), un agente biológico de señalización que se produce en muchos tejidos animales (Capítulos 21 y 23). El producto es **peroxinitrito**



Peroxidación lipídica



8-Oxoguanina



Timina glicol

($OONO^-$), que se considera también una especie de oxígeno reactiva. El peroxinitrito produce peroxidación lipídica y también da lugar a la nitración de los grupos hidroxilo de la tirosina de las proteínas, una reacción particularmente dañina para las proteínas de la membrana.

El metabolismo celular normal produce ROS en cantidades muy elevadas y se calcula que la producción de superóxido en el ser humano es de unos 0.02 picomoles por célula por día, o 0.15 moles en todo el cuerpo. Es un tema de discusión la cantidad de este superóxido que se produce en las mitocondrias durante la cadena de transporte electrónico respiratoria. Se ha calculado que entre un 1-2% de todos los electrones que entran en la cadena respiratoria no llegan nunca a la citocromo oxidasa sino que se desprenden de los complejos I, II y III, principalmente de los centros hierro-azufre, y llevan a cabo reducciones de un electrón del oxígeno a superóxido. Cualquiera que sea su origen, la producción a gran escala de especies de oxígeno reactivas tiene la capacidad de producir un daño considerable a los tejidos en los que se producen, por una situación que se denomina **agresión oxidativa**. Han aparecido diversos mecanismos para hacer mínimas sus consecuencias perjudiciales.

A propósito de la agresión oxidativa

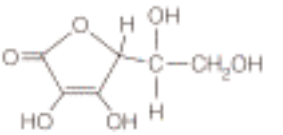
Como se considerará en el Capítulo 17, la Tierra tuvo una atmósfera anaerobia durante su primer millardo de años y el oxígeno era muy tóxico para todas las formas de vida que existían en ese tiempo. Con la evolución del oxígeno en nuestra atmósfera, las formas vivas elaboraron defensas, tanto enzimáticas como no enzimáticas, contra la agresión oxidativa. La protección no enzimática la proporcionan los compuestos **antioxidantes**, entre los que se encuentran el glutatión (Capítulo 14), las vitaminas C y E, y el **ácido úrico**, un producto final del metabolismo de las purinas (Capítulo 22). Estos compuestos pueden eliminar las ROS antes de que puedan producir daños, o pueden evitar que se disperse el daño oxidativo. Por ejemplo, la peroxidación lipídica es una reacción en cadena en la que cada reacción de peroxidación genera un radical libre que puede iniciar otra peroxidación. De esta manera, cuando se atrapa un radical se rompe una cadena en la que de otra manera se dañarían un gran número de acilos de ácidos grasos. La vitamina E es una familia de compuestos, de los cuales el más común es el α-tocoferol, que componen el principal compuesto antioxidante liposoluble que desempeña una función importante en la prevención del daño de las membranas. El β-caroteno y otros compuestos carotenoides relacionados con la vitamina A (página 778) son antioxidantes liposolubles que también participan en el atrapamiento de radicales libres. El glutatión, como se señaló en el Capítulo 14, es abundante dentro de las células y desempeña un cometido particularmente importante en la protección antioxidante celular. La vitamina C, o **ácido ascórbico**, es un antioxidante importante debido a su hidrosolubilidad y su fácil oxidación a ácido deshidroascórbico. En los líquidos extracelulares, las concentraciones de ascorbato son mucho mayores que las de glutatión, y el ascorbato probablemente desempeña el papel predominante en la protección antioxidante extracelular. Los datos más recientes sugieren que el principal cometido antioxidante del ácido úrico está en su capacidad de unirse al peroxinitrito e inactivarlo.

Entre los mecanismos enzimáticos, la primera línea de defensa es la **superóxido dismutasa** (**SOD**), una familia de metaloenzimas que catalizan una **dismutación** (una reacción en la que dos moléculas de sustrato idénticas tienen destinos diferentes). En este caso, una molécula de superóxido se oxida y otra se reduce.

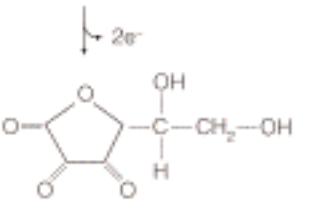
$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$



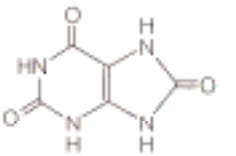
Glutatión



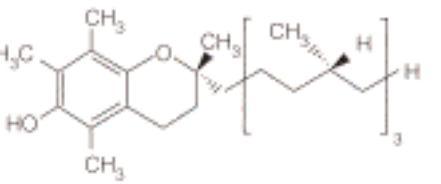
Ácido L-Ascórbico (vitamina C)



Ácido deshidroascórbico



Ácido úrico



α-Tocoferol (vitamina E)

Una forma de esta enzima que contiene cobre y zinc se encuentra en el citosol de las células eucariotas; en las mitocondrias y en las células bacterianas hay una forma que contiene manganeso, y en las cianobacterias y algunas plantas se encuentra una forma relacionada que contiene hierro. Se ha descrito recientemente una SOD bacteriana que contiene níquel.

El peróxido de hidrógeno se metaboliza, bien por la *catalasa*, una enzima de amplia distribución, o bien por una familia más limitada de **peroxidasas**. La catalasa es una hemoproteína con una tasa de renovación extraordinariamente elevada (>40 000 moléculas por segundo). Cataliza la reacción siguiente:

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

Las peroxidasas, que tienen una distribución amplia en las plantas, reducen el H_2O_2 a agua a costa de la oxidación de un sustrato orgánico. Un ejemplo de peroxidasa es la que se encuentra en los eritrocitos, que es especialmente sensible a la acumulación de peróxido. (Véanse las páginas 578-579 en el Capítulo 14 para un análisis de las consecuencias de la acumulación de peróxido en el déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.) Dentro de los eritrocitos se encuentra la *glutatión peroxidasa*, una enzima que reduce el H_2O_2 a agua, junto con la oxidación del glutatión.

$$2GSH + H_2O_2 \longrightarrow GSSG + 2H_2O$$

La glutatión peroxidasa es interesante por cuanto contiene un residuo por mol de un aminoácido poco habitual, la *selenocisteína*, que es un análogo de la cisteína que contiene selenio en vez de azufre. Esto puede estar relacionado con el interés actual de los suplementos de selenio en el alimento para prevenir el cáncer.

En algunos casos, la producción de especies de oxígeno reactivas no es un fenómeno indeseable sino que forma parte del funcionamiento normal de una célula. Así, por ejemplo, determinados leucocitos contribuyen a la defensa frente a los agentes infecciosos mediante la **fagocitosis** (del griego, "comer células"). Estas células pueden engullir una célula bacteriana. Este fenómeno va seguido de una **explosión respiratoria**, un rápido aumento de la captación de oxígeno, estimulada por mecanismos que están aún en estudio. Gran parte de este oxígeno se reduce a ion superóxido y a H_2O_2, que contribuyen a destruir la bacteria engullida. Así pues, aunque la mayor parte de las células contienen mecanismos complejos para protegerse frente a la toxicidad de las especies de oxígeno reactivas, la explosión respiratoria comporta una producción deliberada y controlada de estas especies.

Metabolismo del oxígeno y enfermedades humanas

El daño oxidativo puede lesionar muchas biomoléculas, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, por lo que la lesión tisular que se produce puede, en principio, conducir a diversas enfermedades. Se ha implicado al daño oxidativo en cerca de cien enfermedades, entre las que se encuentran las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, los accidentes cerebrovasculares, las enfermedades neurodegenerativas y las enfermedades inflamatorias crónicas. Es difícil en este momento determinar las relaciones causa-efecto precisas y está claro que, en algunos casos, la agresión oxidativa no es la causa, sino más bien el resultado de la lesión tisular por algún otro factor que exacerba el problema original. Sin embargo, las pruebas epidemiológicas apuntan con fuerza hacia el valor de una ingestión alimenticia adecuada de compuestos antioxidantes para prevenir muchas de estas enfermedades. Los efectos promotores de salud evidentes de las

alimentaciones con abundantes frutas y verduras, particularmente con relación a la incidencia de las enfermedades cardiovasculares y del cáncer, probablemente son el resultado en gran parte de su elevado contenido de compuestos antioxidantes, en particular de vitaminas C y E. Muchas personas toman en la actualidad suplementos alimenticios de vitaminas C y E como medida preventiva.

Cualquiera que sea la relación causa-efecto entre el daño oxidativo y la enfermedad, hay poca duda de que el daño del DNA que producen las radiaciones ionizantes, que se sabe son cancerígenas, está mediado a través de los efectos mutágenos de los radicales hidroxilo. Además, los radicales hidroxilo se generan por agentes oxidantes con independencia de los efectos de la radiación. Como se considerará en los Capítulos 23, 25 y 28, el cáncer es claramente una enfermedad genética, que se produce por la acumulación dentro de una célula precancerosa de mutaciones que en última instancia destruyen la capacidad de la célula para regular su propio crecimiento y su muerte programada (apoptosis, véase las páginas 1251-1252). La generación de bases alteradas en el DNA, como la 8-oxoguanina o la 5-hidroxicitosina, es muy mutágena. Aun cuando estas lesiones normalmente se eliminan por los sistemas de reparación del DNA (Capítulo 25), los sistemas de reparación no son eficaces al 100%, y con el tiempo la acumulación de lesiones del DNA no reparadas puede contribuir a la acumulación de mutaciones que finalmente transforman una célula normal en una célula cancerosa. En parte debido a que la incidencia del cáncer está correlacionada con fuerza con la edad, muchos científicos también atribuyen el envejecimiento normal a la acumulación de lesiones mutágenas del DNA sin reparar, y se implica a la agresión oxidativa en lo que se ha llamado "teoría del envejecimiento de los radicales libres".

Otras pruebas, tanto circunstanciales como genéticas, apuntan con fuerza hacia los papeles del metabolismo del oxígeno en las enfermedades humanas; a continuación, se dan algunos ejemplos. Las mutaciones humanas del gen que codifica la forma de la superóxido dismutasa que contiene cobre/zinc están asociadas con la esclerosis lateral amiotrófica, una enfermedad neurodegenerativa conocida también como enfermedad de Lou Gehrig, aunque no se conoce bien la relación causal precisa. El papel del peroxinitrito en la degeneración nerviosa que produce la esclerosis múltiple (MS) se ha considerado al observarse que los pacientes con gota difícilmente desarrollan MS, lo cual sugiere que la elevación crónica de ácido úrico que produce la gota (Capítulo 22) también evita la aparición de MS. Finalmente, se ha visto que producen enfermedades, entre las que se encuentran la degeneración del nervio óptico y diversas enfermedades musculares, un número creciente de mutaciones de los genes mitocondriales que codifican proteínas respiratorias. Las mutaciones que afectan las subunidades de la citocromo oxidasa codificadas en la mitocondria se han asociado con la enfermedad de Alzheimer. De manera clara, la relación entre el metabolismo oxidativo y la enfermedad humana representa uno de las fronteras de investigación más excitantes de la bioquímica.

RESUMEN

La mayor parte de la energía capturada para la síntesis de ATP a partir de las reacciones oxidativas de las células se genera en la fosforilación oxidativa mitocondrial. Los transportadores electrónicos reducidos, NADH y $FADH_2$, transfieren sus equivalentes reductores a la matriz mitocondrial. Los complejos enzimáticos unidos a la membrana mitocondrial interna hacen pasar estos electrones

a través de la cadena respiratoria, una serie de transportadores electrónicos con un potencial de reducción sucesivamente creciente. Los complejos se numeran I (NADH deshidrogenasa), II (succinato-coenzima Q oxidorreductasa), III (coenzima Q-citocromo *c* oxidorreductasa), IV (citocromo oxidasa) y V (ATP sintasa). Finalmente, los electrones se transfieren al O_2, que se reduce a agua. Las reacciones de los complejos I, III y IV proporcionan energía para bombear protones a través de la membrana interna, lo cual hace que la superficie externa sea mucho más ácida que la matriz. La descarga del gradiente protónico resultante, cuando los protones vuelven a la matriz a través de un canal iónico específico, genera energía, que se utiliza para impulsar la síntesis de ATP. Aunque la respiración da cuenta de alrededor del 90% del consumo total de oxígeno en la mayoría de las células, en otras muchas reacciones, docenas de enzimas utilizan O_2 como sustrato: oxigenasas, oxidasas e hidroxilasas. Algunas reacciones generan especies de oxígeno parcialmente reducidas, radicales hidroxilo, superóxido y peróxido, que son tóxicos y mutágenos. Las células poseen numerosos mecanismos de anulación de la toxicidad de estas especies de oxígeno reactivas.

BIBLIOGRAFÍA

Antecedentes históricos

Lehninger, A. L. (1965) *The Mitochondrion: Molecular Basis of Structure and Function*. Benjamin, Nueva York. Una descripción de los trabajos iniciales realizada por uno de los investigadores que contribuyeron de manera importante a realizarlos.

Saier, M. H., Jr. (1997) Peter Mitchell and his chemiosmotic theories. *ASM News* 63:13-21. Una biografía científica corta del bioquímico que propuso el gradiente de protones como la fuerza impulsora para la síntesis de ATP.

Estructura y función de las mitocondrias

Kiberstis, P. A. (1999) Mitochondria make a comeback. *Science* 283:1475. Un trabajo de introducción a una sección especial de *Science*, con cuatro revisiones actualizadas sobre la evolución de la mitocondria, las enfermedades mitocondriales, la fosforilación oxidativa y la genética mitocondrial.

Tzagoloff, A. (1982) *Mitochondria*. Plenum, Nueva York. Una revisión amplia, bien ilustrada y concisa de la estructura y función mitocondrial.

Mecanismos del transporte electrónico

Beinert, H., R. H. Holm y E. Münck (1997) Iron-sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277:653-659. Una revisión sobre las funciones de estas estructuras en las enzimas oxidativas y sus otras numerosas funciones.

Gennis, R. B. (1998) How does cytochrome oxidase pump protons? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12747-12749. Una mini-revisión y comentario que resume de forma concisa la estructura y la función de la citocromo oxidasa.

Tsukihara, T. y ocho coautores (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* 272:1136-1144. Estructura cristalina del complejo IV, una consecución que marcó un hito.

Xia, D. y siete coautores (1997) Crystal structure of the cytochrome bc_1 complex from bovine heart mitochondria. *Science* 277:60-66. Visiones sobre el ciclo Q a partir de la estructura del complejo III, también una consecución importante.

Mecanismos de la fosforilación oxidativa

Abrahams, J. P., R. Lutter, A. G. W. Leslie y J. E. Walker (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F_1 ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370:621-626. Una estructura que confirma las características esenciales del mecanismo de la fosforilación oxidativa.

Bianchet, M. A., J. Hullihen, P. L. Pedersen y L. M. Amzel (1998) The 2.80 Å structure of rat liver F_1-ATPase: Configuration of a critical intermediate in ATP synthesis-hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:11065-11070. La estructura del complejo F_1-ATP condujo a una modificación del modelo para la síntesis de ATP que se acepta en la actualidad.

Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase—A splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66:717-750. Un análisis del mecanismo de la función de la ATP sintasa F_0F_1 por la persona que predijo el mecanismo correcto de la síntesis de ATP y realizó los primeros experimentos cruciales.

Hinkle, P. C., M. A. Kumar, A. Resetar y D. L. Harris (1991) Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry* 30:3576-3582. Un análisis conceptual y experimental cuidadoso que cuestiona la necesidad de que las relaciones P/O necesiten ser enteras.

Lee, C. P., Q. Gu, Y. Xiong, R. A. Mitchell y L. Ernster (1996) P/O ratios reassessed. Mitochondrial P/O ratios consistently exceed 1.5 with succinate and 2.5 with NAD-linked substrates. *FASEB J.* 10:345-350. Aunque los valores no necesitan ser enteros, los valores experimentales más altos que se han conseguido recientemente se corresponden con los históricos.

Trumpower, B. L. (1990) The protonmotive Q cycle: Energy transduction by coupling of proton translocation by the cytochrome bc_1 complex. *J. Biol. Chem.* 285:11409-11412. Una mini-revisión del mecanismo del acoplamiento energético en el complejo III.

Yasuda, R., H. Noji, K. Kinosita, Jr. y M. Yoshida (1998) F_1 ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps. *Cell* 93:1117-1124. Prueba directa de la rotación utilizando microscopia de fluorescencia.

Yoshikawa, S. y 12 coautores (1998) Redox-coupled crystal structure changes in bovine heart cytochrome *c* oxidase. *Science* 280:1723-1729. Visión del bombeo de protones a partir de los cambios estructurales que se producen del cambio del estado redox del complejo IV.

Zhou, Y., T. M. Duncan y R. L. Cross (1997) Subunit rotation in *Escherichia coli* F_0F_1-ATP synthase during oxidative phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10583-10587. Utilización de reactivos de entrecruzamiento de proteínas para obtener pruebas de la rotación física.

Metabolismo del oxígeno

Ames, B. N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 221:1256-1264. Una de las primeras propuestas explícitas de que las especies de oxígeno reactivas intervienen en la mutación, el cáncer y el envejecimiento, y de que los antioxidantes de los alimentos naturales podrían contrarrestar estos efectos.

Beckman, K. B. y B. N. Ames (1998) The free radical theory of aging. *Physiol. Rev.* 78:547-581. Una revisión completa de Bruce Ames, uno de los primeros en proponer la idea de que el daño oxidativo produce el cáncer y el envejecimiento.

Chanock, S. J., J. E. Benna, R. M. Smith y B. M. Babior (1994) The respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* 269:24519-24522. La producción de superóxidos como mecanismo de defensa antibacteriano.

Estabrook, R. W. (1996) The remarkable P450s: A historical overview of these versatile hemeprotein catalysts. *FASEB J.* 10:202-204. Introducción a una serie de artículos de revisión sobre los citocromos P450 por un pionero de este campo.

Frei, B. (1994) Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *Am. J. Med.* 97(suppl 3A):5S-13S. Una revisión con mucha información de los orígenes de las especies de oxígeno reactivas y las acciones de los antioxidantes.

Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64:97-112. Una revisión por el descubridor de la superóxido dismutasa.

Halliwell, B. (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344:721-724. Una revisión breve aunque con mucha información y referencias a la literatura previa.

Malmström, B. (1982) Enzymology of oxygen. *Annu. Rev. Biochem.* 51:21-59. Una revisión de las enzimas que utilizan oxígeno como sustrato.

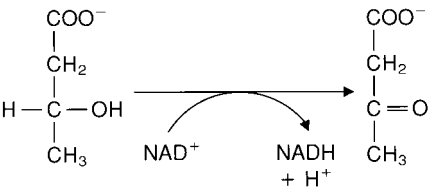
Vaughan, M. (1997) Oxidative modification of macromolecules minireview series. *J. Biol. Chem.* 272:18513. La primera de una serie coordinada de seis mini-revisiones del JBC, que proporcionan información reciente sobre la modificación oxidativa de los ácidos nucleicos, las proteínas y las lipoproteínas.

PROBLEMAS

1. Utilice los valores de E'_0 de la Tabla 15.1 para calcular el $\Delta G^{\circ\prime}$ para la oxidación del malato por la malato deshidrogenasa.

2. Cuando se añade citocromo *c* reducido puro a mitocondrias cuidadosamente preparadas junto con ADP, P_i, antimicina A y oxígeno, el citocromo *c* se oxida y se forma ATP, con una relación P/O próxima a 1.0.
   (a) Indique el flujo probable de los electrones en este sistema.
   (b) ¿Por qué se añade antimicina A?
   (c) ¿Qué información aporta este experimento acerca de la localización de los lugares de acoplamiento de la fosforilación oxidativa?
   (d) Escriba una ecuación equilibrada para la reacción global.
   (e) Calcule $\Delta G^{\circ\prime}$ para la reacción anterior, utilizando los valores de E'_0 de la Tabla 15.1 y un valor de $\Delta G^{\circ\prime}$ para la hidrólisis del ATP de aproximadamente –31 kJ/mol.

3. Se incubaron mitocondrias recién preparadas con β-hidroxibutirato, citocromo *c* oxidado, ADP, P_i y cianuro. El β-hidroxibutirato se oxida por una deshidrogenasa dependiente de NAD^+.



   El investigador midió la tasa de oxidación del β-hidroxibutirato y la tasa de formación de ATP.
   (a) Indique el flujo probable de electrones en este sistema.
   (b) ¿Cuántos moles de ATP es de prever que se formen por mol de β-hidroxibutirato oxidado en este sistema?
   (c) ¿Por qué se añade β-hidroxibutirato en vez de NADH?
   (d) ¿Qué función tiene el cianuro?
   (e) Escriba una ecuación equilibrada para la reacción global que tiene lugar en este sistema.
   (f) Calcule el cambio de energía libre neto ($\Delta G^{\circ\prime}$) en este sistema, utilizando los valores de E'_0 de la Tabla 15.1, y un $\Delta G^{\circ\prime}$ para la hidrólisis del ATP de aproximadamente –31 kJ/mol.

4. Si quisiera determinar la relación P/O para la oxidación del α-cetoglutarato, probablemente incluiría en su sistema de reacción algo de malonato. ¿Por qué? En estas condiciones, ¿qué relación P/O cabría esperar que se observara?

5. De las diversas reacciones de oxidación de la glucólisis y del ciclo del ácido cítrico, la única en la que no interviene el NAD^+ es la reacción de la succinato deshidrogenasa. ¿Cuál sería el $\Delta G^{\circ\prime}$ para una enzima que oxida el succinato con NAD^+ en vez de FAD? Si la concentración intramitocondrial de succinato fuera 10 veces superior a la de fumarato, ¿qué relación mínima $[NAD^+]/[NADH]$ en las mitocondrias sería necesaria para hacer esta reacción exergónica?

6. Las concentraciones intramitocondriales de ATP son de aproximadamente 5 mM y la concentración de fosfato es de alrededor de 10 mM. Si el ADP es cinco veces más abundante que el AMP, calcule las concentraciones molares de ADP y AMP a una carga energética de 0.85. Calcule el $\Delta G'$ para la hidrólisis del ATP en estas condiciones. La carga energética es la concentración de ATP más la mitad de la concentración de

ADP dividido por la concentración total de nucleótidos de adenina:

$$\frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

7. A partir de los valores de E'_0 de la Tabla 15.1, calcule la constante de equilibrio para la reacción de la glutatión peroxidasa.

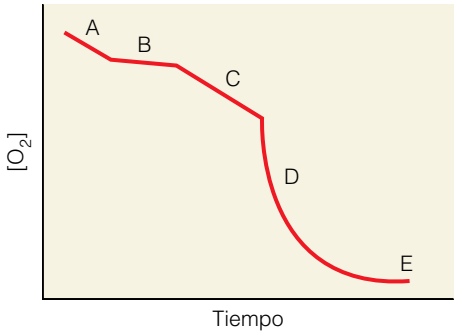
*8. Al inicio de la "mitocondriología", las relaciones P/O se determinaban mediante las medidas del volumen de O_2 captado por las mitocondrias en respiración y los análisis químicos para determinar la desaparición del fosfato inorgánico. Sin embargo, en la actualidad se puede medir la relación P/O simplemente con un electrodo de oxígeno de registro. ¿Cómo podría hacerse?

9. Hace unos años hubo interés por el empleo de desacopladores como el dinitrofenol como productos para el control del peso. Se pensaba que podría oxidarse la grasa sin una síntesis simultánea de ATP para la nueva formación de grasa o de hidratos de carbono. ¿Por qué era errónea esta idea?

10. Los bioquímicos que trabajan con mitocondrias aisladas reconocen cinco "estados" energéticos de las mitocondrias, según la presencia o ausencia de sustratos esenciales para la respiración, O_2, ADP, sustratos oxidables, etc. Las características de cada uno de estos estados se indican en la tabla adjunta (véase la tabla y la gráfica de la página abajo).
   (a) Identifique en el gráfico un estado que pudiera predominar en cada conjunto de condiciones indicadas con una letra.
   (b) Para determinar si las mitocondrias aisladas presentan un control respiratorio se determina la relación de la captación de oxígeno en dos estados diferentes. ¿Qué estados?
   (c) ¿Qué estado predomina probablemente in vivo en el músculo esquelético fatigado por un trabajo prolongado y extenuante?
   (d) ¿Qué estado predomina probablemente en el músculo esquelético en reposo de un animal bien nutrido?

	Estado 1	Estado 2	Estado 3	Estado 4	Estado 5
Disponibilidad de O_2	Aerobio	Aerobio	Aerobio	Aerobio	Anaerobio
Concentración de ADP	Baja	Alta	Alta	Baja	Alta
Sustrato oxidable	Endógeno (bajo)	Próximo a cero	Alto	Alto	Alto
Frecuencia respiratoria	Lenta	Lenta	Rápida	Lenta	Cero
Componente limitante de la velocidad	ADP	Sustrato oxidable	Transporte electrónico	ADP	O_2

   (e) ¿Qué estado predomina probablemente en el músculo cardíaco durante la mayor parte del tiempo?

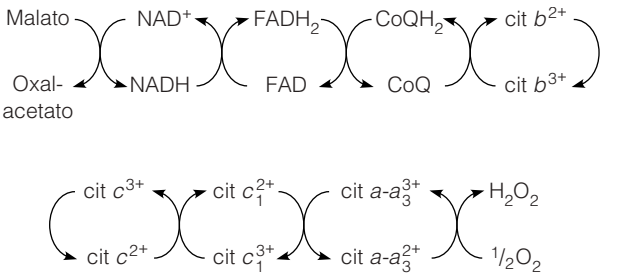


11. Basándose en la Figura 15.12, prediga la relación P/O para la oxidación del ascorbato por las mitocondrias aisladas.

*12. Los citocromos P450 catalizan reacciones distintas de las hidroxilaciones, como desaminaciones, deshalogenaciones, desulfuraciones, peroxidaciones, desalquilaciones y epoxidaciones. Escriba ecuaciones equilibradas para dos de estas reacciones.

*13. NAD^+/NADH y $NADP^+$/NADPH tienen unos potenciales de reducción estándar prácticamente idénticos. ¿Por qué requiere, pues, energía la reacción de la transhidrogenasa?

14. Como representación de la cadena respiratoria, qué está mal en esta imagen. Hay cuatro errores deliberados.



15. $GSSG + NADPH + H^+ \longrightarrow 2GSH + NADP^+$

E'_0 (GSSG $\longrightarrow$ 2GSH) = −0.23 V

E'_0 ($NADP^+$/NADPH) = −0.32 V F = 96.5 kJ/mol-V

   (a) Calcular $\Delta G°'$ para la reacción de la glutatión reductasa en la dirección que se muestra.
   (b) Suponga que una célula contiene una isoforma de la glutatión reductasa que utiliza NADH en lugar de NADPH como coenzima reductora. ¿Esperaría que la $\Delta G°'$ para esta enzima fuera mayor, menor o la misma que el valor correspondiente para la glutatión reductasa real? Explique brevemente su respuesta.
   (c) Dado lo que conoce sobre las funciones metabólicas y/o los cocientes de concentración intracelulares de NAD^+/NADH y $NADP^+$/NADPH, ¿esperaría que el $\Delta G'$ (no el $\Delta G°'$) de esta enzima fuera mayor, menor o el mismo que el $\Delta G'$ de la verdadera enzima en condiciones intracelulares? Explique brevemente su respuesta.

16. Se añadieron succinato, citocromo *c*, ADP, ortofosfato y cianuro sódico a mitocondrias preparadas con cuidado. Observando las Figuras 15.9 y 15.12, conteste lo siguiente:
   (a) Dar la lista de la secuencia de transportadores electrónicos de este sistema.
   (b) Escribir una ecuación equilibrada de la reacción global que se produce en este sistema, donde se muestre la oxidación

del donador de electrones inicial, la reducción del aceptor final y la síntesis de ATP.

(c) Calcular $\Delta G°'$ de la reacción global. $\Delta G°'$ para la hidrólisis de ATP es –31 kJ/mol.

(d) ¿Por qué se añadió cianuro en este experimento?

(e) ¿Cuál sería la relación P/O si se realizara el mismo experimento con la adición de 2,4-dinitrofenol a la mitocondria?

17. Para actuar como desacoplador de la fosforilación oxidativa (página 606), el 2,4-dinitrofenol debe actuar de forma catalítica, no estequiométrica. ¿Qué significa esto? Identificar y comentar una implicación importante de esta conclusión.

CAPÍTULO 16

Metabolismo de los hidratos de carbono II: biosíntesis

EN ESTE CAPÍTULO NUESTRA ATENCIÓN GIRA DESDE LAS RUTAS DE DEGRADACIÓN productoras de energía hasta los procesos de biosíntesis que requieren energía. Las rutas de biosíntesis de los hidratos de carbono que se resaltan en este capítulo son (Figura 16.1): la gluconeogénesis, o síntesis de glucosa a partir de precursores que no son hidratos de carbono; la síntesis de polisacáridos, fundamentalmente el glucógeno en los animales; y la síntesis de **glucoconjugados**, moléculas que contienen hidratos de carbono ligados a una molécula proteica o lipídica. Un proceso de biosíntesis de hidratos de carbono de extraordinaria importancia, la fotosíntesis de las plantas y de algunos microorganismos, se presentará por separado en el Capítulo 17.

Encontramos aquí los primeros ejemplos de un principio enunciado en el Capítulo 12: *los procesos de biosíntesis no son nunca la simple inversión de las correspondientes rutas catabólicas.* Superficialmente, la gluconeogénesis se parece mucho a la glucólisis a la inversa, pero se utilizan reacciones enzimáticas diferentes en los lugares cruciales. Estos lugares corresponden a las reacciones fuertemente exergónicas que se controlan en gran parte de una forma recíproca, de forma que las condiciones fisiológicas que activan la glucólisis inhiben la gluconeogénesis y a la inversa. Obtendremos una imagen general muy parecida al considerar la síntesis del glucógeno en comparación con la movilización del mismo, posteriormente en este capítulo.

Gluconeogénesis

NECESIDAD FISIOLÓGICA DE LA SÍNTESIS DE GLUCOSA EN LOS ANIMALES

La mayoría de los órganos animales pueden metabolizar diversas fuentes de carbono para generar energía: triacilgliceroles, diversos azúcares, piruvato, aminoácidos, etc. Sin embargo, el cerebro y el sistema nervioso central necesitan glucosa como única o principal fuente de carbono. Lo mismo ocurre en algunos otros tejidos, como la médula renal, los testículos y los eritrocitos (Figura 16.2). Por consiguiente, las células animales deben ser capaces de sintetizar glucosa a

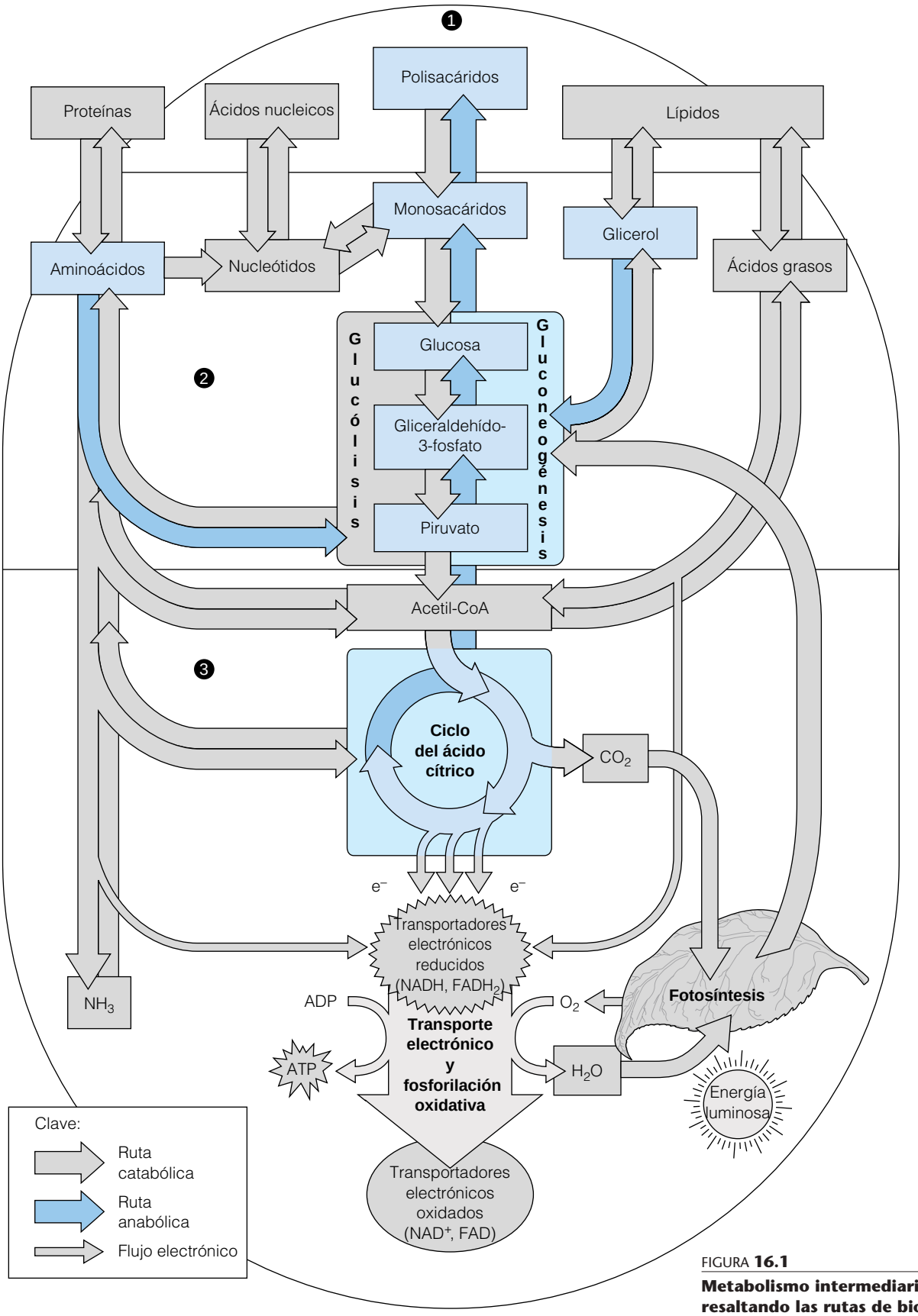


FIGURA **16.1**

Metabolismo intermediario, resaltando las rutas de biosíntesis de los hidratos de carbono.

partir de otros precursores y también de mantener las concentraciones sanguíneas de glucosa dentro de unos límites estrechos, tanto para el funcionamiento adecuado del cerebro y del sistema nervioso central como para proporcionar precursores para el almacenamiento de glucógeno en otros tejidos. Las necesidades de glucosa del cerebro humano son relativamente enormes, 120 gramos al día, de los 160 gramos que necesita todo el cuerpo. La cantidad de glucosa que puede generarse a partir de las reservas de glucógeno del organismo en un momento dado es de unos 190 gramos, y la cantidad total de glucosa en los líquidos corporales es de poco más de 20 gramos. En consecuencia, las reservas de glucosa de fácil acceso ascienden a aproximadamente un día de aporte. Cuando se produce un período de ayuno de más de un día, la glucosa debe formarse a partir de otros precursores. Lo mismo ocurre durante el ejercicio intenso, por ejemplo durante una carrera de maratón, cuando las reservas de glucosa sufren una rápida disminución.

El proceso de síntesis se denomina **gluconeogénesis:** literalmente, producción de nueva glucosa. La gluconeogénesis se define como la biosíntesis de hidratos de carbono a partir de precursores de tres y cuatro carbonos, que generalmente no tienen naturaleza de hidratos de carbono. Los principales sustratos de la gluconeogénesis son el *lactato*, producido fundamentalmente mediante la glucólisis en el músculo esquelético y los eritrocitos, los *aminoácidos*, generados a partir de las proteínas de la alimentación o a partir de la degradación de las proteínas musculares durante la inanición, el aminoácido específico *alanina*, producido en el músculo mediante el ciclo glucosa-alanina (véase el Capítulo 20), el *propionato*, procedente de la degradación de algunos ácidos grasos y aminoácidos, y el *glicerol*, procedente del catabolismo de las grasas. Los ácidos grasos liberados durante la degradación de los lípidos se convierten en su mayor parte en acetil-CoA y no pueden utilizarse para la síntesis de hidratos de carbono, excepto en los organismos que disponen de un ciclo del glioxilato funcionante (véase la Figura 14.20, página 569).

La gluconeogénesis tiene lugar principalmente en el citosol, aunque algunos precursores se generan en las mitocondrias y deben transportarse al citosol para utilizarse. El principal órgano gluconeogénico de los animales es el hígado, con una contribución menor, aunque aún significativa, de la corteza renal (véase la Figura 16.2). Los principales destinos de la glucosa formada en la gluconeogénesis son el catabolismo por el tejido nervioso y la utilización por el músculo esquelético. Además, la glucosa es el precursor primario de todos los demás hidratos de carbono, entre ellos los aminoazúcares, los polisacáridos complejos y los componentes hidrocarbonados de las glucoproteínas y los glucolípidos. La necesidad de glucosa como intermediario biosintético hace que la gluconeogénesis sea una ruta importante en las plantas y en los microorganismos, al igual que en los animales, y que sea prácticamente idéntica en todos los organismos. Sin embargo, la cantidad de información de que disponemos sobre el control de la gluconeogénesis en los animales nos lleva a centrarnos en el metabolismo animal en la primera parte de este capítulo.

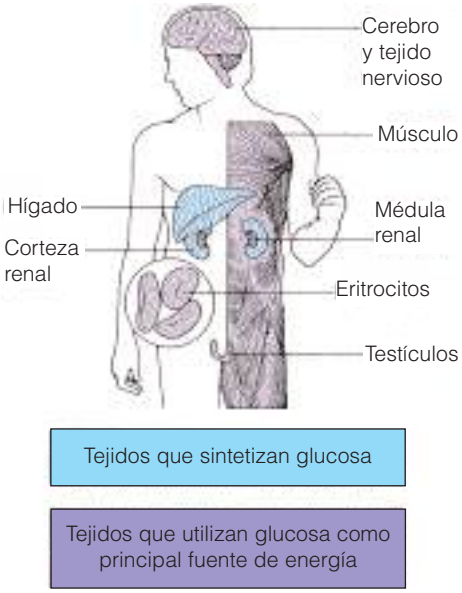


FIGURA **16.2**

Síntesis y utilización de glucosa en el cuerpo humano. El hígado y la corteza renal son los principales tejidos gluconeogénicos. El cerebro, el músculo esquelético, la médula renal, los eritrocitos y los testículos utilizan glucosa como fuente de energía única o principal, pero carecen de la maquinaria enzimática necesaria para sintetizarla.

La síntesis de glucosa a partir de precursores que no son hidratos de carbono es esencial para el mantenimiento de las concentraciones sanguíneas de glucosa dentro de unos límites aceptables.

RELACIÓN ENZIMÁTICA DE LA GLUCONEOGÉNESIS CON LA GLUCÓLISIS

La gluconeogénesis debiera ser una ruta fácil de aprender, puesto que se parece mucho a la glucólisis en sentido inverso. Sin embargo, hay algunas diferencias importantes, que permiten que la ruta transcurra en dirección a la *síntesis* de glucosa en la célula.

Recuérdese que una ruta metabólica puede darse sin dificultad sólo si su $\Delta G'$ es fuertemente negativo para el conjunto de la ruta en la dirección en que se es-

La gluconeogénesis utiliza enzimas específicas para evitar tres reacciones irreversibles de la glucólisis.

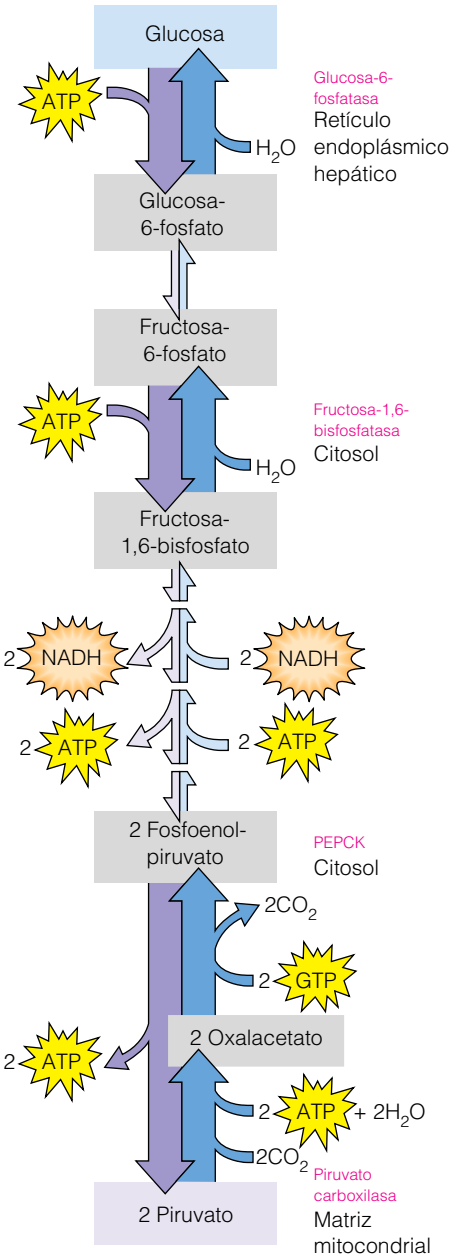


FIGURA **16.3**

Reacciones de la glucólisis y la gluconeogénesis. Las reacciones irreversibles de la glucólisis se indican de color morado oscuro. Las reacciones opuestas de la gluconeogénesis, que evitan estos pasos, se indican de color azul oscuro. Las flechas claras identifican las reacciones reversibles utilizadas en ambas rutas.

cribe. En el Capítulo 13 se indicó que la glucólisis desde la glucosa hasta el piruvato es fuertemente exergónica, ya que en las condiciones intracelulares habituales, el $\Delta G'$ es de aproximadamente –96 kJ/mol. ¿Cómo puede hacerse, pues, que la conversión del piruvato en glucosa sea exergónica? Recuérdese que tres reacciones de la ruta glucolítica son tan exergónicas que pueden ser irreversibles: las catalizadas por la hexoquinasa, la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa. En la gluconeogénesis, se utilizan distintas enzimas en cada uno de estos pasos, con lo que, por ejemplo, la conversión de fructosa-1,6-bisfosfato en fructosa-6-fosfato no es simplemente la inversión de la reacción de la fosfofructoquinasa. En esencia, las tres reacciones irreversibles de la glucólisis se evitan mediante enzimas específicas de la gluconeogénesis, que catalizan reacciones que van fuertemente en la dirección de la síntesis de glucosa. Este proceso de biosíntesis comporta un considerable coste de energía, que debe pagarse si el proceso global debe estar favorecido termodinámicamente (véase la página 632). Las siete reacciones restantes de la gluconeogénesis están catalizadas por enzimas glucolíticas que catalizan reacciones reversibles y que pueden decantarse en uno u otro sentido mediante acción de masas. Otra forma de relacionar la glucólisis con la gluconeogénesis es decir que difieren tan sólo en tres pasos controlados por *ciclos de sustrato* (véase la página 470).

En la Figura 16.3 se resume toda la ruta de la gluconeogénesis, desde el piruvato a la glucosa. Nos centraremos aquí en las reacciones que evitan los tres pasos irreversibles de la glucólisis.

Paso 1: conversión del piruvato en fosfoenolpiruvato

Evitar la piruvato quinasa implica dos reacciones, la primera de las cuales la hemos visto ya en el Capítulo 14. La **piruvato carboxilasa** cataliza la conversión, dependiente de ATP y de biotina, del piruvato en oxalacetato (véase la Figura 14.19, página 567). La enzima requiere acetil-CoA como activador alostérico:

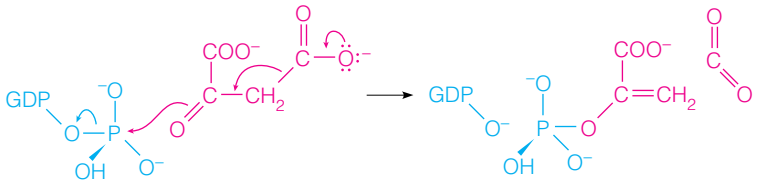
$$\text{Piruvato} + CO_2 + H_2O + \text{ATP} \longrightarrow \text{oxalacetato} + \text{ADP} + P_i + 2H^+ \quad \Delta G^{\circ\prime} = -2.1 \text{ kJ/mol}$$

Ésta no es más que una de las reacciones *anapleróticas* que se utilizan para mantener las concentraciones de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico (véase la página 563). La piruvato carboxilasa genera oxalacetato en la matriz mitocondrial, en donde puede oxidarse en el ciclo del ácido cítrico. Para poder utilizarlo en la gluconeogénesis, el oxalacetato debe salir de la mitocondria para pasar al citosol, donde tiene lugar el resto de la ruta. Sin embargo, la membrana mitocondrial no tiene un transportador eficaz para el oxalacetato. En consecuencia, el oxalacetato se reduce por la malato deshidrogenasa mitocondrial a malato, que se transporta al citosol por intercambio con ortofosfato y luego se reoxida por la malato deshidrogenasa citosólica. Éste es uno de los procesos de transporte mitocondrial que se han presentado en el Capítulo 15.

Una vez en el citosol, el oxalacetato sufre la acción de la **fosfoenolpiruvato carboxiquinasa** (que se abrevia **PEPCK**) para dar fosfoenolpiruvato:

$$\text{Oxalacetato} + \text{GTP} \rightleftharpoons \text{fosfoenolpiruvato} + CO_2 + \text{GDP} \qquad \Delta G^{\circ\prime} = +2.9 \text{ kJ/mol}$$

Obsérvese que el donador de energía es el GTP y no el ATP, y que el CO_2 que se ha fijado por la piruvato carboxilasa se libera en esta reacción, con lo que no se produce una fijación neta de CO_2. La reacción de la PEPCK requiere Mg^{2+} o Mn^{2+} y es fácilmente reversible. En la reacción, el grupo carboxilo formado a partir del CO_2 transferido proporciona electrones para facilitar la formación del enlace O—P:



La PEPCK se encuentra en el citosol de la mayoría de las células animales, aunque en algunas especies se encuentra tanto en el citosol como en las mitocondrias. La forma citosólica es la más importante en la gluconeogénesis, como indica el hecho de que su concentración intracelular está regulada por las condiciones hormonales que controlan la gluconeogénesis.

La reacción global para evitar la piruvato quinasa es la siguiente:

$$\text{Piruvato} + \text{ATP} + \text{GTP} + H_2O \longrightarrow \text{fosfoenolpiruvato} + \text{ADP} + \text{GDP} + P_i + 2H^+$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = +0.8 \text{ kJ/mol}$$

El $\Delta G^{\circ\prime}$ para las dos reacciones combinadas es ligeramente positivo. Sin embargo, en las condiciones intracelulares, la secuencia es muy exergónica, con un $\Delta G'$ de unos –25 kJ/mol. Como se indica en la reacción global, es precisa una inversión de dos fosfatos de energía elevada para la síntesis de un mol de fosfoenolpiruvato de energía super-elevada. Tras esta derivación, el fosfoenolpiruvato se convierte en fructosa-1,6-bisfosfato por las enzimas glucolíticas que actúan en sentido inverso.

Paso 2: conversión de la fructosa-1,6-bisfosfato en fructosa-6-fosfato

La reacción de la fosfofructoquinasa de la glucólisis es esencialmente irreversible pero sólo debido a que está impulsada por la transferencia de fosfato del ATP. La reacción que tiene lugar en la gluconeogénesis para evitar este paso consiste en una simple reacción hidrolítica, catalizada por la **fructosa-1,6-bisfosfatasa**.

$$\text{Fructosa-1,6-bisfosfato} + H_2O \longrightarrow \text{fructosa-6-fosfato} + P_i \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -16.3 \text{ kJ/mol}$$

El $\Delta G^{\circ\prime}$ negativo de esta reacción favorece la reacción hacia la derecha. La enzima con múltiples subunidades requiere la presencia de Mg^{2+} para su actividad y constituye uno de los principales lugares de control que regulan la ruta global de la gluconeogénesis. La fructosa-6-fosfato formada en esta reacción experimenta posteriormente la isomerización a glucosa-6-fosfato por la acción de la fosfoglucoisomerasa.

Paso 3: conversión de la glucosa-6-fosfato en glucosa

La glucosa-6-fosfato no puede convertirse en glucosa por la acción inversa de la hexoquinasa o la glucoquinasa, debido al $\Delta G^{\circ\prime}$ muy positivo de esa reacción; la transferencia de fosfato desde el ATP hace a la reacción virtualmente irreversible. Otra enzima específica de la gluconeogénesis, la **glucosa-6-fosfatasa**, es la que en su lugar entra en acción. Esta reacción de derivación se produce también mediante una simple hidrólisis.

$$\text{Glucosa-6-fosfato} + H_2O \longrightarrow \text{glucosa} + P_i \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -12.1 \text{ kJ/mol}$$

La glucosa-6-fosfatasa, que requiere también Mg^{2+}, se encuentra fundamentalmente en el retículo endoplásmico del hígado con su lugar activo sobre el lado citosólico. La importancia de su localización en el hígado es que una función característica del hígado es sintetizar glucosa para exportarla a los tejidos a través de la circulación sanguínea. Los datos más recientes sugieren que la glucosa-6-

fosfatasa también participa en la síntesis de glucosa-6-fosfato a partir de donantes alternativos de fosfato como el pirofosfato y que la forma de la enzima unida al retículo endoplásmico podría ser parte de un sistema de varias proteínas que regula las concentraciones de G6P. Dado que la mayor parte de los tejidos y, en especial, el cerebro y el músculo esquelético, carecen de esta enzima, no pueden liberar glucosa al torrente sanguíneo, aunque sí sintetizan glucosa-6-fosfato para su propio uso.

ESTEQUIOMETRÍA Y BALANCE ENERGÉTICO DE LA GLUCONEOGÉNESIS

Hemos resaltado que las rutas catabólicas generan energía, mientras que las anabólicas comportan un coste energético. En el caso de la gluconeogénesis podemos calcular ese coste. La conversión global de 2 moles de piruvato en 1 mol de glucosa es bastante exergónica, como se muestra en la Tabla 16.1. El $\Delta G^{\circ\prime}$ del proceso global es de aproximadamente –47.6 kJ/mol. Sin embargo, la síntesis de glucosa es costosa para la célula en un sentido energético. Se consumen seis grupos fosfato de energía elevada (cuatro ATP y dos GTP), así como 2 moles de NADH, que es el equivalente energético de otros seis ATP (ya que la oxidación mitocondrial de 1 mol de NADH genera 3 moles de ATP).

Se consumen doce fosfatos de energía elevada por mol de glucosa sintetizado mediante la gluconeogénesis.

En cambio, si la glucólisis pudiera actuar en sentido inverso, la ecuación neta indicaría un gasto de energía mucho menor: 2 moles de NADH y 2 moles de fosfato de energía elevada:

$$2\ \text{Piruvato} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{glucosa} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i + 2\text{NAD}^+$$

Sin embargo, este proceso sería muy endergónico, con un $\Delta G^{\circ\prime}$ de +73.3 kJ/mol. En consecuencia, es evidente que la inversión de cuatro enlaces fosfato de energía elevada adicionales es esencial si se quiere conseguir que se produzca una síntesis neta de glucosa como un proceso irreversible.

SUSTRATOS DE LA GLUCONEOGÉNESIS

Como se ha indicado antes, la gluconeogénesis obtiene sus precursores de diversos orígenes, como el lactato, los aminoácidos, el glicerol y el propionato. Las

TABLA 16.1 Resumen de la gluconeogénesis, desde el piruvato a la glucosa

Reacción		$\Delta G^{\circ\prime}$ (kJ/mol)
Piruvato + CO_2 + ATP + H_2O ⟶ oxalacetato + ADP + P_i + $2H^+$	× 2	−4.2
Oxalacetato + GTP ⇌ fosfoenolpiruvato + CO_2 + GDP	× 2	+5.8
Fosfoenolpiruvato + H_2O ⇌ 2-fosfoglicerato	× 2	−3.4
2-Fosfoglicerato ⇌ 3-fosfoglicerato	× 2	−9.2
3-Fosfoglicerato + ATP ⇌ 1,3-bisfosfoglicerato + ADP	× 2	+37.6
1,3-Bisfosfoglicerato + NADH + H^+ ⇌ gliceraldehído-3-fosfato + NAD^+ + P_i	× 2	−12.6
Gliceraldehído-3-fosfato ⇌ dihidroxiacetona fosfato		−7.6
Gliceraldehído-3-fosfato + dihidroxiacetona fosfato ⇌ fructosa-1,6-bisfosfato		−23.9
Fructosa-1,6-bisfosfato + H_2O ⟶ fructosa-6-fosfato + P_i		−16.3
Fructosa-6-fosfato ⇌ glucosa-6-fosfato		−1.7
Glucosa-6-fosfato + H_2O ⟶ glucosa + P_i		−12.1
Neto: 2 Piruvato + 4ATP + 2GTP + 2NADH + $6H_2O$ ⟶ glucosa + 4ADP + 2GDP + $6P_i$ + $2NAD^+$ + $2H^+$		−47.6

Nota: Las reacciones indicadas en negrita son las que permiten evitar las reacciones irreversibles de la glucólisis; las demás reacciones son reacciones reversibles de la glucólisis. Las seis primeras reacciones se multiplican por 2, ya que son necesarios 2 precursores de tres carbonos para formar una molécula de glucosa.

rutas mediante las que estos sustratos entran en la gluconeogénesis se muestran en la Figura 16.4 y se consideran en este apartado.

Los precursores gluconeogénicos más importantes son el lactato, la alanina, el glicerol y el propionato.

Lactato

En términos cuantitativos, el lactato es el precursor gluconeogénico más importante. Recuérdese del Capítulo 13 que el músculo esquelético obtiene gran parte de su energía de la glucólisis, en especial durante el ejercicio intenso, cuando la respiración no puede proporcionar a los tejidos el oxígeno suficiente para la oxidación completa de la glucosa. En estas condiciones, se movilizan las reservas de glucógeno, y la glucosa-6-fosfato se convierte en piruvato con mayor rapidez de la que puede alcanzar su ulterior metabolismo a través de la piruvato deshidrogenasa y del ciclo del ácido cítrico. La lactato deshidrogenasa es abundante en el músculo, y el equilibrio se decanta claramente hacia la reducción del piruvato a lactato. Así pues, se libera lactato a la sangre, de donde puede captarse con facilidad por el corazón que lo oxida como combustible. La acumulación de lactato durante el ejercicio prolongado es un factor significativo que limita la actividad atlética.

Parte del lactato que se produce en el músculo entra en el hígado y se reoxida a piruvato. Este piruvato puede experimentar entonces gluconeogénesis para dar glucosa, que se devuelve al torrente sanguíneo y se capta por el músculo para regenerar las reservas de glucógeno. Este proceso que fue descrito por primera vez por Carl y Gerti Cori, y al que acertadamente se denominó **ciclo de Cori**, se esquematiza en la Figura 16.5. La ruta es esencialmente activa durante la recu-

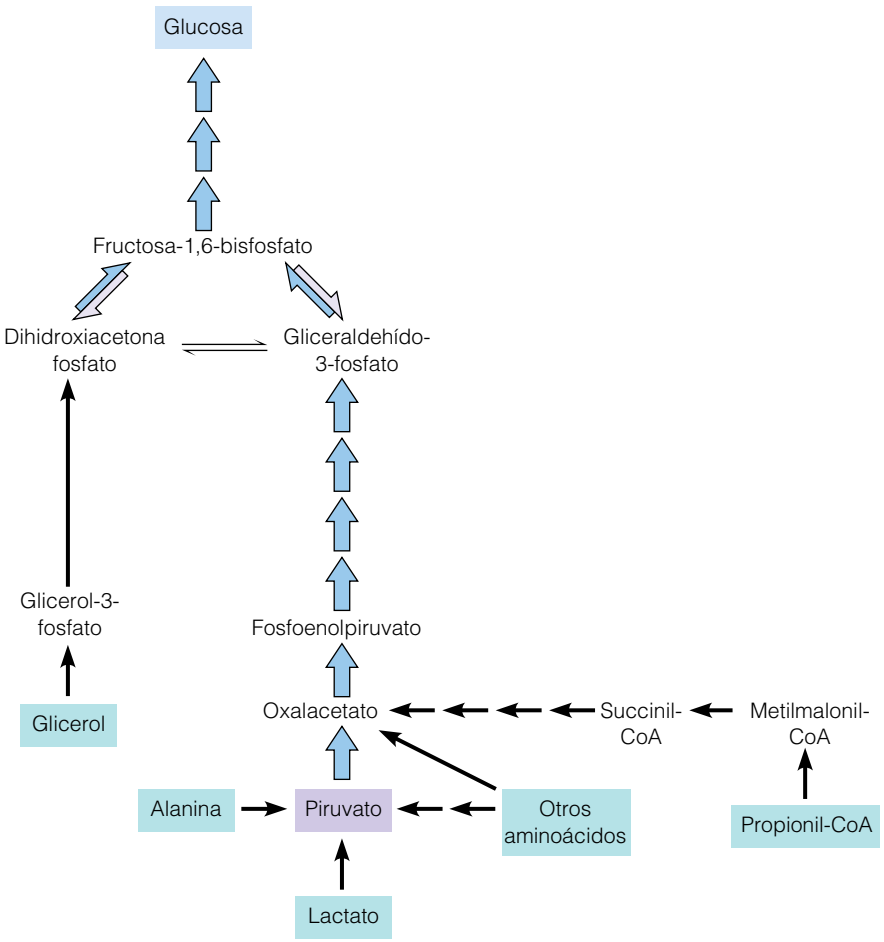


FIGURA **16.4**

Esquema general de las rutas de síntesis de glucosa a partir de los principales precursores gluconeogénicos. Obsérvese que tanto la glucosa como el lactato se transportan en la sangre.

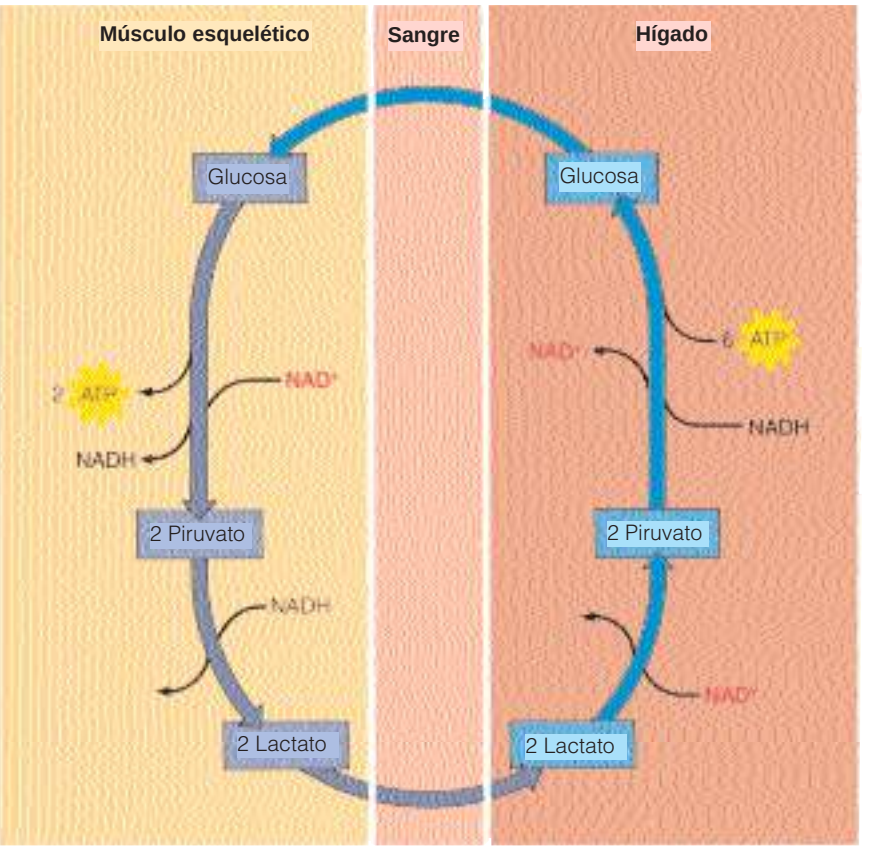


FIGURA **16.5**

Ciclo de Cori. El lactato producido en la glucólisis durante el ejercicio muscular se transporta al hígado, para sintetizar de nuevo glucosa mediante la gluconeogénesis.

peración posterior a un ejercicio muscular intenso. Durante este tiempo, la frecuencia respiratoria aumenta y el mayor metabolismo oxidativo genera más ATP, gran parte del cual se utiliza para reconstituir las reservas de glucógeno mediante la gluconeogénesis.

En un proceso paralelo, denominado **ciclo glucosa-alanina**, el piruvato de los tejidos periféricos experimenta una transaminación a alanina, que se devuelve al hígado y se utiliza para la gluconeogénesis. Esta ruta, que se presentará detalladamente en el Capítulo 20, ayuda a los tejidos a eliminar el amoníaco tóxico que se forma durante la degradación de las proteínas.

Aminoácidos

Al igual que la alanina, muchos otros aminoácidos pueden convertirse con facilidad en glucosa, fundamentalmente a través de las rutas de degradación que generan intermediarios del ciclo del ácido cítrico, que pueden convertirse en oxalacetato (véase la Figura 16.4). Estos aminoácidos se denominan **glucogénicos** (es decir, capaces de convertirse en glucosa), aunque probablemente sería más exacta la denominación de *gluconeogénicos*. Entre los 20 aminoácidos que se encuentran en las proteínas, tan sólo las rutas catabólicas de la leucina y la lisina no generan precursores gluconeogénicos. Durante el ayuno, cuando la cantidad de hidratos de carbono ingerida es insuficiente, el catabolismo de las proteínas musculares constituye la principal fuente de mantenimiento de las concentraciones normales de glucosa en sangre. Lo mismo ocurre en la diabetes mellitus, como se comentará en el Capítulo 23.

Glicerol

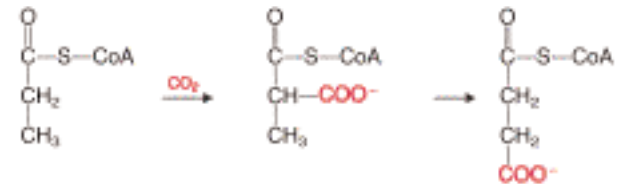
En general, los lípidos son malos precursores gluconeogénicos. El catabolismo de los triacilgliceroles produce ácidos grasos y glicerol. Los ácidos grasos sufren

β-oxidación para producir acetil-CoA. En las plantas y las bacterias, la acetil-CoA puede incorporarse a los hidratos de carbono a través del ciclo del glioxilato. Sin embargo, en los animales la acetil-CoA no puede convertirse en piruvato ni en ningún otro precursor gluconeogénico. Así pues, *los ácidos grasos no pueden experimentar una conversión neta en hidratos de carbono*. Aunque es cierto que las unidades de dos carbonos procedentes de la acetil-CoA pueden pasar a oxalacetato en el ciclo del ácido cítrico, no se produce una conversión neta, puesto que se pierden dos carbonos en cada vuelta del ciclo. En consecuencia, aparte de una contribución menor de los ácidos grasos de cadena impar (que se explica en el apartado siguiente), el único producto de degradación de las grasas que puede entrar en la gluconeogénesis es el glicerol. Su empleo comporta una fosforilación, seguida de una deshidrogenación para producir dihidroxiacetona fosfato (véase la Figura 16.4).

Debido a que los animales carecen del ciclo del glioxilato, no pueden realizar la conversión neta de grasas en hidratos de carbono.

Propionato

En todos los organismos, una acil-CoA de tres carbonos, la **propionil-CoA**, se genera, bien a partir de la degradación de algunos aminoácidos o bien a partir de la oxidación de los ácidos grasos que tienen un número impar de átomos de carbono. La propionil-CoA entra en la gluconeogénesis a través de su conversión en succinil-CoA y de ésta en oxalacetato. En el proceso, que se detallará en el Capítulo 18, interviene una coenzima que deriva de la vitamina B_{12}



Propionil-CoA **Metilmalonil-CoA** **Succinil-CoA**

Aunque todos los organismos utilizan el propionato como sustrato gluconeogénico, este compuesto es especialmente importante en el metabolismo de los animales rumiantes como las vacas. Estos animales realizan una gran cantidad de gluconeogénesis a partir de diversos sustratos, debido a la gran cantidad de fermentación bacteriana que se produce en sus diversas cámaras estomacales. En las vacas las cuatro cámaras del estómago tienen un volumen total de hasta 70 litros. La acción de las diversas bacterias degrada las sustancias vegetales, en especial la celulosa, para dar glucosa. Pero antes de que la glucosa pueda absorberse al torrente sanguíneo, como ocurre en la digestión humana, se fermenta para producir diversos productos, en especial lactato y propionato. El propionato se convierte en propionil-CoA y luego en succinil-CoA, y el lactato simplemente se deshidrogena a piruvato.

CONSUMO DE ETANOL Y GLUCONEOGÉNESIS

Aunque se pueden visualizar rutas por medio de las cuales el etanol podría convertirse en glucosa, realmente el etanol es un mal precursor gluconeogénico. De hecho, el etanol inhibe fuertemente la gluconeogénesis y puede provocar **hipoglucemia**, un descenso potencialmente peligroso de las concentraciones de glucosa en sangre.

El etanol se metaboliza fundamentalmente en el hígado, por la alcohol deshidrogenasa:

$$\text{Etanol} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{acetaldehído} + NADH + H^+$$

Esta reacción eleva la relación [NADH]/[NAD^+] en el citosol hepático, lo cual desplaza a su vez el equilibrio de la lactato deshidrogenasa y de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, inhibiendo la glucólisis. El mismo mecanismo desplaza el equilibrio de la malato deshidrogenasa citosólica, de tal forma que el oxalacetato tiende a reducirse a malato y deja de estar disponible para la gluconeogénesis. La hipoglucemia resultante puede afectar a las zonas del cerebro que se encargan de la regulación de la temperatura. Esta respuesta puede provocar, a su vez, una disminución de la temperatura corporal de hasta 2°C. En consecuencia, la práctica que durante tanto tiempo se ha utilizado de dar coñac o whisky a quienes se están recuperando de unas condiciones de frío y humedad, es contraproducente. Ciertamente, el alcohol crea una sensación de calor mediante la vasodilatación, pero esta vasodilatación periférica produce una mayor pérdida de calor. Desde el punto de vista metabólico, la glucosa resultaría mucho más eficaz para elevar la temperatura corporal.

FUNCIONES DE LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXIQUINASA EXTRAHEPÁTICA

Además de su función en el hígado, que es el tejido gluconeogénico predominante, la PEPCK es importante en el metabolismo de otros dos tejidos. El primero es la corteza renal, el otro tejido gluconeogénico principal, donde la PEPCK participa en la regulación ácido-base. La corteza produce amoníaco para titular la acidez de la orina. El origen primario del amoníaco es la glutamina, que genera dos moles de amoníaco:

$$\text{Glutamina} + H_2O \longrightarrow \text{glutamato} + NH_3$$

$$\text{Glutamato} + NAD^+ + H_2O \longrightarrow \alpha\text{-cetoglutarato} + NH_3 + NADH + H^+$$

El α-cetoglutarato que se produce en la segunda reacción (glutamato deshidrogenasa, página 568) se convierte a través del ciclo del ácido cítrico en oxalacetato, el cual genera fosfoenolpiruvato a través de la reacción de la PEPCK, para sintetizar finalmente glucosa.

El segundo es el tejido adiposo (graso), donde la PEPCK participa en un proceso que se ha denominado **gliceroneogénesis**, que evidentemente actúa para producir glicerol-3-fosfato suficiente para la formación de triacilgliceroles, particularmente durante la inanición, cuando se ha activado la degradación de las grasas (Capítulos 18 y 23) y es necesario equilibrar la degradación y la nueva síntesis. En este tejido, el fosfoenolpiruvato que se produce por la piruvato carboxilasa y la PEPCK *no* se convierte en glucosa, sino que en su lugar se desvía hacia la dihidroxiacetona fosfato para su reducción a glicerol-3-fosfato, que se combina con los derivados de coenzima A de los ácidos grasos (Capítulo 18) para producir triacilgliceroles.

Regulación de la gluconeogénesis

La regulación de la gluconeogénesis es crucial para muchas funciones fisiológicas, pero sobre todo para el funcionamiento adecuado del tejido nervioso. Aunque otros órganos pueden utilizar diversas fuentes de energía, el buen estado del sistema nervioso central requiere un mantenimiento de las concentraciones sanguíneas de glucosa dentro de unos límites estrechos. El control de la gluconeogénesis es importante también cuando el animal se adapta a un ejercicio muscular o a los ciclos de alimentación y ayuno. El flujo a través de la ruta debe aumentar o disminuir, en función de la disponibilidad del lactato producido por

los músculos, de la glucosa procedente de la alimentación, o de otros precursores gluconeogénicos.

La gluconeogénesis se controla en gran parte por la alimentación. Los animales que ingieren una alimentación con hidratos de carbono abundantes presentan tasas bajas de gluconeogénesis, mientras que los animales en ayunas o los que ingieren alimentaciones con un bajo contenido de hidratos de carbono presentan un flujo elevado a través de esta ruta. Estos efectos hormonales, que se producen fundamentalmente a través de la insulina y del glucagón, comportan un control de la síntesis de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y una regulación efectuada mediante el control de las concentraciones de AMP cíclico. Nuestro análisis se centrará aquí en estos efectos mediados por el cAMP, así como en otros mecanismos que afectan a las actividades enzimáticas. Volveremos a considerar los efectos hormonales sobre la síntesis enzimática en el Capítulo 23, al presentar de manera detallada la acción hormonal.

Las tasas de flujo gluconeogénico están inversamente relacionadas con el contenido de hidratos de carbono de la alimentación. Este efecto se produce de forma hormonal.

REGULACIÓN RECÍPROCA DE LA GLUCÓLISIS Y LA GLUCONEOGÉNESIS

La gluconeogénesis y la glucólisis se producen en gran parte en el citosol. Dado que la gluconeogénesis sintetiza glucosa y la glucólisis la cataboliza, es evidente que *la gluconeogénesis y la glucólisis deben controlarse de manera recíproca*. En otras palabras, las condiciones intracelulares que activan una ruta tienden a inhibir la otra. Si no fuera por el control recíproco, la glucólisis y la gluconeogénesis actuarían de manera conjunta formando un ciclo inútil gigante. La regulación recíproca se basa en gran parte en la carga energética de adenilato. Las condiciones de carga energética baja tienden a activar los pasos que controlan la velocidad de la glucólisis, al tiempo que inhiben el flujo de carbono a través de la gluconeogénesis. Y a la inversa, la gluconeogénesis se estimula a cargas energéticas elevadas, en condiciones en las que las velocidades de flujo catabólico son adecuadas para mantener unas concentraciones suficientes de ATP.

Las condiciones que fomentan la glucólisis inhiben la gluconeogénesis, y a la inversa.

Recuérdese del Capítulo 13 que la glucólisis se controla fundamentalmente por la regulación de las tres reacciones fuertemente exergónicas de la ruta, las catalizadas por la hexoquinasa (o glucoquinasa en el hígado), la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa. Las reacciones opuestas de la gluconeogénesis, las catalizadas por la glucosa-6-fosfatasa, la fructosa-1,6-bisfosfatasa y la combinación de la piruvato carboxilasa con la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, son fuertemente exergónicas y constituyen el principal objetivo del control de esta ruta. En otras palabras, los tres ciclos de sustrato que diferencian la glucólisis de la gluconeogénesis (véase la Figura 16.3) constituyen los lugares principales de regulación recíproca de estas rutas. La Figura 16.6 identifica los principales activadores e inhibidores alostéricos de las reacciones exergónicas clave de la glucólisis y la gluconeogénesis.

La glucosa-6-fosfatasa no tiene un control alostérico conocido, pero su K_M para la glucosa-6-fosfato es muy superior a las concentraciones intracelulares de este metabolito. Así pues, la actividad intracelular se controla mediante un proceso de primer orden por la concentración de este sustrato.

La carga energética afecta al control de la glucólisis y la gluconeogénesis mediante la regulación de la interconversión de la fructosa-6-fosfato y la fructosa-1,6-bisfosfato. La fosfofructoquinasa se activa por el AMP, y la enzima contraria, la fructosa-1,6-bisfosfatasa, se inhibe por el AMP. Así pues, cuando se reduce la carga energética, la glucólisis se activa y la gluconeogénesis se inhibe por los efectos opuestos del AMP sobre la fosfofructoquinasa y la fructosa-1,6-bisfosfatasa, respectivamente. Sin embargo, aunque las concentraciones intracelulares de nucleótidos de adenina varían en paralelo con los cambios del flu-

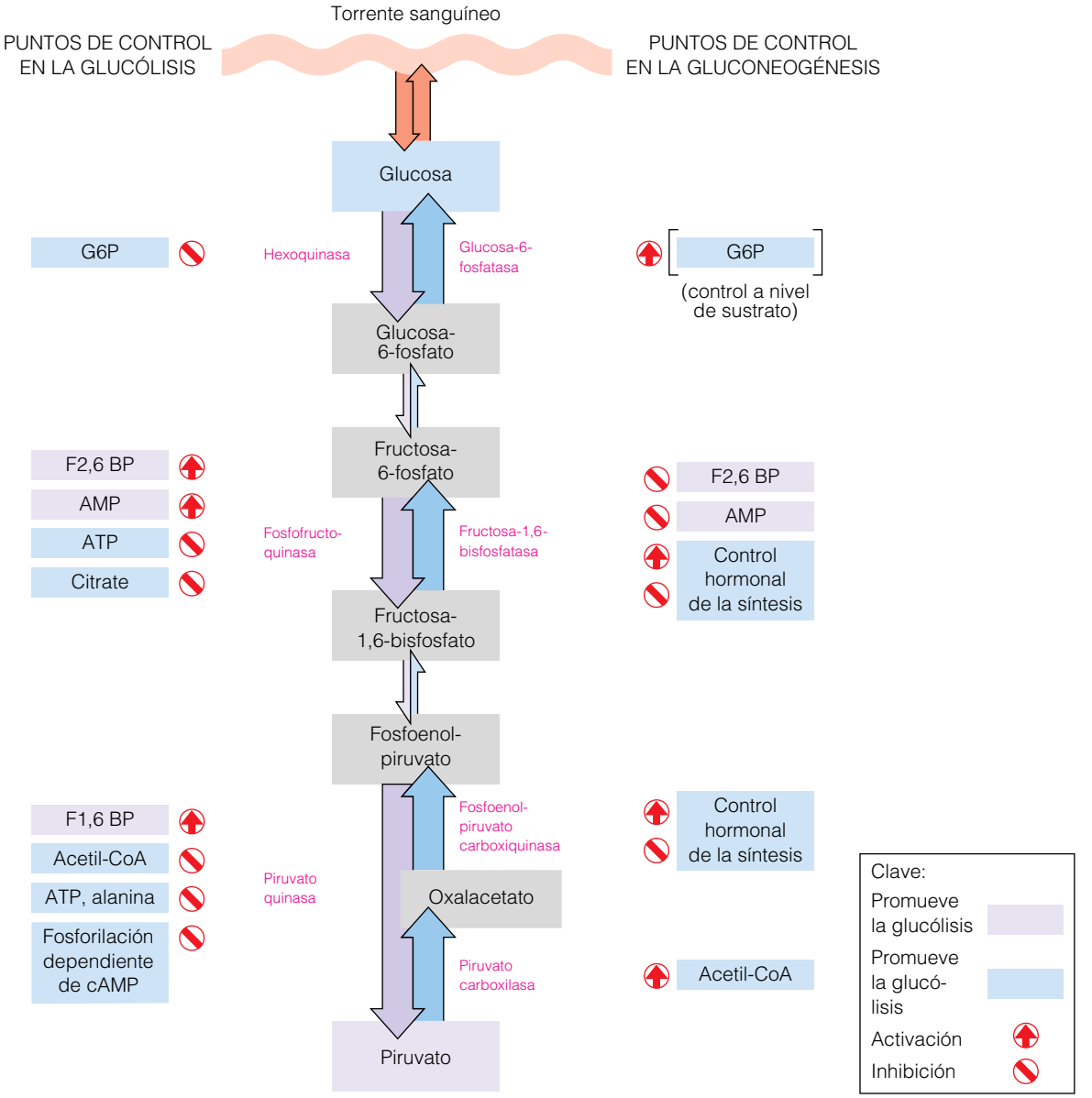


FIGURA **16.6**

Principales mecanismos de control que afectan a la glucólisis y a la gluconeogénesis. La figura muestra las reacciones fuertemente exergónicas de la glucólisis y la gluconeogénesis y los principales activadores e inhibidores de estas reacciones.

jo a través de la glucólisis y la gluconeogénesis, como es de esperar si la carga energética constituye un factor regulador importante, la correspondencia no es absoluta. Estas observaciones sugirieron la participación de otros mecanismos de control y condujeron al descubrimiento de un importante regulador fisiológico, la fructosa-2,6-bisfosfato, que hemos presentado en el Capítulo 13 y que describiremos con detalle más adelante en este capítulo.

Sin embargo, la carga energética controla una de las dos formas isoenzimáticas de la piruvato quinasa. En el hígado y en otros tejidos gluconeogénicos, predomina la denominada forma L de la piruvato quinasa, mientras que en el músculo se encuentra mayoritariamente la forma M. La forma L se inhibe tanto por el ATP como por algunos aminoácidos, en especial la alanina, que es el principal precursor gluconeogénico de entre los aminoácidos. Esta relación permite la inhibición de la glucólisis, con la consiguiente activación de la gluconeogénesis, específicamente en los tejidos gluconeogénicos, cuando se dispone de energía y sustratos de manera abundante. El control en el paso de la piruva-

to quinasa permite conservar el fosfato de energía elevada en la molécula de fosfoenolpiruvato.

La acetil-CoA puede verse también como un regulador recíproco de la glucólisis y la gluconeogénesis, al actuar sobre las enzimas que interconvierten el piruvato y el fosfoenolpiruvato. La acetil-CoA es un activador necesario de la piruvato carboxilasa y un inhibidor de la piruvato quinasa y del complejo piruvato deshidrogenasa. Cuando sus concentraciones aumentan, puede indicar, pues, que se dispone de sustratos suficientes para proporcionar energía a través del ciclo del ácido cítrico y que puede pasarse más carbono a la gluconeogénesis, para almacenarlo finalmente en forma de glucógeno. Sin embargo, algunos bioquímicos han puesto en duda que la activación de la piruvato carboxilasa por la acetil-CoA constituya un mecanismo de regulación importante, ya que sus concentraciones intramitocondriales en la mayoría de las circunstancias son muy superiores a la concentración que proporciona la mitad de la estimulación máxima. Así pues, la actividad in vivo de la piruvato carboxilasa podría no variar en respuesta a los cambios de concentración de acetil-CoA.

FRUCTOSA-2,6-BISFOSFATO Y CONTROL DE LA GLUCONEOGÉNESIS

La fructosa-2,6-bisfosfato, el regulador más importante de la gluconeogénesis, se sintetiza y degrada por formas diferentes de la misma enzima.

Aunque los efectos que se han señalado anteriormente son todos ellos importantes para el control de la glucólisis y la gluconeogénesis, los avances realizados desde 1980 han permitido identificar a la **fructosa-2,6-bisfosfato** como el regulador más importante, a través de sus efectos sobre la interconversión de la fructosa-6-fosfato y la fructosa-1,6-bisfosfato. La fructosa-2,6-bisfosfato es activa a concentraciones mucho más bajas que las de los demás reguladores fisiológicos que hemos comentado. Así, por ejemplo, la fructosa-2,6-bisfosfato inhibe a la fructosa-1,6-bisfosfatasa con una K_i de 2.5 μM, mientras que el AMP tiene una K_i para la misma enzima de 25 μM. Recuérdese del Capítulo 13 que la fructosa-2,6-bisfosfato es también un activador alostérico de la fosfofructoquinasa. Así pues, la acumulación de este regulador tiene el efecto de activar la glucólisis e inhibir la gluconeogénesis. La concentración de la propia fructosa-2,6-bisfosfato se controla en última instancia por el AMP cíclico, a través de la acción de la proteína quinasa dependiente de cAMP.

Como se indica en la Figura 16.7, la fructosa-2,6-bisfosfato se forma a partir de la fructosa-6-fosfato por la acción de una forma distinta de la fosfofructoquinasa, denominada PFK-2 para diferenciarla de la conocida PFK de la glucólisis, a la que para mayor claridad podemos denominar PFK-1. La actividad de la PFK-2 se controla, a su vez, por el AMP cíclico. Una subunidad de 49 kilodalton de la enzima sufre una fosforilación por acción de la proteína quinasa dependiente de cAMP. Esta fosforilación *reduce* la actividad de la PFK-2 mediante un aumento de su K_M para la fructosa-6-fosfato. La caída que resulta de la concentración de fructosa-2,6-bisfosfato hace que se disocie de la PFK-1, y de esta forma aumente la sensibilidad de la PFK-1 a los inhibidores alostéricos, citrato, ATP y fosfoenolpiruvato.

Otra actividad enzimática, denominada **fructosa-2,6-bisfosfatasa**, fragmenta la fructosa-2,6-bisfosfato para volver a formar fructosa-6-fosfato. El control de esta actividad puede contribuir a regular la concentración de la fructosa-2,6-bisfosfato. La fructosa-2,6-bisfosfatasa se inhibe fuertemente por la fructosa-6-fosfato. Y lo que es más importante, esta enzima se regula también por la fosforilación, estimulada por el cAMP, de una subunidad de 49 kilodalton, excepto que en este caso la fosforilación *potencia* la actividad de la enzima.

El hallazgo de que ambas actividades están reguladas por la fosforilación de una proteína de 49 kilodalton llevó al descubrimiento de que la misma proteí-

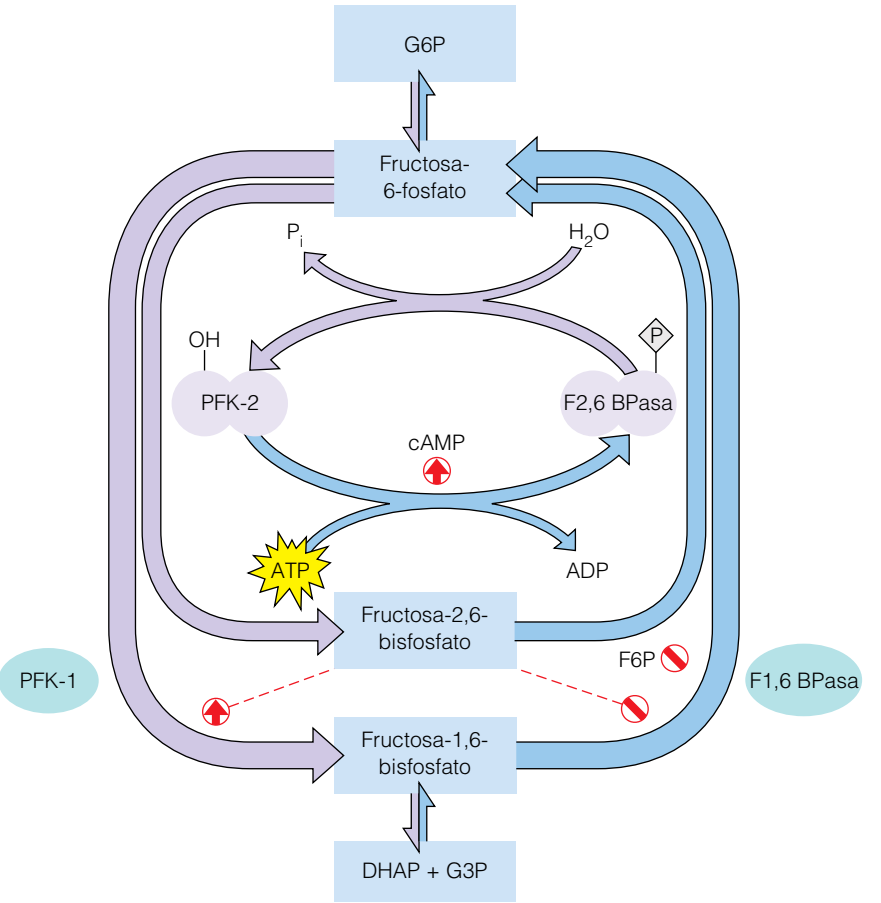


FIGURA **16.7**

Biosíntesis y degradación de la fructosa-2,6-bisfosfato por la acción de una enzima bifuncional. La fosforilación de una subunidad de la PFK-2 la realiza una proteína quinasa dependiente de cAMP. La fructosa-2,6-bisfosfato activa la fosfofructoquinasa-1 e inhibe la fructosa-1,6-bisfosfatasa. Las reacciones que fomentan la glucólisis se indican con flechas moradas y las que favorecen la gluconeogénesis con flechas azules.

na interviene en ambos efectos. De hecho, la PFK-2 y la fructosa-2,6-bisfosfatasa constituyen una enzima bifuncional. Cuando la proteína de 49 kilodalton se encuentra en la forma *no fosforilada*, la enzima bifuncional cataliza la síntesis de fructosa-2,6-bisfosfato, y cuando la proteína de 49 kilodalton está fosforilada, está activada la actividad fosfatasa. Así pues, el cAMP tiene un efecto doble sobre las concentraciones de fructosa-2,6-bisfosfato, mediante la inactivación de la actividad PFK-2 y la estimulación de la actividad fructosa-2,6-bisfosfatasa, y ambos efectos tienden a *reducir* las concentraciones de fructosa-2,6-bisfosfato. Ello reduce, a su vez el flujo a través de la glucólisis y *estimula* la gluconeogénesis mediante: (1) una disminución de la estimulación de la PFK-1, y (2) un alivio de la inhibición de la fructosa-1,6-bisfosfatasa.

Recuérdese del Capítulo 13 que la hormona principal cuya acción eleva la concentración de cAMP en el hígado es la hormona pancreática *glucagón*. El glucagón eleva las concentraciones sanguíneas de glucosa por medio de dos mecanismos diferentes: (1) la estimulación producida por el cAMP de la cascada reguladora que causa la degradación del glucógeno, y (2) como se describe aquí, la depresión que produce el cAMP de las concentraciones de fructosa-2,6-bisfosfato, que estimula la gluconeogénesis. Además, el glucagón controla las concentraciones de la enzima clave fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), mediante una activación de la transcripción del gen estructural de la PEPCK. La insulina tiene el efecto contrario. Mediante la inhibición de la transcripción del gen de la PEPCK, la insulina tiende a deprimir la velocidad del flujo gluconeogénico. El glucagón tiene una acción adicional a nivel genético: reprime la síntesis de la piruvato quinasa, la enzima glucolítica que convierte el fosfoenolpi-

ruvato en piruvato, otro efecto que tiende a fomentar el flujo del piruvato hacia el fosfoenolpiruvato.

La fructosa-2,6-bisfosfato desempeña también una función reguladora en las plantas. Al inhibir una fructosa-1,6-bisfosfatasa citosólica, controla el flujo de los azúcares de tres carbonos, producidos por la fotosíntesis, fuera de los cloroplastos y dentro de la ruta de síntesis de la sacarosa en el citosol.

Biosíntesis de glucógeno

Un destino importante de la glucosa en los animales es la síntesis de glucógeno, el polímero de glucosa con uniones $\alpha(1\rightarrow4)$ muy ramificado (Capítulo 9). Éste es un buen lugar para iniciar la consideración de la síntesis de los polisacáridos, puesto que la síntesis de glucógeno ilustra los mecanismos generales que se utilizan en la síntesis de los enlaces glucosídicos. Además, la regulación recíproca de la síntesis y degradación del glucógeno es de gran importancia metabólica.

Durante muchos años se pensó que la inversión de la reacción de la glucógeno fosforilasa descrita en el Capítulo 13 (véase la página 530) era la principal ruta para la síntesis de glucógeno. Sin embargo, tres observaciones no podían reconciliarse con esta idea. En primer lugar, la secreción de adrenalina activa el metabolismo del glucógeno tan sólo en la dirección de la degradación; de hecho, la adrenalina inhibe la síntesis de glucógeno. En segundo lugar, las concentraciones intracelulares de ortofosfato son relativamente elevadas, lo cual dificultaría, por motivos de equilibrio, que la fosforilasa catalizara in vivo la síntesis de glucógeno. En tercer lugar, aunque la fosforilasa puede sintetizar in vitro glucógeno, el producto obtenido tiene un peso molecular muy inferior al del glucógeno natural. Todos estos factores sugerían que el glucógeno se sintetiza mediante una enzima diferente.

GLUCÓGENO SINTASA Y PROCESO DE RAMIFICACIÓN

La UDP-glucosa es la forma de glucosa activada metabólicamente para la síntesis de glucógeno.

A finales de los años 1950, el bioquímico argentino Luis Leloir descubrió la *uridina difosfato glucosa*, habitualmente denominada UDP-glucosa o UDP-Glc. Aunque hemos comentado el cometido que desempeña la UDP-glucosa en el metabolismo de la galactosa en el Capítulo 13, su primera función conocida fue la de sustrato de la biosíntesis de glucógeno. La enzima que interviene, la **glucógeno sintasa**, es un tetrámero, estrechamente unido a los gránulos intracelulares de glucógeno.

Biosíntesis de la UDP-glucosa

Revisemos en primer lugar de qué forma se sintetiza el sustrato UDP-Glc a partir de la glucosa sanguínea. La glucosa se transporta dentro de las células mediante una proteína unida a la membrana, el **transportador de glucosa**. Como se muestra en la Figura 16.8, a continuación se fosforila por la hexoquinasa o la glucoquinasa, para dar glucosa-6-fosfato, que se isomeriza a glucosa-1-fosfato por la fosfoglucomutasa. La enzima **UDP-glucosa pirofosforilasa**, que se ha presentado en el Capítulo 13 (véase la Figura 13.13b) cataliza entonces la síntesis de UDP-glucosa. La reacción se decanta hacia la derecha gracias a la rápida fragmentación enzimática del pirofosfato a ortofosfato, catalizada por la pirofosfatasa. La hidrólisis del pirofosfato produce unos 30 kJ/mol en condiciones estándar.

Reacción de la glucógeno sintasa

La UDP-glucosa es el donador inmediato de un residuo glucosilo al extremo no reductor de una rama de glucógeno, que debe tener como mínimo una longi-

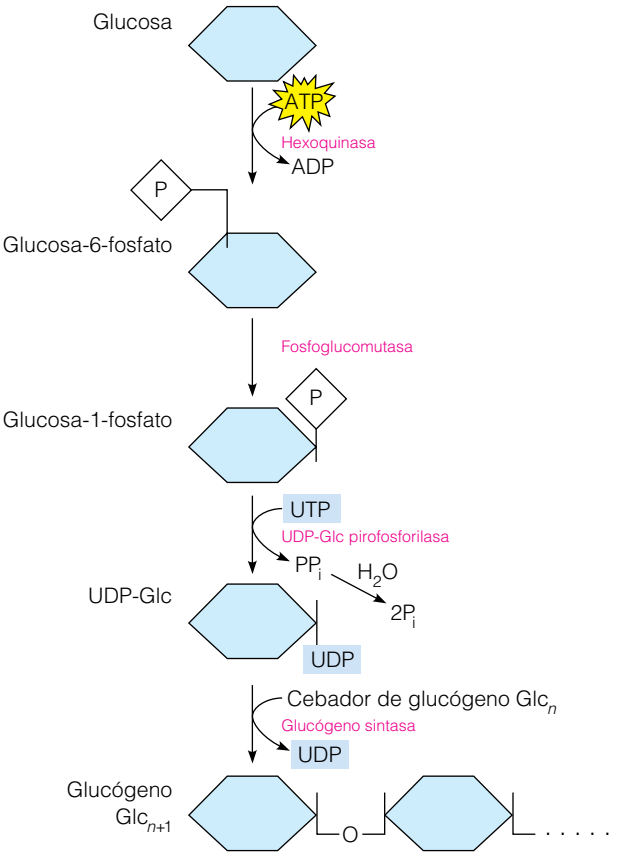


FIGURA **16.8**
Ruta de conversión de los monómeros de glucosa en glucógeno polimérico.

tud de cuatro unidades de glucosa. La glucógeno sintasa es una **glucosiltransferasa**, una enzima que transfiere una unidad de azúcar activada a un grupo hidroxilo de azúcar no reductor. La reacción, que se presenta en la Figura 16.9, genera un enlace glucosídico $\alpha(1\rightarrow4)$ entre el carbono 1 del grupo glucosilo que entra y el carbono 4 del residuo de glucosa del extremo de la cadena de glucó-

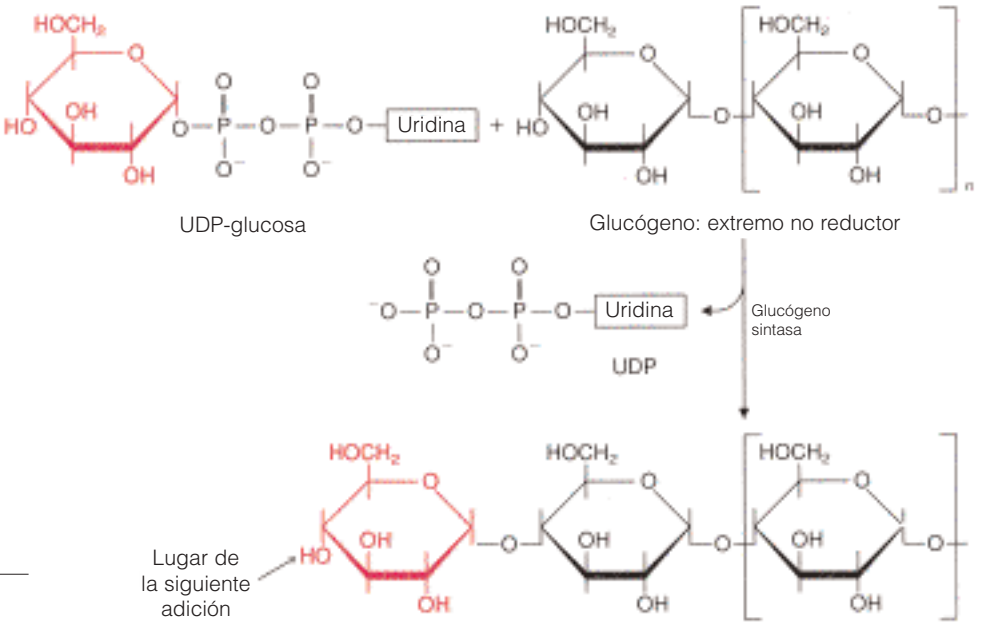


FIGURA **16.9**
Reacción de la glucógeno sintasa.

geno. La enzima continúa añadiendo residuos de glucosa de manera sucesiva al grupo 4-hidroxilo del extremo no reductor. Dado que la UDP-Glc es un compuesto de energía elevada, la reacción de la glucógeno sintasa es exergónica, con un valor de $\Delta G°'$ de aproximadamente –13.4 kJ/mol.

El cebador de la glucógeno sintasa es una cadena corta de residuos de glucosa ensamblados por una proteína denominada **glucogenina**, que transfiere la glucosa desde la UDP-Glc a un residuo de tirosina en la propia proteína. La glucogenina transfiere luego las unidades adicionales de glucosilo de la UDP-Glc, para dar cebadores con enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ de hasta ocho residuos de longitud. Estos cebadores son alargados luego por la glucógeno sintasa.

Formación de las ramas

La síntesis de glucógeno implica tanto la polimerización de las unidades de glucosa como la ramificación mediante enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$. Estas ramificaciones son importantes porque aumentan la solubilidad del polímero y también aumentan el número de extremos no reductores de los que puede obtenerse glucosa-1-fosfato durante la movilización del glucógeno. Sin embargo, estas ramas no pueden introducirse por la glucógeno sintasa. Otra enzima, denominada **enzima ramificante**, aunque sería más exacto denominarla **amilo-(1,4→1,6)-transglucosilasa**, interviene en el proceso como se muestra en la Figura 16.10. Esta enzima ramificante transfiere un fragmento terminal, de unos 6 ó 7 residuos de longitud, desde un extremo de al menos 11 residuos de longitud a un grupo hidroxilo situado en la posición 6 de un residuo de glucosa del interior del polímero. La reacción implica el ataque nucleófilo del hidroxilo de C-6 sobre el C-1 del oligosacárido que formará la ramificación. La reacción crea, pues, dos extremos para que continúe la acción de la glucógeno sintasa, cuando antes sólo existía uno. El proceso de ramificación no comporta un cambio de energía libre grande, debido a la semejanza química de los enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ y $\alpha(1\rightarrow6)$.

La biosíntesis de glucógeno requiere la glucógeno sintasa para la polimerización y una transglucosilasa para crear las ramificaciones.

RELACIÓN RECÍPROCA ENTRE LA SÍNTESIS Y LA MOVILIZACIÓN DEL GLUCÓGENO

Hemos señalado antes que la secreción de adrenalina inhibe la síntesis de glucógeno en el músculo a la vez que fomenta la movilización de glucógeno. El glucagón tiene unos efectos semejantes en el hígado. El control de la síntesis y la degradación del glucógeno se realiza mediante cascadas reguladoras bien definidas en las que interviene una proteína quinasa dependiente de AMP y fosforilaciones proteicas reversibles. Sin embargo, mientras que la cascada que controla la

Las condiciones que activan la degradación del glucógeno inhiben la síntesis de éste, y viceversa.

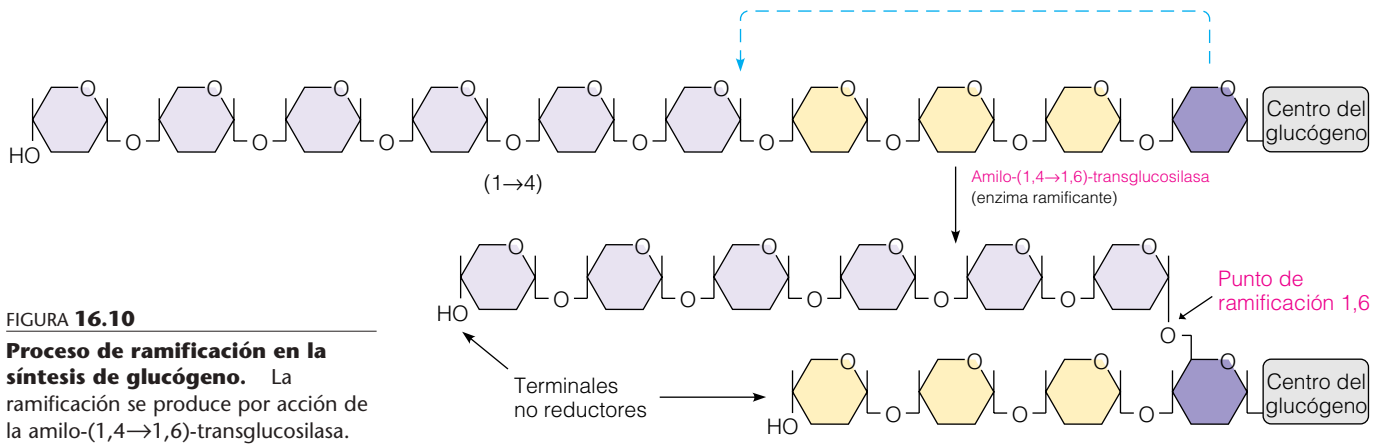


FIGURA **16.10**

Proceso de ramificación en la síntesis de glucógeno. La ramificación se produce por acción de la amilo-(1,4→1,6)-transglucosilasa.

glucogenólisis conduce a la *activación* de la glucógeno fosforilasa (véase la Figura 13.18), la cascada que controla la síntesis de glucógeno conduce a la *inhibición* de la glucógeno sintasa (Figura 16.11).

La actividad de la glucógeno sintasa está controlada por fosforilación, mediante mecanismos comparables a los que controlan la degradación del glucógeno por la fosforilasa, pero que tienen efectos inversos sobre la actividad enzimática.

Fosforilación de la glucógeno sintasa

La glucógeno sintasa de los tejidos de los vertebrados es una proteína tetramérica formada por cuatro subunidades idénticas y que tiene un peso molecular total de aproximadamente 350 000 dalton. Al igual que la fosforilasa, la glucógeno sintasa se encuentra en estados fosforilados y desfosforilados, con la unión reversible de fosfato a un residuo de serina en cada subunidad. Algunas de las fosforilaciones y desfosforilaciones las catalizan las mismas proteína quinasas y fosfatasas que regulan la glucogenólisis. De hecho, la enzima que se ha presentado en el Capítulo 13 como fosforilasa *b* quinasa se denomina también **sintasa-fosforilasa quinasa** (**SPK**), para resaltar esta doble especificidad.

La forma desfosforilada de la glucógeno sintasa, denominada **glucógeno sintasa I** es la forma activa. Las proteína quinasas fosforilan residuos de serina y generan la **glucógeno sintasa D** menos activa. En términos cinéticos, la fosforilación de la glucógeno sintasa de la forma I a la D, aumenta la K_M para la UDP-glucosa, *pero sólo cuando las reacciones se producen en ausencia de glucosa-*

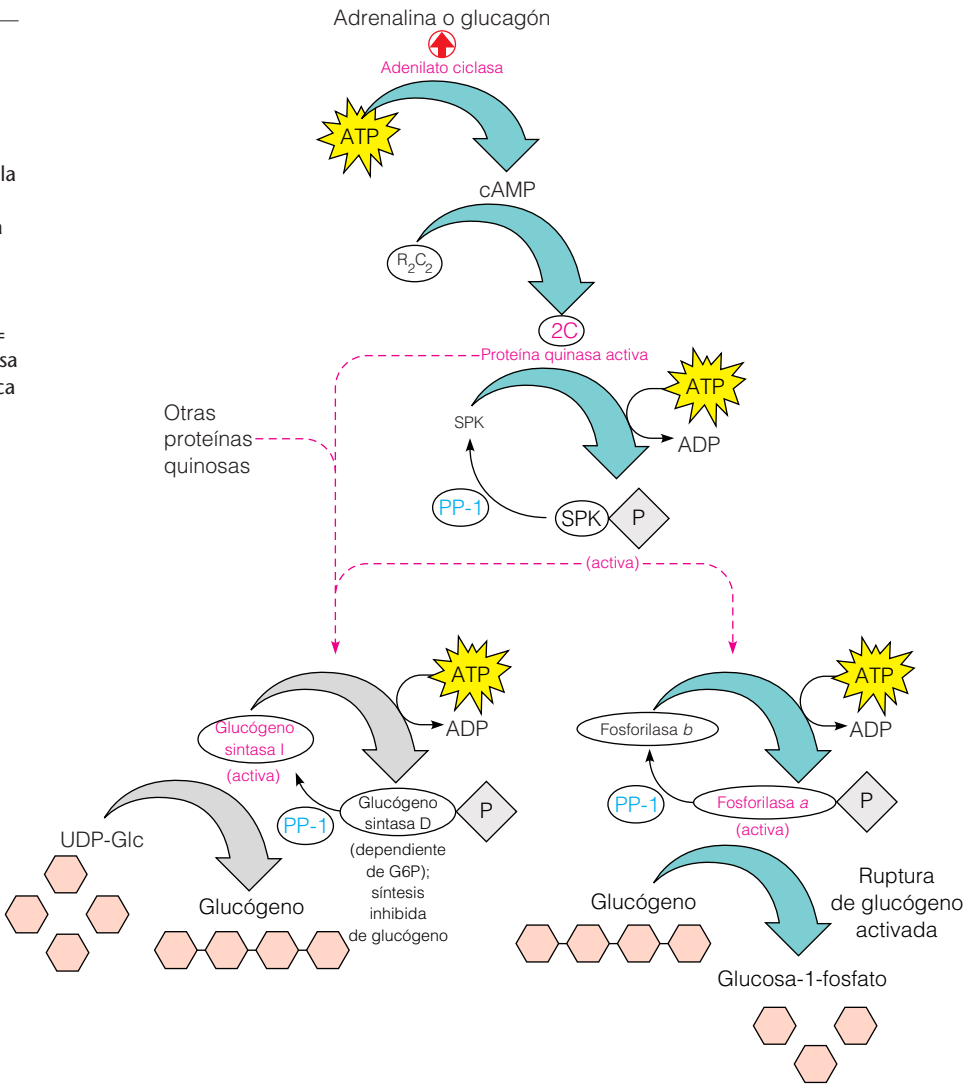


FIGURA **16.11**

Cascadas reguladoras que afectan a la síntesis y movilización del glucógeno. Fenómenos que se producen tras la activación de la adenilato ciclasa y que promueven la activación simultánea de la degradación del glucógeno y la inhibición de la síntesis del mismo. Cinco proteína quinasas diferentes, entre las que se encuentra la forma fosforilada de la SPK y la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP, pueden inactivar la glucógeno sintasa I al convertirla en la forma D menos activa. PP-1 = fosfoproteína fosfatasa; R_2C_2 = proteína quinasa dependiente de cAMP; C = subunidad catalítica de R_2C_2; SPK = sintasa-fosforilasa quinasa.

6-fosfato. La glucosa-6-fosfato es un efector alostérico, y cuando está presente a concentraciones suficientes (> 1 mM), no hay efecto sobre la K_M para la UDP-Glc. En la práctica, esto significa que la actividad de la glucógeno sintasa D *depende* de la presencia de glucosa-6-fosfato, y de ahí la letra D para designar a la forma menos activa de la glucógeno sintasa. En cambio, la forma I desfosforilada de la enzima es *independiente* de la presencia de glucosa-6-fosfato para su actividad. En el músculo en reposo predomina la forma I; durante la contracción muscular la especie dominante es la forma D, que es activa tan sólo a concentraciones elevadas de glucosa-6-fosfato.

La relación de la actividad de la glucógeno sintasa D con la concentración de glucosa-6-fosfato tiene sentido desde el punto de vista metabólico. Cuando las concentraciones de glucosa-6-fosfato son altas, la activación de la glucógeno sintasa puede constituir una señal para convertir parte de esa glucosa-6-fosfato en glucógeno (a través de la glucosa-1-fosfato y la UDP-Glc). Este efecto puede producirse en ausencia de un estímulo hormonal, comparable al de la activación de la glucógeno fosforilasa *b* por el 5′-AMP. Estos efectos de la glucosa-6-fosfato y del AMP constituyen mecanismos no hormonales que regulan el metabolismo del glucógeno de una forma metabólicamente razonable.

AMP cíclico y regulación de la glucógeno sintasa

El 5′-AMP y la glucosa-6-fosfato regulan, respectivamente, la glucogenólisis y la gluconeogénesis por medios no hormonales.

Examinemos ahora las consecuencias que tiene la liberación hormonal sobre la glucógeno sintasa (véase la Figura 16.11). Tal como se indica en la Figura 13.18, la activación de la adenilato ciclasa por la adrenalina o el glucagón fomenta la disociación de la proteína quinasa dependiente de cAMP (R_2C_2) para dar monómeros catalíticos libres (C). El C puede fosforilar la glucógeno sintasa I a D directamente, o puede fosforilar la SPK, que a su vez activa la SPK para que fosforile la glucógeno sintasa I.

Para complicar aún más la situación, otras tres proteína quinasas, menos conocidas, actúan sobre la glucógeno sintasa I. Cada una de las cinco enzimas fosforilan residuos de serina diferentes, con lo que hay varias formas diferentes de glucógeno sintasa D y constituye una excesiva simplificación el hablar de tan sólo dos formas. En general, cuantos más lugares se fosforilan, la actividad de la enzima disminuye progresivamente a causa de los siguientes cambios progresivos: (1) afinidad disminuida por el sustrato, la UDP-glucosa; (2) afinidad disminuida por el activador alostérico, la glucosa-6-fosfato; y (3) afinidad incrementada por el ATP y el P_i, que tienden a antagonizar la activación por la glucosa-6-fosfato. Así pues, hay una serie gradual de respuestas a las condiciones metabólicas cambiantes, en la que intervienen una serie de proteína quinasas diferentes. Los mecanismos de control que afectan a las tres quinasas distintas de la proteína quinasa dependiente de cAMP y la SPK no se conocen todavía bien. Sea cual sea la quinasa utilizada, el efecto neto de la fosforilación de la glucógeno sintasa es la inhibición de la enzima, con la consiguiente inhibición de la síntesis de glucógeno.

Obsérvese que la cascada de *síntesis* de glucógeno sólo puede tener un ciclo menos que la cascada de *degradación* del glucógeno, ya que C puede fosforilar la glucógeno sintasa directamente, mientras que puede actuar sobre la glucógeno fosforilasa tan sólo a través de su acción sobre la SPK. El ciclo extra permite una regulación más sensible de la degradación del glucógeno que de su síntesis, lo cual concuerda con las necesidades que tienen los animales de unos cambios extraordinariamente rápidos de la demanda de generación de energía en el músculo. De hecho, las observaciones experimentales indican que la velocidad máxima de degradación del glucógeno muscular es unas 300 veces mayor que la de síntesis de glucógeno.

Un examen más detenido de la regulación de la glucógeno sintasa: desfosforilación de la forma D

Diversas fosfatasas diferentes actúan para regenerar las formas desfosforiladas de la glucógeno sintasa y la SPK. Tiene una especial importancia fisiológica la **fosfoproteína fosfatasa-1**, también denominada **PP-1**. La actividad de esta enzima se controla, a su vez, por una proteína denominada **inhibidor de la fosfoproteína fosfatasa, PI-1**. Una forma fosforilada del PI-1 es activa como inhibidor, y la forma desfosforilada es inactiva. La fosforilación la lleva a cabo C, la proteína quinasa dependiente de cAMP. Así pues, como se indica en la Figura 16.12, el cAMP ejerce dos efectos inhibidores sobre la síntesis de glucógeno: (1) fosforilación de la glucógeno sintasa, provocando su inactivación, y (2) inhibición de la fosfoproteína fosfatasa (PP-1), cuya actividad tendería a restablecer la actividad de la glucógeno sintasa. La PP-1 y otras fosfoproteínas fosfatasas desempeñan papeles inversos en la glucogenólisis, en la que la *desfosforilación* de la glucógeno fosforilasa quinasa (SPK) causa su inactivación.

La fosfoproteína fosfatasa es también uno de los diversos lugares de acción de la insulina. La secreción de esta hormona estimula la actividad fosfatasa, que tiende a oponerse a los efectos del glucagón y la adrenalina.

FUNCIONES DE LAS RESERVAS DE GLUCÓGENO EN EL MÚSCULO Y EL HÍGADO

El hígado regula las concentraciones sanguíneas de glucosa en parte mediante el control de su glucógeno sintasa y fosforilasa.

El glucógeno constituye la principal fuente de energía para la contracción del músculo esquelético. Dado que el hígado obtiene la mayor parte de su energía metabólica de la oxidación de los ácidos grasos, el glucógeno hepático tiene una función muy distinta, como fuente de glucosa sanguínea que se transporta a otros tejidos para su catabolismo. El hígado actúa fundamentalmente como un "glucostato", detectando las concentraciones de glucosa sanguínea y ajustando consecuentemente la síntesis y degradación del glucógeno; gran parte de esta regulación comporta el control de la glucógeno sintasa y la fosforilasa. Para cumplir esta función, el hígado contiene unas reservas de glucógeno relativamente elevadas, desde un 2 a un 8% del peso del órgano. En el hígado, la velocidad máxima de síntesis y de degradación del glucógeno son aproximadamente iguales, mientras que en el músculo la velocidad máxima de glucogenó-

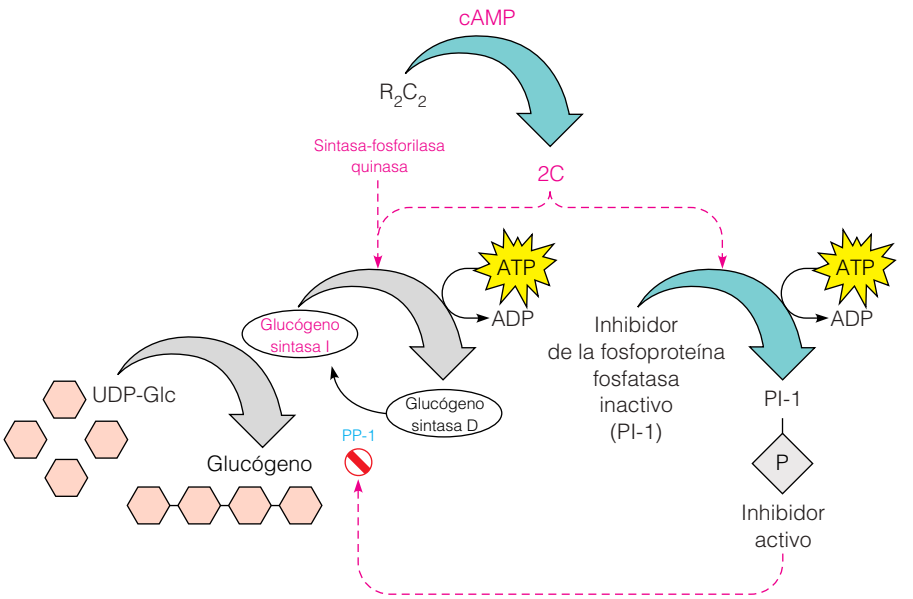


FIGURA **16.12**

Regulación de la actividad glucógeno sintasa mediante el control de la actividad de la fosfoproteína fosfatasa (PP-1) por medio del cAMP.

lisis supera a la de síntesis de glucógeno en unas 300 veces. Aunque la enzimología de la síntesis y degradación del glucógeno es semejante en el hígado y el músculo, el control endocrino del hígado es bastante diferente, como comentaremos en el Capítulo 23. Las enzimas difieren también estructuralmente.

DEFECTOS CONGÉNITOS DEL METABOLISMO DEL GLUCÓGENO EN EL SER HUMANO

Las mutaciones en el ser humano que afectan a las enzimas del metabolismo del glucógeno pueden tener consecuencias clínicas benignas o profundas.

Varias enzimas del metabolismo del glucógeno pueden experimentar una inactivación como consecuencia de una mutación, aunque no necesariamente con consecuencias mortales. Los síntomas clínicos de estos trastornos, denominados **enfermedades de almacenamiento de glucógeno**, pueden ser muy graves y generalmente se deben a un almacenamiento de cantidades anormales de glucógeno o al almacenamiento de un glucógeno con unas propiedades anormales. La acumulación de glucógeno anormal se debe a un fallo de su degradación. Los estudios realizados sobre estos trastornos han ayudado a identificar el cometido que desempeñan las enzimas que intervienen en el metabolismo del glucógeno.

Una de las primeras enfermedades de almacenamiento de glucógeno que se describió fue la *enfermedad de von Gierke*, denominada así en honor del médico alemán que estudió a una niña de 8 años de edad con un aumento crónico del tamaño del hígado. Tras la muerte de la niña, en 1929, a causa de la gripe, se comprobó que su hígado contenía un 40% de glucógeno. El glucógeno parecía normal, pero no podía degradarse por extractos del hígado de la niña, y sí en cambio por extractos de otros hígados. En la actualidad sabemos que estos síntomas pueden deberse a un déficit de la glucosa-6-fosfatasa o de la enzima desramificante. Cuando hay un déficit de la enzima desramificante, la fosforilasa puede degradar el glucógeno únicamente hasta que se alcanzan los puntos de ramificación pero no puede pasar de ellos.

En la Tabla 16.2 se aporta información sobre varias enfermedades de almacenamiento de glucógeno que se han caracterizado. Una de las clínicamente más graves es la enfermedad de tipo I, que se debe a la carencia funcional de glucosa-6-fosfatasa. Las personas que padecen este trastorno pueden degradar el glucógeno normalmente, pero puesto que no son capaces de fragmentar la G6P a glucosa que el hígado pueda liberar al torrente sanguíneo, presentan una hipoglucemia crónica. En la forma menos grave de esta enfermedad, las concentraciones de glucosa en sangre son normales excepto tras situaciones de estrés, en las que está inhibida la respuesta hiperglucémica normal. Una forma de esta en-

TABLA 16.2 Defectos congénitos del metabolismo del glucógeno en el ser humano

Tipo	Nombre común	Déficit enzimático	Estructura del glucógeno	Órgano afectado
Ia	Enfermedad de von Gierke	Glucosa-6-fosfatasa	Normal	Hígado, riñón, intestino
Ib		Glucosa-6-fosfatasa translocasa	Normal	Hígado
II	Enfermedad de Pompe	$\alpha(1\rightarrow4)$Glucosidasa	Normal	Generalizado
III	Enfermedad de Cori	Enzima desramificante	Cadenas externas cortas	Hígado, corazón, músculo
IV	Enfermedad de Andersen	Enzima ramificante	Cadenas no ramificadas anormalmente largas	Hígado y otros órganos
V	Enfermedad de McArdle-Schmidt-Pearson	Glucógeno fosforilasa muscular	Normal	Músculo esquelético
VI	Enfermedad de Hers	Glucógeno fosforilasa hepática	Normal	Hígado, leucocitos
VII		Fosfofructoquinasa muscular	Normal	Músculo
VIII		Fosforilasa quinasa hepática	Normal	Hígado

fermedad (tipo Ia) es la que se debe a un déficit de la propia glucosa-6-fosfatasa. La enfermedad de tipo Ib comporta un déficit de una **translocasa** específica, una proteína que facilita el transporte de la glucosa-6-fosfatasa a su lugar de acción en la luz del retículo endoplásmico.

Otras formas de enfermedad de almacenamiento de glucógeno se deben a anomalías que pueden comprenderse fácilmente en función del defecto enzimático conocido. En los enfermos de tipo III que tienen una enzima desramificante defectuosa, se acumula glucógeno con unas ramificaciones externas muy cortas, lo cual da lugar a un agrandamiento del hígado. En cambio, la enfermedad de tipo IV, que se asocia a una enzima ramificante defectuosa, comporta una acumulación de glucógeno con ramas externas muy largas. La muerte prematura por insuficiencia hepática se observa con frecuencia en las personas con la enfermedad de tipo IV. Las enfermedades de tipo III, V, VI, VII y VIII tienen unos síntomas menos graves. Así, por ejemplo, las personas con una enfermedad de tipo V, con un déficit de glucógeno fosforilasa muscular, generalmente no presentan síntomas hasta aproximadamente los 20 años de edad. Una vez han aparecido los síntomas, las manifestaciones principales son espasmos musculares intensos con el ejercicio y falta de acumulación de lactato en sangre tras el ejercicio.

Biosíntesis de otros polisacáridos

En la biosíntesis de los polisacáridos intervienen, en general, intermediarios azúcar activados por nucleótidos y enzimas glucosiltransferasas.

La síntesis de otros polisacáridos comportan los mismos mecanismos que se acaban de presentar para el glucógeno, en especial el uso de azúcares ligados a nucleótidos como intermediarios biosintéticos activados y de enzimas glucosiltransferasas. En este apartado consideraremos brevemente la síntesis de los polisacáridos más abundantes y de más amplia distribución: la celulosa, el almidón, el dextrano y varios heteropolisacáridos.

La UDP-glucosa se utiliza en algunas especies de plantas para la síntesis de celulosa, un homopolímero de glucosa de cadenas lineales, con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ (página 335). El mecanismo es idéntico al de la síntesis de glucógeno, excepto por la estereoquímica de la formación del enlace glucosídico. Otros azúcares ligados a nucleótidos son también activos en la síntesis de polisacáridos. La *adenosina* difosfato glucosa y la *citidina* difosfato glucosa son los sustratos de la biosíntesis de la celulosa en algunas plantas. Dada la importancia de la celulosa en los productos textiles y en otros productos con fibras, existe un gran interés en el mecanismo de la biosíntesis de celulosa. El año 1998 vio la primera clonación del gen vegetal de una enzima que sintetiza celulosa.

La ADP-glucosa es también el intermediario utilizado en la síntesis del almidón de las plantas y en la síntesis del glucógeno en las células bacterianas. La *quitina*, un polisacárido estructural del exoesqueleto de los artrópodos y los moluscos, se sintetiza en los insectos a partir de la UDP-*N*-acetilglucosamina, siendo el producto un polímero del azúcar con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ (véase el Capítulo 9). En la síntesis del lubricante biológico *ácido hialurónico* en los animales intervienen dos enzimas, dado que el producto es un heteropolímero con una secuencia alternante estricta de ácido glucurónico y *N*-acetilglucosamina. Las dos enzimas utilizan como sustratos el UDP-glucuronato y la UDP-*N*-acetilglucosamina, respectivamente.

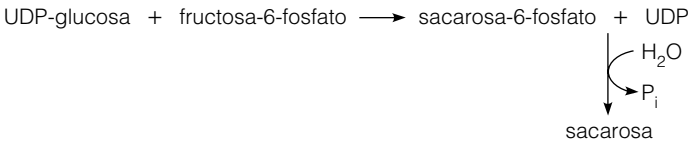
Una excepción sorprendente al uso de los nucleósidos difosfato azúcares como intermediarios activados es la biosíntesis en algunas bacterias de **dextrano**, un polímero de glucosa con enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$, que tiene puntos de ramificación $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ o $\alpha(1\rightarrow4)$. La polimerización, catalizada por la **dextrano sa-**

carosa, comporta una reacción de transglucosilación con la sacarosa como sustrato:

$$n\ \text{Sacarosa} \longrightarrow \text{glucosa}_n\ \text{(dextrano)} + n\ \text{fructosa}$$

Varias bacterias que crecen en la cavidad bucal del ser humano sintetizan grandes cantidades de dextrano, que contribuye a la formación de la placa dentaria, de ahí la preocupación de los especialistas en nutrición por el consumo de sacarosa.

La síntesis de la propia sacarosa en las plantas se produce a través de un azúcar ligado a un nucleótido:



La hidrólisis exergónica de la sacarosa-6-fosfato lleva el proceso en la dirección de síntesis de la sacarosa.

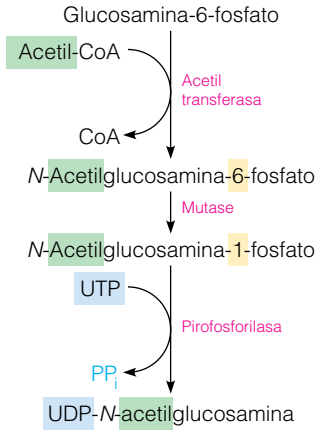


FIGURA **16.13**

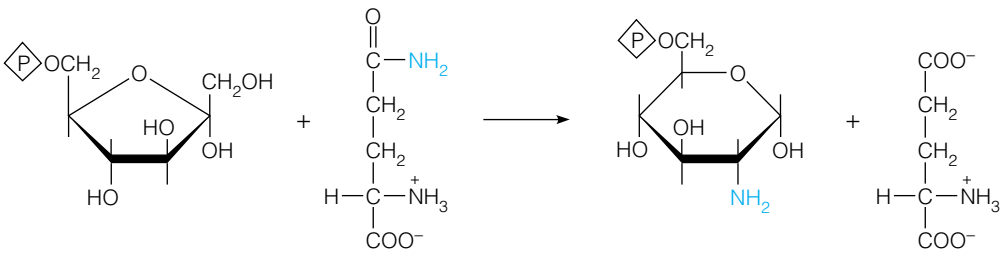
Ruta de la biosíntesis de la UDP-*N*-acetilglucosamina a partir de glucosamina-6-fosfato.

Biosíntesis de los aminoazúcares

Los aminoazúcares son componentes principales de los *glucoconjugados*, macromoléculas que contienen cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente. Como se describe en el Capítulo 9 y en la sección siguiente de este capítulo, los glucoconjugados incluyen las glucoproteínas y los glucolípidos. Consideraremos aquí la biosíntesis de algunos de los bloques de construcción de los glucoconjugados, los propios aminoazúcares.

La glucosa es el precursor metabólico de todos los demás azúcares, aunque en la mayoría de los animales, la alimentación aporta también otros azúcares. El aminoazúcar que se forma en primer lugar, y da origen a todos los demás, no procede de la glucosa sino de la fructosa-6-fosfato. El nitrógeno procede del grupo amida de la glutamina, mediante una reacción básicamente irreversible catalizada por la **glutamina:fructosa-6-fosfato amidotransferasa**:

La glucosa es el precursor metabólico de prácticamente todos los azúcares, incluyendo los aminoazúcares.



Obsérvese que la enzima cataliza tanto la transferencia del grupo amida como la oxidorreducción interna del azúcar, con la oxidación del C-1 acoplada a la reducción del C-2. La glucosamina-6-fosfato se convierte posteriormente en UDP-*N*-acetilglucosamina mediante una secuencia de tres pasos, que se muestra en la Figura 16.13.

El **ácido siálico** (**ácido N-acetilneuramínico**) es un componente importante de las glucoproteínas, como se considera a continuación. Su síntesis (Figura 16.14) se realiza mediante una epimerización de la UDP-*N*-acetilglucosamina, comparable al intercambio de UDP-glucosa y UDP-galactosa (véanse las páginas 524-527 y la Figura 13.14). El producto, la UDP-*N*-acetilgalactosamina, se

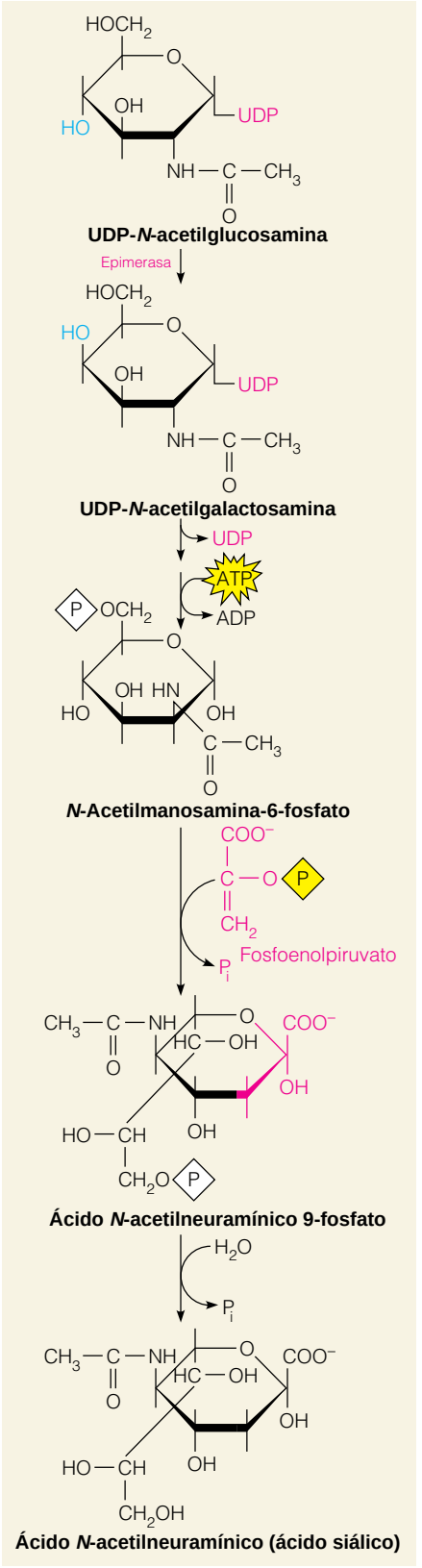


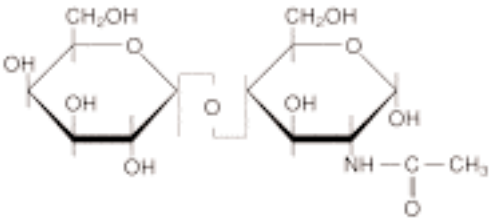
FIGURA **16.14**
Biosíntesis del ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico) a partir de la UDP-*N*-acetilglucosamina.

convierte en una secuencia corta, que implica la epimerización en C-2 y C-4, en ***N*-acetilmanosamina-6-fosfato**. Esta última experimenta una reacción con el fosfoenolpiruvato, algo semejante a la condensación aldólica. El producto, el **ácido *N*-acetilneuramínico-9-fosfato**, se fragmenta para dar ácido *N*-acetilneuramínico, o ácido siálico. La activación metabólica del ácido siálico para la biosíntesis de oligosacáridos no comporta la formación de un nucleósido difosfato azúcar sino de un nucleósido *monofosfato* azúcar, la **citidina monofosfato-ácido siálico**, o CMP-ácido siálico, a partir de la citidina trifosfato (CTP).

$$\text{CTP} + \text{ácido siálico} \longrightarrow \text{CMP-ácido siálico} + PP_i$$

Es interesante señalar que el CMP-ácido siálico se sintetiza en el núcleo de las células animales, mientras que todos los demás azúcares ligados a nucleótidos que se conocen se sintetizan en el citosol.

Un aspecto sorprendente del metabolismo de los aminoazúcares es el relativo a la biosíntesis de ***N*-acetil-β-lactosamina**, un componente de la porción hidrato de carbono de las glucoproteínas.



***N*-Acetil-β-lactosamina**

La reacción de síntesis la cataliza la **galactosiltransferasa**.

$$\text{UDP-galactosa} + \textit{N}\text{-acetilglucosamina} \longrightarrow \text{UDP} + \textit{N}\text{-acetillactosamina}$$

La forma habitual de la enzima contiene una sola unidad polipeptídica. La presencia de una subunidad adicional modifica la especificidad de la enzima, de tal manera que en su lugar se sintetiza lactosa.

$$\text{UDP-galactosa} + \text{glucosa} \longrightarrow \text{UDP} + \text{lactosa}$$

Esta enzima modificada, que se denomina **lactosa sintasa**, se encuentra en los animales tan sólo en la glándula mamaria, en donde sintetiza el principal azúcar de la leche. El polipéptido que modifica la especificidad de la enzima es la proteína de la glándula mamaria *α-lactalbúmina*. La síntesis de α-lactalbúmina se activa hormonalmente en las madres poco después del parto. La proteína se combina con la galactosiltransferasa preexistente, cambia su especificidad y activa la gran cantidad de síntesis de lactosa que es necesaria para la producción de leche.

Biosíntesis de los glucoconjugados

Como se ha indicado en el Capítulo 9, la unión covalente de los hidratos de carbono a las proteínas o a los lípidos provoca cambios importantes en las propiedades físicas de estas sustancias, que les permiten desempeñar funciones bioquímicas especializadas. Por ejemplo, en algunas glucoproteínas con abundantes hidratos de carbono (50% o más), la presencia de polisacáridos sulfatados o de ácidos urónicos proporciona una carga neta negativa que los hace útiles como lubricantes biológicos. Además, en los glucolípidos, la parte de hidratos de carbono proporciona un grupo de cabeza polar, que permite a estos componentes insertarse en las membranas. Como consecuencia, los glucolípidos se encuentran en cantidades abundantes en la capa externa de la membra-

na plasmática de la mayoría de las células. La biosíntesis de los glucolípidos se presentará en el Capítulo 19.

Como se ha señalado en el Capítulo 9, la enorme diversidad estructural que es posible en los hidratos de carbono permite que estas sustancias se utilicen para el reconocimiento intracelular y extracelular en las glucoproteínas, a pesar de que se encuentren en cantidades muy pequeñas. Los componentes hidratos de carbono de las glucoproteínas de la superficie celular dirigen la interacción de las células con otras células y con su entorno. Estas interacciones implican procesos tan diversos como los movimientos celulares en el desarrollo, la adherencia celular, la motilidad celular, el control del crecimiento celular, la transformación oncogénica y la **endocitosis** (internalización de sustancias del medio extracelular; véase el Capítulo 18).

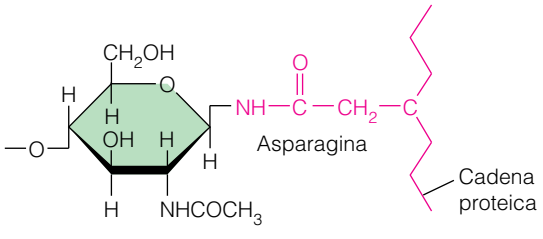
En este apartado consideramos la biosíntesis de los componentes hidratos de carbono de algunos glucoconjugados seleccionados, los componentes oligosacáridos de las glucoproteínas y los peptidoglucanos y las partes del antígeno O de las paredes celulares bacterianas. Los ejemplos elegidos tienen un interés biológico general e ilustran los mecanismos que se utilizan en la síntesis de la amplia gama de glucoconjugados. En general, esos mecanismos se basan en la acción de las glucosiltransferasas específicas que, como la glucógeno sintasa, transfieren una unidad de monosacárido de un azúcar ligado a un nucleótido a un extremo no reductor de una cadena de oligosacárido o a un grupo funcional adecuado situado en el componente proteico. Como se ha indicado antes, los azúcares ligados a nucleótidos se sintetizan en el citosol, excepto el CMP-ácido siálico, que se forma en el núcleo. Las glucosiltransferasas están unidas a las membranas del retículo endoplásmico liso o rugoso, o al aparato de Golgi.

Una parte particularmente fascinante de la síntesis de las glucoproteínas es la de la clasificación de las proteínas o "tráfico" que se produce cuando las cadenas de oligosacáridos están creciendo. En algunos casos, la estructura de la cadena o cadenas de oligosacáridos sobre una proteína actúa como determinante de reconocimiento molecular, dirigiendo esa proteína hacia la localización intracelular adecuada para el paso siguiente en la síntesis de oligosacáridos y, finalmente, hacia el lugar en el que residirá la proteína madura.

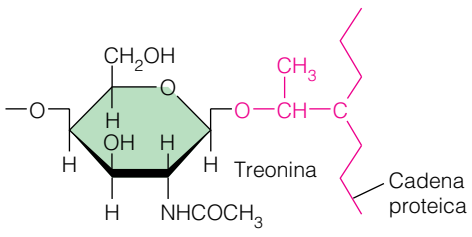
OLIGOSACÁRIDOS LIGADOS POR O: ANTÍGENOS DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS

Las glucoproteínas de los mamíferos se clasifican en **ligadas por O** o **ligadas por N**. Como se ha descrito en el Capítulo 9, las glucoproteínas ligadas por N contienen un residuo de *N*-acetilglucosamina ligado al nitrógeno amida de un residuo de asparagina de la proteína. La ligazón O más común es la que incluye un residuo de *N*-acetilgalactosamina terminal en el oligosacárido ligado a un residuo de serina o treonina. Las sustancias de los grupos sanguíneos A, B y O que se encuentran en las superficies de los eritrocitos son los ejemplos mejor conocidos de glucoproteínas ligadas por O.

Las modificaciones de las cadenas de hidratos de carbono de las glucoproteínas ligadas por N ayudan a dirigir estas proteínas a sus destinos intracelulares o extracelulares.



***N*-Acetilglucosamina**



***N*-Acetilgalactosamina**

La presencia o ausencia de una o dos glucosiltransferasas específicas que intervienen en la síntesis de oligosacáridos ligados por O determina el grupo sanguíneo A, B, AB u O.

Los azúcares de estos oligosacáridos de los grupos sanguíneos son la fucosa (Fuc), la galactosa (Gal), la *N*-acetilgalactosamina (GalNac) y el ácido siálico (Sia). Como se muestra en la Figura 16.15, la ruta de síntesis se inicia con una proteína transportadora (R). Se producen a continuación una serie de reacciones de glucosiltransferasa unidas a la membrana, cada una de las cuales utiliza un sustrato azúcar ligado al nucleótido. La ruta conduce a dos productos pentasacáridos diferentes, el antígeno A y el antígeno B. La última enzima en la síntesis del antígeno A es una glucosiltransferasa en la que interviene la UDP-GalNAc; en la síntesis del antígeno B en esta última reacción interviene la UDP-Gal. Las personas con sangre del grupo A tienen esta última glucosiltransferasa y sintetizan el antígeno A, mientras que las personas del grupo B tienen la galactosiltransferasa y sintetizan el antígeno B. Las personas AB son heterocigotas; es decir, tienen ambas enzimas y presentan sustancias de ambos grupos sanguíneos en sus eritrocitos. Las personas del grupo O no tienen ninguna glucosiltransferasa y, por tanto, no sintetizan ninguno de los antígenos; son portadoras del tetrasacárido que se identifica como sustancia O en la Figura 16.15.

OLIGOSACÁRIDOS LIGADOS POR N: GLUCOPROTEÍNAS

Un proceso muy diferente es el que se produce en la síntesis de los oligosacáridos ligados por N, comunes a la mayor parte de las glucoproteínas. En este

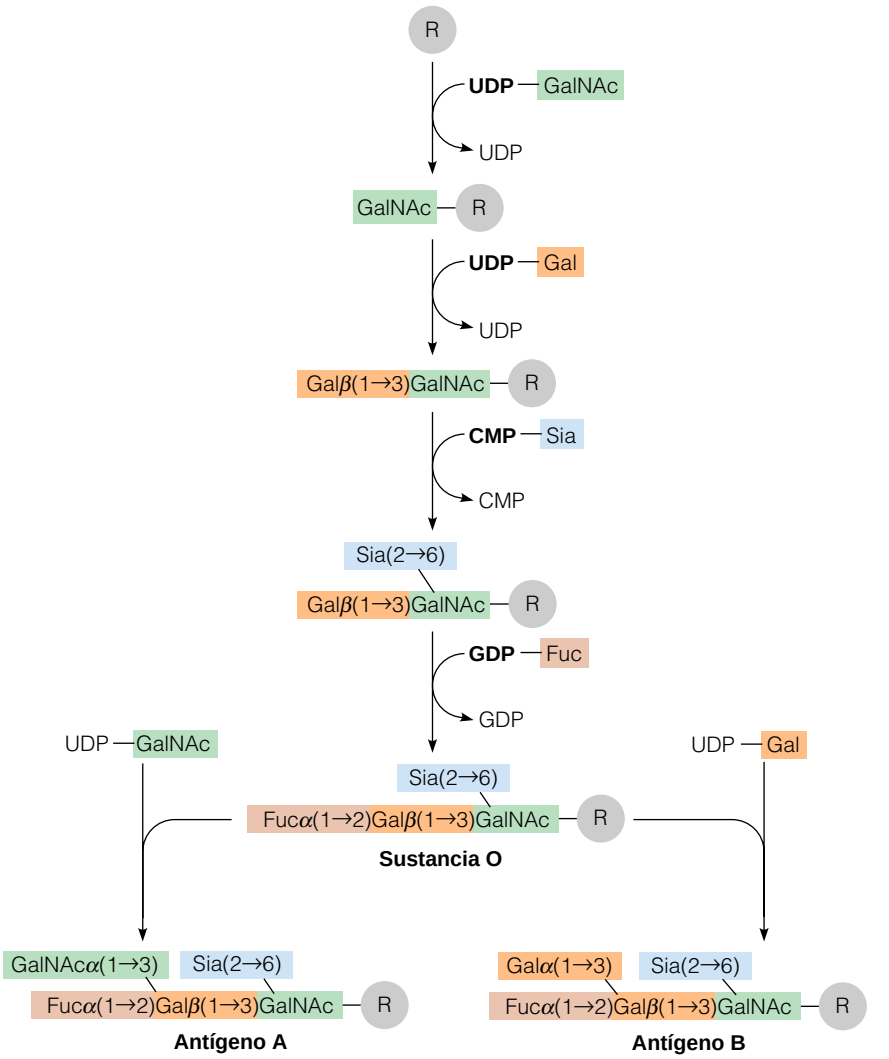
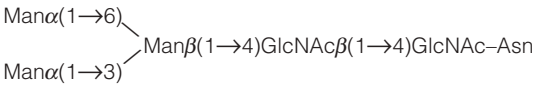


FIGURA **16.15**

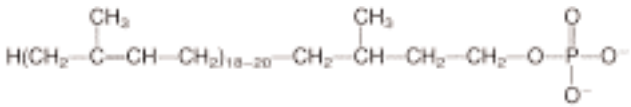
Biosíntesis de las unidades de oligosacáridos ligados por O en las glucoproteínas de las sustancias de los grupos sanguíneos O, A y B.

caso, el ensamblaje del oligosacárido no se produce sobre la cadena polipeptídica sino sobre un *intermediario ligado a lípidos*. A continuación, se transfiere un oligosacárido precursor a una cadena polipeptídica, que puede encontrarse ella misma en la fase central de su propia síntesis. Este tipo de reacción se denomina **cotraduccional**. Por último, el oligosacárido transferido sufre otras etapas de procesado durante su paso desde el retículo endoplásmico rugoso y liso a través del aparato de Golgi.

Las múltiples glucoproteínas ligadas por N cuya estructura se conoce pueden clasificarse de acuerdo con tres estructuras básicas de oligosacáridos, tal como se resume en la Figura 16.16: **compleja**, **híbrida** y de **manosa elevada**. Todos los oligosacáridos conocidos ligados por N tienen una estructura común de un núcleo de pentasacárido (las zonas recuadradas de la figura; véase también las páginas 343-344 en el Capítulo 9).



Ese núcleo se ensambla formando parte de un intermediario oligosacárido más grande ligado al compuesto lipídico isoprenoide **dolicol fosfato**.



Dolicol fosfato

En los tejidos de los vertebrados, el dolicol contiene de 18 a 20 unidades isoprenoides con dos dobles enlaces *trans*, mientras que el resto son *cis*, excepto la unidad de isopreno terminal saturada. El dolicol se sintetiza a partir de la misma ruta que produce colesterol, otros esteroles y otros compuestos isoprenoides (véase el Capítulo 19) y se convierte luego en dolicol fosfato (Dol-P) por una quinasa que necesita CTP.

Síntesis del intermediario ligado al lípido

El primer paso de la síntesis de glucoproteínas es el ensamblaje de un intermediario oligosacárido ligado a un lípido, que actúa como precursor de todos los oligosacáridos conocidos ligados por N. Ese proceso tiene lugar en el retículo endoplásmico (RE). En la Figura 16.17 se resume la ruta de biosíntesis que conduce a este intermediario. Los siete primeros azúcares se transfieren al dolicol fosfato desde los nucleósidos difosfato azúcares, UDP-GlcNAc y GDP-Man. Cada reacción está catalizada por una glucosiltransferasa diferente. La primera de estas enzimas se inhibe específicamente por el antibiótico *tunicamicina*, que bloquea la reacción de la UDP-GlcNAc y el Dol-P e inhibe, por tanto, la síntesis de todas las glucoproteínas ligadas por N.

Las siete glucosiltransferasas siguientes no utilizan como sustrato azúcares ligados a nucleótidos sino azúcares ligados a dolicol, Dol-P-Man y Dol-P-Glc. Éstos se sintetizan, a su vez, a partir de Dol-P y GDP-Man o UDP-Glc, respectivamente. Durante esta fase, el intermediario ligado a lípidos ($Man_5GlcNAc_2$-P-P-Dol, el tercer intermediario de la Figura 16.17) sufre una translocación y pasa de la superficie exterior de la membrana del RE a la cara luminal o interna de ésta. Esta translocación explica la necesidad de azúcares ligados al dolicol fosfato para las siguientes glucosilaciones, puesto que los azúcares ligados a nucleósidos difosfato no pueden entrar en el lado luminal de la membrana.

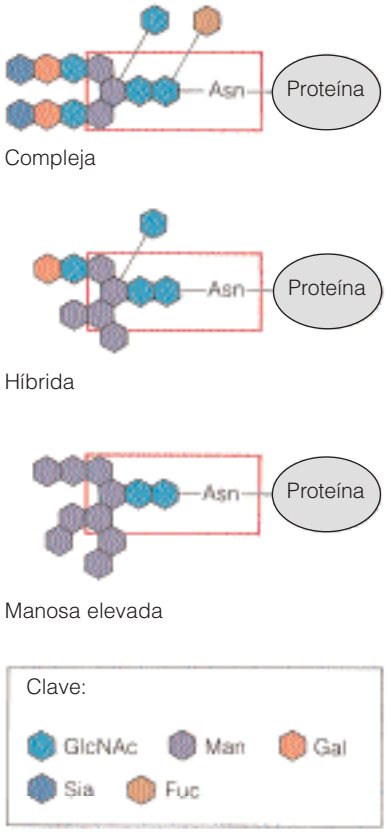


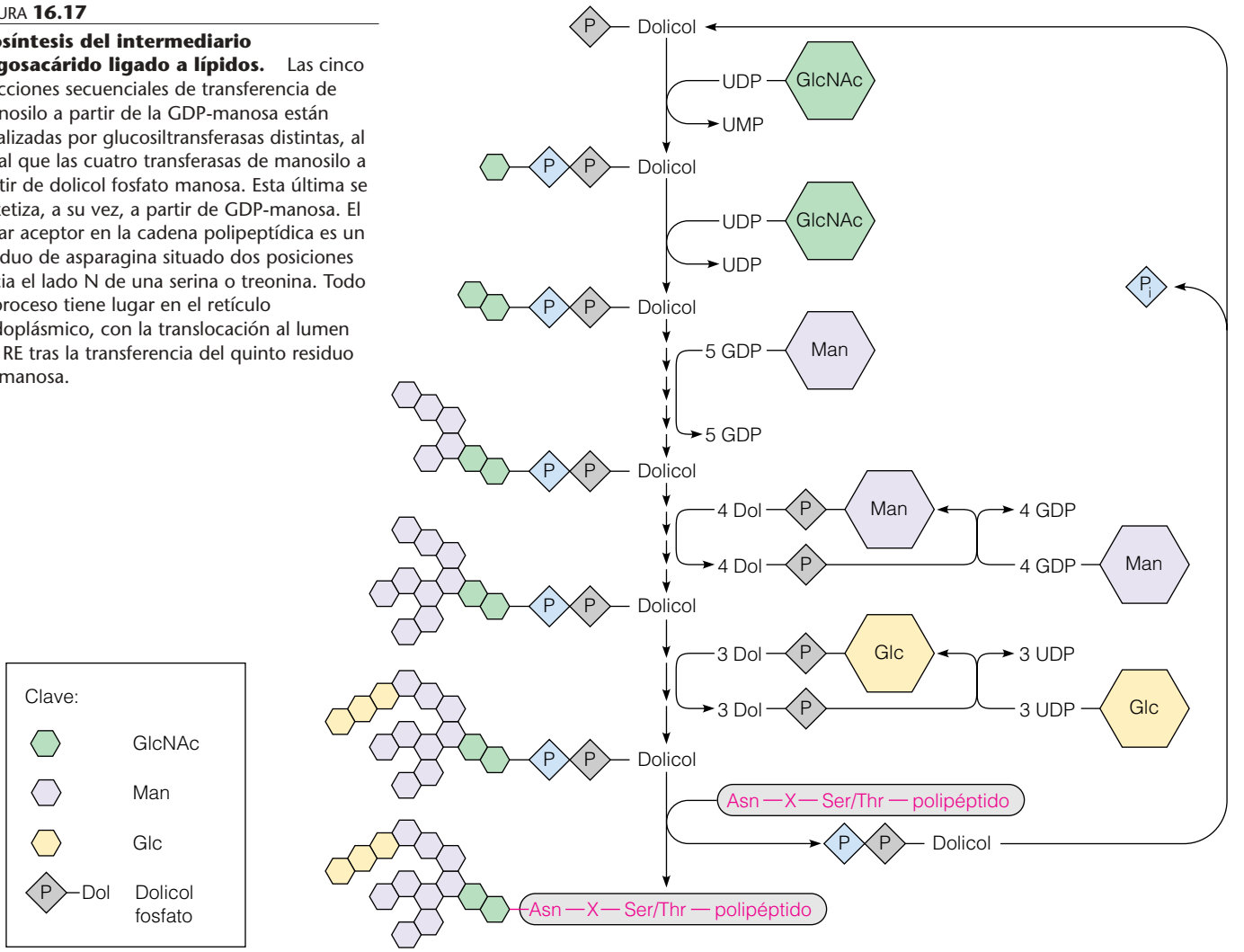
FIGURA **16.16**

Estructuras de los principales tipos de oligosacáridos ligados a la asparagina (ligados por N). Los recuadros rojos contienen el núcleo común a todas las estructuras conocidas ligadas por N.

Las cadenas de polisacáridos de las glucoproteínas ligadas por N se forman mientras están ligadas a un compuesto lipídico, el dolicol fosfato.

FIGURA **16.17**

Biosíntesis del intermediario oligosacárido ligado a lípidos. Las cinco reacciones secuenciales de transferencia de manosilo a partir de la GDP-manosa están catalizadas por glucosiltransferasas distintas, al igual que las cuatro transferasas de manosilo a partir de dolicol fosfato manosa. Esta última se sintetiza, a su vez, a partir de GDP-manosa. El lugar aceptor en la cadena polipeptídica es un residuo de asparagina situado dos posiciones hacia el lado N de una serina o treonina. Todo el proceso tiene lugar en el retículo endoplásmico, con la translocación al lumen del RE tras la transferencia del quinto residuo de manosa.



El paso siguiente, la transferencia de la unidad oligosacárido a un polipéptido aceptor, se produce también en la luz, catalizada por una **oligosacaril-transferasa** específica. El lugar aceptor es un residuo de asparagina de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X es cualquier aminoácido. El lugar aceptor debe ser accesible en un bucle o una hendidura de la cadena polipeptídica, y éste es probablemente el motivo por el que la transferencia se produce simultáneamente con la traducción del polipéptido aceptor. Los tres residuos glucosilo en la unidad oligosacarilo transferida facilitan de algún modo la transferencia pero no son absolutamente necesarios. En la práctica totalidad de las glucoproteínas, estos residuos glucosilo se eliminan en los pasos posteriores del procesamiento.

Procesamiento de los oligosacáridos

El procesamiento de los polipéptidos ligados a los oligosacáridos se inicia en la luz del retículo endoplásmico rugoso y continúa a medida que la glucoproteína en formación se va desplazando hacia el RE liso y finalmente a las diversas cisternas del aparato de Golgi. Se genera una amplia variedad de estructuras de oligosacáridos durante este proceso. Parte de la diversidad se debe a diferencias de conformación de la porción proteica en la proximidad de una cadena de hidratos de carbono, que afecta a la accesibilidad de la cadena a las glucosidasas y

a las glucosiltransferasas. Las cadenas de oligosacáridos generan probablemente lugares de reconocimiento para el direccionamiento de cada compuesto procesado a los distintos lugares del interior y luego del exterior del aparato de Golgi, en donde se encuentran las enzimas de procesamiento específicas ligadas a la membrana (Figura 16.18). En la práctica totalidad de los casos, el procesamiento se inicia (después de la transferencia a una cadena polipeptídica) con la eliminación de los tres residuos glucosilo en el RE rugoso, seguido de la eliminación de algunos de los residuos manosilo en el aparato de Golgi. Estos procesos son críticos para el plegado correcto de algunas proteínas en el RE. Las glucoproteínas destinadas a ser del tipo "complejo" se procesan posteriormen-

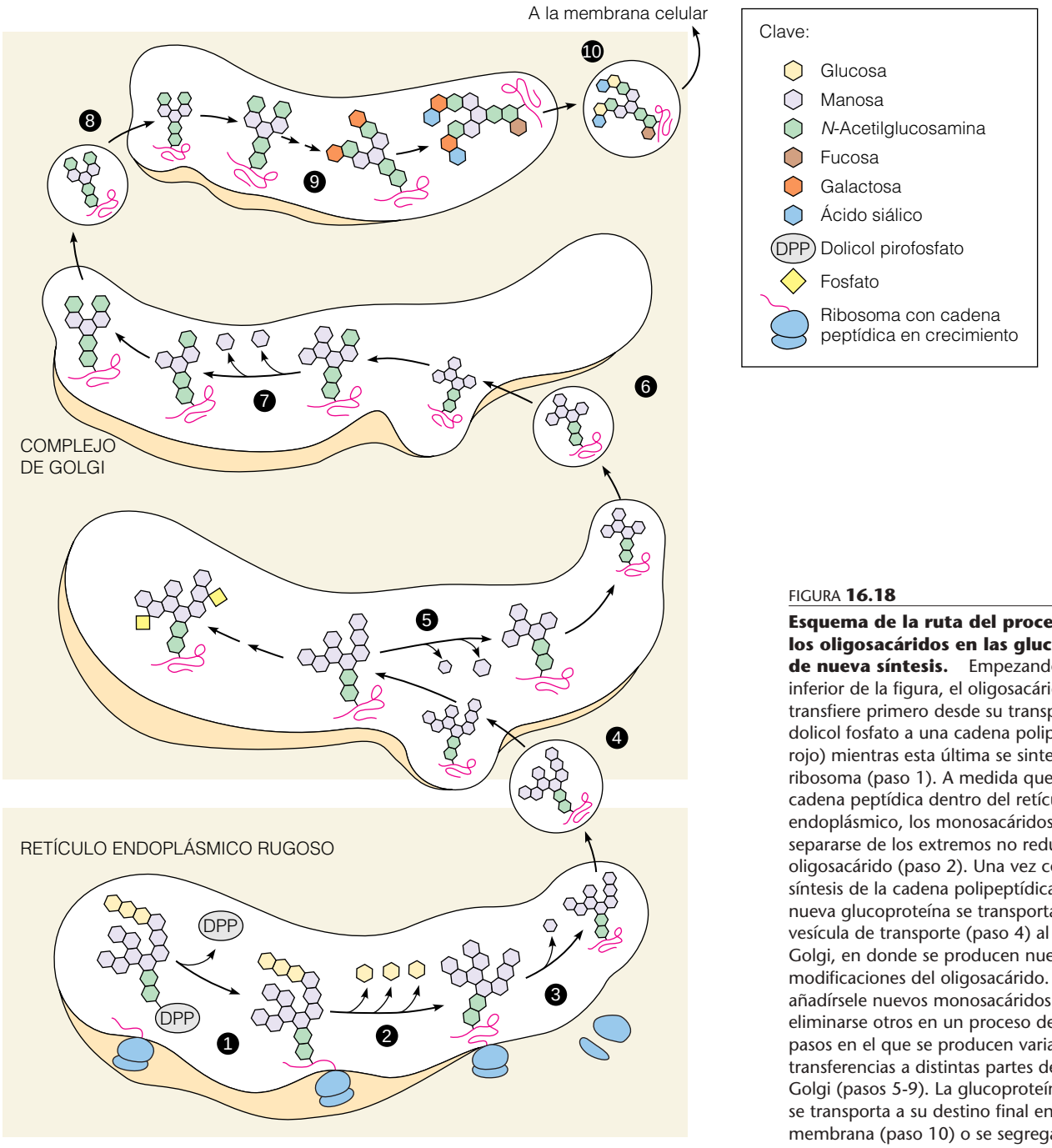


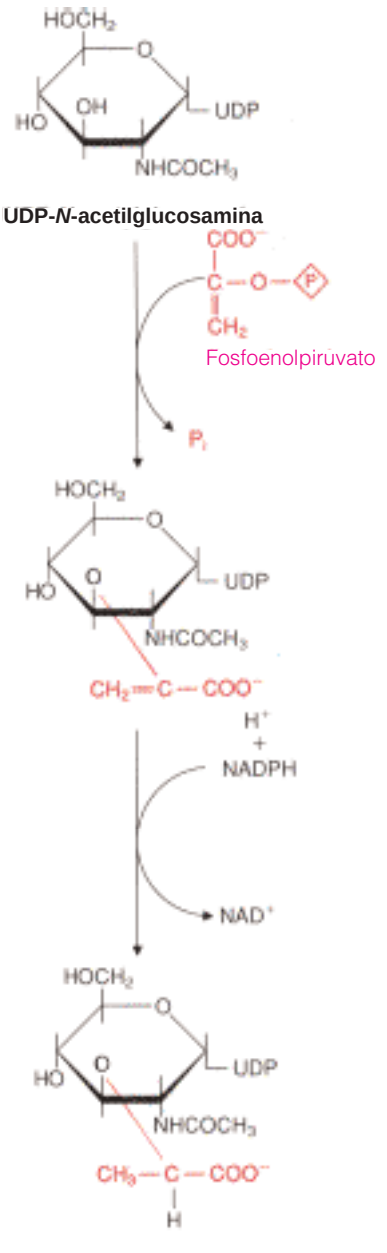
FIGURA **16.18**

Esquema de la ruta del procesamiento de los oligosacáridos en las glucoproteínas de nueva síntesis. Empezando en la parte inferior de la figura, el oligosacárido se transfiere primero desde su transportador dolicol fosfato a una cadena polipeptídica (en rojo) mientras esta última se sintetiza aún en el ribosoma (paso 1). A medida que crece la cadena peptídica dentro del retículo endoplásmico, los monosacáridos pueden separarse de los extremos no reductores del oligosacárido (paso 2). Una vez completada la síntesis de la cadena polipeptídica (paso 3), la nueva glucoproteína se transporta en una vesícula de transporte (paso 4) al aparato de Golgi, en donde se producen nuevas modificaciones del oligosacárido. Pueden añadírsele nuevos monosacáridos y pueden eliminarse otros en un proceso de múltiples pasos en el que se producen varias transferencias a distintas partes del aparato de Golgi (pasos 5-9). La glucoproteína completada se transporta a su destino final en una membrana (paso 10) o se segrega.

te mediante la adición de *N*-acetilglucosamina, seguida de una ulterior eliminación de los residuos manosilo. Los residuos fucosilo, galactosilo y sialilo se añaden a partir de los azúcares ligados a nucleótidos adecuados mediante la acción de glucosiltransferasas. Hay otras rutas comparables que conducen a las demás clases de glucoproteínas.

Procesamiento y tráfico intracelular de proteínas

Como se ha señalado antes, las cadenas de oligosacáridos ayudan a dirigir las glucoproteínas a su destino intracelular final. Una demostración gráfica de ello es la generación de residuos de manosa-6-fosfato durante el procesado de las glucoproteínas denominadas hidrolasas ácidas lisosómicas. Todas las enzimas conocidas de este tipo contienen entre una y cinco unidades manosa-6-fosfato, que evidentemente ayudan a dirigir las proteínas hacia la membrana lisosómica y a través de ellas. Este cometido de la manosa-6-fosfato en el direccionamiento del tráfico de proteínas se confirma por la existencia de una anomalía congénita rara y mortal denominada **enfermedad de células I**. En este trastorno, los lisosomas no pueden realizar su función normal de digestión intracelular como consecuencia de que un déficit de la primera glucosiltransferasa que genera un residuo de manosa-6-fosfato hace que el contenido de hidrolasa ácida de los lisosomas sea muy bajo. Las enzimas lisosómicas, elaboradas en el RE, no pueden dirigirse hacia sus destinos finales, sino que son segregadas al medio extracelular. Cuando se purifican y caracterizan, se comprueba que estas enzimas carecen de manosa-6-fosfato en sus cadenas de oligosacáridos. Nuestro conocimiento del reconocimiento molecular que interviene en el direccionamiento de estas proteínas ha avanzado con la reciente clonación del gen que codifica el receptor de manosa-6-fosfato de la membrana lisosómica.



POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR MICROBIANA: PEPTIDOGLUCANOS

Recuérdese del Capítulo 9 que las bacterias grampositivas contienen una pared celular rígida de peptidoglucano que rodea a la membrana citoplasmática. Las bacterias gramnegativas, por otro lado, contienen una tercera capa, además de la membrana citoplasmática y de la capa de peptidoglucano. Esta membrana externa es una estructura compleja que contiene lipoproteínas y lipopolisacáridos (véase la Figura 9.25, página 341). La diversidad estructural de estas macromoléculas en las distintas especies bacterianas es enorme, y las limitaciones de espacio sólo nos permiten presentar dos de las rutas más interesantes. La primera de ellas, la biosíntesis de la capa de peptidoglucano de *Staphylococcus aureus*, tiene interés por dos motivos. En primer lugar, esta ruta es el lugar de acción de varios antibióticos importantes, en especial las penicilinas. En segundo lugar, gran parte del proceso de biosíntesis se produce en el exterior de la célula, en donde no hay un aporte fácil de energía en forma de ATP.

Recuérdese de la Figura 9.25 que los peptidoglucanos bacterianos están formados por cadenas poliméricas de aminoazúcares entrecruzadas por cadenas de oligopéptidos, para formar una red tridimensional enorme en la que toda la capa de peptidoglucano de una célula es una macromolécula gigante. La cadena de glucano, o polisacárido, es un polímero alternado de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico, este último derivado de la *N*-acetilglucosamina. En *S. aureus*, los grupos carboxilo de todos los residuos de ácido *N*-acetilmurámico están ligados al grupo amino terminal del tetrapéptido L-alanil-D-γ-isoglutaminil-L-lisil-D-alanina. Cada entrecruzamiento adopta la forma de una cadena de pentaglicina que une el grupo carboxilo de un residuo de D-alanina al grupo ε-amino de un residuo de lisina en un oligopéptido adyacente.

La biosíntesis del peptidoglucano de *S. aureus* puede dividirse en tres fases diferenciadas: (1) síntesis del *N*-acetilmuramilpéptido, (2) formación de la cadena de polisacárido mediante la polimerización de *N*-acetilglucosamina y *N*-acetilmuramilpentapéptido, y (3) entrecruzamiento de las diversas cadenas individuales de peptidoglucano. Gran parte de esta ruta se determinó en estudios realizados sobre la acción de la penicilina, que destruye las células bacterianas mediante el bloqueo de la síntesis de la pared celular por la inhibición de la síntesis del peptidoglucano.

Síntesis del N-acetilmuramilpéptido

La primera fase se inicia con la síntesis de ácido UDP-*N*-acetilmurámico a partir de la UDP-*N*-acetilglucosamina (véase el margen de la página anterior). Se transfiere un mol de fosfoenolpiruvato, para producir el éter 3-enolpiruvilo de la UDP-*N*-acetilglucosamina. El grupo piruvilo se reduce por el NADPH para dar el éter 3-O-D-lactilo de la *N*-acetilglucosamina, o ácido *N*-acetilmurámico. Se forma a continuación un pentapéptido de una forma escalonada, como se indica en la Figura 16.19. No intervienen en este proceso ningún molde de RNA mensajero ni tampoco los ribosomas, como ocurre en la síntesis de las cadenas polipeptídicas en la síntesis proteica. La especificidad radica en las acciones secuenciales de una serie de ligasas dependientes de ATP, que añaden primero L-alanina, seguido de D-glutamato (que más tarde se amida a D-isoglutamina), luego L-lisina (ligada al grupo γ-carboxilo del glutamato) y finalmente el dipéptido D-alanil-D-alanina. Uno de estos dos residuos de D-alanina será eliminado en un paso posterior (véase la Figura 16.21).

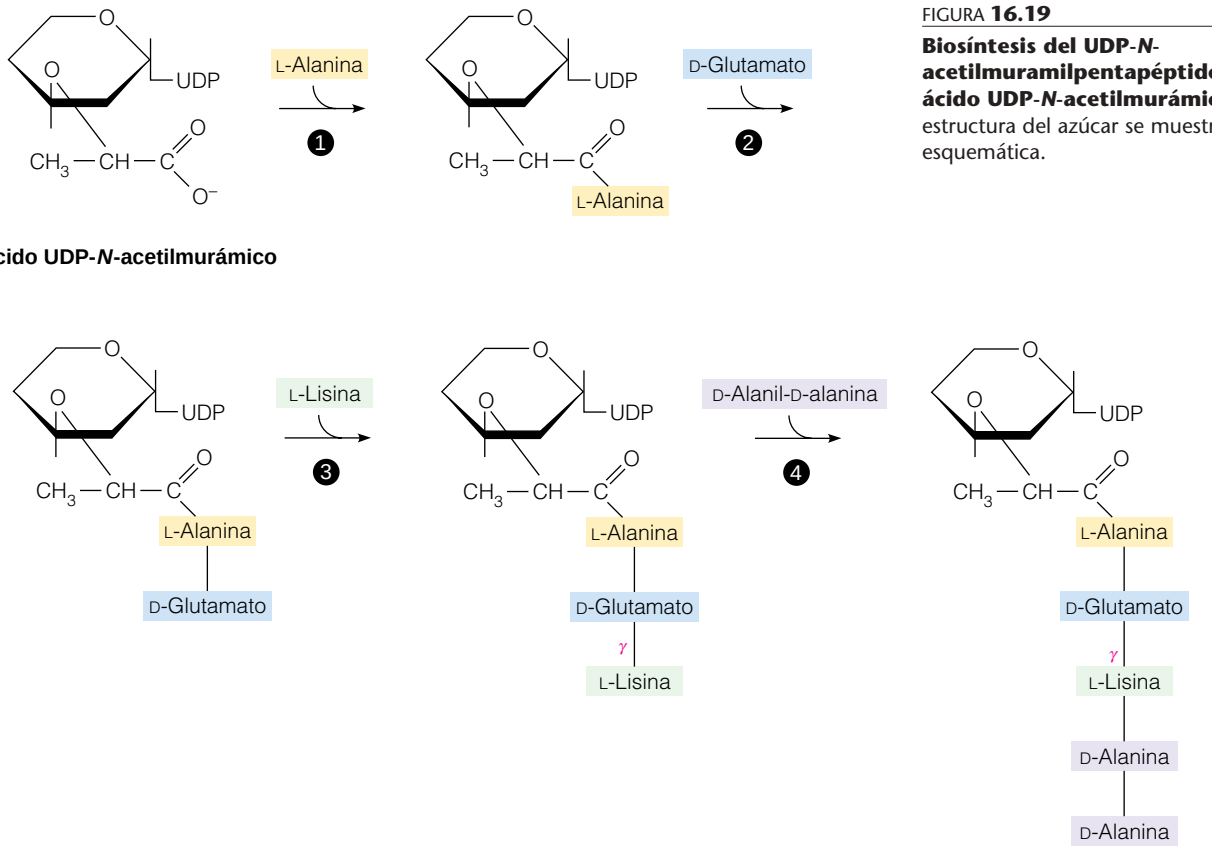
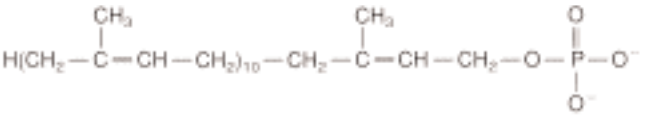


FIGURA **16.19**

Biosíntesis del UDP-*N*-acetilmuramilpentapéptido a partir del ácido UDP-*N*-acetilmurámico. La estructura del azúcar se muestra de forma esquemática.

Formación de la cadena de peptidoglucano

La siguiente fase es la polimerización de la *N*-acetilglucosamina y el *N*-acetilmuramilpentapéptido para dar una cadena lineal de peptidoglucano. En este proceso interviene un transportador lipídico, el **undecaprenol fosfato**, comparable al dolicol fosfato, que hemos encontrado en la síntesis de los oligosacáridos ligados por N.



Undecaprenol fosfato

El undecaprenol fosfato es un compuesto de 55 carbonos que contiene 11 unidades isoprenoides, con fosfato ligado en el terminal. A este fosfato se transfiere la porción *N*-acetilmuramilpentapéptido procedente del UDP-*N*-acetilmuramilpentapéptido (Figura 16.20, paso 1). Este compuesto acepta entonces *N*-acetilglucosamina procedente de UDP-*N*-acetilglucosamina (paso 2), y a continuación, se produce la adición secuencial de cinco residuos de glicina, desde el RNA de transferencia de la glicina (paso 3). Parece probable que en esta fase el transportador de fosfolípidos actúe llevando la unidad peptidodisacárido a través de la membrana (paso 4), puesto que se produce la polimerización (adición al extremo reductor de una cadena de peptidoglucano preexistente) en la parte externa de la pared celular (paso 5). Los antibióticos *bacitracina* y *vancomicina* inhiben determinados pasos de este proceso en los lugares que se indican en la Figura 16.20.

Entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglucano

Gran parte de la biosíntesis de las cadenas peptidoglucano de los oligosacáridos se produce fuera de la pared celular, utilizando intermediarios activados que se sintetizan en el interior de la célula.

Finalmente, se produce el entrecruzamiento entre las cadenas adyacentes, también fuera de la célula. Este proceso implica una reacción de **transpeptidación**, con la ruptura de un enlace peptídico que proporciona la energía necesaria para impulsar la formación de otro enlace peptídico. Esto significa que la energía libre necesaria para impulsar la formación de entrecruzamientos se ha incorporado a las estructuras mientras éstas eran aún accesibles al ATP, dentro de la célula. Como se presenta en la Figura 16.21, la transpeptidación implica un ataque nucleófilo por parte del grupo amino terminal libre de la cadena de pentaglicina sobre el carbono amida que liga las D-alaninas terminales en una cadena adyacente.

La actividad antibiótica de la penicilina se debe a su interferencia con la síntesis de peptidoglucanos extracelulares.

La reacción de entrecruzamiento es el objetivo de la acción de dos clases importantes de antibióticos, las *penicilinas* y las *cefalosporinas*. Se cree que la penicilina reacciona de manera irreversible con la transpeptidasa que cataliza el entrecruzamiento Esa enzima forma normalmente un intermediario acil-enzima, a través de la penúltima D-alanina de la cadena pentapeptídica (Figura 16.21, derecha). Evidentemente la penicilina se parece al dipéptido terminal de esta estructura hasta el punto de que puede reaccionar también con la transpeptidasa. La reacción se impulsa en parte por la tensión incorporada en el **anillo lactámico** de cuatro eslabones de la penicilina, puesto que ese anillo se abre durante la reacción. La penicilina se ha estudiado mucho como un antibiótico "ideal", puesto que la reacción de entrecruzamiento no tiene equivalente en el metabolismo animal. Dado que la célula bacteriana debe continuar sintetizando la pared celular con objeto de crecer y dividirse, la inhibición de un paso de este proceso proporciona una forma completamente específica de interferir sobre el crecimiento de los patógenos bacterianos. Lamentablemente, puede adquirirse resistencia a la penicilina. Esta resistencia implica generalmente la síntesis, di-

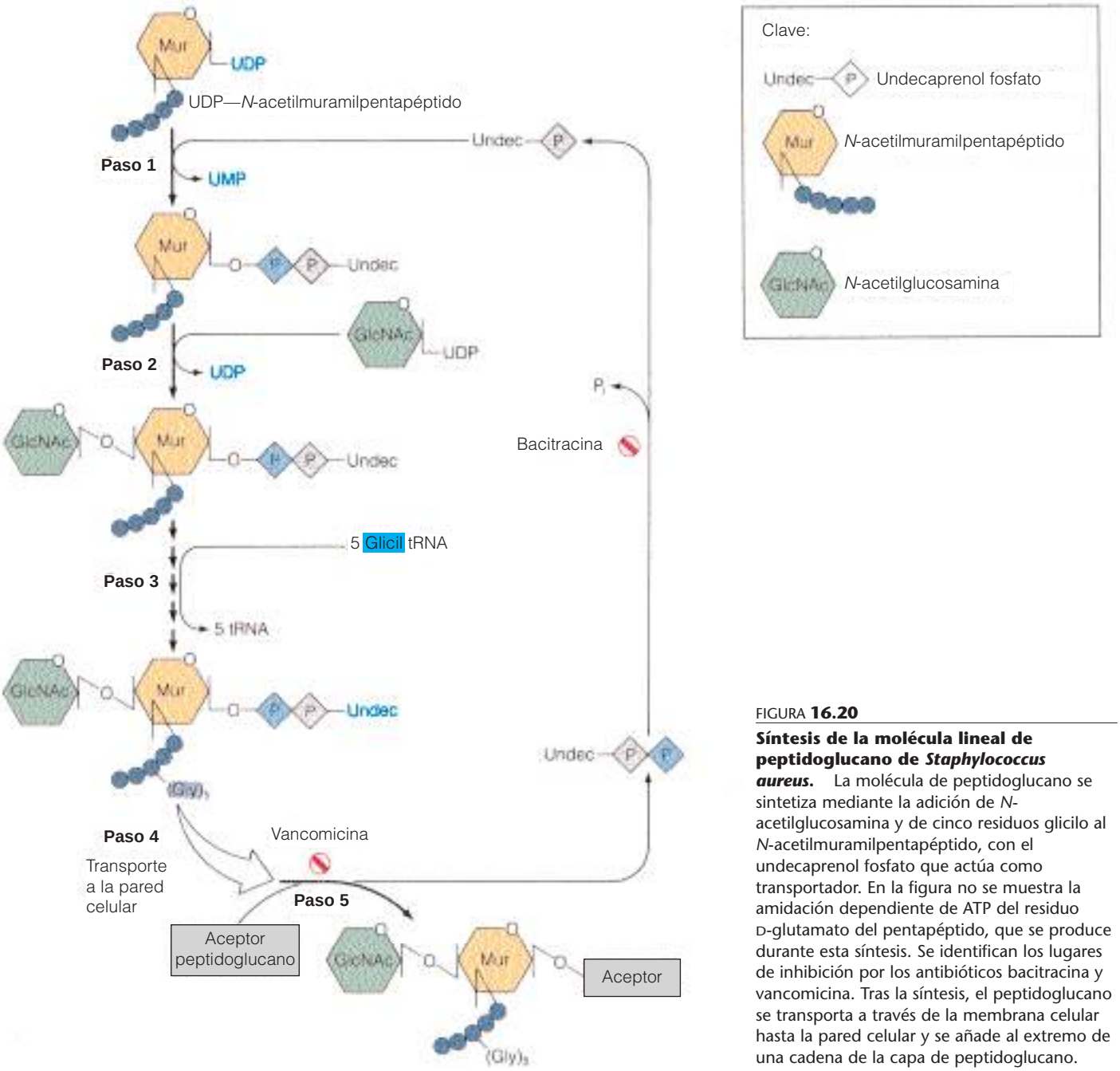


FIGURA **16.20**

Síntesis de la molécula lineal de peptidoglucano de *Staphylococcus aureus*. La molécula de peptidoglucano se sintetiza mediante la adición de *N*-acetilglucosamina y de cinco residuos glicilo al *N*-acetilmuramilpentapéptido, con el undecaprenol fosfato que actúa como transportador. En la figura no se muestra la amidación dependiente de ATP del residuo D-glutamato del pentapéptido, que se produce durante esta síntesis. Se identifican los lugares de inhibición por los antibióticos bacitracina y vancomicina. Tras la síntesis, el peptidoglucano se transporta a través de la membrana celular hasta la pared celular y se añade al extremo de una cadena de la capa de peptidoglucano.

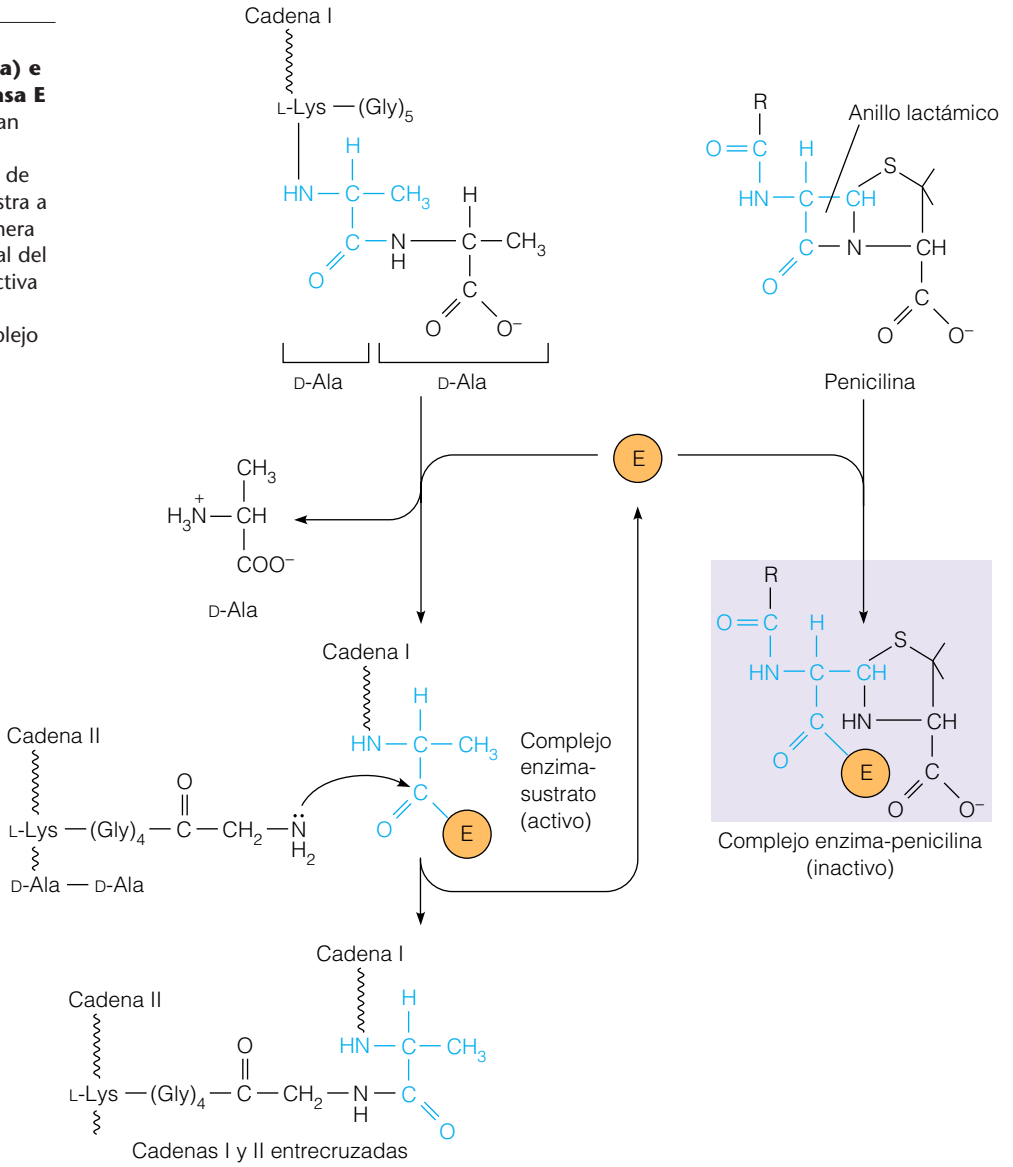
rigida por un gen extracromosómico, de una **lactamasa**, que es una enzima que hidroliza el anillo lactámico de la penicilina y destruye su capacidad de interferir en la síntesis de los peptidoglucanos.

POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR MICROBIANA: ANTÍGENOS O

El segundo ejemplo que consideraremos es la biosíntesis del antígeno O de *Salmonella typhimurium* gramnegativa. El antígeno O (que no debe confundirse con la sustancia del grupo sanguíneo O de los eritrocitos humanos) es el principal componente lipopolisacárido de la membrana externa. Los lipopolisacáridos contienen unidades de oligosacáridos repetidas que están unidas a un núcleo de polisacárido basal. Este último está unido, a su vez, a un complejo de-

FIGURA **16.21**

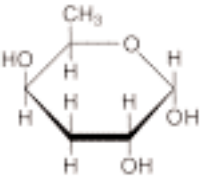
Reacción de entrecruzamiento en la síntesis de peptidoglucano (izquierda) e inhibición de la enzima transpeptidasa E por la penicilina (derecha). Se forman entrecruzamientos entre las cadenas de peptidoglucanos adyacentes por la acción de una enzima transpeptidasa, como se muestra a la izquierda. A la derecha, se indica la manera en que la penicilina, un análogo estructural del sustrato natural, reacciona con la forma activa de la enzima para formar un complejo covalente inactivo que se asemeja al complejo enzima-sustrato.



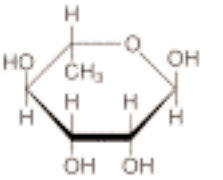
nominado lípido A. Las unidades de oligosacárido repetidas protruyen como minúsculas fibras de la superficie de la membrana externa. Dado que representan a la superficie externa de la célula y están formadas por estructuras de hidratos de carbono específicas, estas fibras provocan reacciones inmunitarias intensas; de ahí el término *antígeno O* que se aplica a las fibras. La producción de anticuerpos dirigidos contra los antígenos O constituye un mecanismo de defensa primario que utilizan los vertebrados contra la infección bacteriana. Las bacterias han respondido a lo largo de la evolución mediante un cambio de la estructura del antígeno O a través de cambios genéticos extremadamente rápidos, cuyo mecanismo no se conoce bien. Por consiguiente, existen centenares de serotipos diferentes (cepas inmunológicamente distintas) de bacterias como *Salmonella typhimurium*, cada una con una unidad repetitiva diferente del antígeno O.

En las cepas silvestres de *S. typhimurium*, la unidad repetitiva del antígeno O tiene la estructura abecuosa(α1→3)manosa(α1→4)ramnosa(β1→3)galactosa. Obsérvese en el margen de la página siguiente que tanto la abecuosa como

la ramnosa son desoxiazúcares. La unidad oligosacárido se ensambla sobre un transportador lipídico, el undecaprenol fosfato, el mismo transportador que hemos encontrado en la síntesis de peptidoglucano. Se forma un tetrasacárido ligado a lípidos dentro de la membrana interna, como se muestra en la Figura 16.22 y luego sale al exterior a través de la membrana externa, en donde la galactosa activada de un polímero ligado al lípido ataca a la manosa del tetrasacárido activado. Como se señaló antes, este esquema general puede conducir a una diversidad estructural tremenda entre los lipopolisacáridos.



D-Abecuosa



L-Ramnosa

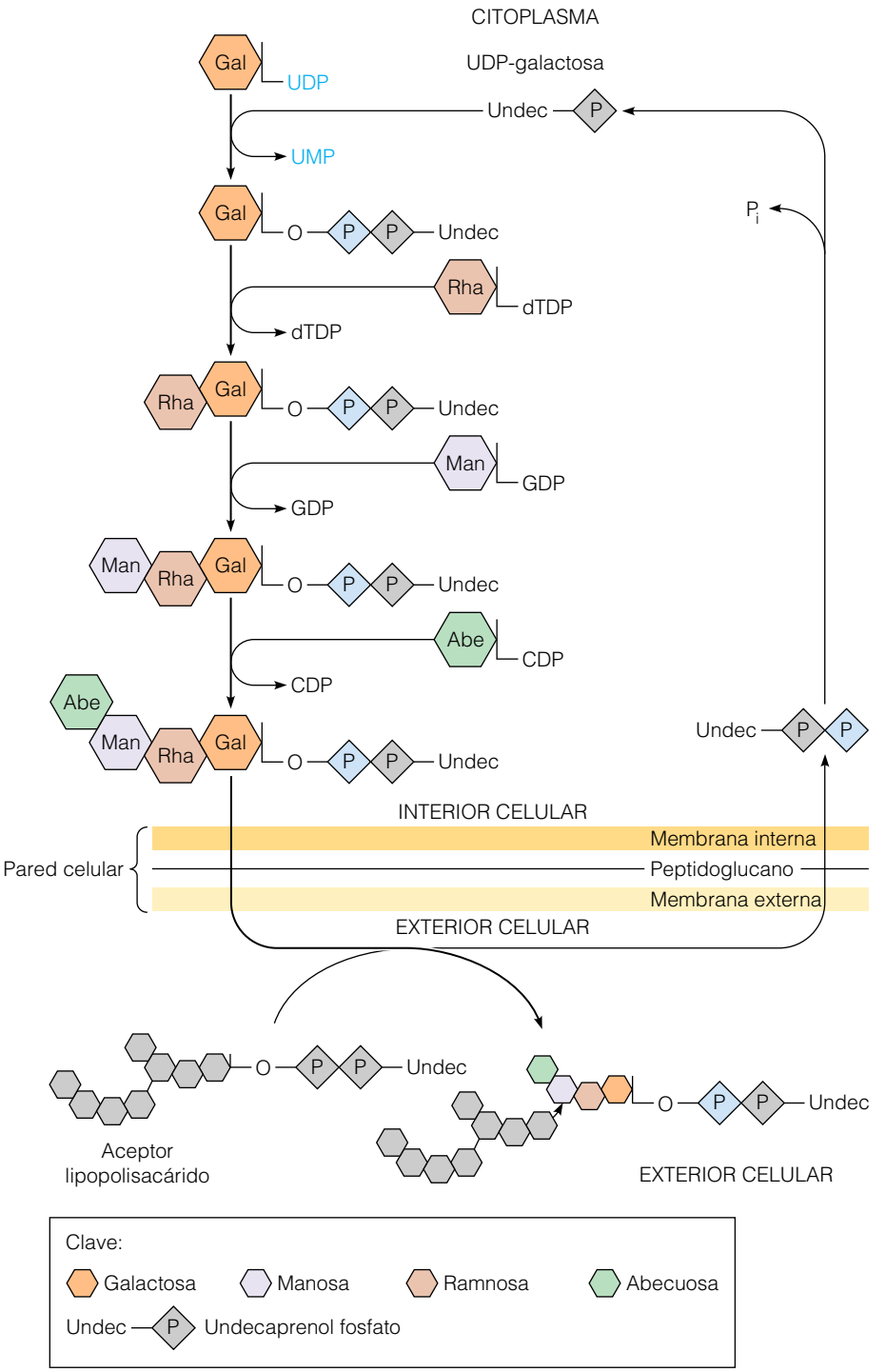


FIGURA **16.22**

Biosíntesis de la unidad oligosacárido repetida del antígeno O de *Salmonella typhimurium*. Las primeras cuatro reacciones se producen dentro de la membrana interna. La transferencia de la unidad tetrasacárido activada al extremo inactivo de una unidad de polisacárido en formación se produce en la parte exterior de la membrana externa.

RESUMEN

En la biosíntesis de los hidratos de carbono intervienen rutas diferentes que conducen a los monosacáridos, los oligosacáridos y los polisacáridos. Todos los organismos realizan la gluconeogénesis, la síntesis de hidratos de carbono a partir de compuestos de tres y cuatro carbonos que no pertenecen al grupo de los hidratos de carbono. La gluconeogénesis utiliza siete enzimas glucolíticas y cuatro enzimas gluconeogénicas específicas, estas últimas permiten evitar los tres pasos irreversibles de la glucólisis. Las cuatro enzimas específicas de la gluconeogénesis son piruvato carboxilasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa y glucosa-6-fosfatasa. La regulación se produce en los lugares de estos tres ciclos de sustrato. El control es extraordinariamente importante en el metabolismo animal, que necesita que las concentraciones de glucosa en sangre se mantengan dentro de unos límites estrechos. Participan mecanismos hormonales y alostéricos, siendo la fructosa-2,6-bisfosfato el regulador clave.

En la síntesis de todos los oligosacáridos y polisacáridos intervienen las glucosiltransferasas, enzimas que transfieren la unidad azúcar de un compuesto de azúcar unido a un nucleótido, o activado de algún otro modo, a un azúcar aceptor, en un extremo no reductor. La glucógeno sintasa utiliza la uridina difosfato glucosa como donador de glucosilo. La enzima se regula por procesos hormonales y no hormonales complementarios y contrarios a los que regulan la degradación del glucógeno por la fosforilasa.

Las partes de hidrato de carbono de las glucoproteínas se sintetizan también mediante glucosiltransferasas, que sintetizan cadenas de oligosacáridos y las ligan a las proteínas. Los hidratos de carbono añadidos a las superficies de las proteínas proporcionan unos determinantes de reconocimiento molecular que facilitan su desplazamiento hacia las localizaciones intracelulares y extracelulares adecuadas. Los pasos de la síntesis y procesamiento de las glucoproteínas complejas son lugares de acción de numerosos antibióticos.

BIBLIOGRAFÍA

Gluconeogénesis

Foster, J. D., B. A. Pederson y R. C. Nordlie (1997) Glucose-6-phosphatase structure, regulation, and function: An update. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 207:314-332. Esta mini-revisión considera los modelos que reflejan la localización membranosa de esta enzima gluconeogénica.

Granner, D. y S. Pilkis (1990) The genes of hepatic glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 265:10173-10176. Una mini-revisión que describe los progresos realizados de cara a la clonación de los genes de las enzimas reguladoras de la glucólisis y la gluconeogénesis y el análisis del control de dichos genes.

Hanson, R. W. y L. Reshef (1997) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* 66:581-611. Se conoce mucho sobre la regulación alimenticia y hormonal de la síntesis de PEPCK.

Hanson, R. W. y Y. M. Patel (1994) Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP): The gene and the enzyme. *Adv. Enzymol. Relat. Areas* 69:203-281. Estructura, funciones y regulación de esta importante enzima gluconeogénica.

Pilkis, S. J., M. R. El-Maghrabi y T. H. Claus (1988) Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 57:755-784. Revisión de la fructosa-2,6-bisfosfato y del control hormonal de las concentraciones de este regulador gluconeogénico.

Metabolismo del glucógeno

Chen, Y.-T. y A. Burchell (1995) Glycogen storage diseases. En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7.ª ed., editado por C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle, pp. 935-966. McGraw-Hill, Nueva York. Un capítulo de este tratado en tres volúmenes que se considera la referencia con mayor autoridad sobre las enfermedades metabólicas humanas hereditarias.

Krebs, E. G. (1994) The growth of research on protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 19:439-440. El artículo inicial de un número especial de la revista TIBS dedicado a la fosforilación proteica.

Leloir, L. F. (1983) Long ago and far away. *Annu. Rev. Biochem.* 52:1-16. Un recuerdo personal, en el que se describe el papel del ganador del Premio Nobel en el descubrimiento de los azúcares ligados a nucleótidos y el mecanismo de síntesis del glucógeno.

Millward, T. A., S. Zolnierowicz y B. A. Hemmings (1999) Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends*

Biochem. Sci. 24:186-191. Información reciente sobre el control de la fosforilación y desfosforilación proteicas.

Segal, S. y G. T. Berry (1995) Disorders of galactose metabolism. En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7.ª ed., editado por C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle, pp. 967-1000. McGraw-Hill, Nueva York. Una revisión profunda de las galactosemias y las enfermedades relacionadas.

Shulman, R. G. y D. L. Rothman (1996) Enzymatic phosphorylation of muscle glycogen synthase: A mechanism for maintenance of metabolic homeostasis. *Proc. Natl. Sci. USA* 93:7491-7495. Este trabajo aplica el análisis del control metabólico (véase el Capítulo 12) a las complejidades del control de la glucógeno sintasa en múltiples lugares de fosforilación.

Silverman, M. (1991) Structure and function of glucose transporters. *Annu. Rev. Biochem.* 60:757-794. Se describen las cinco proteínas transportadoras de glucosa diferentes, con la distribución tisular, las funciones metabólicas y las formas de regulación de cada una.

Síntesis de glucoproteínas

Abeijon, C. y C. B. Hirschberg (1992) Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* 17:32-37. Una buena síntesis de la biología celular y la bioquímica que son necesarias para comprender el procesamiento de las glucoproteínas.

Allan, B. B. y W. E. Balch (1999) Protein sorting by directed maturation of Golgi compartments. *Science* 285:63-66. Una revisión reciente.

Elbein, A. D. (1987) Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains. *Annu. Rev. Biochem.* 56:497-534. La complejidad de los pasos de síntesis y procesamiento ha hecho que los inhibidores resulten especialmente útiles para determinar el papel de las diversas reacciones individuales.

Featherstone, C. (1998) Coming to grips with the Golgi. *Science* 282:2172-2174. Un artículo de tipo noticias, escrito 100 años después de la primera descripción por Camillo Golgi, de esta estructura.

Gahmberg, C. G. y M. Tolvanen (1996) Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* 21:308-311. Cómo se adapta la diversidad de posibles estructuras de hidratos de carbono para su uso como determinantes de reconocimiento sobre las superficies celulares.

Kornfeld, S. (1992) Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 61:307-330. Revisión que describe el sistema de direccionamiento a las membranas lisosómicas y el descubrimiento inesperado de que el receptor es idéntico a un factor de crecimiento celular descubierto de manera independiente.

Rothman, J. E. y F. T. Wieland (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272:227-233. Una revisión hasta la fecha de la clasificación que se produce durante la maduración proteica y glucoproteica.

Síntesis de los polisacáridos de plantas y bacterias

Arioli, T. y 13 coautores (1998) Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis. Science* 279:717-720. Este artículo y las noticias que lo acompañan describen la primera clonación de un gen que controla un paso de la síntesis de celulosa.

Tipper, D. J. y A. Wright (1979) The structure and biosynthesis of bacterial cell walls. En: *Mechanisms of Adaptation*, editado por J. R. Sokatch y L. N. Ornston, Vol. 7 de *The Bacteria*, pp. 291-426. Academic Press, Nueva York. Una revisión detallada que incluye las rutas de los complejos procesos de la síntesis de los hidratos de carbono.

Walsh, C. T. (1989) Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. *J. Biol. Chem.* 264:2393-2396. Una mini-revisión que describe los mecanismos de esta ruta, que es el lugar de acción de la penicilina y otros antibióticos.

Síntesis de los polisacáridos de la pared celular bacteriana

Stinson, S. C. (1996) Drug firms restock antibacterial arsenal. *Chem. Eng. News*, número del 23 de septiembre, pp. 75-100. La proliferación de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos ha avivado la investigación de nuevos antibióticos y nuevas dianas de los fármacos, que se consideran en esta "revisión de producto".

PROBLEMAS

1. ¿Cuántos ATP se consumen en la conversión de cada una de las siguientes sustancias a un residuo glucosilo en el glucógeno?
   (a) Dihidroxiacetona fosfato
   (b) Fructosa-1,6-bisfosfato
   (c) Piruvato
   (d) Glucosa-6-fosfato
2. ¿Cuántos fosfatos de energía elevada se generan en: (a) la conversión de 1 mol de glucosa en lactato, (b) la conversión de 2 moles de lactato en glucosa?
3. La avidina es una proteína que se une de manera extraordinariamente fuerte a la biotina. En consecuencia, es un potente inhibidor de las reacciones enzimáticas que requieren biotina. Considere la biosíntesis de glucosa a partir de cada uno de los siguientes sustratos y prediga cuáles de estas rutas serían inhibidas por la avidina.
   (a) Lactato
   (b) Oxalacetato
   (c) Fumarato
   (d) Fructosa-6-fosfato
   (e) Fosfoenolpiruvato
4. Se burbujeó $^{14}CO_2$ a través de una suspensión de células hepáticas que estaba realizando gluconeogénesis desde lactato a glucosa. ¿Qué carbonos de la molécula de glucosa se harán radiactivos?

*5. Proponga rutas de síntesis para los intermediarios nucleótido-azúcar siguientes que participan en la biosíntesis del antígeno O de *Salmonella typhimurium*: UDP-Gal, GDP-Man, CDP-abecuosa y dTDP-L-ramnosa.

6. Escriba una ecuación equilibrada para cada una de las siguientes reacciones o secuencias de reacciones:
   (a) La reacción catalizada por la PFK-2
   (b) La conversión de 2 moles de oxalacetato en glucosa
   (c) La conversión de glucosa en UDP-Glc
   (d) La conversión de 2 moles de glicerol en glucosa
   (e) La conversión de 2 moles de malato en glucosa-6-fosfato
7. Dibuje las curvas de velocidad de reacción frente a [fructosa-6-fosfato] para las formas fosforilada *y* no fosforilada de PFK-2.

8. A partir de la información presentada en las páginas 644-646, dibuje las curvas que relacionan la velocidad de reacción de la glucógeno sintasa con la [UDP-glucosa], para las formas I y D de la enzima, en presencia y en ausencia de glucosa-6-fosfato.
9. La síntesis y la degradación de glucógeno están reguladas fundamentalmente a nivel hormonal. Sin embargo, existen también mecanismos *no hormonales* importantes que controlan las tasas de síntesis y de movilización. Describa estos procesos de regulación no hormonales.
10. Para una célula bacteriana que contiene enzimas del ciclo del glioxilato, calcule el número de ATP consumidos en la biosíntesis de 1 mol de glucosa a partir de acetil-CoA. ¿Cuántos moles de acetil-CoA son necesarios?
11. ¿Por qué tiene sentido, desde el punto de vista metabólico, que sea la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, y no la piruvato carboxilasa, el objetivo principal de la regulación de la gluconeogénesis a nivel del control de la síntesis enzimática?
12. ¿Qué factores determinan que la piruvato carboxilasa actúe fundamentalmente como enzima anaplerótica o gluconeogénica?
13. ¿Cuál es la trascendencia metabólica de las siguientes observaciones? (1) Tan sólo la forma hepática de la piruvato quinasa se inhibe por la alanina, y (2) tan sólo los tejidos gluconeogénicos contienen concentraciones apreciables de glucosa-6-fosfatasa.

*14. Prediga de qué forma podrían interactuar la fosfoproteína fosfatasa-1 (PP-1) y el inhibidor de la fosfoproteína fosfatasa (PI-1) con componentes de la cascada glucogenolítica para regular de manera recíproca sus efectos sobre la síntesis de glucógeno.

15. Escriba una explicación de una frase para cada una de las siguientes afirmaciones:
    (a) En el hígado, el glucagón estimula la degradación del glucógeno a través del AMP cíclico. Aunque puede esperarse que el glucagón estimule también el catabolismo de la glucosa formada, el glucagón *inhibe* la glucólisis y estimula la gluconeogénesis.
    (b) Una persona con un déficit de glucosa-6-fosfatasa padece hipoglucemia crónica.
    (c) La acción de la sintasa-fosforilasa quinasa simultáneamente activa la degradación de glucógeno e inhibe la síntesis de glucógeno.
    (d) Una persona con sangre del grupo AB no puede donar a personas con los grupos de sangre A, B u O.
    (e) La presencia en el hígado de glucosa-6-fosfatasa es esencial para la función del hígado en la síntesis de glucosa para su uso por otros tejidos.

CAPÍTULO 17

Fotosíntesis

En capítulos anteriores hemos descrito con un grado de detalle considerable las formas en que los organismos extraen y almacenan en el ATP una parte importante de la energía que obtienen de la oxidación de los hidratos de carbono. Utilizando como ejemplo la glucosa, hemos planteado la siguiente reacción global:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O \qquad \Delta G^\circ = -2870 \text{ kJ/mol}$$

Hemos indicado que hasta un 40% de esta energía puede recuperarse para un trabajo bioquímico útil.

Pero la vida no puede depender del metabolismo oxidativo como fuente última de energía, y no puede continuar devolviendo indefinidamente el carbono orgánico a la atmósfera en forma de CO_2. La reacción que hemos indicado es tan sólo la mitad del gran ciclo energía-carbono de la naturaleza (Figura 17.1). La inversa de la reacción de oxidación de los hidratos de carbono la realizan las plantas, las algas y algunos microorganismos, utilizando la energía de la luz solar para proporcionar la enorme cantidad de energía libre requerida.

$$6CO_2 + 6H_2O \xrightarrow{\text{Energía luminosa}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \qquad \Delta G^\circ = +2870 \text{ kJ/mol}$$

Este proceso se denomina **fotosíntesis**. No sólo proporciona hidratos de carbono para la producción de energía en las plantas y los animales, sino que constituye también la vía principal a través de la cual el carbono vuelve a entrar en la biosfera, es decir, el principal medio de fijación del carbono. Además, la fotosíntesis constituye la principal fuente de oxígeno en la atmósfera terrestre.

La fotosíntesis proporciona hidratos de carbono para la producción de energía, fija el CO_2 y es la principal fuente del O_2 atmosférico.

Antes de la evolución de los organismos fotosintéticos, la atmósfera de la tierra carecía probablemente de oxígeno (aunque era abundante el dióxido de carbono). Los organismos prefotosintéticos debieron utilizar para su metabolismo moléculas de energía elevada sintetizadas de forma abiótica. Sin la aparición de la fotosíntesis, estas fuentes de energía se hubieran consumido por completo y la vida hubiera desaparecido. Los fósiles que conocemos sugieren que los organismos fotosintéticos aparecieron hace aproximadamente 3500 mi-

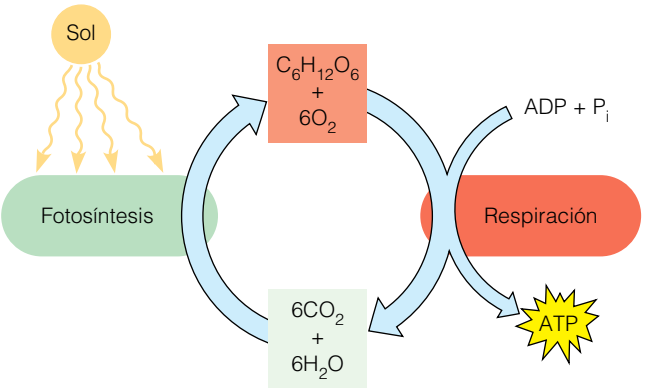


FIGURA **17.1**

El ciclo del carbono en la naturaleza. El dióxido de carbono y el agua se combinan mediante la fotosíntesis en las plantas para formar hidratos de carbono. Tanto en las plantas como en los animales, estos hidratos de carbono pueden reoxidarse para regenerar el CO_2 y el H_2O. Parte de la energía obtenida de la fotosíntesis o de la oxidación se atrapa en el ATP.

llones de años. Su conversión gradual de la atmósfera primitiva no oxidante de la tierra a una atmósfera oxidante abrió el camino al metabolismo aerobio y a la evolución de los animales. En la actualidad, la fotosíntesis constituye la fuente última de energía para casi todas las formas de vida*. Se utiliza por las plantas, las algas y una amplia variedad de procariotas, todos los cuales constituyen alimentos para otros organismos. En la Figura 17.2 se presenta una perspectiva global de las relaciones de la fotosíntesis con otras rutas que hemos estudiado.

Procesos básicos de la fotosíntesis

La ecuación que acabamos de presentar para la reacción fotosintética es, naturalmente, una simplificación excesiva. Como cabría prever, en el proceso real de la fotosíntesis intervienen muchos pasos intermedios. Además, una hexosa en sí no es el principal hidrato de carbono obtenido. Por lo tanto, la reacción fotosintética suele escribirse de esta forma más general:

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Energía luminosa}} [CH_2O] + O_2$$

en donde $[CH_2O]$ indica un hidrato de carbono general.

Dado que la combustión de los hidratos de carbono para producir CO_2 es un proceso oxidativo, la conversión del CO_2 en hidratos de carbono debe comportar una *reducción* del carbono. En la reacción precedente, el H_2O es el agente reductor último, como ocurre en las plantas, la mayoría de las algas y las cianobacterias. Sin embargo, en muchas bacterias existen procesos fotosintéticos que utilizan otros reductores. Así pues, una reacción aún más general puede escribirse de la siguiente forma:

$$CO_2 + 2H_2A \xrightarrow{\text{Energía luminosa}} [CH_2O] + H_2O + 2A$$

en donde H_2A es un reductor general y A es el producto oxidado. En la Tabla 17.1 se presentan algunos ejemplos de reacciones fotosintéticas. La comparación

* Los avances recientes hacen necesario matizar la afirmación de que todas las formas de vida obtienen su energía de la fotosíntesis. Se han encontrado algunas bacterias, como las asociadas a las corrientes biotérmicas submarinas, que utilizan la oxidación de sustancias como el H_2S o el H_2 como fuente alternativa de energía en ausencia completa de luz. Este ciclo energético constituye, sin embargo, tan sólo una pequeña fracción del flujo energético de la biosfera.

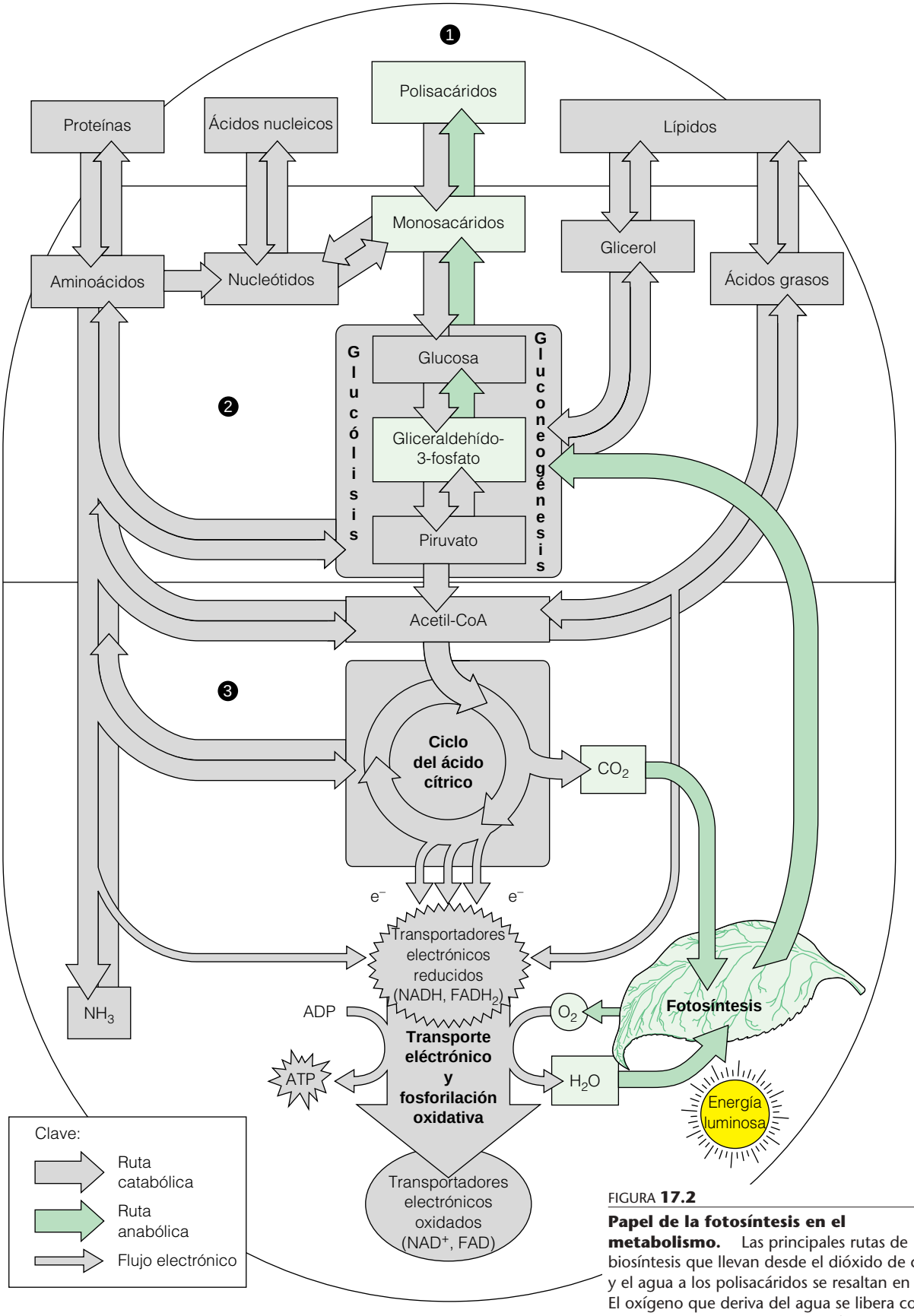


FIGURA **17.2**

Papel de la fotosíntesis en el metabolismo. Las principales rutas de biosíntesis que llevan desde el dióxido de carbono y el agua a los polisacáridos se resaltan en verde. El oxígeno que deriva del agua se libera como producto secundario de la fotosíntesis.

TABLA 17.1 Ejemplos de algunas reacciones fotosintéticas

Organismos	Reductor	Reacción
Plantas, algas, cianobacterias	H_2O	$CO_2 + 2H_2O \longrightarrow [CH_2O] + H_2O + O_2$
Bacterias sulfúricas verdes	H_2S	$CO_2 + 2H_2S \longrightarrow [CH_2O] + H_2O + 2S$
Bacterias sulfúricas púrpuras	$[HSO_3^-]$	$CO_2 + H_2O + 2[HSO_3^-] \longrightarrow [CH_2O] + 2[HSO_4^-]$
Bacterias fotosintéticas no sulfúricas	H_2 o muchos otros reductores, como el lactato	$CO_2 + 2H_2 \longrightarrow [CH_2O] + H_2O$
		$CO_2 + 2$ (Lactato) $\longrightarrow [CH_2O] + H_2O + 2$ (Piruvato)

La fotosíntesis requiere un reductor, generalmente el H_2O, para reducir el CO_2 hasta el nivel de hidratos de carbono.

de las reacciones presentadas en la tabla sugiere que la fuente del oxígeno liberado en la fotosíntesis por las plantas, las algas y las cianobacterias debe ser el H_2O en vez del CO_2. Esta fuente fue pronosticada a comienzos de los años 1930 por C. B. van Niel, uno de los iniciadores de los estudios fotosintéticos, y confirmada en 1941 mediante experimentos de marcaje isotópico en los que se utilizó agua marcada con ^{18}O y CO_2 sin marcar. Estos experimentos demostraron que ninguno de los átomos de oxígeno del O_2 procede del CO_2. En consecuencia, es más correcto escribir las reacciones fotosintéticas de la forma que se indica en la Tabla 17.1, que deja claro que uno de los oxígenos del CO_2 va a parar finalmente a los hidratos de carbono y el otro al agua:

$$CO_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{Energía luminosa}} [CH_2O] + H_2O + O_2$$

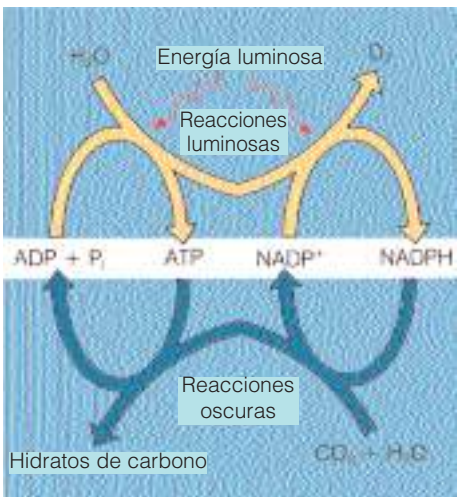


FIGURA **17.3**

Los dos subprocesos de la fotosíntesis. El proceso global de la fotosíntesis se divide en reacciones luminosas y reacciones oscuras. Las reacciones luminosas, que requieren luz visible como fuente de energía, producen poder reductor (en forma de NADPH), ATP y O_2. El NADPH y el ATP impulsan las denominadas reacciones oscuras, que se producen tanto en presencia de luz como en ausencia de ella y fijan el CO_2 en los hidratos de carbono.

La energía luminosa no puede utilizarse *directamente* para impulsar esta reacción, y el H_2O no reduce al CO_2 *directamente* en ninguna de las circunstancias conocidas. El proceso global que acabamos de describir está, realmente, separado, tanto química como físicamente, en dos subprocesos en todos los organismos fotosintéticos. En la Figura 17.3 se presenta una versión ligeramente más sofisticada de lo que realmente sucede. En el primer subproceso, en una serie de pasos denominados **reacciones luminosas**, se utiliza la energía de la luz solar para llevar a cabo la oxidación fotoquímica del H_2O. Con esta oxidación se consiguen dos cosas. En primer lugar, el agente oxidante $NADP^+$ se reduce a NADPH, produciendo equivalentes reductores, y se libera O_2. En segundo lugar, parte de la energía de la luz solar se captura mediante la fosforilación del ADP para producir ATP. Este proceso se denomina **fotofosforilación**. En el segundo subproceso, las denominadas **reacciones oscuras** de la fotosíntesis, el NADPH y el ATP producidos por las reacciones luminosas se utilizan para la síntesis reductora de los hidratos de carbono a partir de CO_2 y agua. A estas reacciones se las denominó inicialmente *oscuras* para resaltar que no requieren la participación directa de la energía luminosa. Aunque esto es cierto, el término tiene la implicación desafortunada de que estas reacciones de síntesis se producen tan sólo en la oscuridad. Nada podría estar más lejos de la realidad. De hecho, estas reacciones se producen en todo momento y son realmente aceleradas por la luz. Dado que el término *reacciones oscuras* está muy establecido, lo conservaremos, pero es preciso evitar que cause confusiones.

Antes de considerar los detalles de las reacciones luminosas o de las reacciones oscuras, conviene analizar los lugares en que se produce la fotosíntesis. De

la misma manera que todas las células eucariotas tienen orgánulos (mitocondrias) especializados en el metabolismo oxidativo, las plantas y las algas poseen orgánulos especializados en la fotosíntesis.

El cloroplasto

En todas las plantas superiores y las algas, los procesos fotosintéticos están localizados en unos orgánulos denominados **cloroplastos**. En las plantas, la mayoría de los cloroplastos se encuentran en células situadas bajo la superficie de las hojas (células mesófilas). Cada célula puede contener entre 20 y 50 de estos orgánulos (Figura 17.4). Las algas eucariotas tienen también cloroplastos, pero con frecuencia se encuentra tan sólo uno muy grande en cada célula.

Como las mitocondrias, los cloroplastos son semiautónomos, poseen su propio DNA que codifica algunas de sus proteínas, así como los ribosomas necesarios para la traducción de los RNA mensajeros adecuados. Existen muchos datos que indican que los cloroplastos han evolucionado a partir de organismos unicelulares similares a las cianobacterias (algas azul-verdosas). Estos fotosintetizadores procariotas no contienen cloroplastos sino que tienen estructuras membranosas que desempeñan la misma función que las membranas de los cloroplastos (Figura 17.5). Hasta cierto punto, las cianobacterias se parecen a cloroplastos de vida libre. Se cree que, en una fase temprana de la evolución, los organismos unicelulares primitivos captaron procariotas similares a las cianobacterias y que finalmente esta relación pasó a ser simbiótica: los orgánulos fotosintéticos dejaron de ser capaces de realizar una vida independiente, y las algas pasaron a depender de ellos como fuentes de energía. En la actualidad, algunos genes de los cloroplastos están codificados en el genoma del orgánulo, y otros en el núcleo de la célula.

La estructura interna de un cloroplasto, que se muestra en la Figura 17.4b y c, guarda cierto parecido con la de una mitocondria (véase la Figura 15.2a).

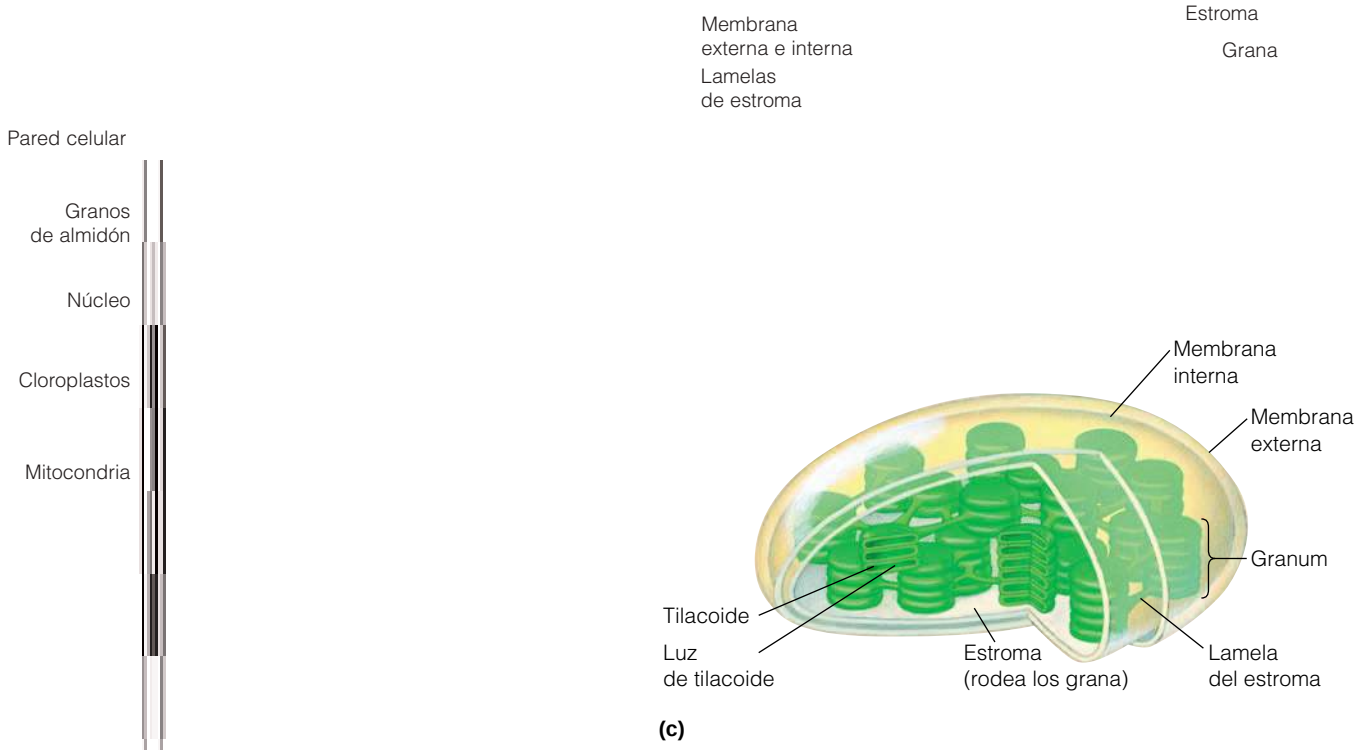
La fotosíntesis puede dividirse en reacciones luminosas, que utilizan la energía solar para producir NADPH y ATP, liberando O_2 en el proceso, y reacciones oscuras, que utilizan NADPH y ATP para fijar el CO_2.

La fotosíntesis de las plantas y las algas se produce en orgánulos denominados cloroplastos.

FIGURA **17.4**

Los cloroplastos, orgánulos fotosintéticos de las plantas verdes y las algas. **(a)** Se muestran varios cloroplastos en un corte transversal de una célula de una hoja de *Coleus*. **(b)** Imagen ampliada de un solo cloroplasto de una hoja de la hierba *Phleum pratense*. **(c)** Representación esquemática de un cloroplasto.

(a) Fotografía microscópica de M. W. Steer, imagen proporcionada por E. H. Newcomb; **(b)** fotografía microscópica de K. P. Wergin, imagen proporcionada por E. H. Newcomb/BPS; **(c)** tomado de Neil Campbell, Jane Reece y Larry Mitchell, *Biology*, 5.ª ed. (Menlo Park, CA: Addison Wesley Longman, 1999). © Addison Wesley Longman, Inc.



La absorción de luz y las reacciones luminosas se producen en las membranas del cloroplasto. Las reacciones oscuras tienen lugar en el estroma.



FIGURA **17.5**

Procariota fotosintético. Esta fotografía de microscopia electrónica de un corte fino de la cianobacteria *Anabaena azollae* muestra las membranas plegadas, que se asemejan a los tilacoides de los cloroplastos eucariotas.

Cortesía de N. Lang, Universidad de California, Davis/BPS.

Posee una membrana externa, libremente permeable, y una membrana interna con una permeabilidad selectiva. La membrana interna encierra un material denominado **estroma** que es análogo a la matriz mitocondrial. Dentro del estroma están inmersas múltiples estructuras membranosas en forma de sacos planos, denominadas, **tilacoides**, que, a menudo, están apilados como monedas, formando unidades denominadas *grana* (véase la Figura 17.4c). Los grana individuales están interconectados de manera irregular mediante unas extensiones de los tilacoides denominadas *lamelas del estroma*. La membrana tilacoide encierra un espacio interior, la **luz** del tilacoide.

La división del trabajo dentro de un cloroplasto es sencilla. La absorción de la luz y todas las reacciones luminosas se producen dentro de las membranas tilacoides o sobre ellas. El ATP y el NADPH producidos por estas reacciones se liberan al estroma circundante, en donde se producen todas las reacciones oscuras de síntesis. De esta manera, existen analogías en la estructura y el cometido de la matriz mitocondrial y del estroma de los cloroplastos, y entre la membrana interna de la mitocondria y la membrana tilacoide del cloroplasto. De hecho, veremos que se realiza un tipo de generación quimiosmótica de ATP muy similar a través de estas membranas tanto en las mitocondrias como en los cloroplastos. Para ver cómo se produce esta generación de ATP debemos examinar primero detalladamente las reacciones luminosas, empezando con el proceso de absorción de luz.

Reacciones luminosas

ABSORCIÓN DE LA LUZ: EL SISTEMA DE RECOGIDA DE LUZ

Energía de la luz

Para comprender de qué forma puede capturarse y utilizarse la energía de la luz solar, debemos revisar primero la naturaleza de la radiación electromagnética. La teoría mecanocuántica de la radiación afirma que la luz (y las demás radiaciones electromagnéticas) tiene dos aspectos: el de onda y el de partícula. Podemos caracterizar un tipo determinado de radiación mediante su longitud de onda (λ) o su frecuencia (ν); estos parámetros caracterizan los aspectos de *onda* de la luz. Si las ondas de una longitud λ llegan a un observador a una velocidad c, el número de ondas que pasan por segundo es la frecuencia, ν. Así pues,

$$\nu = c/\lambda \qquad (17.1)$$

en donde c es la velocidad de la luz, 3×10^8 m/s. La luz roja de un láser de neón tiene una longitud de onda de 632.8 nm, o 6.328×10^{-7} m. Así pues, su frecuencia es 4.74×10^{14} s^{-1}. Pero para ver cómo puede obtenerse *energía* de la luz, es necesario considerar el aspecto de partícula de la radiación. Debemos considerar un haz de luz como una corriente de partículas luminosas o **fotones**. Cada fotón tiene una unidad de energía asociada denominada **cuanto**. El valor energético de un cuanto, es decir, la energía por fotón, está relacionado con la frecuencia de la luz según una de las ecuaciones más básicas de la física, la ley de Planck:

$$E = h\nu \qquad (17.2)$$

en donde h es la constante de Planck, 6.626×10^{-34} J·s. Así, el láser de neón de nuestro ejemplo puede proporcionar energía luminosa únicamente en paquetes, o cuantos, de 3.14×10^{-19} J (o, $[6.626 \times 10^{-34}$ J·s$] \times [4.74 \times 10^{14}$ $s^{-1}]$). Sin

embargo, los bioquímicos rara vez tratan con fotones únicos. Puesto que nos interesa la forma en que la radiación puede promover los procesos químicos o bioquímicos, que generalmente se expresan en forma molar, la magnitud más adecuada para nuestros fines es la energía de un *mol* (6.02×10^{23}) de fotones. Para la luz de un láser de neón, multiplicando la energía por fotón por 6.02×10^{23} se obtienen 189 kJ. Un mol de fotones se denomina un **einstein**.

En la Figura 17.6 se muestra un gráfico de la energía por mol de fotones en función de la longitud de onda, para las partes infrarroja, visible y ultravioleta del espectro. Se indican, con fines comparativos, las energías asociadas con las vibraciones moleculares y con diversos enlaces covalentes. Cuando los fotones de la radiación infrarroja se absorben por una molécula, pueden hacer poco más que estimular vibraciones moleculares, que percibimos como calor. En cambio, los fotones de la radiación ultravioleta lejana tienen energías capaces de romper los enlaces covalentes. La radiación ultravioleta lejana es químicamente destructiva para el ser humano, al igual que para otros organismos, pero por fortuna la mayor parte de ella se filtra por la capa de ozono antes de llegar a la superficie de la tierra. Éste es el motivo de que la amenaza de destrucción de la capa de ozono sea una preocupación tan grave.

La fotosíntesis depende principalmente de la luz de las regiones visible e infrarroja próxima del espectro, que se encuentran entre los extremos de ruptura de los enlaces covalentes y de estimulación de las vibraciones moleculares. Los fotones del visible y del infrarrojo cercano no son muy destructivos, pero pueden producir transiciones de los estados electrónicos de las moléculas orgánicas que pueden impulsar reacciones y, de esta manera, capturar la energía en forma química. La capacidad de utilizar la radiación en este margen ha tenido unas ventajas evolutivas claras para los organismos fotosintéticos. La mayoría de la energía del sol que llega a la superficie de la tierra se encuentra en esta región del espectro. La pequeña cantidad de radiación ultravioleta que llega puede penetrar tan sólo una corta distancia en el agua y, por tanto, no hubieran podido utilizarla los organismos fotosintéticos primitivos que viven en el mar. Los fotones de la radiación infrarroja lejana tienen energías demasiado bajas para ser útiles para cualquier proceso fotoquímico.

Pigmentos de absorción de luz

Para capturar la parte útil de la energía luminosa, los organismos fotosintéticos han desarrollado un conjunto de pigmentos que absorben de manera eficaz la luz visible e infrarroja próxima. Las partes de estos pigmentos que absorben luz se denominan **cromóforos**, compuestos que absorben luz de una longitud de

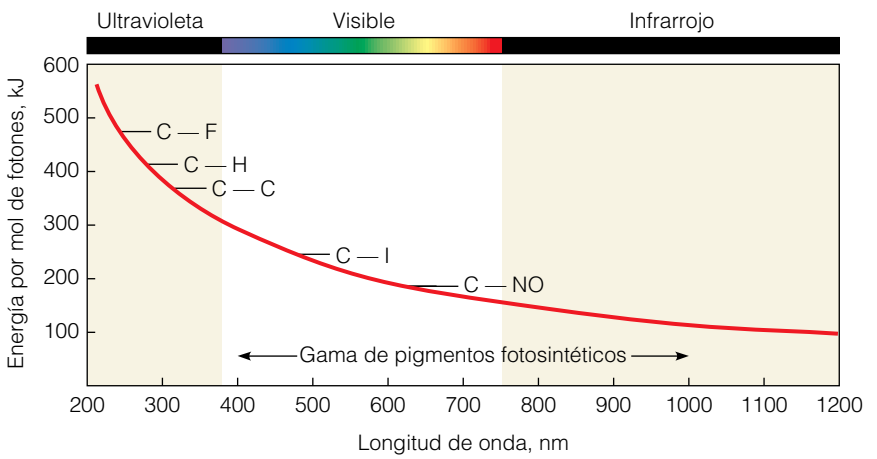


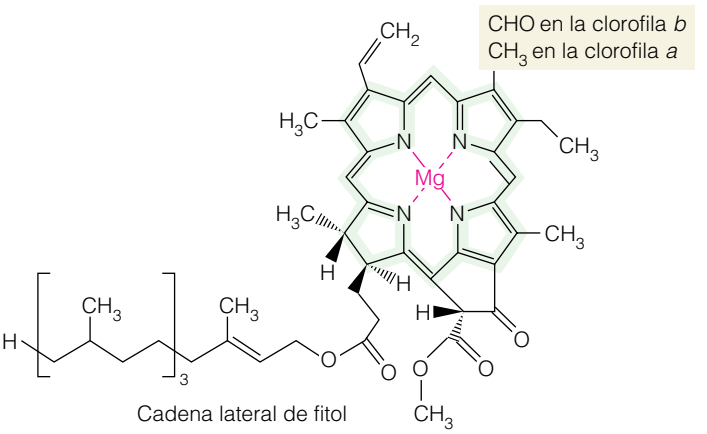
FIGURA **17.6**

Energía de los fotones. En el gráfico se indica la energía por mol de fotones en función de la longitud de onda, en comparación con las energías de varios enlaces químicos. La luz ultravioleta tiene energía suficiente para romper directamente muchos enlaces químicos. La luz visible puede romper algunos enlaces débiles. La luz de la porción de longitudes de onda largas de la región infrarroja del espectro produce tan sólo vibraciones moleculares productoras de calor.

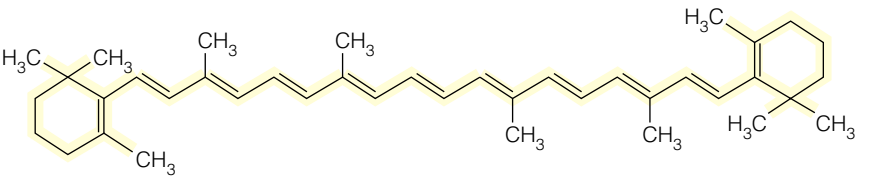
onda específica. En la Figura 17.7 se presentan las estructuras de algunos de los cromóforos fotosintéticos más importantes. En la Figura 17.8, se comparan los espectros de absorción de estos pigmentos fotosintéticos con la distribución de la radiación solar en el espectro. En conjunto, los cromóforos cubren todo el espectro visible; apenas algún fotón de los que llegan no puede absorberse por uno u otro cromóforo. Los pigmentos más abundantes en las plantas superiores son la clorofila *a* y la clorofila *b*. Como puede observarse comparando la Figura 17.7a con la Figura 7.4b (página 240), estas moléculas están relacionadas con la protoporfirina IX que se encuentra en la hemoglobina y la mioglobina. Sin embargo, el metal unido a las clorofilas es el Mg^{2+} y no el Fe^{2+}. En la Figura 17.7b y c se muestran otros dos pigmentos accesorios. Todas estas moléculas absorben la luz de la región visible del espectro porque poseen grandes sistemas de dobles enlaces conjugados. Dado que las clorofilas *a* y *b* absorben intensamente la luz del azul oscuro y del rojo, la luz que *no* se absorbe sino que se *refleja* por los cloroplastos es verde, el color que asociamos con la mayor parte de las plantas en crecimiento. Los demás colores observados, como el rojo, el marrón o el púrpura de las algas y las bacterias fotosintéticas, se deben a las distintas cantidades de los pigmentos accesorios. La pérdida de clorofila en las hojas en otoño hace que se manifiesten los colores de los pigmentos accesorios, así como de los pigmentos no fotosintéticos. Algunas bacterias fotosintéticas utilizan pigmentos que absorben longitudes de onda de aproximadamente 1000 nm, en el infrarrojo próximo.

FIGURA **17.7**

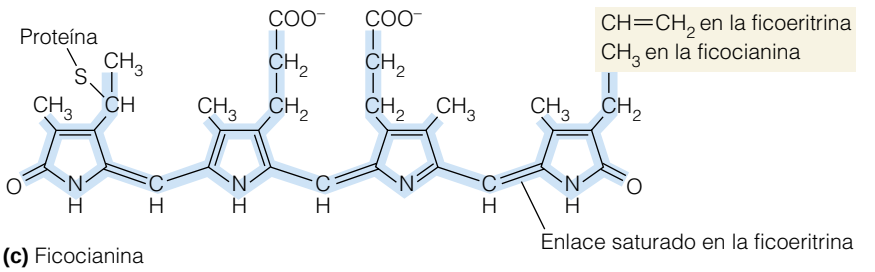
Algunos pigmentos fotosintéticos. Las clorofilas *a* y *b* son los pigmentos más abundantes de las plantas, mientras que el *β*-caroteno y la ficocianina son ejemplos de pigmentos accesorios. La ficocianina está unida de manera covalente a una proteína a través de un grupo sulfhidrilo. Las ficoeritrinas relacionadas forman también complejos pigmento-proteína. Las clorofilas *a* y *b* se encuentran en las plantas superiores y las algas. También hay bacterioclorofilas, que difieren ligeramente en su estructura.



(a) Clorofilas *a* y *b*



(b) *β*-Caroteno



(c) Ficocianina

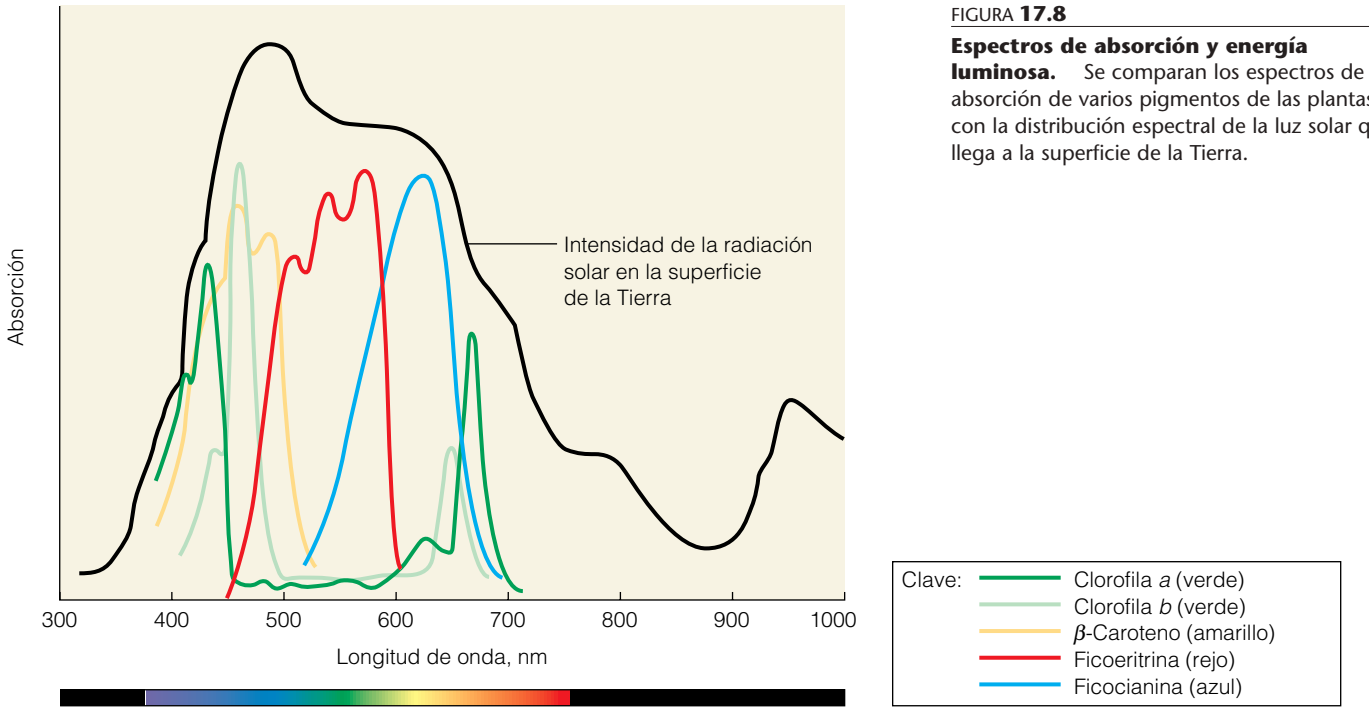


FIGURA **17.8**

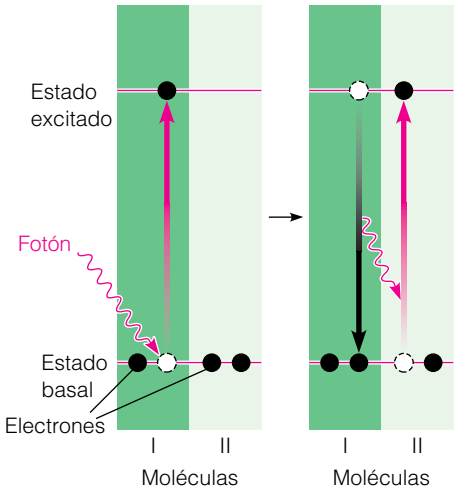
Espectros de absorción y energía luminosa. Se comparan los espectros de absorción de varios pigmentos de las plantas con la distribución espectral de la luz solar que llega a la superficie de la Tierra.

Estructuras de captación de la luz

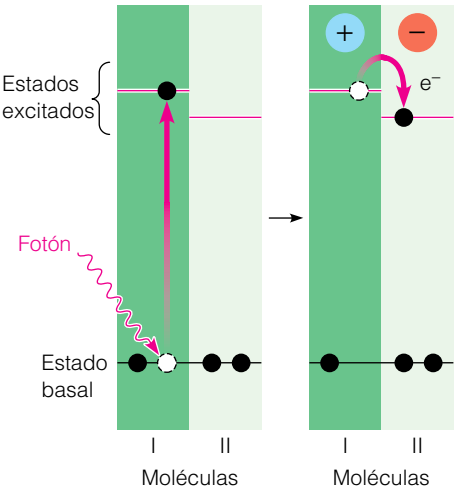
La clorofila y algunos de los pigmentos accesorios están contenidos en las **membranas tilacoides** del cloroplasto. La composición de estas membranas es poco habitual. Contienen tan sólo una pequeña fracción de los fosfolípidos comunes, mientras que tienen abundantes glucolípidos. También contienen gran cantidad de proteínas, y algunos de los pigmentos fotosintéticos están unidos a algunas de estas proteínas. Otros pigmentos fotosintéticos, como las clorofilas *a* y *b*, no están unidos covalentemente sino que interaccionan con las proteínas y los lípidos de la membrana. La interacción de estos pigmentos con los lípidos de la membrana se realiza a través de las colas hidrófobas de fitol (véase la Figura 17.7a).

Los ensamblajes de los pigmentos de captación de la luz en la membrana tilacoide, junto con sus proteínas asociadas, están organizados en **fotosistemas** bien definidos, unidades estructurales dedicadas a la tarea de absorber fotones de luz y recuperar parte de su energía en forma química. La primera parte de este proceso se produce en los que se denominan **complejos de captación de luz.** Cada uno de ellos es un complejo proteico de muchas subunidades que contiene múltiples moléculas de pigmento **antena** (clorofilas y algunos pigmentos accesorios) y un par de moléculas de clorofila que actúan como **centro de reacción**, atrapando los cuantos de energía excitados por la absorción de la luz.

Para comprender cómo funciona este sistema, debemos examinar con algo más de detalle lo que puede ocurrir cuando una molécula absorbe un cuanto de energía radiante. Recuérdese de Herramientas de la Bioquímica 6A que la absorción en la región visible del espectro excita la molécula desde su estado basal a un estado electrónico superior. En el caso de los pigmentos fotosintéticos, el electrón así excitado ocupa un orbital π en el sistema de enlaces conjugados. En Herramientas de la Bioquímica 6A describimos dos formas en que podría perderse la energía al regresar la molécula a su estado basal: la disipación de la energía sin radiación en forma de calor, o la emisión de una nueva radiación en forma de fluorescencia. Sin embargo, cuando moléculas con una absorción si-



(a) Transferencia de resonancia



(b) Transferencia electrónica

FIGURA **17.9**

Dos modos de transferencia energética tras la fotoexcitación. Para cada uno de los dos tipos de transferencia energética que se producen en un fotosistema, la ilustración del lado izquierdo muestra una molécula que se excita a un estado de energía superior por la absorción de un fotón de radiación. Las ilustraciones de la derecha indican cómo se transfiere la energía a una molécula adyacente. **(a)** En la *transferencia de resonancia* la molécula I transfiere su energía de excitación a la molécula II, que sube a un estado de energía superior, al tiempo que la molécula I desciende de nuevo al estado basal. **(b)** En la *transferencia electrónica*, un electrón excitado de la molécula I se transfiere al estado excitado ligeramente inferior de la molécula II, haciendo que la molécula I pase a ser un catión y la molécula II un anión.

milar están densamente empaquetadas, como ocurre en un fotosistema, aparecen otras dos posibilidades. En primer lugar, la energía de excitación puede pasarse desde una molécula a otra adyacente, un proceso denominado *transferencia de resonancia* o *transferencia de excitón* (Figura 17.9a). Otra posibilidad es que el propio electrón excitado pueda pasarse a una molécula cercana, con un estado de excitación ligeramente inferior, una reacción de *transferencia electrónica* (Figura 17.9b). Ambos procesos son importantes en la fotosíntesis.

La pista que llevó finalmente al descubrimiento de que la transferencia de resonancia desempeñaba un cometido importante en la fotosíntesis se debió a las determinaciones efectuadas por Robert Emerson y William Arnold en los años 1930. Estos investigadores demostraron que a pesar de que el sistema fotosintético del alga *Chlorella* actuara con una eficacia máxima, tan sólo se producía una molécula de O_2 por cada 2500 moléculas de clorofila. Ahora sabemos que la mayor parte de las moléculas de clorofila no intervienen directamente en el propio proceso fotoquímico, sino que actúan como moléculas antena de los complejos de captación de luz. Se ha determinado recientemente la estructura de un tipo de complejo de captación de luz, que se muestra en la Figura 17.10. Las moléculas antena absorben fotones y la energía se pasa mediante transferencia de resonancia a moléculas específicas de clorofila en un número relativamente reducido de centros de reacción. En otras palabras, la energía de un fotón absorbido por cualquier molécula antena de un fotosistema se desplaza de manera aleatoria por el sistema (Figura 17.11). Finalmente (es decir, en aproximadamente 10^{-10} s), la energía encuentra su camino hacia una molécula de clorofila en el centro de reacción. Esta molécula es como las demás clorofilas, pero se encuentra en un entorno algo diferente, por lo que su nivel del estado energético excitado es algo inferior. En consecuencia, actúa como una trampa de cuantos de energía absorbidos por cualquiera de las demás moléculas de pigmento. Es la excitación de este centro de reacción la que inicia el proceso fotoquímico real de las reacciones luminosas, puesto que pone en marcha una serie de transferencias electrónicas.

FOTOQUÍMICA DE LAS PLANTAS Y LAS ALGAS: DOS FOTOSISTEMAS EN SERIE

Nuestro conocimiento de las reacciones fotoquímicas luminosas ha evolucionado a partir de muchos experimentos elegantes llevados a cabo en muchos laboratorios diferentes. Un estudio pionero, realizado en 1939 por Robert Hill, en la Universidad de Cambridge, produjo la observación fundamental de que los cloroplastos aislados pueden fomentar la reducción cuando se les ilumina en presencia de alguno de los diversos tipos de aceptores electrónicos. Así, por ejemplo, cuando se utilizó ion férrico, se producía de manera eficaz la siguiente reacción:

$$4Fe^{3+} + 2H_2O \xrightarrow{\text{Energía luminosa}} 4Fe^{2+} + 4H^+ + O_2$$

Se conocen numerosas reacciones de este tipo en las que intervienen diversos oxidantes inorgánicos, y actualmente se denominan de forma colectiva *reacciones de Hill*. Estas reacciones, en ausencia de una activación fotoquímica, son muy desfavorables. Así, por ejemplo, el Fe^{3+} es un oxidante mucho más débil que el O_2; $\Delta G°$ para la reacción escrita es de unos +180 kJ; de forma que el equilibrio debe estar muy desplazado hacia la izquierda. Los descubrimientos de Hill demostraron que *los cloroplastos irradiados con luz son capaces de impulsar reac-*

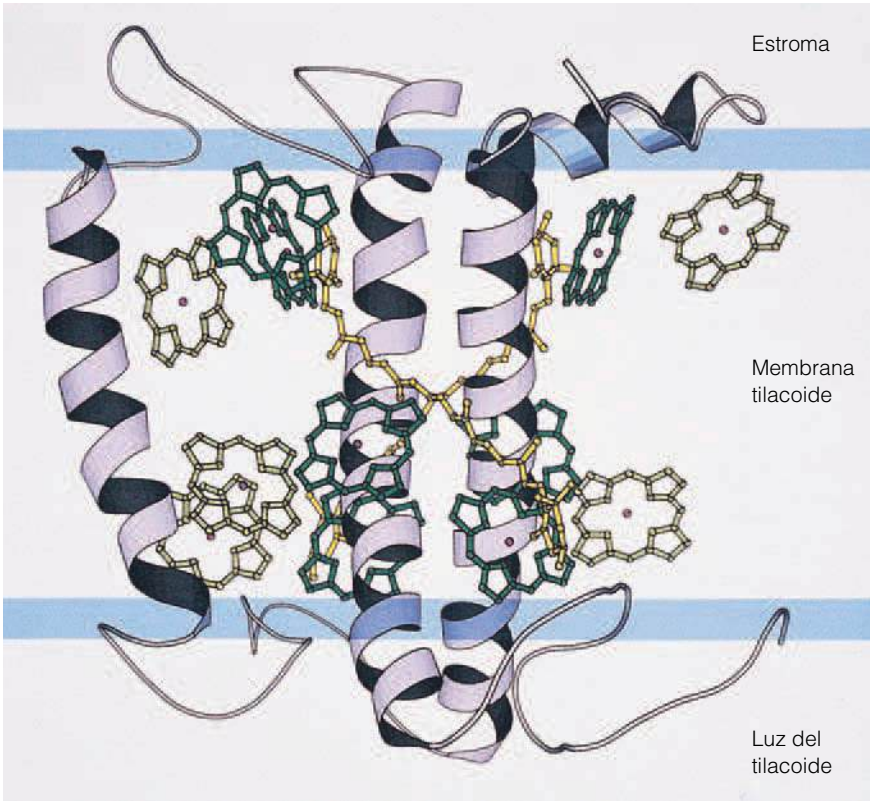


FIGURA **17.10**

Estructura tridimensional de un monómero del complejo trimérico de captación de luz de las plantas. Esta perspectiva lateral muestra el monómero de captación de luz enterrado en la membrana tilacoide. Las moléculas de clorofila y los pigmentos accesorios se observan claramente en el interior de la estructura.

Cortesía de W. Kühlbrandt et al., *Nature* (1994) 367:614-621. © 1994 Macmillan Magazines, Ltd.

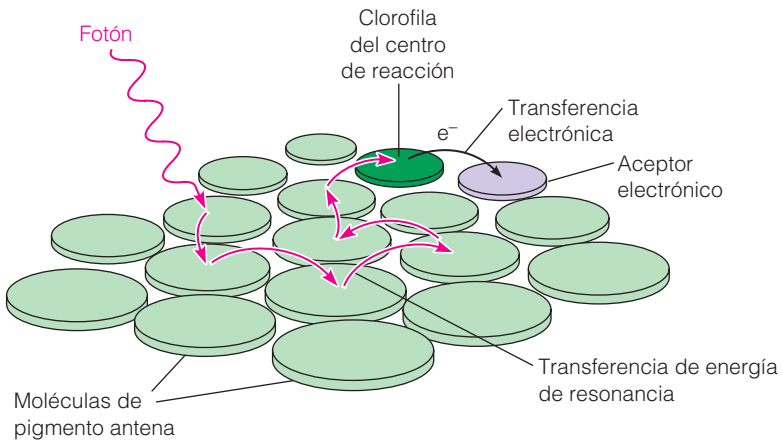


FIGURA **17.11**

Transferencia de energía de resonancia en un complejo de captación de luz. La energía de excitación que se origina en un fotón de luz se desplaza de una molécula antena a otra hasta que llega a un centro de reacción. Allí, un electrón se transfiere a una molécula aceptora de electrones primaria y la energía queda atrapada.

ciones termodinámicamente desfavorables. Las reacciones de Hill demostraron también que el sistema fotosintético puede oxidar el agua a O_2 sin que intervenga en ello el CO_2 (véase la Figura 17.3). Esta observación constituyó la primera indicación clara de que las reacciones luminosas y oscuras eran procesos separados, y llevó finalmente al descubrimiento de que el aceptor electrónico final de las reacciones luminosas in vivo es el $NADP^+$ que da NADPH.

Los estudios posteriores revelaron que en la fotosíntesis de las plantas deben participar *dos* tipos de fotosistemas. El primer indicio se obtuvo en experimentos que medían la eficacia cuántica de la fotosíntesis en las algas, utilizando luz de distintas longitudes de onda. La *eficacia cuántica* (*Q*) es la proporción de moléculas de oxígeno liberadas por fotones absorbidos. Cuando la longitud de onda de la luz monocromática utilizada se aumentaba por encima de 680 nm

La mayor parte de las moléculas de clorofila se utilizan como antenas para capturar los fotones y trasladar su energía a los centros de reacción.

(rojo lejano), se observaba una caída brusca de *Q*. Esta "caída del rojo" constituía una observación extraña, puesto que las clorofilas de las plantas continúan mostrando una absorbancia apreciable incluso a longitudes de onda más altas. De alguna manera la energía no se utilizaba de manera tan eficaz por encima de 680 nm. Aún más notable fue la observación de que la iluminación simultánea con luz amarilla (650 nm) producía un notable aumento de la eficacia cuántica de la luz a 700 nm. Aunque la luz amarilla se apagaba unos minutos antes de realizar la medida, la eficacia cuántica continuaba siendo alta. La única explicación razonable de estos resultados es que existan dos fotosistemas complementarios, uno que absorba más fuertemente a longitudes de onda de alrededor de 700 nm y otro que actúe mejor a longitudes de onda más cortas. Debe ser necesaria la acción de *ambos* para que la fotosíntesis se produzca con una eficacia máxima.

Se han identificado y caracterizado los dos fotosistemas que predijeron los primeros investigadores. Ambos están localizados en la membrana tilacoide. Cada fotosistema es un complejo proteico transmembrana de múltiples subunidades, que posee moléculas de clorofila antena y centros de reacción y agentes de transporte electrónico. Los fotosistemas se han denominado de acuerdo con el orden en que se descubrieron. El que presenta una absorbancia hasta 700 nm se denomina **fotosistema I** (**PSI**), y el que absorbe tan sólo hasta una longitud de onda de aproximadamente 680 nm se denomina **fotosistema II** (**PSII**). En las algas, las cianobacterias y todas las plantas superiores, estos dos fotosistemas están ligados en serie para realizar la secuencia completa de las reacciones luminosas. La secuencia básica se ilustra en la Figura 17.12a, que muestra el trayecto que siguen los electrones a través de los dos sistemas. En la Figura 17.12b se resaltan las características energéticas del flujo electrónico y se colocan los principales elementos que participan en las reacciones luminosas en una escala de potencial de reducción.

Dos fotosistemas, conectados en serie, intervienen en las reacciones luminosas de la fotosíntesis en las algas, las cianobacterias y las plantas superiores.

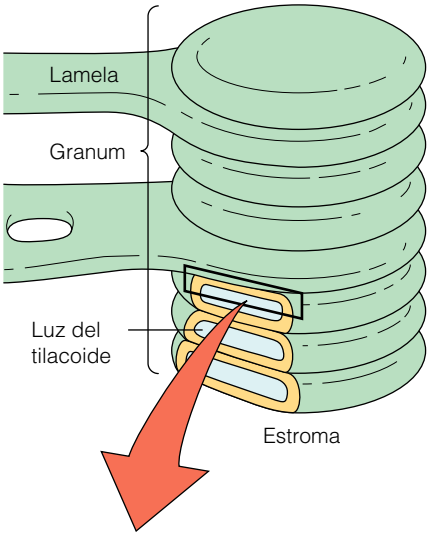
En cada uno de los dos fotosistemas el paso primario es la transferencia de un electrón excitado por la luz desde un centro de reacción (P680 o P700) a una cadena de transporte electrónico. El origen último de los electrones son las moléculas de agua que se muestran a la izquierda en ambas partes de la Figura 17.12. El destino final de los electrones es la molécula de $NADP^+$ de la derecha, que se reduce de esta forma a NADPH. En las dos fases del proceso de transporte electrónico, se liberan protones a la luz del tilacoide. Algunos de los protones proceden del H_2O que se rompe, y otros proceden del estroma. Esta transferencia de protones a la luz produce un gradiente de pH a través de la membrana tilacoide. No debe resultar extraño el hecho de que este gradiente protónico impulse la producción de ATP, puesto que un gradiente de este mismo tipo produce ATP en las mitocondrias (véase el Capítulo 15). Así pues, el ATP y el poder reductor en forma de NADPH son los productos de las reacciones luminosas. Estos compuestos son exactamente lo que se necesita para impulsar los procesos de síntesis que tienen lugar en las reacciones oscuras. Para examinar con detalle su generación, empezaremos con el fotosistema II, porque es donde entran los electrones en el esquema.

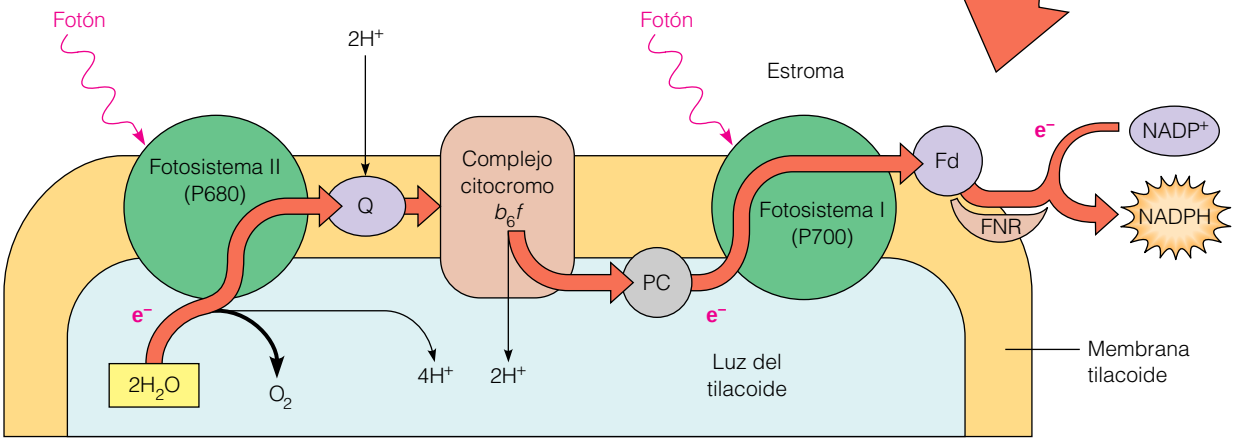
Fotosistema II: fragmentación del agua

Cada uno de los fotosistemas es una cadena de transporte electrónico, que extrae energía cuando un electrón excitado pierde su energía de excitación de una forma escalonada. El fotosistema lleva a cabo una serie de reacciones de oxidación-reducción. Lo más fácil es seguir los procesos que tienen lugar en un fotosistema empezando con la absorción de un fotón captado por el sistema de captación de luz del fotosistema II. El fotón es conducido a una clorofila centro

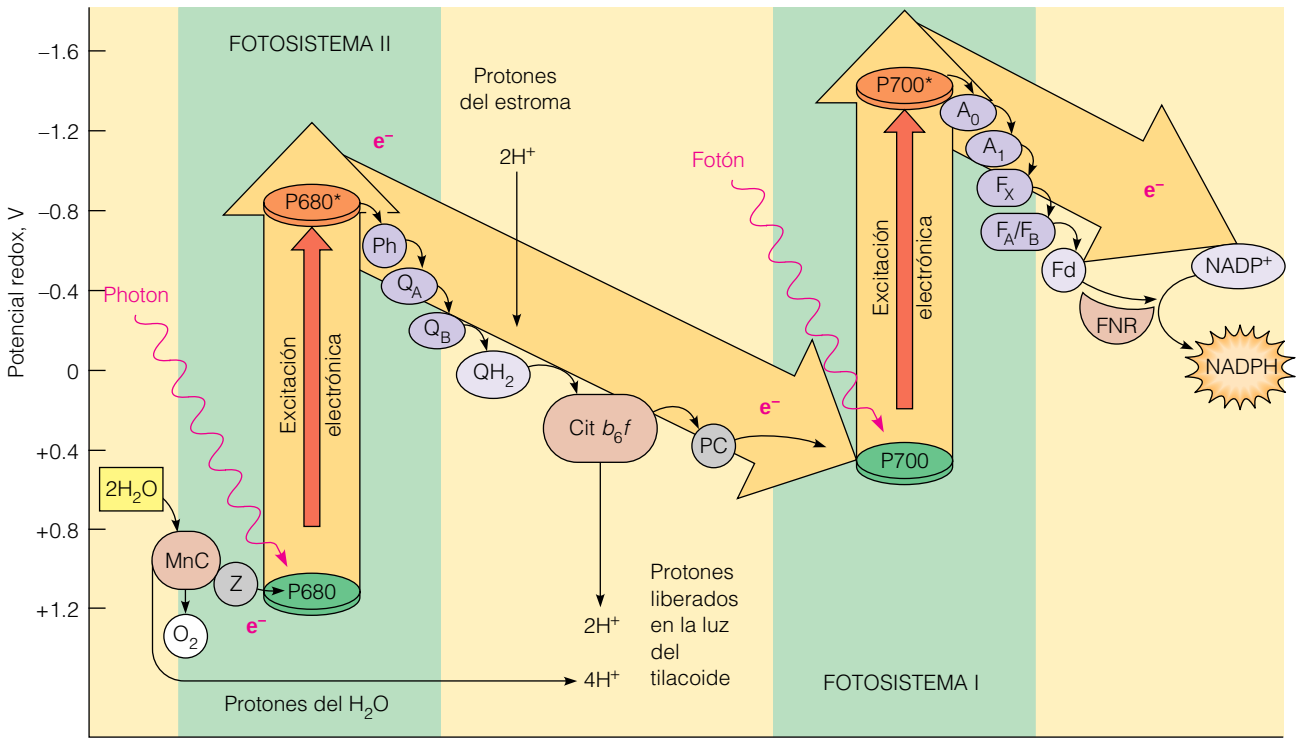
FIGURA **17.12**

Reacciones luminosas de los dos fotosistemas. En el modo de fotosíntesis de dos fotosistemas, las reacciones luminosas las llevan a cabo dos fotosistemas conectados en serie. **(a)** Representación esquemática del trayecto que siguen los electrones a través de los dos fotosistemas. Los dos sistemas y el complejo citocromo están incluidos en la membrana tilacoide. Los electrones captados del agua en el fotosistema II se transfieren al fotosistema I a través de las quinonas (Q), el complejo citocromo b_6f y la plastocianina (PC). En el fotosistema I, los electrones se excitan de nuevo por la luz, para su transferencia a través de una serie de intermediarios a la ferredoxina. La ferredoxina reducida reduce el $NADP^+$. **(b)** Energética de las reacciones luminosas de los dos fotosistemas. En cada uno de los dos centros de reacción, P680 y P700, los electrones suben a un estado excitado mediante la absorción de fotones. En cada fotosistema, los electrones excitados pasan por una cadena de transporte electrónico, que impulsa el bombeo de iones hidrógeno al interior de la luz del tilacoide. El modo de dos fotosistemas se denomina a veces esquema Z, debido al patrón de cambios energéticos que se muestra aquí. **Clave:** MnC = centro de manganeso; Z = donador para el P680; P680 = clorofila del centro de reacción del fotosistema II; Ph = feofitina aceptora; Q_A, Q_B = plastoquinonas unidas a proteínas; QH_2 = plastoquinol (plastoquinona reducida) en la membrana; Cit b_6f = complejo citocromo b_6f; PC = plastocianina; P700 = clorofila del centro de reacción del fotosistema I; A_0 = aceptor de clorofila; A_1 = filoquinona unida a proteína; F_A, F_B, F_X = agrupaciones hierro-azufre; Fd = ferredoxina; FNR = ferredoxina:$NADP^+$ oxidorreductasa.





(a)



(b)

de reacción, denominada P680 en la Figura 17.12. La excitación del P680 hace pasar a la molécula del estado basal a un estado excitado de –0.8 voltios. Así pues, el P680 excitado pasa a ser un excelente agente reductor, capaz de transferir rápidamente un electrón desde el P680 a un aceptor electrónico primario de menor energía, la *feofitina a* (*Ph*), como se muestra en la Figura 17.12b. Las feofitinas son moléculas idénticas a las clorofilas, excepto que dos protones sustituyen al ion magnesio central. Podemos considerar a este electrón excitado como un electrón de bajo potencial redox (véase el Capítulo 15).

El electrón se transfiere a continuación a una serie de moléculas de *plastoquinona* (Q_A y Q_B) asociadas con proteínas del PSII. Finalmente, dos electrones y dos protones son captados por la plastoquinona Q_B; los protones proceden del estroma. La plastoquinona reducida, QH_2 (*plastoquinol*) se libera entonces a la porción lipídica de la membrana tilacoide. La reacción global puede escribirse de la siguiente forma:



Plastoquinona **Plastoquinol**

El plastoquinol interacciona a continuación con un complejo de citocromos y proteínas hierro-azufre, el complejo citocromo b_6f. Este complejo cataliza la transferencia de los electrones a una cuproproteína, la *plastocianina* (*PC*). Al hacerlo, el complejo b_6f realiza dos funciones. En primer lugar, transmite electrones activados desde el fotosistema II al fotosistema I. Al mismo tiempo, bombea protones desde el estroma a la luz del tilacoide. Los principales componentes de este complejo son dos citocromos (*f* y b_6) y una proteína hierro-azufre (ISF). El orden de la transferencia electrónica parece ser

Plastoquinol ⟶ citocromo b_6 ⟶ ISF ⟶ citocromo *f* ⟶ plastocianina

Cuando el plastoquinol se oxida para producir de nuevo plastoquinona, los dos protones que ha captado del estroma se liberan a la luz del tilacoide. El complejo citocromo b_6f desempeña un cometido análogo al del complejo citocromo reductasa de las mitocondrias, al que se parece. La plastocianina, una proteína móvil de la luz del tilacoide, pasa los electrones a los centros de reacción P700. En este proceso, el cobre de la plastocianina se reduce primero a Cu(I) y luego se reoxida a Cu(II). Consideraremos el destino de los electrones que pasan al P700 cuando tratemos el fotosistema I.

El fotosistema II extrae los electrones del agua, los transfiere al fotosistema I y libera O_2.

Obsérvese que los procesos que hemos descrito hasta ahora han dejado el centro de reacción P680 con un déficit de electrones; en otras palabras, oxidado a un oxidante fuerte, el $P680^+$. Estos electrones se recuperan del agua, que se fragmenta en presencia de un aceptor electrónico, liberando oxígeno en el proceso. Como se observa en la Figura 17.12b (izquierda), el aceptor electrónico es una proteína que contiene un grupo de cuatro átomos de manganeso (MnC) puenteados con oxígeno. Este grupo metálico puede encontrarse en diversos estados de oxidación como se indica en la Figura 17.13; girando a través de estos estados de oxidación permite al grupo desmantelar dos moléculas de agua, y pasar cuatro electrones de vuelta al P680 y liberar los cuatro protones acompañantes a la luz del tilacoide. El tema de debate todavía es a qué puntos exactamente del ciclo se liberan los electrones y protones individuales y se han propuesto varios modelos. En la versión que se muestra en la Figura 17.13, los electrones y pro-

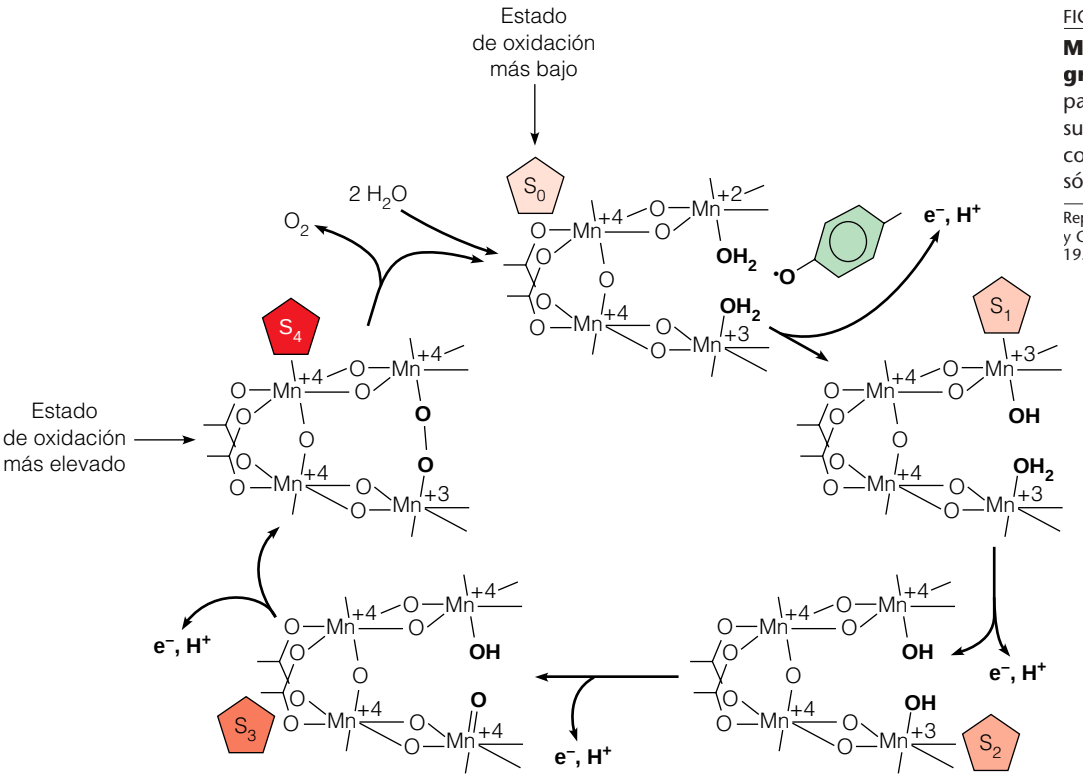
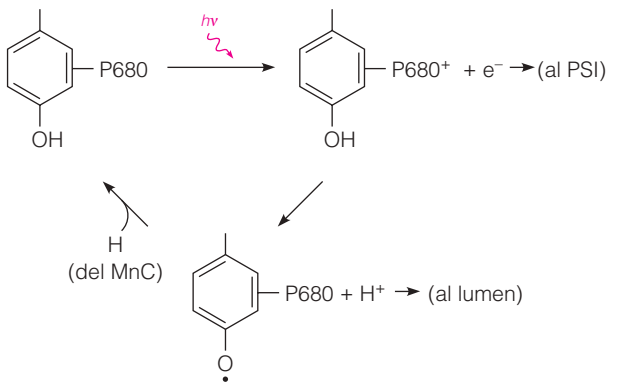


FIGURA **17.13**

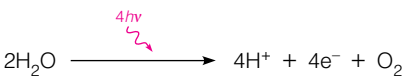
Modelo de la función del grupo MnC en el PSII. Los pares e^-, H^+ se transfieren sucesivamente al radical tirosilo como átomos de H. Por claridad, sólo se muestra el radical una vez.

Reproducido con permiso de C. W. Hoganson y G. T. Babcock, *Science* (1997) 277:1953-1955. © 1997 AAAS.

tones se liberan en pares, que suponen la extracción de hidrógeno. Esta idea es consistente con la observación de que el donador de electrones que devuelve los electrones al P680 oxidado es una tirosina de una de las proteínas PSII. Esto produce un radical tirosina, que se ha observado mediante resonancia de espín electrónico (véase Herramientas de la Bioquímica 10A), y libera un protón. Se ha propuesto, pues, que cada uno de los pasos de la Figura 17.13 en el que se extrae un átomo de hidrógeno ($H^+ + e^-$) implica el ciclo siguiente:



El sistema ha "desmembrado" de hecho dos moléculas de agua. El oxígeno producido se libera y difunde hacia fuera del cloroplasto. Los cuatro protones que se producen a partir de las $2H_2O$ se liberan a la luz del tilacoide, y ayudan a generar una diferencia de pH entre la luz y el estroma. Podemos resumir la reacción que lleva a cabo el fotosistema II de la siguiente forma:



Los electrones producidos han viajado a través de la cadena de transporte del fotosistema II y se trasladarán al fotosistema I a través del complejo b_6f.

Fotosistema I: producción de NADPH

Hemos visto que en las plantas, que utilizan dos fotosistemas, el fotosistema II realiza la fragmentación del agua con obtención de O_2 y ayuda a generar un gradiente protónico a través de la membrana tilacoide. Sin embargo, los electrones de las moléculas de agua no han alcanzado aún su destino final en el NADPH. Este proceso es la tarea del fotosistema I, en el que los electrones se liberan de nuevo desde un centro de reacción por la excitación luminosa, y pasan a través de una segunda cadena de transporte electrónico. Estos electrones se sustituyen por los que proceden del fotosistema II.

El fotosistema I es un complejo multiproteico que contiene al menos 11 cadenas polipeptídicas. También contiene muchas clorofilas antena y una clorofila centro de reacción, P700, que puede absorber luz de hasta 700 nm. Como se muestra en la Figura 17.12b, la excitación por un fotón absorbido por las clorofilas antena asciende los electrones del P700 desde un estado basal a un estado excitado a aproximadamente –1.3 V. Cada electrón excitado pasa entonces a través de una cadena de transporte electrónico. Primero es captado por un aceptor clorofílico (denominado A_0), luego se transfiere a una molécula de *filoquinona* (A_1, también denominada vitamina K_1, véase la página 780) y por último se transporta por una serie de tres proteínas hierro-azufre (F_x, F_B y F_A). Estas proteínas contienen grupos hierro-azufre de los tipos que se indican en la Figura 15.4. Por último, el electrón se transfiere a otra proteína hierro-azufre, la *ferredoxina soluble* (Fd), que se encuentra en el estroma. La enzima ferredoxina:$NADP^+$ oxidorreductasa cataliza la transferencia de electrones al $NADP^+$, una vez que la ferredoxina ha sido reducida por el fotosistema I:

El fotosistema I recibe los electrones del fotosistema II y los transfiere al $NADP^+$ para formar NADPH.

$$2Fd\ (red) + H^+ + NADP^+ \xrightarrow[Reductasa]{} 2Fd\ (ox) + NADPH$$

En cierto sentido, es la ferredoxina, y no el $NADP^+$, la que puede considerarse como receptor *directo* de los electrones de la ruta. Aunque gran parte de la ferredoxina reducida se utiliza para reducir al $NADP^+$, una parte se emplea para otras reacciones reductoras, que comentaremos más adelante. De hecho, podemos considerar a la ferredoxina reducida como una fuente de electrones de bajo potencial para muchos procesos reductores. El NADPH producido por la oxidación de la ferredoxina se libera al estroma, en donde se utilizará en las reacciones oscuras.

Los electrones que se han conducido a través del fotosistema I tenían su origen en la transferencia de electrones desde los centros de reacción P700. Los centros de reacción oxidados ($P700^+$) producidos de esta forma deben recibir un nuevo aporte de electrones para que continúe la fotosíntesis. En la fotosíntesis de dos sistemas, estos electrones los proporciona el fotosistema II a través de la plastocianina.

Recientemente, los estudios de difracción de rayos X han revelado, a alta resolución, la estructura de todo el complejo del fotosistema I de una cianobacteria (véase la Bibliografía). El complejo se presenta como un trímero en el que cada unidad consta de varias cadenas polipeptídicas y contiene unas 100 clorofilas (la mayoría de las cuales son moléculas antena) y todos los componentes de la cadena de transporte electrónico excepto la ferredoxina (Figura 17.14a). El complejo se extiende de lado a lado de la membrana tilacoide. Las localizaciones aproximadas de los componentes de transporte electrónico en relación con las caras de la luz y el estroma se muestran en la Figura 17.14b. Los

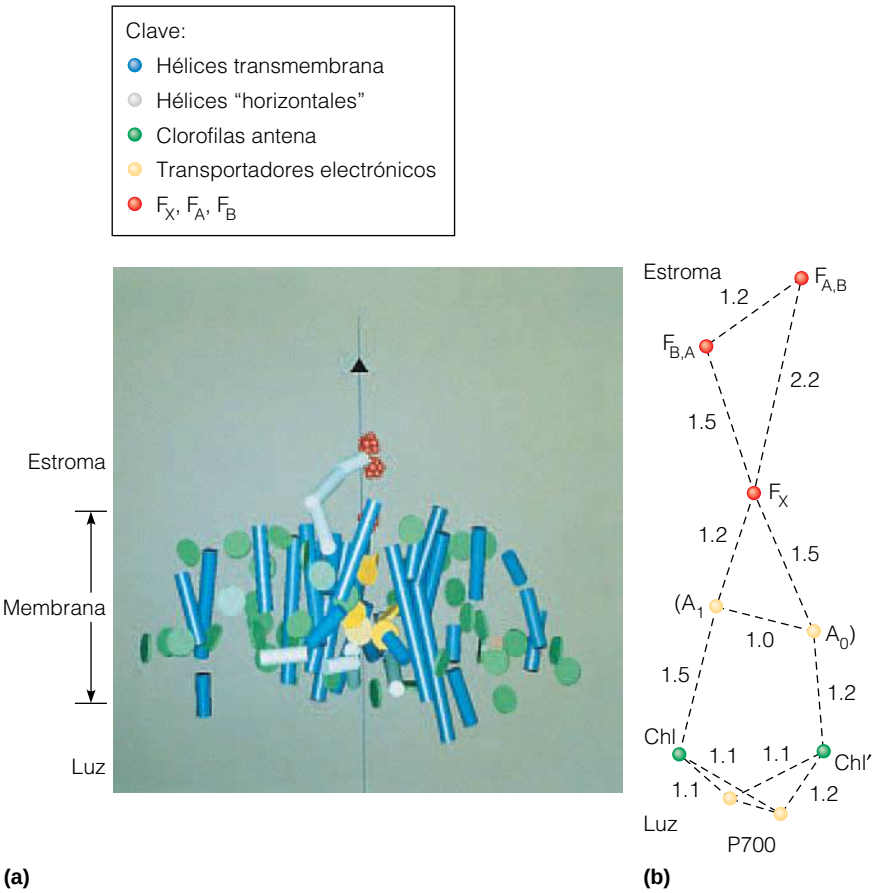


FIGURA **17.14**

Estructura del fotosistema I. **(a)** Perspectiva de un monómero de la estructura trimérica vista lateralmente (el plano de la membrana es perpendicular a la página; el eje triple del trímero, indicado por una línea con un triángulo negro, es perpendicular al plano de la membrana). El estroma se encuentra en la parte superior y la luz en la inferior. Varias cadenas polipeptídicas están contenidas en el complejo. Sus dominios individuales no pueden resolverse a 0.6 nm de resolución de este estudio. **(b)** Perspectiva esquemática en que se muestran las posiciones de los elementos de la cadena de transporte electrónico. Las posiciones de A_0 y A_1 no son seguras. Se indican las distancias en nm.

Cortesía de N. Krauss et al., *Nature* (1993) 361:326-331.
© 1993 Macmillan Magazines, Ltd. Reproducido con permiso.

estudios más recientes de la estructura del fotosistema II han descubierto unas semejanzas sorprendentes, lo cual sugiere un origen evolutivo común.

Suma de los dos sistemas: reacción global y generación de ATP

Podemos resumir ahora el flujo electrónico a través de las reacciones luminosas de los dos sistemas. Como se muestra en la Figura 17.12, los electrones son captados del agua y terminan en el NADPH. Para la reacción global del fotosistema II, escribimos:

$$2H_2O \xrightarrow{4h\nu} 4H^+ + 4e^- + O_2$$

Las reacciones del fotosistema I, si se escriben para cuatro electrones y se eliminan los intermediarios, son

$$4e^- + 2H^+ + 2NADP^+ \longrightarrow 2NADPH$$

Sumando estas dos reacciones se obtiene la siguiente expresión para el conjunto de las reacciones luminosas:

$$2H_2O + 2NADP^+ \xrightarrow{4h\nu} 2H^+ + O_2 + 2NADPH$$

con el conocimiento de que se han bombeado otros protones adicionales desde el estroma a la luz tilacoide durante el paso de cada electrón por la cadena de

Los dos fotosistemas transportan protones desde el estroma a la luz del tilacoide. El retorno de los protones, a través de los complejos CF_0-CF_1, se utiliza para generar ATP.

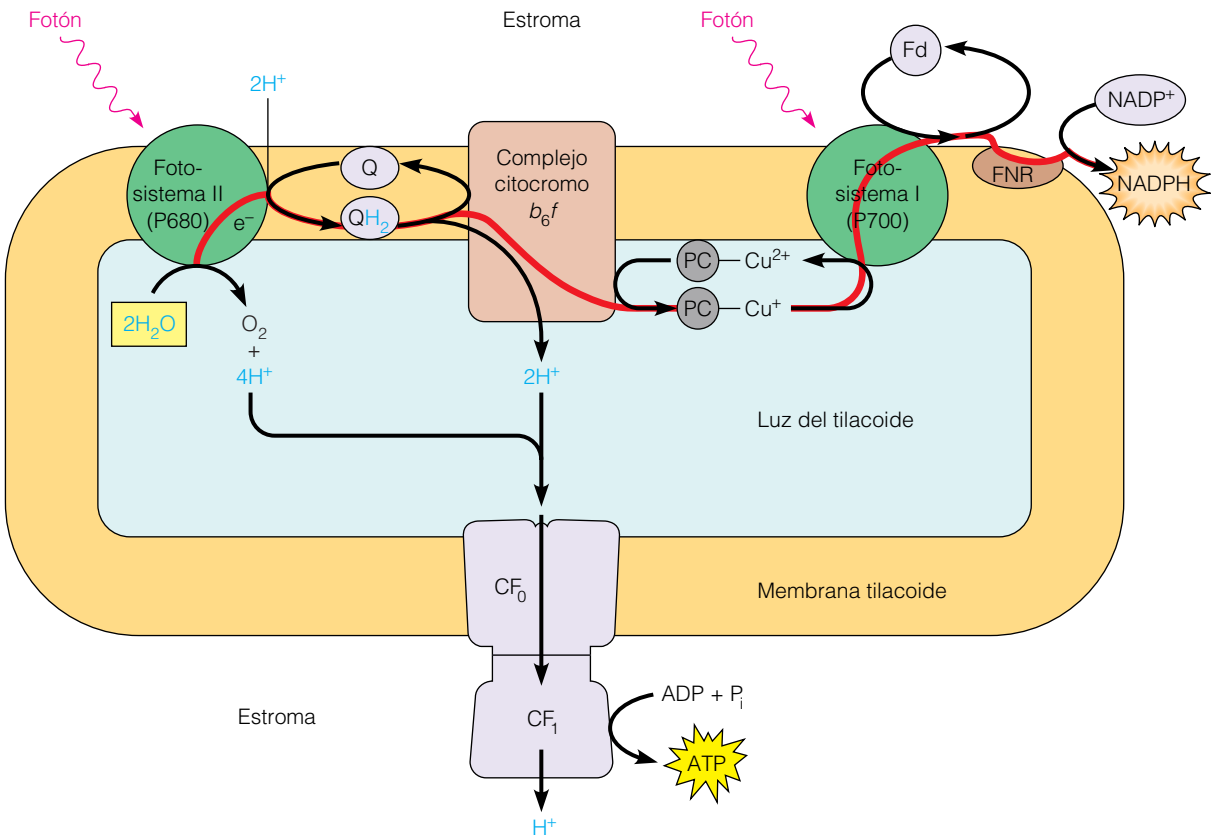
transporte electrónico. Los cálculos actuales sobre el número total de protones son algo dudosos, porque no se conoce exactamente el número transportado por electrón por el complejo b_6f. Sin embargo, un buen cálculo estaría en el margen de 8 a 12 por oxígeno liberado. El resultado neto de la función conjunta del sistema I y II es la reducción del $NADP^+$ y la generación de un gradiente protónico a través de la membrana tilacoide, de tal manera que la luz pasa a ser más ácida que el estroma.

La diferencia de pH producida a través de la membrana tilacoide puede ser considerable, de hasta 3.5 unidades de pH en los cloroplastos iluminados de manera intensa. Como ocurre en la generación de ATP en las mitocondrias, estos protones pueden volver a atravesar la membrana tilacoide en sentido contrario únicamente a través de complejos de ATP sintasa unidos a la membrana. En los cloroplastos, estos complejos se denominan complejos CF_0-CF_1 y se parecen mucho a los complejos F_0-F_1 de las mitocondrias (véase el Capítulo 15). El gradiente de pH a través de la membrana corresponde a un ΔG de aproximadamente –20 kJ/mol para el paso de un protón. Se ha calculado que se produce un ATP por cada tres protones que pasan por el complejo CF_0-CF_1, un resultado que es termodinámicamente razonable. Dado que se transportan dos o tres H^+ por electrón, se genera hasta un ATP por cada electrón que pasa por la cadena.

En la Figura 17.15 se presenta un resumen del conjunto de reacciones luminosas. Debe señalarse que los fotosistemas I y II, el complejo citocromo b_6f y la ATP sintasa (CF_0-CF_1) son entidades individuales que están inmersas en la membrana tilacoide aunque no necesariamente contiguas. Los componentes que conectan los fotosistemas y el complejo b_6f son móviles, la plastoquinona en la fase lipídica de la membrana y la plastocianina en la luz tilacoidea. Así pues, los electrones pueden desplazarse largas distancias en este sistema. Este transporte

FIGURA **17.15**

Perspectiva resumida de las reacciones luminosas tal como se producen en el tilacoide. Los fotosistemas I y II y el complejo citocromo b_6f son complejos proteicos físicamente separados, que están incluidos en la membrana tilacoide. La transferencia electrónica desde el PSII al citocromo b_6f se realiza por difusión de la plastoquinona reducida (QH_2) en los lípidos de la membrana. La transferencia desde b_6f a PSI se produce a través de la plastocianina (PC), soluble en la luz. Los protones añadidos a la luz del tilacoide durante las reacciones luminosas atraviesan la membrana tilacoide a través de los complejos ATP sintasa (CF_0-CF_1). Las partículas de ATP sintasa se encuentran en la subunidad CF_1 y están situadas frente al estroma, de manera que el ATP se genera en ese compartimiento. La reducción del $NADP^+$ se produce también en la superficie de la membrana que contacta con el estroma o cerca de ella.



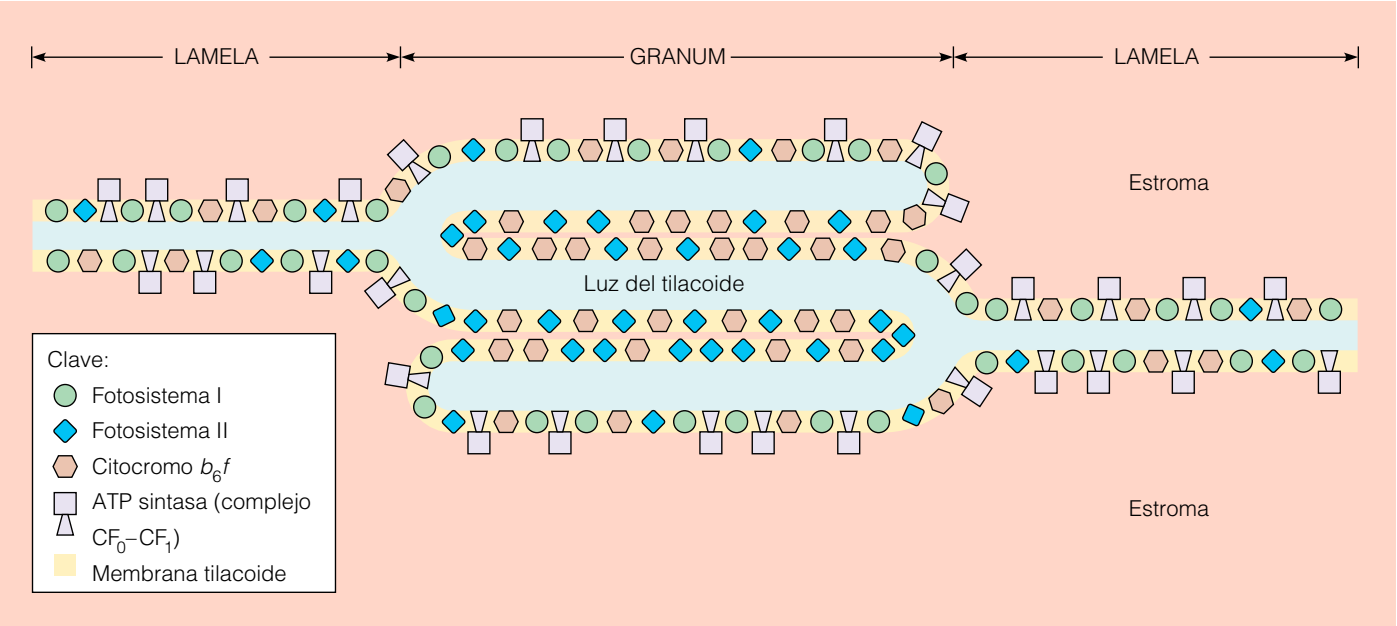


FIGURA **17.16**

Disposición de los componentes de los dos fotosistemas en la membrana tilacoide. Las capas de membrana del interior del granum son ricas en el fotosistema II. Las lamelas de estroma y las superficies superior e inferior del granum son ricas en el fotosistema I y en partículas de ATP sintasa, lo que permite que se produzca la reducción del $NADP^+$ y la generación de ATP en la superficie que contacta con el estroma o cerca de ella.

de gran alcance es necesario debido a la disposición de los componentes en la membrana tilacoide. Un análisis cuidadoso de la composición de los grana indica que las capas de la membrana interna de los grana tienen gran cantidad del fotosistema II, mientras que las lamelas del estroma tienen gran cantidad del fotosistema I (véanse las Figuras 17.4b y 17.16).

UN MECANISMO ALTERNATIVO DE LA REACCIÓN LUMINOSA: FLUJO ELECTRÓNICO CÍCLICO

En las reacciones luminosas de dos sistemas que acabamos de describir, los electrones desplazados del fotosistema I por la excitación son sustituidos por el fotosistema II, que los recibe del agua. El proceso global se denomina **flujo electrónico no cíclico**, y la generación de ATP mediante este proceso se denomina **fotofosforilación no cíclica**. Una ruta alternativa de las reacciones luminosas, denominada **flujo electrónico cíclico**, utiliza los componentes del fotosistema I, junto con la plastocianina y el complejo citocromo b_6f (Figura 17.17). El que esta ruta se utilice o no depende de las concentraciones de $NADP^+$ en el estroma del cloroplasto. Cuando el $NADP^+$ está presente tan sólo en pequeñas cantidades, los electrones excitados en el centro P700 no se transfieren al $NADP^+$. En su lugar se pasan desde la ferredoxina al complejo citocromo b_6f y de éste vuelven al estado basal del P700 a través de la plastocianina. Una forma de examinar este flujo electrónico cíclico es considerar el complejo b_6f y el $NADP^+$ como competidores por los electrones de la Fd. El complejo b_6f bombea protones a través de la membrana tilacoide durante este proceso cíclico, con lo que se asegura la generación de ATP. Se genera aproximadamente un ATP por cada dos electrones que completan el ciclo, un proceso denominado **fotofosforilación cíclica**. Sin embargo, en ese proceso, no se libera O_2 y no se reduce $NADP^+$.

El flujo electrónico cíclico, una alternativa al flujo electrónico de los dos sistemas (no cíclico) genera ATP adicional cuando el NADPH es abundante.

El flujo electrónico cíclico parece servir para generar ATP en situaciones en las que el NADPH reductor es abundante y se dispone de poco $NADP^+$ como aceptor electrónico. Puede desempeñar también un cometido más fundamental. Como veremos, las necesidades de ATP en las reacciones oscuras fotosintéticas son considerables y es posible que no siempre sean plenamente satisfechas

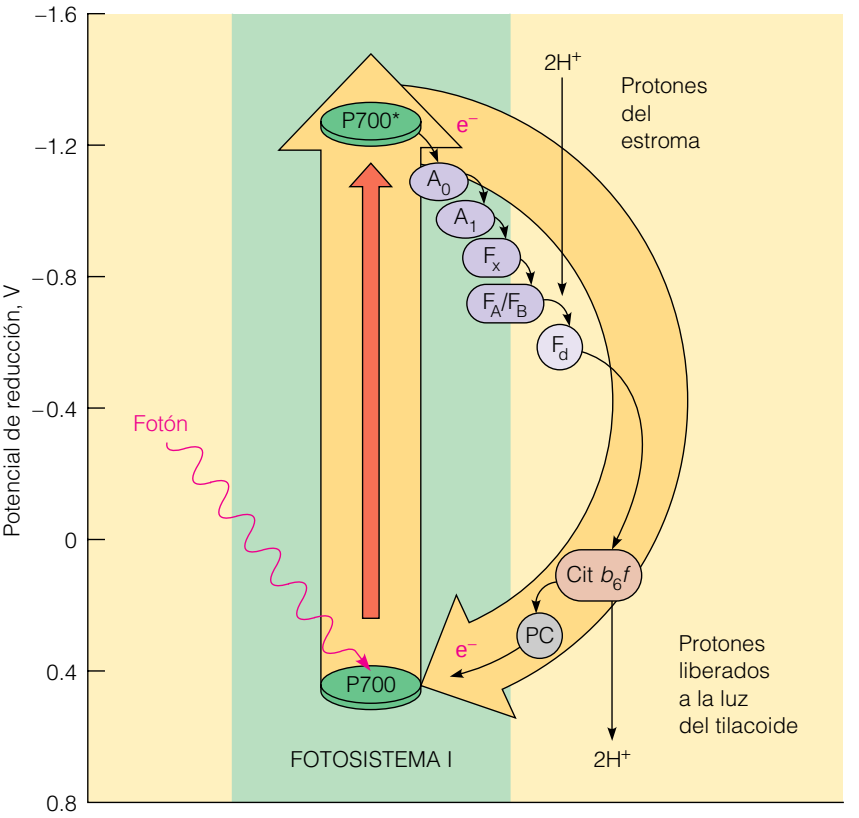


FIGURA **17.17**

Flujo electrónico cíclico. Cuando las concentraciones de $NADP^+$ son bajas y las concentraciones de NADPH son altas, los electrones procedentes del centro P700 vuelven a éste a través del complejo citocromo b_6f. No se produce reducción de $NADP^+$, aunque se bombean los protones a través de la membrana y, por tanto, se genera ATP. Los símbolos son los mismos que en la Figura 17.12.

por el flujo electrónico no cíclico. La fotofosforilación cíclica, que produce ATP pero no NADPH, puede ayudar a mantener el equilibrio necesario entre la producción de ATP y NADPH.

COMPLEJOS DEL CENTRO DE REACCIÓN EN LAS BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS

Las reacciones luminosas que acabamos de describir son las que se producen en las plantas y las algas. Sin embargo, parte de la información más precisa de que disponemos respecto al funcionamiento de las reacciones luminosas procede de los estudios realizados con las bacterias fotosintéticas. Los estudios iniciales de Roderick Clayton indicaron que los centros de reacción de estos organismos podían aislarse de forma pura. Posteriormente, Johann Deisenhofer, Hartmut Michel y Robert Huber, con el empleo de la difracción de rayos X, determinaron la estructura molecular completa del complejo centro de reacción cristalizado de la bacteria sulfúrica púrpura, *Rhodobacter viridis*. Este trabajo les valió el Premio Nobel de química en el año 1988.

En la Figura 17.18 se presenta un modelo del complejo centro de reacción. Se trata de una proteína transmembrana formada por cuatro polipéptidos. La parte del complejo que se encuentra fuera de la membrana plasmática bacteriana, en el espacio periplásmico, es un citocromo portador de cuatro grupos hemo. En cambio, la subunidad H se encuentra en gran parte en la cara citosólica de la membrana. Enterradas en la membrana se encuentran dos subunidades (L y M) que son en gran parte hélices α. Estas subunidades contienen cuatro moléculas de bacterioclorofila *b*, dos bacteriofeofitinas, dos quinonas (denominadas Q_A y Q_B) y un átomo de hierro unido. Dos de las clorofilas se encuentran muy próximas y forman el centro de reacción en sí. La absorción de

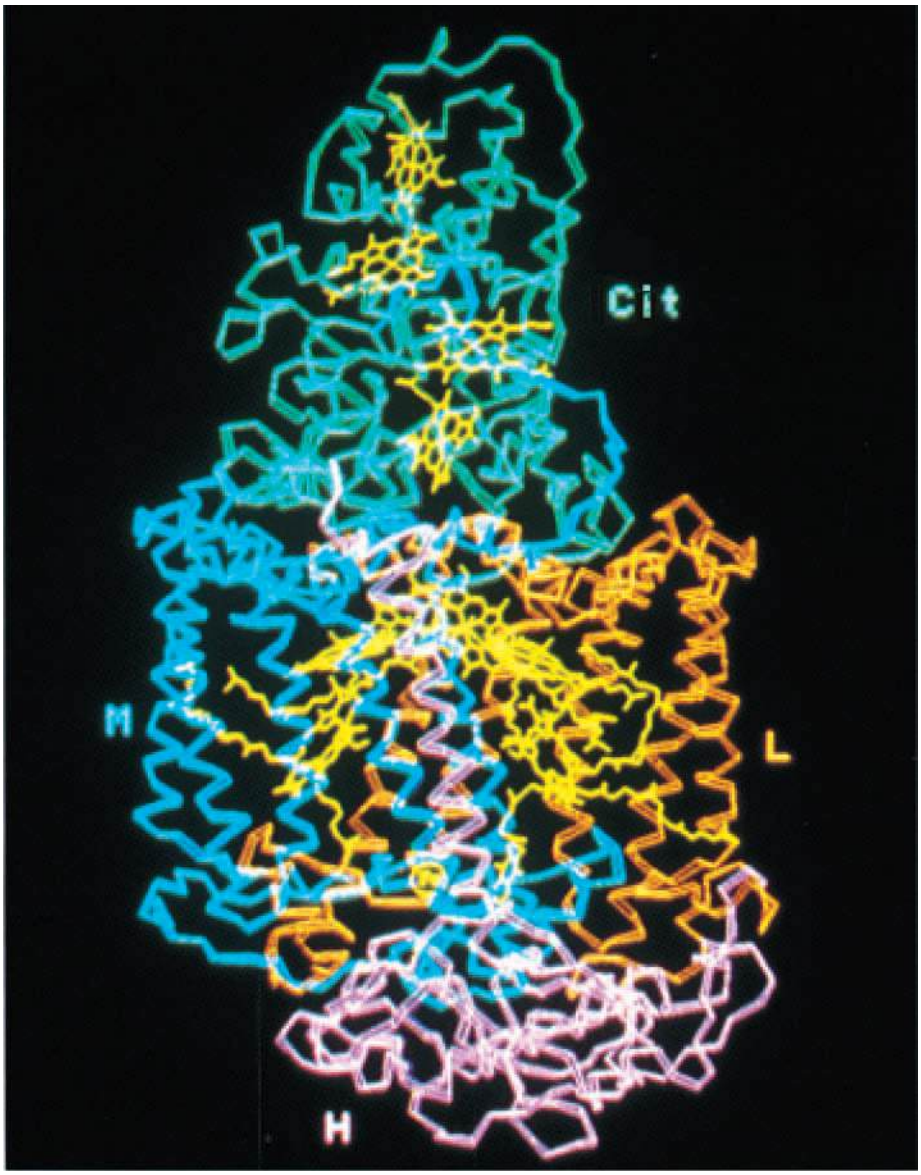


FIGURA **17.18**

Modelo de un complejo centro de reacción bacteriano. Este modelo del complejo enzimático que contiene el centro de reacción de la bacteria fotosintética *Rhodobacter viridis* se dedujo a partir de las medidas de difracción de rayos X. El citocromo (verde) que lleva cuatro grupos hemo (amarillo) se encuentra en el espacio periplásmico, entre las membranas interna y externa de la bacteria. Las subunidades M y L, cada una con cinco hélices α transmembrana, se extienden de lado a lado de la membrana. Estas subunidades llevan cuatro bacterioclorofilas, dos bacteriofeofitinas, dos quinonas y un átomo de hierro, todos ellos implicados en la captación de fotones y la transferencia electrónica. Dos de las bacterioclorofilas constituyen el centro de reacción. La subunidad H se encuentra en su mayor parte sobre el lado citosólico de la membrana, aunque tiene una hélice α que se extiende de lado a lado de la membrana.

Cortesía de H. Michel y J. Deisenhofer, Max Planck Institut für Biochemie, Munich.

luz es máxima en el infrarrojo próximo, a aproximadamente 870 nm, por lo que este centro se denomina P870.

Químicamente, el complejo del centro de *Rhodobacter* se parece mucho al fotosistema II de las plantas, teniendo en cuenta que contiene feofitinas (bacteriofeofitina o BPh) y quinonas. Los estudios realizados sobre la cinética de las reacciones en centros aislados han permitido determinar la ruta de los electrones (Figura 17.19). La excitación del centro de reacción conduce muy rápidamente (en aproximadamente 10^{-12} s) a la transferencia de un electrón a una de las dos feofitinas. El electrón pasa luego a Q_A y después a Q_B. Normalmente, estas quinonas están unidas en el complejo, pero al recibir un segundo electrón (y dos protones), Q_B se disocia. Se cree que QH_2 se desplaza entonces y reduce el complejo citocromo bc_1 (bastante parecido al complejo b_6f). El electrón vuelve desde el complejo bc_1 al centro de reacción a través de los citocromos en el complejo centro de reacción.

Obsérvese que el resultado neto de este flujo electrónico cíclico es bombear protones desde el citosol bacteriano al espacio periplásmico. Los citosoles de es-

Algunas bacterias fotosintéticas utilizan un fotosistema que genera ATP de una forma análoga a la del fotosistema II.

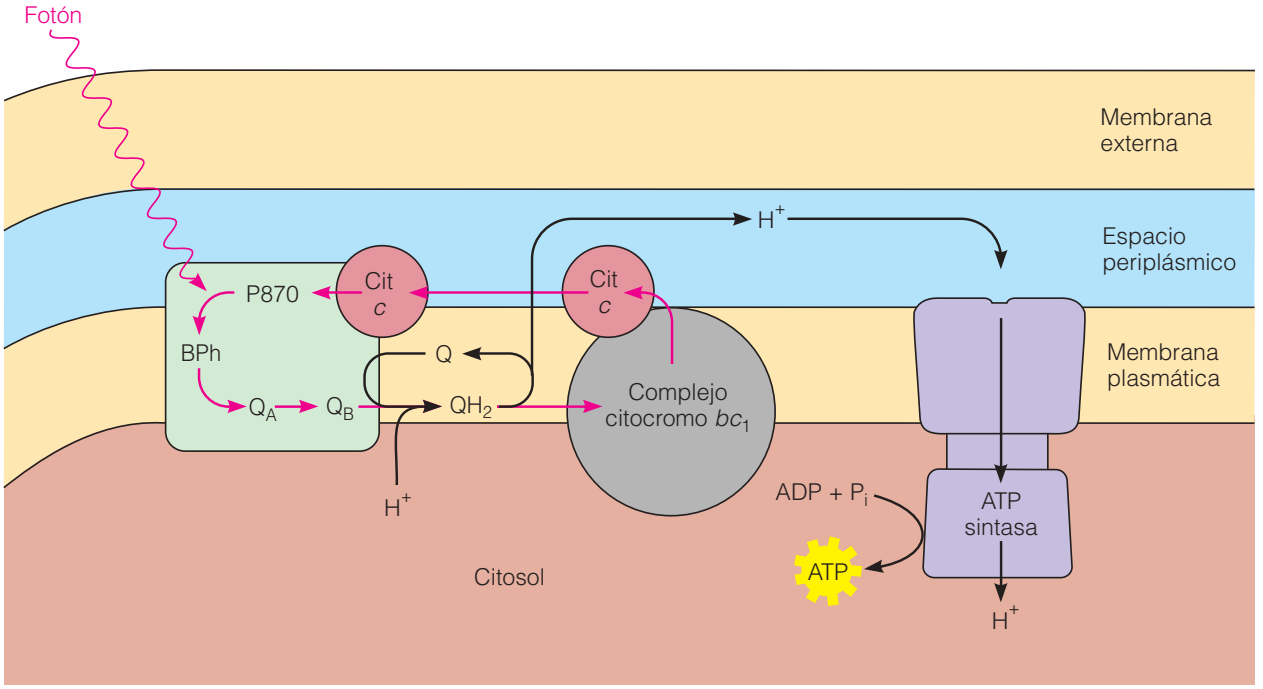


FIGURA **17.19**

Mecanismo propuesto para la fotosíntesis bacteriana. Este proceso se parece algo a las reacciones luminosas que se producen en el tilacoide (véase la Figura 17.15), con un centro de reacción y un complejo citocromo unido a la membrana. Sin embargo, sólo hay un tipo de centro de reacción, y no se fragmenta agua ni se reduce directamente el $NADP^+$.

tas bacterias se hacen muy alcalinos a medida que continúa la fotosíntesis. La vuelta de los protones se realiza a través de complejos ATP sintasa, con la generación de ATP. El flujo electrónico cíclico en estas bacterias debe diferenciarse bien del flujo cíclico que puede producirse a través del fotosistema I en las plantas. El sistema bacteriano es, en cuanto a sus transportadores electrónicos, mucho más parecido al fotosistema II. Aunque en este caso no se ha generado poder reductor directamente por la reacción luminosa, estas bacterias pueden realizar reacciones oscuras de la fotosíntesis utilizando la energía del ATP para transferir electrones desde diversos sustratos al $NADP^+$.

FOTOSÍNTESIS ARTIFICIAL

El gran incentivo para diseñar nuevas fuentes de energía que sean seguras para el medio ambiente ha llevado a varios científicos a intentar imitar a las plantas fotosintetizadoras que son los convertidores de energía solar más eficaces que se conocen. Aunque pueden capturar protones muchos tipos de moléculas, en la mayor parte de los casos, la energía simplemente se degrada a calor a bajas temperaturas y no puede producir un trabajo utilizable. La argucia es producir, mediante la captura de la radiación, un estado excitado de larga duración que pueda acoplarse al proceso deseado de ahorro energético. Recientemente, se ha descubierto que los compuestos en los que se encuentra emparedado de forma covalente un pigmento de porfirina entre un carotenoide y una quinona pueden excitarse fotoquímicamente a un estado dirradical de larga duración, con la transferencia electrónica desde el carotenoide a la quinona:

$$C\text{—}P\text{—}Q \xrightarrow{h\nu} C^+\text{—}P\text{—}Q^-$$

Cuando estas moléculas se colocan en vesículas membranosas lipídicas, junto con una quinona liposoluble, la irradiación con luz visible hace que se bombeen los protones desde fuera de las vesículas al interior. Si las membranas contienen

también el complejo ATP sintasa, se sintetizará ATP. Este sistema es análogo a los sistemas fotosintéticos que hemos descrito que se encuentran en plantas, algas y bacterias fotosintetizadoras.

Se han desarrollado o propuesto una amplia variedad de otros sistemas modelo, en un campo que avanza con gran rapidez. Es muy probable que una fuente principal de energía en el futuro será la que se base en lo que la naturaleza diseñó hace varios millardos de años.

Reacciones oscuras: ciclo de Calvin

Las reacciones oscuras se producen en el estroma del cloroplasto. Su función es la de fijar el dióxido de carbono atmosférico en los hidratos de carbono, utilizando la energía del ATP y el poder reductor (NADPH) generados en las reacciones luminosas. Como se ha señalado antes, las reacciones oscuras pueden producirse sin luz, pero se aceleran en presencia de luz.

La fijación del dióxido de carbono se realiza mediante la adición de un CO_2 cada vez a una molécula aceptora y el paso de la molécula a través de una serie cíclica de reacciones que se muestran esquemáticamente en la Figura 17.20. Al conjunto de la serie se le denomina **ciclo de Calvin**, en honor del bioquímico norteamericano Melvin Calvin, que en 1961 recibió el Premio Nobel por su trabajo en este campo. El ciclo da lugar a la formación de hexosas y a la regeneración de la molécula aceptora. El ciclo de Calvin puede contemplarse como formado por dos fases. En la fase I, el dióxido de carbono se atrapa en forma de carboxilato y se reduce al nivel de aldehído-cetona que se encuentra en los azúcares, con lo que se produce una síntesis neta de hidratos de carbono. La fase II está dedicada a la regeneración de la molécula aceptora. Examinaremos cada fase de forma consecutiva.

El ciclo de Calvin utiliza el ATP y el NADPH generados en las reacciones luminosas para fijar el CO_2 atmosférico en hidratos de carbono.

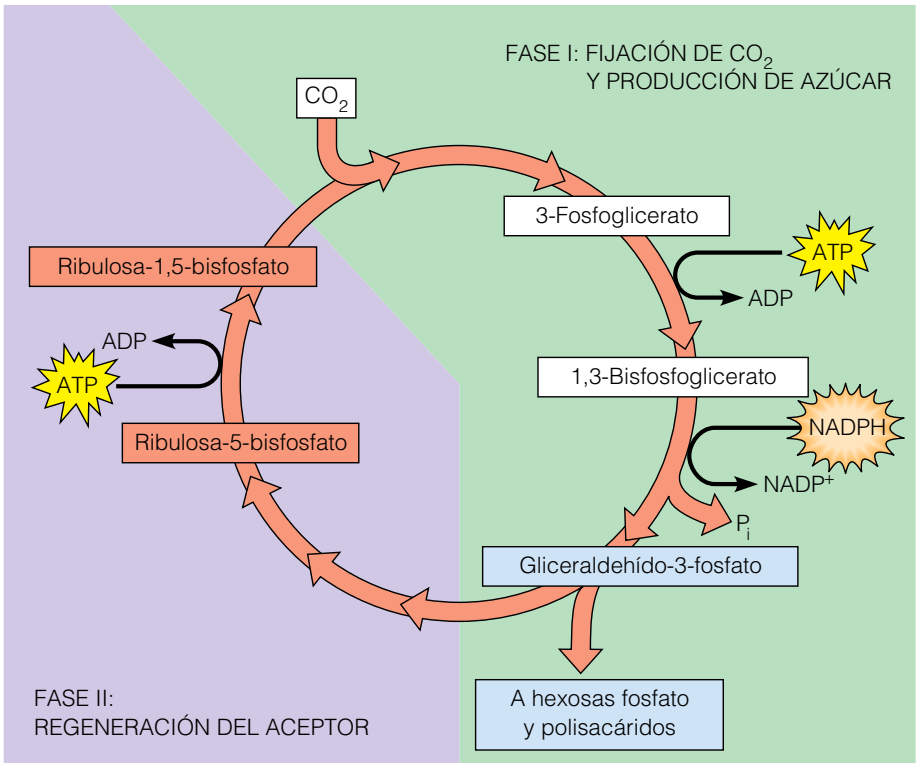


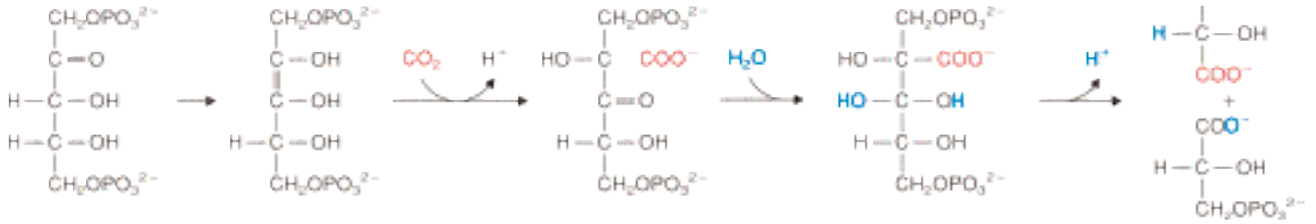
FIGURA **17.20**

Perspectiva esquemática del ciclo de Calvin. El ciclo puede dividirse en dos fases. En la fase I, se fija el CO_2 y se produce gliceraldehído-3-fosfato. Parte de este G3P se utiliza para la formación de hexosas fosfato y finalmente polisacáridos. Otra fracción del G3P se utiliza en la fase II para regenerar la molécula aceptora, la ribulosa-1,5-bisfosfato.

FASE I: FIJACIÓN DEL DIÓXIDO DE CARBONO Y PRODUCCIÓN DE AZÚCAR

Incorporación del CO_2 en un azúcar de tres carbonos

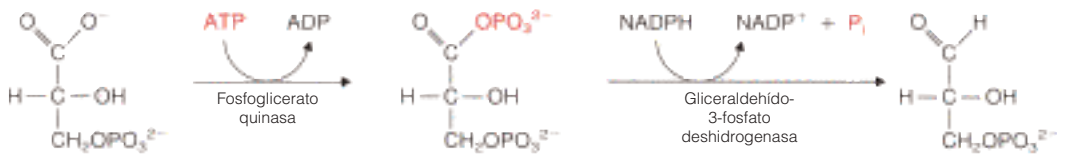
El dióxido de carbono se incorpora al gliceraldehído-3-fosfato (G3P) a través de los intermediarios que se indican en la Figura 17.20. La molécula aceptora del CO_2 es la **ribulosa-1,5-bisfosfato** (**RuBP**). El dióxido de carbono del aire difunde hacia el interior del estroma del cloroplasto, en donde se añade al carbono carbonilo de la RuBP. La reacción la cataliza la enzima **ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa**, también denominada ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (o **rubisco**). Esta enzima es una de las más importantes de la biosfera y ciertamente la más abundante. Constituye hasta un 15% del total de proteínas de los cloroplastos y se ha calculado que en el mundo existen unos 40 millones de toneladas de la misma (unos 10 kilogramos por cada persona viva). Como indica su nombre completo, la enzima tiene también una actividad alternativa de oxigenasa. Veremos la importancia de esta otra actividad más adelante. Por el momento, nos centraremos en su función de fijación de CO_2 (carboxilasa). El verdadero sustrato es el intermediario enediol de cinco carbonos:



El ciclo de Calvin tiene dos fases. Primero, se fija el CO_2 mediante la adición a la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) y se forman hexosas. En la segunda fase, se regenera la RuBP.

El intermediario enediol se carboxila y el producto se hidrata y luego se fragmenta produciendo dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3PG). La reacción es básicamente irreversible, con un valor de $\Delta G^{\circ} = -51.9$ kJ/mol. En este punto, el CO_2 ha quedado fijado ya a un hidrato de carbono. El resto de las reacciones del ciclo de Calvin están dedicadas a producir hexosas a partir de la triosa y a regenerar la RuBP.

Cada molécula de 3PG se fosforila por el ATP, en una reacción catalizada por la *fosfoglicerato quinasa*. El 1,3-bisfosfoglicerato así producido se reduce luego a gliceraldehído-3-fosfato (G3P), con la pérdida asociada de un fosfato. El agente reductor es el NADPH, producido en la reacción luminosa, y la reacción la cataliza la enzima *gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa*:



Hemos encontrado enzimas similares anteriormente, en relación con su función en la glucólisis (véase el Capítulo 13).

En esta fase del ciclo, una molécula de CO_2 ha quedado fijada ya en un monosacárido simple (de tres carbonos). Resulta útil señalar los requerimientos de ATP y NADPH hasta este punto. Por cada molécula de CO_2 que ha pa-

sado por estos pasos, se han hidrolizado dos moléculas de ATP y se han oxidado dos moléculas de NADPH. Sin embargo, resulta más adecuado realizar los cálculos en función de la cantidad de glucosa, porque queremos ver qué debe suceder para generar una molécula de hexosa a partir de CO_2. En la Figura 17.21 se muestra una representación esquemática de la estequiometría de todo el ciclo de Calvin. Deben entrar seis moléculas de CO_2 en el ciclo para proporcionar los seis carbonos necesarios para cada nueva molécula de hexosa producida. Eso requerirá la formación de 12 G3P y, por tanto, serán necesarios 12 ATP y 12 NADPH.

En este punto la ruta se divide en dos, para cumplir los dos objetivos esenciales: formar hexosas y regenerar el aceptor. De las 12 moléculas de G3P que se han producido, 2 se utilizarán para formar una molécula de hexosa. Las 10 restantes se emplearán para regenerar las 6 moléculas de ribulosa bisfosfato que son necesarias para mantener el ciclo. Es decir, 10 moléculas de tres carbonos se convertirán en 6 moléculas de cinco carbonos.

Formación de hexosas

Consideremos en primer lugar la formación de hexosas. Este tema nos resulta ya familiar, puesto que sigue una parte de la ruta de la gluconeogénesis que se ha descrito en el Capítulo 16. Las reacciones se presentan esquemáticamente en la Figura 17.21. Recuérdese que el gliceraldehído-3-fosfato puede isomerizarse a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) por la triosa fosfato isomerasa (páginas 414-416). Así pues, las 12 moléculas de G3P producidas pueden considerarse una reserva interconvertible de G3P y DHAP. Una molécula de G3P y una molécula de DHAP pueden combinarse, mediante la acción de la enzima *fructosa bisfosfato aldolasa*, para dar la fructosa-1,6-bisfosfato (FBP). Como se indica en la Figura 17.21, 6 de las moléculas de G3P siguen esta ruta, para dar 3 molécu-

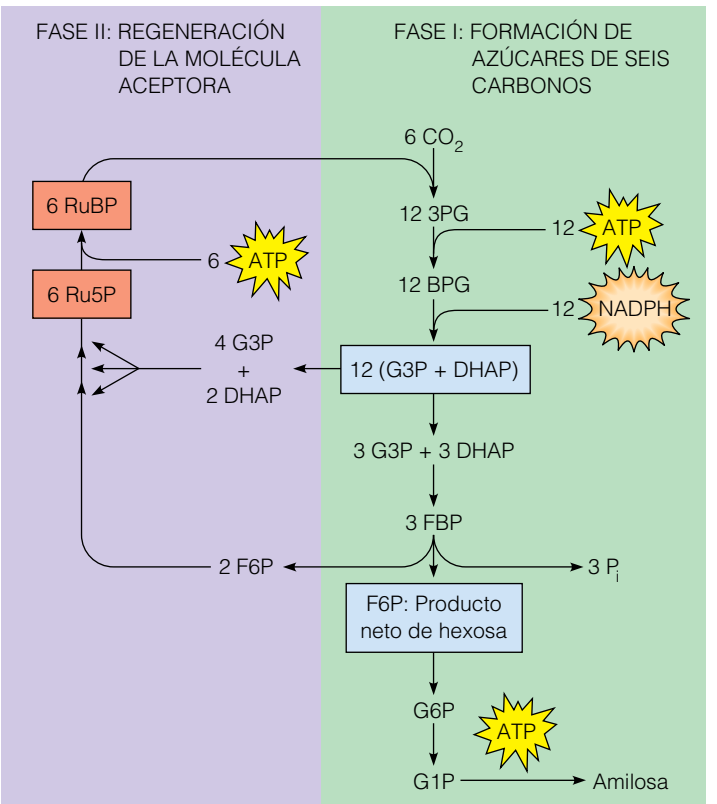


FIGURA **17.21**

Estequiometría del ciclo de Calvin. En seis vueltas del ciclo de Calvin, seis moléculas de CO_2 habrán entrado en el mismo y se habrán unido a seis moléculas de ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) para producir 12 moléculas de gliceraldehído-3-fosfato (G3P). Dado que el G3P está en equilibrio isomérico con la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), los 12 G3P pueden considerarse una reserva interconvertible de 12 moléculas de (G3P + DHAP). Seis de estas moléculas se utilizan para producir tres moléculas de fructosa-1,6-bisfosfato (FBP), de las que *una* constituye el producto neto de hexosa de las seis vueltas. Las otras dos FBP se utilizan, junto con las seis moléculas restantes de (G3P + DHAP), para formar seis moléculas de ribulosa-5-fosfato (Ru5P), que se fosforilan a continuación para regenerar las seis moléculas de RuBP necesarias.

las de FBP. La FBP se desfosforila para producir tres moléculas de fructosa-6-fosfato (F6P). Dos de ellas se utilizarán en la ruta de regeneración, pero una podría utilizarse como producto neto del ciclo de Calvin; esta molécula se isomeriza entonces a glucosa-6-fosfato (G6P) y finalmente a glucosa-1-fosfato (G1P).

En los animales y en las plantas, la glucosa-1-fosfato es el precursor de la formación de oligosacáridos y polisacáridos. La formación del almidón de las plantas (amilosa) sigue un camino similar al que se utiliza en los animales para la síntesis de glucógeno. Sin embargo, en vez de utilizar UTP para activar el monómero de glucosa, como ocurre en la formación del glucógeno, se emplea ATP en la polimerización de la amilosa:

$$\text{Glucosa-1-fosfato} + \text{ATP} \longrightarrow \text{ADP-glucosa} + PP_i$$

$$\text{ADP-glucosa} + (\text{glucosa})_n \longrightarrow (\text{glucosa})_{n+1} + \text{ADP}$$

La amilosa, que no es muy soluble, es un hidrato de carbono de almacenamiento. Sin embargo, gran parte del sacárido sintetizado en las hojas de las plantas se exporta a otras partes de la planta, la mayoría en forma de sacarosa. La sacarosa se sintetiza en el citosol de las hojas de las plantas mediante la siguiente secuencia de reacciones:

$$\text{UTP} + \text{glucosa-1-P} \longrightarrow \text{UDP-glucosa} + PP_i$$

$$\text{UDP-glucosa} + \text{fructosa-6-P} \longrightarrow \text{UDP} + \text{sacarosa-6-P}$$

$$\text{Sacarosa-6-P} + H_2O \longrightarrow \text{sacarosa} + P_i$$

La UDP producida se convierte posteriormente en UTP mediante la transferencia de fosfato desde el ATP.

FASE II: REGENERACIÓN DEL ACEPTOR

Las reacciones que hemos considerado hasta este punto pueden explicar la introducción de un carbono en una molécula de hexosa, con la posterior formación de oligosacáridos y polisacáridos. Pero para completar el ciclo de Calvin, es necesario regenerar ribulosa-1,5-bisfosfato suficiente que mantenga en funcionamiento el ciclo. Esto significa que necesitaremos regenerar 6 moles de RuBP por cada 6 moles de CO_2 capturado. Esto se consigue mediante el conjunto de reacciones que se muestran en la Figura 17.22, que constituyen la fase regenerativa del ciclo que se presenta esquemáticamente en las Figuras 17.20 y 17.21. Obsérvese que las moléculas de *entrada* en esta ruta de reacción algo compleja son las siguientes:

1. Dos moléculas de DHAP y cuatro moléculas de G3P procedentes de los seis G3P que se han derivado a la ruta de regeneración de la Figura 17.21.
2. Dos de las tres moléculas de fructosa-6-fosfato que se han producido a partir de los tres G3P y tres DHAP restantes.

Para formar moléculas de cinco carbonos a partir de moléculas de seis carbonos y de tres carbonos, son necesarios varios reordenamientos. Ello se consigue mediante *transcetolasas* y *transaldolasas*. En el Capítulo 9 se indicaron las estructuras de los azúcares que intervienen en estas reacciones. Lo que tiene importancia aquí es la forma en que se han reordenado y recombinado las dos hexosas y las seis triosas para formar seis pentosas.

El paso final de la regeneración de la ribulosa-1,5-bisfosfato es una fosforilación, catalizada por la enzima *ribulosa-5-fosfato quinasa* con el empleo de ATP. Para seis vueltas del ciclo, este paso requerirá 6 ATP además de los 12 ya

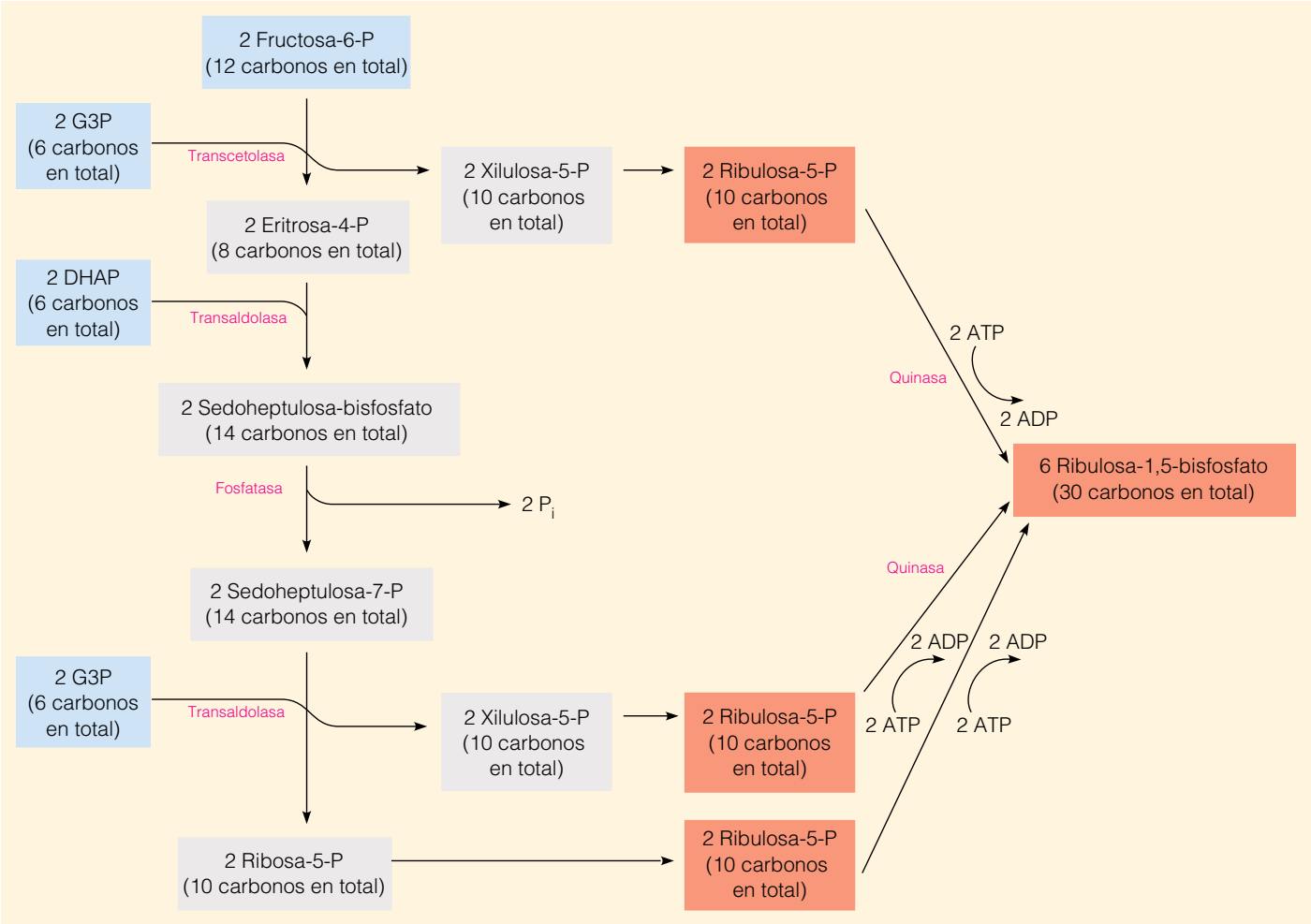


FIGURA **17.22**

Fase de regeneración del ciclo de Calvin. La estequiometría aquí sigue la de la Figura 17.21. Las dos moléculas de fructosa-6-fosfato que entran en la parte superior se combinan con cuatro moléculas de G3P y dos moléculas de DHAP para producir las seis moléculas necesarias de ribulosa-5-fosfato. Éstas se fosforilan a continuación para producir la RuBP necesaria. Obsérvese la semejanza de esta ruta con partes de la ruta de las pentosas fosfato que transcurre en sentido inverso (véase la Figura 14.22, página 571).

considerados. Por lo tanto, las necesidades para la síntesis de 1 mol de hexosa a partir de CO_2 son de 12 moles de NADPH y 18 moles de ATP. La reacción oscura global puede escribirse de la siguiente forma:

$$6CO_2 + 18ATP + 12NADPH + 12H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 18ADP + 18P_i + 12NADP^+ + 6H^+$$

Resumen de las reacciones luminosa y oscura en la fotosíntesis de dos sistemas

REACCIÓN GLOBAL Y EFICACIA DE LA FOTOSÍNTESIS

El ATP y el NADPH necesarios para las reacciones oscuras se liberan al estroma por las reacciones luminosas de la fotosíntesis. Si recordamos que son necesarios dos protones por cada electrón que pasa a través de los fotosistemas I y II, y que son necesarios dos electrones para reducir cada $NADP^+$, podemos deducir que son precisos cuatro fotones para la producción de cada molécula de NADPH. Esto corresponde a ocho fotones por O_2, cifra que concuerda con la eficacia cuántica observada experimentalmente cuando actúan los dos fotosistemas, que es de aproximadamente 0.12 O_2 por fotón. Para los 12 NADPH necesarios en la reacción oscura, como se resume en la sección anterior, deben absorberse 48 fotones. Si suponemos que estos fotones bombearán también los protones

suficientes a través de la membrana tilacoide para producir los 18 ATP precisos, podemos establecer una aproximación de las reacciones luminosas de la siguiente forma

$$12NADP^+ + 18ADP + 18P_i + 6H^+ \xrightarrow{48\ \text{fotones}} 6O_2 + 12NADPH + 18ATP + 6H_2O$$

Esta ecuación difiere de la tercera ecuación de la página 681 porque ahora incluimos la generación de ATP a partir del gradiente protónico. Sumando esta ecuación para la reacción luminosa a la reacción oscura global, obtenemos

$$6H_2O + 6CO_2 \xrightarrow{48\ \text{fotones}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

La eficacia energética global de la fotosíntesis puede aproximarse al 35%.

Este cálculo de 48 fotones supone que la fotofosforilación no cíclica proporciona la cantidad de ATP suficiente para las reacciones oscuras. Si, como consideran muchos investigadores en este campo, es necesario ATP adicional procedente de la fotofosforilación cíclica, el número de fotones necesarios será superior.

Mediante estos cálculos podemos estimar la eficacia energética de la fotosíntesis. La formación de un mol de hexosa a partir de CO_2 y agua requiere, como hemos visto, 2870 kJ. La entrada de energía por fotón depende de la longitud de onda de la luz utilizada. Suponiendo que se emplee una luz de una longitud de onda de 650 nm, 48 einstein de esa luz corresponden a unos 8000 kJ (véase la Figura 17.6). A partir de esta cifra, podemos calcular una eficacia teórica de aproximadamente un 35%. Las medidas experimentales directas de la eficacia en condiciones óptimas dan resultados del mismo orden o ligeramente inferiores. Con un nivel de iluminación superior, cuando no todos los fotones absorbidos por los cloroplastos pueden utilizarse para la excitación del centro de reacción, la eficacia es mucho menor.

REGULACIÓN DE LA FOTOSÍNTESIS

Las reacciones oscuras fotosintéticas se regulan por la cantidad de luz de que dispone el organismo.

Es evidente, pues, que las denominadas reacciones oscuras de la fotosíntesis, que dan lugar a la producción de azúcares, requieren una regulación cuidadosa. Dado que la reacción oscura depende del poder reductor y del ATP que suministran las reacciones luminosas, no es de extrañar que sean estimuladas por las reacciones luminosas. Existen dos formas importantes mediante las que se realiza esta estimulación. Una enzima central de las reacciones oscuras, la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa, se estimula por un pH elevado y por el CO_2 y el Mg^{2+}. El bombeo de protones desde el estroma a la luz del tilacoide por las reacciones luminosas aumenta el pH del estroma; al mismo tiempo, entran en el estroma iones Mg^{2+} para compensar la carga positiva de los iones H^+ que se han perdido. Experimentos recientes han indicado que existen también rutas con una dependencia directa de la luz para la estimulación de esta enzima.

Otras tres enzimas del ciclo de Calvin se activan de manera específica por otro mecanismo dependiente de la luz. Se trata de la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa (la fosfatasa que se muestra en la Figura 17.22), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (véase la página 689) y la ribulosa-5-fosfato quinasa (véase la Figura 17.22). Esta activación depende de una reducción de disulfuros a sulfhidrilos en las enzimas, que se fomenta por una reacción de intercambio de disulfuro con la proteína *tiorredoxina* (Figura 17.23). La tiorredoxina, una proteína pequeña que lleva dos grupos —SH oxidables de manera reversible, se utiliza en una amplia gama de reacciones redox (véase la página 909). La reducción de la tiorredoxina se fomenta, a su vez, por la oxidación de la forma reducida de

la ferredoxina a través de una reacción catalizada por la enzima *ferredoxina-tiorredoxina reductasa*. En los cloroplastos fuertemente irradiados, en los que las reservas de $NADP^+$ están agotadas, se acumula la ferredoxina reducida. Las concentraciones elevadas de ferredoxina reducida producen pues una activación de las enzimas del ciclo de Calvin, estimulando las reacciones de este ciclo cuando las reacciones luminosas son muy activas. El mismo compuesto, la tiorredoxina reducida, estimula también los complejos CF_0-CF_1, garantizando una elevada generación de ATP cuando la iluminación es intensa.

En la oscuridad, la planta "se convierte en un animal" en términos de su bioquímica. Aunque las reacciones oscuras de la fotosíntesis pueden continuar durante un cierto tiempo, utilizando el ATP y el NADPH fotosintetizados, en última instancia la planta deberá empezar a utilizar sus reservas energéticas, con el uso de rutas que conocemos ya de nuestro estudio del catabolismo animal: glucólisis, ciclo del ácido cítrico y ruta de las pentosas fosfato. En general, estas rutas están inhibidas en las plantas en presencia de la luz solar y pasan a ser más activas en la oscuridad. Las enzimas clave inhibidas por la luz son la fosfofructoquinasa (en la glucólisis) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (en la ruta de las pentosas fosfato). Esta última se desactiva por la misma forma reducida de la tiorredoxina que *activa* las enzimas del ciclo de Calvin.

Por último, debe indicarse que actualmente hay pruebas de la regulación de los genes de los cloroplastos a nivel de la transcripción. La sacarosa y la glucosa pueden actuar como represores.

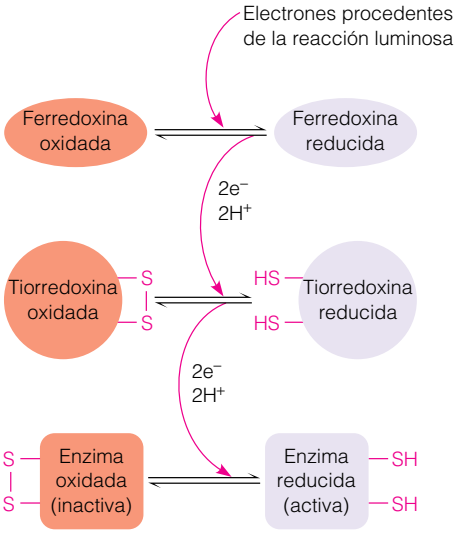
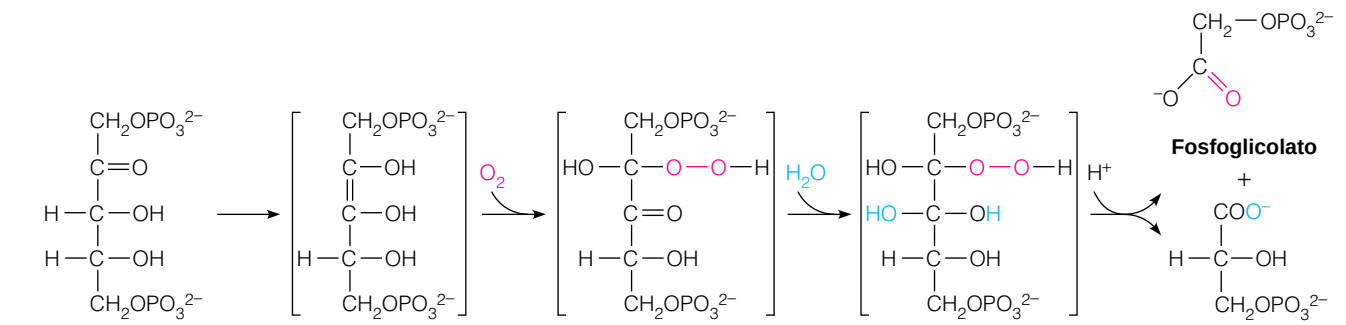


FIGURA **17.23**

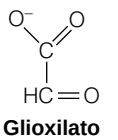
Activación, dependiente de la luz, de las enzimas de la reacción oscura. Algunas enzimas del ciclo de Calvin se activan por la reducción disulfuro, que se produce mediante la tiorredoxina reducida. La tiorredoxina se reduce por la ferredoxina reducida, que se acumula en los cloroplastos irradiados. La activación a través de la tiorredoxina y otros mecanismos dependientes de la luz hacen que la reacción oscura se acelere en presencia de luz. En el Capítulo 22 se presentarán otras funciones adicionales de la tiorredoxina.

Fotorrespiración y ciclo C_4

La ribulosa bisfosfato carboxilasa es una enzima peculiar. En unas condiciones ambientales poco habituales, puede comportarse como una *oxigenasa* en vez de como una carboxilasa:



Esta reacción se produce fundamentalmente en condiciones de concentración de O_2 elevada y concentración de CO_2 baja, puesto que la K_M para el O_2 es aproximadamente 10 veces superior a la del CO_2. Cuando la reacción de la oxigenasa se hace significativa, inicia una ruta de reacción denominada **fotorrespiración**, con la producción en el cloroplasto de 3-fosfoglicerato y *fosfoglicolato*. Como se indica en la Figura 17.24, el fosfoglicolato se desfosforila a continuación y pasa a unos orgánulos denominados **peroxisomas**. Allí, se oxida de nuevo y da lugar a peróxido de hidrógeno y glioxilato. El H_2O_2 tóxico se degrada por la catalasa y el glioxilato se amida, produciendo glicina. La glicina entra en las mitocondrias, en donde *dos* moléculas se convierten en *una* molécu-



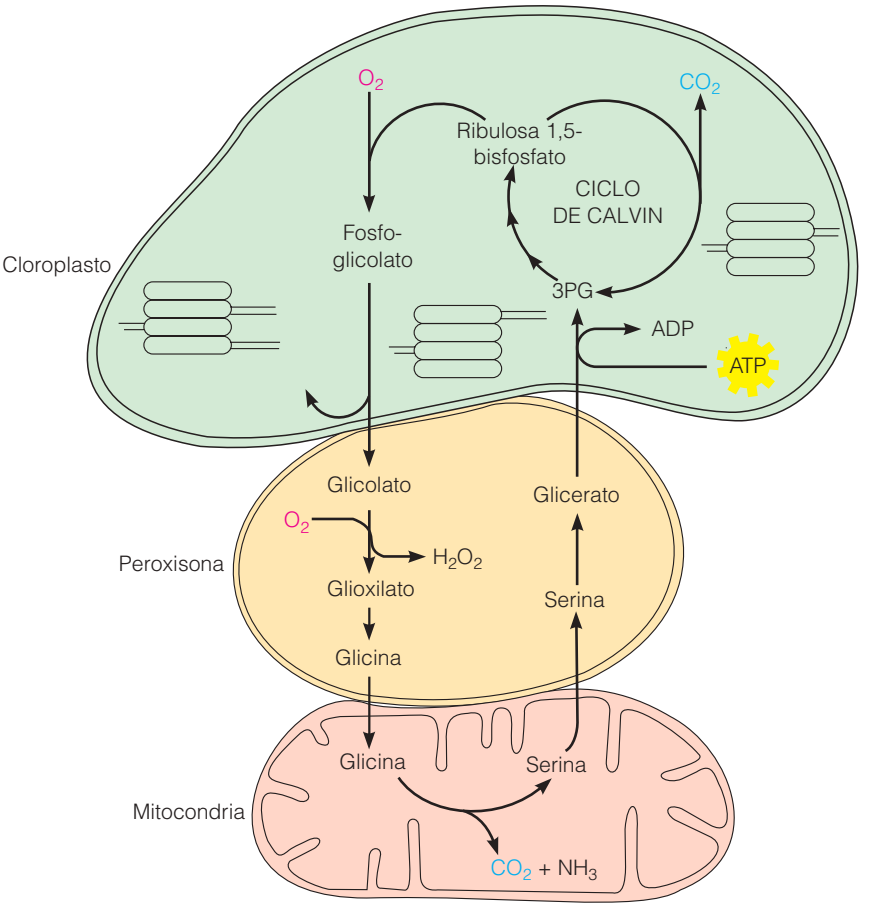


FIGURA **17.24**

Fotorrespiración. La ribulosa-1,5-bisfosfato puede desviarse del ciclo de Calvin, en especial cuando la concentración de CO_2 es baja. La RuBP carboxilasa/oxigenasa cataliza la oxidación de la RuBP para formar fosfoglicolato. En las reacciones que siguen, se utiliza más O_2, se genera CO_2 y se hidroliza ATP, a medida que los metabolitos pasan desde el cloroplasto a los peroxisomas y las mitocondrias próximas y luego vuelven al cloroplasto.

En condiciones de CO_2 bajo y de O_2 alto, las plantas presentan fotorrespiración, en la que se consume O_2 y se libera CO_2.

la de serina y una molécula de CO_2 y otra de NH_3. Este proceso que implica al sistema multiproteico de rotura de glicina, se describirá con detalle en el Capítulo 20. Los gases, CO_2 y amoníaco, se liberan. La serina vuelve al peroxisoma, en donde una serie de reacciones la convierten en glicerato. Al volver al cloroplasto, el glicerato se refosforila (con el uso de ATP) para producir 3-fosfoglicerato.

Sea cual sea la perspectiva desde la que se analice, la fotorrespiración parece ser un proceso con pérdidas. Obsérvese lo siguiente:

1. Se pierde ribulosa-1,5-bisfosfato en el ciclo de Calvin.
2. La fijación de CO_2 se invierte: se consume O_2 y se libera CO_2.
3. Sólo una parte del carbono vuelve al cloroplasto.
4. Se gasta ATP de forma innecesaria.

Resulta difícil apreciar una función útil para la fotorrespiración. Básicamente va en contra del proceso completo de la fotosíntesis, deshaciendo lo que se ha conseguido con ésta. El hecho de que la fotorrespiración se hace importante sólo en condiciones en las que la concentración de CO_2 es muy baja (como en las plantas expuestas a niveles elevados de iluminación de forma que consumen la mayor parte del CO_2 de los alrededores) sugiere una explicación posible. La fotosíntesis continuada en estas condiciones conduciría a la producción de especies de oxígeno reactivas como O_2^- (Capítulo 15), que pueden producir daño celular. En estas circunstancias, la fotorrespiración disminuirá la concentración de oxígeno e inhibirá las reacciones luminosas. A favor de esta idea están los experimentos recientes en los que se modificó mediante ingeniería genética la capacidad de las plantas de tabaco para llevar a cabo la fotorrespiración. Los in-

vestigadores observaron que el proceso que limita la velocidad en la fotorrespiración era la utilización del amoníaco generado (Figura 17.24), por lo que construyeron plantas que producían niveles superiores o inferiores de la enzima glutamina sintetasa, que combina el amoníaco con el glutamato para dar glutamina (véanse las páginas 800-803). Las que tenían niveles elevados (y, por lo tanto, una fotorrespiración eficaz) toleraban la intensidad luminosa elevada con menos daño para las hojas que el tipo silvestre, mientras que las que eran deficitarias de la fotorrespiración eran más sensibles.

A pesar de estas desventajas potenciales en circunstancias adversas, permanece el hecho de que en condiciones normales la existencia de la fotorrespiración disminuye la eficacia de la mayoría de las plantas. En consecuencia, en los últimos años, muchas investigaciones se han dedicado a intentar reducir los niveles de fotorrespiración en las plantas de cultivo. Hasta la fecha, los éxitos han sido muy limitados.

Algunas plantas han establecido su propio sistema de abordar el problema. Cabría prever que lo hubieran hecho mediante una modificación de la enzima ribulosa bisfosfato carboxilasa/oxigenasa para suprimir la función oxigenasa. Sorprendentemente no ha sido así. La enzima, a pesar (o tal vez a causa) de su importancia vital, ha cambiado poco a lo largo del tiempo. Continúa siendo un catalizador relativamente ineficaz (con una $k_{cat} \cong 2\ s^{-1}$) y no ha perdido nunca su función oxigenasa. En vez de modificar la enzima, algunas plantas, denominadas **plantas C_4**, han establecido a lo largo de la evolución una ruta fotosintética adicional que ayuda a conservar el CO_2 liberado por la fotorrespiración. Esta ruta se denomina **ciclo C_4** porque comporta la incorporación de CO_2 a un intermediario C_4 (oxalacetato). Este ciclo se diferencia del ciclo de Calvin, que utiliza un producto intermedio de tres carbonos, y al que se denomina, por tanto, a veces ciclo C_3. El ciclo C_4 se encuentra en varias especies cultivadas (por ejemplo, maíz y caña de azúcar) y es importante en las plantas tropicales que están expuestas a una luz solar intensa y a temperaturas elevadas. Aunque la fotorrespiración se produce en cierto grado y en todo momento en la totalidad de las plantas, es más activa en condiciones de gran iluminación, temperatura alta y agotamiento de CO_2.

Algunas plantas (C_4) reducen al mínimo las pérdidas inútiles de la fotorrespiración mediante el empleo de una alternativa al ciclo de Calvin.

Las plantas C_4 concentran su fotosíntesis del ciclo de Calvin (C_3) en *células de fundas de haces* especializadas, que están situadas debajo de una capa de células mesófilas (Figura 17.25). En cambio, estas últimas células, que están expuestas más directamente al CO_2 externo, contienen las enzimas del ciclo C_4. Esta ruta, que actúa en la mayor parte de las plantas C_4, se muestra en la Figura 17.26. Es básicamente un mecanismo para atrapar CO_2 en el compuesto de cuatro carbonos oxalacetato, y trasmitirlo a las células de fundas de haces para su uso en el ciclo de Calvin (C_3).

La clave de la eficacia de las plantas C_4 está en que la enzima de fijación de CO_2 utilizada en esta ruta, la *fosfoenolpiruvato carboxilasa*, carece de la actividad oxigenasa que presenta la ribulosa bisfosfato carboxilasa, y tiene una K_M mucho más baja para el CO_2. Así pues, incluso en condiciones de concentración de O_2 elevada y concentración de CO_2 baja, las células mesófilas continúan bombeando CO_2 hacia las células de fundas de haces que realizan la fotosíntesis. Este proceso ayuda a mantener unas concentraciones de CO_2 suficientemente elevadas en las células de fundas de haces, de tal manera que se favorece la fijación y no la fotorrespiración. Además, si *se produce* la fotorrespiración, el CO_2 que se libera en el proceso puede recuperarse en gran parte en las células mesófilas circundantes y devolverse al ciclo de Calvin.

Como se indica en la Figura 17.26, el ciclo C_4 representa para la planta un coste de energía en forma de ATP. De hecho, puesto que el ATP se hidroliza a

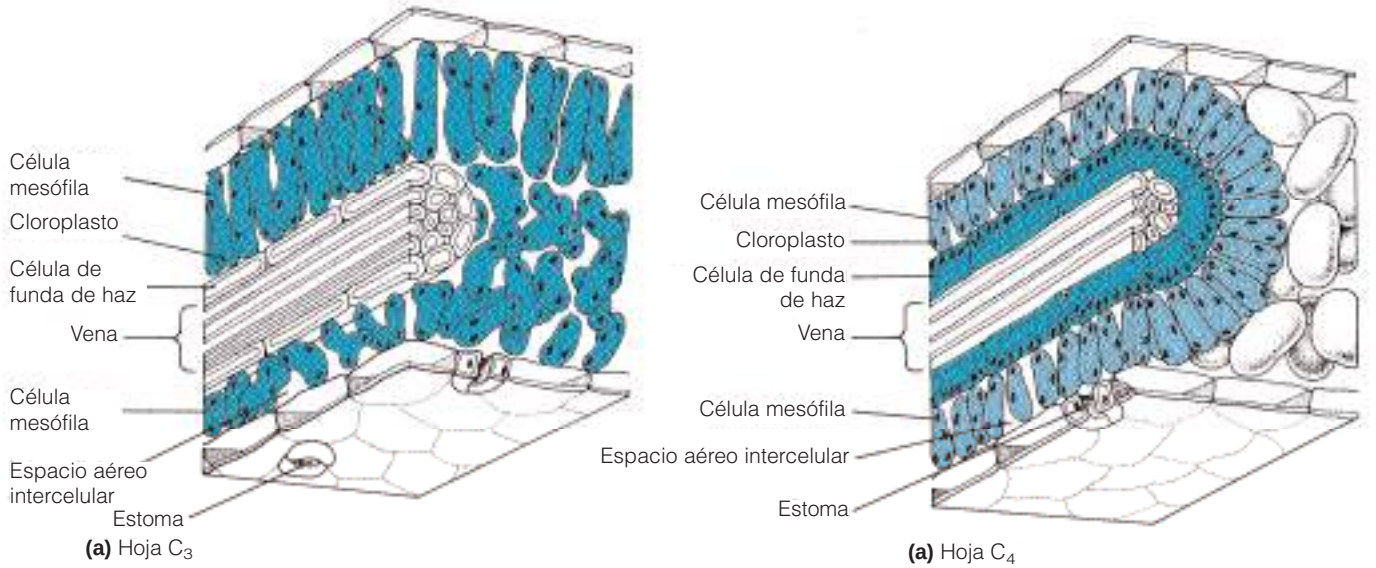


FIGURA **17.25**

Diferencias estructurales entre las hojas de las plantas C_3 y C_4. En la figura se muestran las diferencias estructurales de las células mesófilas y de las células de fundas de haces asociadas con los distintos usos en las plantas de tipo C_3 y C_4. Las células que realizan el ciclo de Calvin (ciclo C_3) se indican de color verde oscuro; las que realizan el ciclo C_4 se indican en verde claro. Los estomas son orificios a través de los cuales la hoja intercambia gases y vapor de agua con el entorno. **(a)** Plantas C_3. En las plantas C_3, que no tienen el ciclo C_4, la fotosíntesis del ciclo de Calvin se produce en su mayor parte en las células mesófilas. **(b)** Plantas C_4. En las plantas C_4, las células mesófilas realizan el ciclo C_4. Los compuestos C_4 se ceden posteriormente a las células de fundas de haces, en donde tiene lugar la mayor parte de la fotosíntesis del ciclo de Calvin.

Tomado de N. A. Campbell, *Biology*, 2.ª ed. (Redwood City, Calif.: Benjamin/Cummings, 1990). © 1990 Benjamin/Cummings Publishing Company.

AMP y fosfato inorgánico en la regeneración del fosfoenolpiruvato, el coste es equivalente a *dos* ATP adicionales por cada molécula de CO_2 fijada. De todos modos, parece que vale la pena pagar este precio en circunstantes en las que dominaría la fotorrespiración.

La eficacia de las plantas como productoras de alimento está reducida en gran medida por la ineficacia como enzima de la rubisco y su participación voluntaria en la fotorrespiración. No sólo se desperdicia energía en la fotorrespiración, sino también las grandes cantidades de rubisco que deben sintetizarse generan demandas aparentemente innecesarias al metabolismo vegetal. Si pudiera formarse una enzima más eficaz, los rendimientos de las cosechas aumentarían mucho y se reducirían las demandas de nitrógeno. Por lo tanto, se están realizando grandes esfuerzos para formar una rubisco más eficaz en las plantas de cultivo. Estos esfuerzos se han realizado en dos direcciones, ninguna de las cuales ha dado resultados hasta el momento. Por otro lado, se han realizado intentos para modificar la rubisco de las plantas superiores. Este esfuerzo se complica por la complejidad de la proteína (16 subunidades) y nuestro conocimiento incompleto de su enzimología. Una estrategia bastante diferente utiliza la observación de que la enzima rubisco en algunas algas rojas es considerablemente más eficaz. Se han realizado varios intentos para incorporar esta enzima en las plantas de cultivo.

RESUMEN

La fotosíntesis es el origen de la mayor parte de la energía de la biosfera y se encarga de la fijación del CO_2 atmosférico y de la producción de la mayor parte o la totalidad del O_2 de la atmósfera. El proceso completo puede dividirse en reacciones luminosas y reacciones oscuras. Las reacciones luminosas utilizan la energía de la luz solar para extraer electrones del agua, producir O_2, poder reductor y un gradiente protónico que impulsa la formación de ATP. Las reacciones oscuras reducen el CO_2 a hidratos de carbono. En las plantas y las algas superiores, se producen ambos tipos de reacciones en los cloroplastos. Los fotones para la reacción luminosa se absorben por pigmentos antena, y la energía se transfiere a centros de reacción, en donde entra en el fotosistema I o el fotosistema II. Estos dos sistemas, actuando conjuntamente, llevan a cabo las reac-

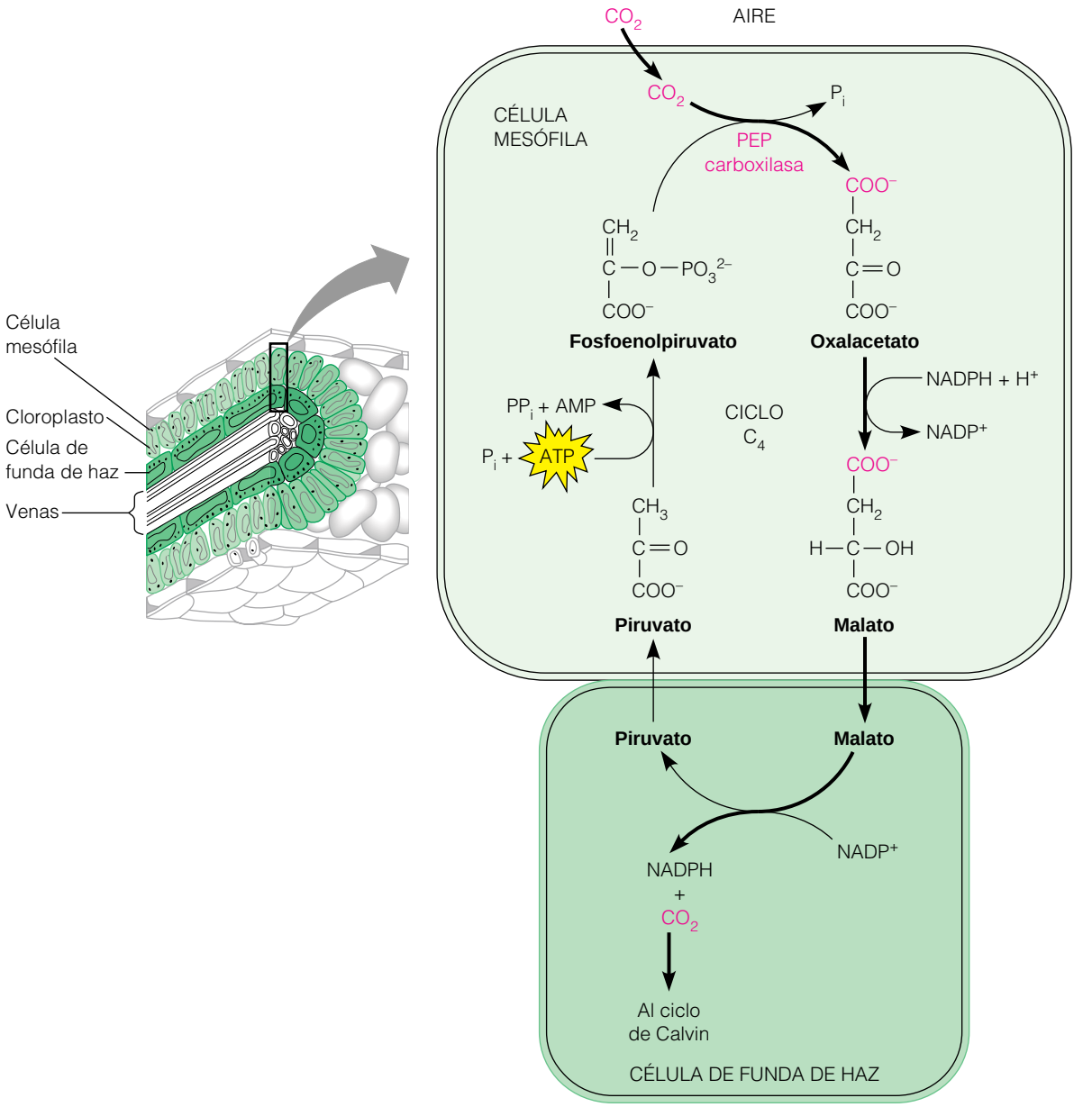


FIGURA **17.26**

Reacciones del ciclo C_4. El CO_2 se transporta desde las células mesófilas a las células de fundas de haces mediante su acoplamiento al fosfoenolpiruvato, formando oxalacetato. El oxalacetato se reduce a continuación a malato, que se transfiere a las células de fundas de haces y se descarboxila. El piruvato producto se devuelve a las células mesófilas, en las que se fosforila para regenerar el fosfoenolpiruvato.

ciones luminosas. El fotosistema II oxida el agua, y el fotosistema I reduce el $NADP^+$. Conjuntamente, los sistemas impulsan el transporte de protones a través de las membranas del cloroplasto para establecer un gradiente de pH que impulsa la producción de ATP. En un "cortocircuito" del fotosistema I denominado fotofosforilación cíclica, sólo se produce ATP. Por otra parte, algunas bacterias fotosintéticas utilizan una versión cíclica del fotosistema II para generar ATP.

Las reacciones oscuras se resumen en gran parte en el ciclo de Calvin, que puede dividirse en dos fases. En la primera de ellas, se añade CO_2 a la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP), que a continuación se fragmenta y se reduce para formar triosas que pueden combinarse entonces para formar una hexosa. La segunda fase del ciclo utiliza la mayor parte de las triosas y hexosas para regenerar la RuBP. Varias de estas reacciones oscuras se regulan por la intensidad de la luz.

En condiciones de CO_2 y O_2 bajos, las plantas presentan un proceso oxidativo denominado fotorrespiración. Este proceso es básicamente ineficaz y algunas plantas tropicales lo compensan mediante el ciclo C_4, que es menos sensible a las concentraciones elevadas de O_2.

BIBLIOGRAFÍA

General

Clayton, R. K. (1980) *Photosynthesis: Physical Mechanisms and Chemical Patterns*. Cambridge University Press, Cambridge. Aunque superado en parte por los estudios más recientes, continúa siendo un excelente resumen de los aspectos más físicos de la fotosíntesis.

Diesenhofer, J. y J. R. Norris, eds. (1993) *The Photosynthetic Reaction Center*. Academic Press, San Diego. Este conjunto de dos volúmenes contiene mucha información tanto de estructura como de función.

Lawlor, D. W. (1987) *Photosynthesis: Metabolism, Control, and Physiology*. Longman, Essex, Inglaterra. Este pequeño libro es una fuente de información de fácil lectura.

Youvan, D. C. y B. L. Marrs (1987) Molecular mechanisms of photosynthesis. *Sci. Am.* 256(6):42-48. Una descripción breve pero clara del tema.

Cloroplastos

Bogorad, L. y I. K. Vasil, eds. (1991) *The Molecular Biology of Plastids*. Academic Press, San Diego.

Hoober, J. K. (1984) *Chloroplasts*. Plenum, Nueva York. Una revisión amplia y detallada.

Reacciones luminosas

Barber, J., ed. (1992) *The Photosystems: Structure, Function, and Molecular Biology*. Elsevier, Amsterdam.

Blankenship, R. E. y R. C. Prince (1985) Excited-state redox potentials and the Z-scheme of photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 10:382-383.

Freemantle, M. (1998) Mimicking natural photosynthesis. *Chem. & Eng. News*, Octubre, pp. 37-46. Una puesta al día de algunos de los métodos propuestos para la "fotosíntesis artificial".

Hoganson, C. W. y G. T. Babcock (1997) A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis. *Science* 277:1953-1956. Una propuesta reciente del funcionamiento de las agrupaciones de Mn en la liberación de O_2.

Metz, J. G., P. J. Nixon, M. Rögner, G. Brudvig y B. A. Diner (1989) Directed alteration of the D1 polypeptide of photosystem II: Evidence that tyrosine-161 is the redox component Z, connecting and oxygen-evolving complex to the primary electron donor, P680. *Biochemistry* 28:6960-6969.

Woodbury, N. W., M. Becker, D. Middendorf y W. W. Parson (1985) Picosecond kinetics of the initial photochemical electron transfer reaction in bacterial photosynthetic reaction centers. *Biochemistry* 24:7516-7521. Un ejemplo de la potencia de los métodos cinéticos rápidos.

Estructuras

Cramer, W. A., S. E. Martinez, P. N. Furbacher, D. Huang y J. L. Smith (1994) The cytochrome b_6f complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4:536-544.

Deisenhofer, J. y H. Michel (1991) High resolution structure of photosynthetic reaction centers. *Annu. Rev. Biophys. & Biophys. Chem.* 20:247-266. Una visión general presentada por dos de los iniciadores de los nuevos estudios estructurales.

Golbeck, J. (1993) The structure of photosystem I. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:508-514. Incluye información sobre los pequeños péptidos y sus funciones en el complejo.

Krauss, N., W. Hinrichs, I. Witt, P. Fromme, W. Pritzkow, Z. Dauter, C. Betzel, K. Wilson, H. Witt y W. Saenger (1993) Three dimensional structure of system I of photosynthesis at 6 Å resolution. *Nature* 361:326-331.

Kühlbrandt, W. y D. N. Wang (1991) Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography. *Nature* 350:130-134. La primera estructura de este complejo que se ha determinado.

Rhee, K.-H., E. P. Morris, J. Barber y W. Kühlbrandt (1998) Three-dimensional structure of photosystem II reaction center at 8 Å resolution. *Nature* 396:283-286.

Reacciones sintéticas y fotorrespiración

Chapman, M. S., S. W. Suh, P. Curmi, D. Cascio, W. W. Smith y D. Eisenberg (1988) Tertiary structure of plant RuBisCo: Domains and their contacts. *Science* 241:71-74.

Ellis, R. J. y J. C. Gray, eds. (1986) Ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 313:303-469. Un volumen que contiene numerosos artículos excelentes sobre esta importante enzima.

Hartman, F. C. y M. R. Harpel (1993) Chemical and genetic probes of the active site of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: A retrospective based on the three-dimensional structure. En: *Advances in Enzymology*, Vol. 67, editado por A. Meister, pp. 1-75. Descrito por su título, contiene mucha información sobre esta importante enzima.

Kozaki, A. y G. Taheba (1996) Photorespiration protects C3 plants from photo-oxidation. *Nature* 384:557-560.

Sheen, J. (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* 2:1027-1038.

PROBLEMAS

1. Según la Figura 17.12b, el centro P700 eleva su potencial de +0.4 a –1.3 voltios tras la excitación. ¿A qué valor de $\Delta G°$ corresponde esto? ¿Qué representa en comparación con la energía de un einstein de fotones de 700 nm?

2. En la fotofosforilación cíclica, se calcula que deben pasar dos electrones por el ciclo para bombear los protones suficientes para generar un ATP. Suponiendo que el ΔG para la hidrólisis del ATP en las condiciones que se dan en el cloroplasto sea de aproximadamente –50 kJ/mol, ¿cuál es el porcentaje de eficacia de la fotofosforilación cíclica, utilizando luz de 700 nm?
3. Suponga un gradiente de pH de 4.0 unidades a través de una membrana tilacoide, con la luz más ácida que el estroma. ¿Cuál es la longitud de onda *más larga* de la luz que podría proporcionar una energía suficiente por fotón para bombear un protón en contra de este gradiente, suponiendo una eficacia del 20% en la fotosíntesis y una $T = 25°$?
*4. Suponga que una planta verde capta un pulso breve de $^{14}CO_2$.
   (a) Siga el curso de marcaje ^{14}C a través de los pasos que conducen a la síntesis de fructosa-1,6-bisfosfato, indicando qué átomos de carbono de cada compuesto deben llevar el marcaje durante el primer ciclo.
   (b) ¿Llevarán todas las moléculas de fructosa-1,6-bisfosfato dos átomos de ^{14}C? Explíquelo.
5. El flujo de energía solar que llega a la superficie de la tierra es de aproximadamente 7 J/cm^2·s. Suponga que *toda* esta energía fuera utilizada por una hoja verde (10 cm^2 de superficie), con la eficacia máxima del 35%. ¿Cuántos moles de hexosa podría generar teóricamente la hoja en una hora? Puede utilizar 600 nm como longitud de onda promedio.
*6. La sustancia diclorofenildimetilurea (DCMU) es un herbicida que inhibe la fotosíntesis mediante el bloqueo de la transferencia electrónica entre las plastoquinonas del fotosistema II.
   (a) ¿Sería de prever que la DCMU interfiriera en la fotofosforilación cíclica?
   (b) Normalmente, la DCMU bloquea la evolución del O_2, pero la adición de ferricianuro a los cloroplastos permite la evolución del O_2 en presencia de DCMU. Explíquelo.
7. Suponga que un investigador está realizando estudios en los que añade un donador electrónico no fisiológico a una suspensión de cloroplastos. La iluminación de los cloroplastos produce la oxidación del donador. ¿Cómo podrá determinar si interviene en ello el fotosistema I, el fotosistema II o ambos?
8. Suponga que se utiliza ribulosa-5-fosfato marcada con ^{14}C en el carbono 1 como sustrato de las reacciones oscuras. ¿En qué carbono del 3PG aparecerá el marcaje?
9. Los siguientes datos, presentados por G. Bowes y W. L. Ogre en *J. Biol. Chem.* (1972) 247:2171-2176, describen la cinética de la incorporación del CO_2 por la enzima rubisco en presencia de N_2 y con O_2 puro. Determine si el O_2 es un inhibidor competitivo o no competitivo.

$[CO_2]$ (mM)	Con N_2	Con O_2
0.20	16.7	10
0.10	12.5	5.6
0.067	8.3	4.2
0.050	7.1	3.2

*10. J. C. Servaites, en *Plant Physiol.* (1985) 78:839-843, observó que la rubisco de las hojas de tabaco recogidas antes del amanecer tenía una actividad específica mucho menor que la enzima recogida al mediodía. Esta diferencia persistía a pesar de la diálisis, la filtración en gel o el tratamiento con calor. Sin embargo, la precipitación de la enzima previa al amanecer con $(NH_4)_2SO_4$ al 50% restablecía la actividad específica al nivel existente en la enzima recogida al mediodía. Sugiera una explicación.
11. Se cree que la proporción de la fotofosforilación cíclica respecto a la fotofosforilación no cíclica se modifica en respuesta a las demandas metabólicas. En cada una de las situaciones siguientes, ¿sería de prever un aumento, una disminución o una ausencia de cambios de la proporción?
   (a) Cloroplastos que realizan el ciclo de Calvin y la reducción del nitrito (NO_2^-) a amoníaco. (Este proceso no requiere ATP.)
   (b) Cloroplastos que realizan no sólo el ciclo de Calvin sino también un amplio transporte activo.
   (c) Cloroplastos que utilizan el ciclo de Calvin y la ruta C_4.
12. Si un organismo fotosintético se ilumina en un ambiente cerrado y sellado, se observa que las concentraciones de CO_2 y O_2 en la atmósfera circundante alcanzan una proporción constante.
   (a) Sugiera una explicación.
   (b) ¿Qué factor piensa que determina fundamentalmente el valor de esta proporción?
13. Si se exponen algas durante un breve período de tiempo a $^{14}CO_2$ mientras se iluminan, el carbono marcado se encuentra inicialmente casi en su totalidad en el grupo carboxilo del 3-fosfoglicerato. Sin embargo, si se continúa con la iluminación tras el pulso de marcaje, se marcan también otros átomos de carbono. Explíquelo.

CAPÍTULO 18

Metabolismo lipídico I: ácidos grasos, triacilgliceroles y lipoproteínas

IGUAL QUE LOS HIDRATOS DE CARBONO QUE HEMOS CONSIDERADO EN LOS capítulos anteriores, los lípidos participan en el metabolismo energético y en varios otros procesos. Para los lípidos, esos otros procesos incluyen sus funciones como componentes de la membrana, hormonas, vitaminas liposolubles, aislantes térmicos y reguladores biológicos como las prostaglandinas. Este capítulo se centra en los aspectos bioenergéticos del metabolismo lipídico. Consideraremos la síntesis y degradación de los lípidos de almacenamiento de energía, así como la oxidación y la biosíntesis de los ácidos grasos (Figura 18.1), procesos que son muy similares en las plantas, los animales y los microorganismos. También presentaremos algunas cuestiones relacionadas más directamente con el metabolismo animal, como la digestión, absorción, almacenamiento y movilización de las grasas. Los lípidos de la membrana y los lípidos con funciones metabólicas más especializadas se considerarán en el Capítulo 19.

Utilización y transporte de las grasas y el colesterol

Como hemos visto en el Capítulo 10, la mayor parte de los lípidos de la mayoría de los organismos se encuentran en forma de *triacilgliceroles* (anteriormente denominados *triglicéridos*). El término *grasa*, o *grasa neutra*, se refiere a esta clase más abundante de lípidos. La utilización de las grasas en los animales está interrelacionada con el metabolismo de las lipoproteínas, como ocurre con el metabolismo del colesterol. Por lo tanto, consideraremos conjuntamente el metabolismo de las grasas y del colesterol, aunque la biosíntesis del colesterol se presentará en el Capítulo 19.

Un mamífero contiene entre un 5 y un 25%, o más, de su peso corporal en forma de lípidos, y hasta un 90% de estos lípidos están en forma de triacilgliceroles. La mayor parte de esta grasa, que está almacenada en el tejido adiposo, constituye la reserva energética principal. En los sistemas animales, la grasa se almacena en unas células especializadas, los *adipocitos*, en las que hay unos glóbulos de grasa gigantes que ocupan la mayor parte del espacio intracelular (véase la Figura 10.3). Las semillas de las plantas almacenan una gran cantidad de grasa para proporcionar energía al embrión de la planta que se forma (Figu-

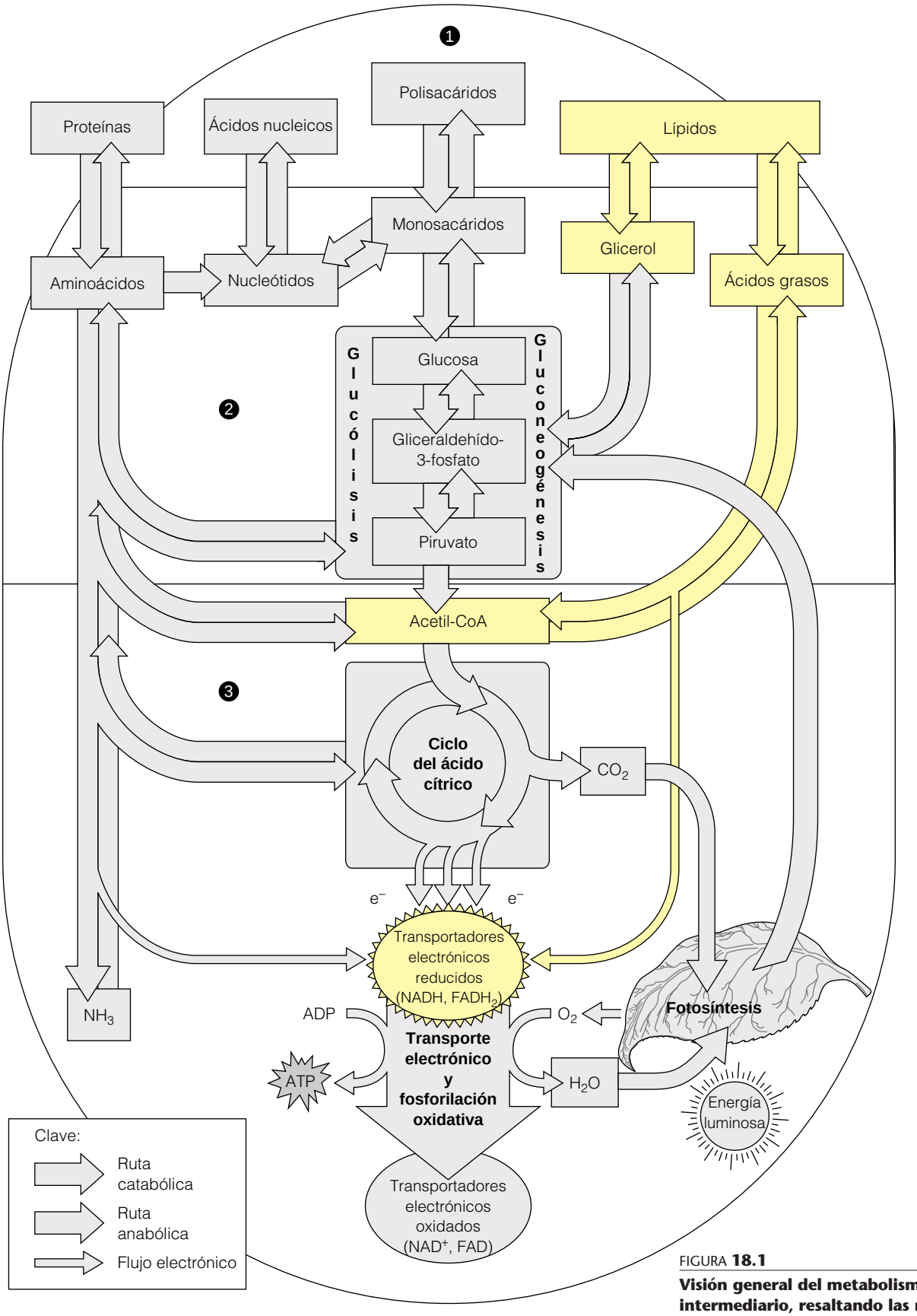


FIGURA **18.1**

Visión general del metabolismo intermediario, resaltando las rutas de los ácidos grasos y de los triacilgliceroles.

ra 18.2). Dado que los lípidos de las plantas contienen principalmente ácidos grasos insaturados, los triacilgliceroles de las semillas se encuentran en gran parte como aceites líquidos.

Los triacilgliceroles intervienen en otras funciones, aparte del almacenamiento de energía. La grasa sirve para amortiguar los golpes que puedan recibir los órganos y constituye un aislante térmico eficaz, en especial en los mamíferos marinos, que deben mantener una temperatura corporal mucho más alta que la del agua del mar en la que viven.

LAS GRASAS COMO RESERVAS ENERGÉTICAS

Recuérdese que la mayor parte del carbono de los triacilgliceroles está más reducido que el carbono de los hidratos de carbono. Ciertamente, los carbonos carboxilo de los ácidos grasos están muy oxidados, pero la mayor parte de los carbonos de los ácidos grasos se encuentran al nivel de reducción de metilo o metileno. Así pues, la oxidación metabólica de la grasa consume más oxígeno, a igualdad de peso, que la oxidación de los hidratos de carbono, con lo que la liberación de energía metabólica es superior. La oxidación metabólica completa de los triacilgliceroles produce 37 kJ/g o más, mientras que la de los hidratos de carbono y la de las proteínas produce unos 17 kJ/g. A esta diferencia entre los hidratos de carbono y las proteínas se suma el carácter hidrófilo de los polímeros de glucosa. El glucógeno une unos 2 gramos de agua por gramo de hidrato de carbono. La grasa, al ser muy apolar, es anhidra. Así pues, debido a que 1 gramo del glucógeno intracelular contiene tan sólo 1/3 de gramo del polímero de glucosa anhidro, la grasa intracelular contiene unas seis veces más energía metabólica potencial, a igualdad de masa, que el glucógeno intracelular. En muchas situaciones esto constituye una ventaja evidente, como en el caso de los animales que hibernan, que deben almacenar lo obtenido con la alimentación de varios meses, o en los músculos de vuelo de los pájaros pequeños, en los que el aumento de peso constituye una ventaja fundamental. Aunque parezca increíble, algunos pájaros pequeños se preparan para la migración incrementando su peso corporal alrededor de un 15% al día, y todo el aumento de peso corresponde a los triacilgliceroles. Estos pájaros obesos pueden volar entonces sin detenerse durante períodos de hasta 60 horas o más. Además, la insolubilidad de la grasa permite almacenarla en las células sin afectar a la presión osmótica intracelular.

No es de extrañar pues que la grasa sea la principal forma de almacenar energía para la mayor parte de las células. Un hombre normal de 70 kg de peso puede tener unas reservas de combustible de 400 000 kJ en la grasa corporal total y de unos 100 000 kJ en las proteínas totales (en su mayor parte proteínas musculares). En cambio, las reservas de glucógeno ascienden sólo a 2500 kJ de energía disponible, y la glucosa total cerca de 170 kJ. Las reservas de grasa se mantienen a partir de la alimentación. Alrededor del 40% del valor calórico de las alimentaciones occidentales procede de las grasas. La mayoría de los especialistas en nutrición recomiendan que este valor esté cerca del 25-30% para evitar problemas cardiovasculares. Además, el exceso de hidratos de carbono consumido que no puede catabolizarse ni almacenarse como glucógeno se convierte fácilmente en grasa.

Gran parte de la energía procedente de la degradación de las grasas se obtiene mediante la oxidación de los ácidos grasos que las forman. La oxidación de los ácidos grasos constituye la principal fuente de energía para muchos tejidos animales. El cerebro tiene unas características especiales puesto que no es capaz de utilizar los ácidos grasos como aporte energético importante y tiene un re-

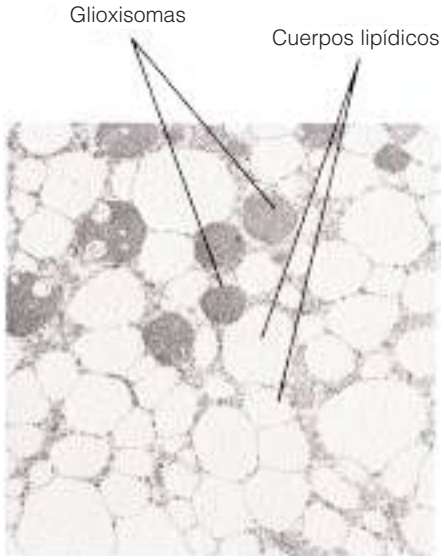


FIGURA **18.2**

Almacenamiento de grasa en las semillas. La fotografía de microscopia electrónica (× 6500) muestra una célula de un cotiledón de pepino (hoja de la semilla) a los pocos días de la germinación. La grasa almacenada en los cuerpos lipídicos se degrada, oxida y convierte en hidratos de carbono en los glioxisomas (o microcuerpos) próximos para mantener el crecimiento de la planta.

Cortesía de R. N. Trelease, P. J. Gruber, W. M. Becker y E. H. Newcomb, *Plant Physiol.* (1971) 48:461.

La grasa tiene un contenido calórico seis veces superior al de los hidratos de carbono, a igualdad de peso, debido a que la grasa está más reducida y es anhidra.

querimiento muy específico de la glucosa. No obstante, en condiciones de inanición, al reducirse las concentraciones de glucosa en sangre, el cerebro puede adaptarse al empleo de una clase de compuestos relacionados con los lípidos, que se denominan *cuerpos cetónicos*, como se expondrá más adelante en este capítulo.

DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE LAS GRASAS

Los triacilgliceroles proceden de tres orígenes principales: (1) la alimentación, (2) la biosíntesis de novo, en especial en el hígado, y (3) las reservas existentes en los adipocitos. Los procesos mediante los cuales se utilizan estas fuentes en los animales se resumen en la Figura 18.3. El principal problema al que deben hacer frente los animales en la digestión, absorción y transporte de los lípidos procedentes de la alimentación es la insolubilidad de estas sustancias en los medios acuosos. La acción de las **sales biliares**, sustancias detergentes que se sintetizan en el hígado y se almacenan en la vesícula biliar, es esencial para la digestión de los lípidos y su absorción a través de la mucosa intestinal. El problema del transporte por la sangre y la linfa se resuelve, en parte, con la formación de complejos de los lípidos con proteínas para formar unos agregados solubles que se denominan **lipoproteínas**.

Una molécula de sal biliar está formada por un **ácido biliar**, como el ácido cólico, y un catión asociado. Los ácidos biliares (que se considerarán con mayor detalle en el Capítulo 19) proceden del colesterol. Como se indica en la Figura 18.4, la molécula de sal biliar tiene superficies hidrófobas e hidrófilas. Este carácter anfipático permite a las sales biliares orientarse en una interfase aceite-

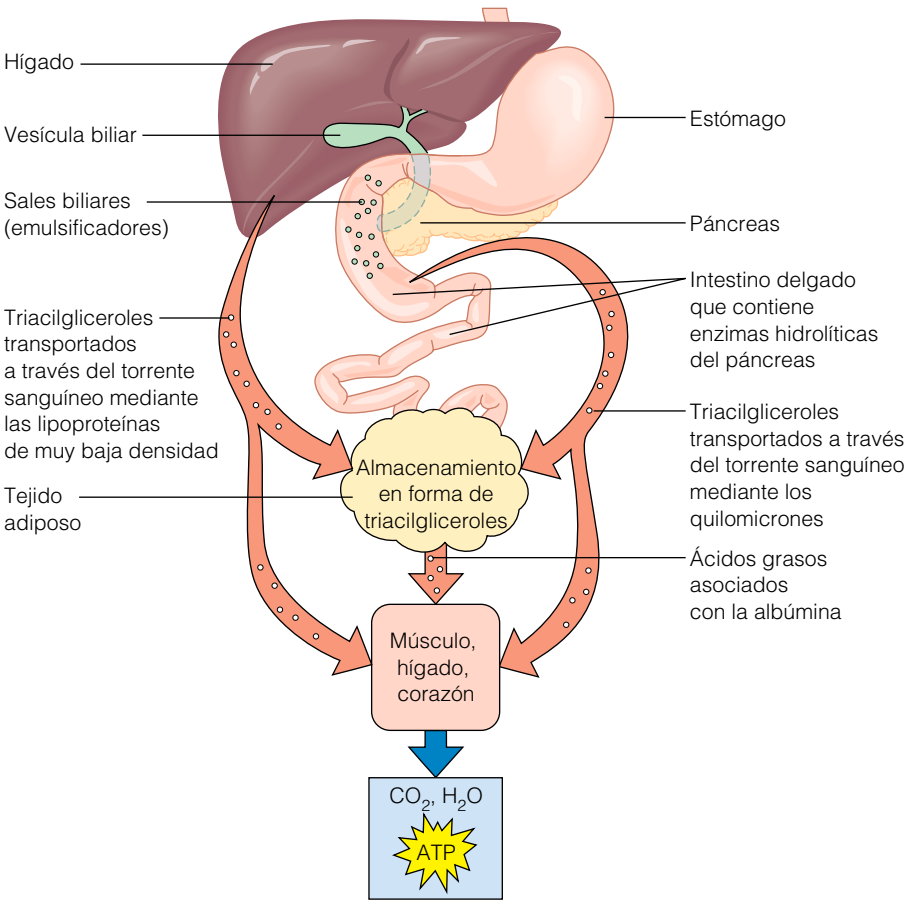


FIGURA **18.3**

Visión general de la digestión, absorción, almacenamiento y movilización de la grasa en el ser humano. Los triacilgliceroles (grasas) se ingieren, se sintetizan en el hígado o se movilizan a partir de los depósitos existentes. Los triacilgliceroles ingeridos se hidrolizan en la luz del intestino delgado por la lipasa pancreática y otras enzimas. Los productos de la hidrólisis absorbidos por la mucosa intestinal se recombinan en triacilgliceroles, que se combinan con apoproteínas para formar las lipoproteínas denominadas quilomicrones. Este proceso solubiliza los lípidos y permite su transporte a través de la sangre y la linfa. Los triacilgliceroles sintetizados en el hígado se combinan con otras apoproteínas para formar las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para su transporte. Las lipoproteínas transportadas a los tejidos periféricos se hidrolizan en las superficies internas de los capilares. Los productos de la hidrólisis que llegan a las células se catabolizan para producir energía o se recombinan en triacilgliceroles para almacenarse. La movilización de los triacilgliceroles almacenados se regula hormonalmente.

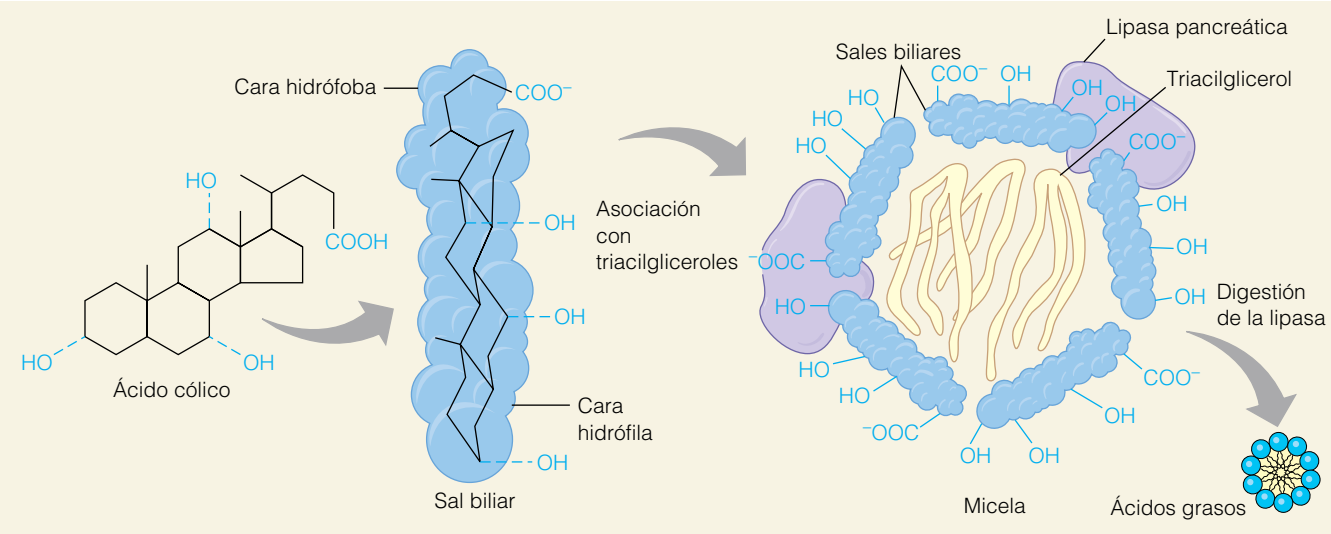


FIGURA **18.4**

Acción de las sales biliares para emulsionar las grasas en el intestino. El ácido cólico, un ácido biliar característico, se ioniza para dar su sal biliar análoga. La superficie hidrófoba de la molécula de sal biliar se asocia con el triacilglicerol y varios complejos de este tipo se agregan para formar una micela. La superficie polar de las sales biliares queda hacia fuera, permitiendo a la micela asociarse con la lipasa pancreática. La acción de esta enzima libera los ácidos grasos para que se asocien en micelas mucho más pequeñas que pueden absorberse a través de la mucosa intestinal.

agua, de tal manera que la superficie hidrófoba esté en contacto con la fase apolar y la superficie hidrófila con la fase acuosa. Esta acción detergente emulsiona los lípidos y da lugar a la formación de micelas (véase el Capítulo 10), que permiten el ataque digestivo por parte de enzimas hidrosolubles y facilitan la absorción de los lípidos a través de las células de la mucosa intestinal. La mayor parte de la digestión se produce por la acción de la **lipasa pancreática**, una enzima poco común, que requiere calcio, y que cataliza una reacción en una interfase aceite-agua. El sustrato que se degrada está en una fase apolar y, naturalmente, el otro sustrato es el agua. Los estudios estructurales sobre la lipasa pancreática indican que el centro catalítico de la misma queda expuesto como resultado de un cambio de conformación que se produce tan sólo en una interfase aceite-agua. A pesar de sus propiedades físicas poco habituales, la lipasa pancreática actúa a través de un lugar activo con serina y un intermediario acil-enzima, igual que las serina proteasas como la quimotripsina.

Los productos de la digestión de las grasas comprenden una mezcla de glicerol, ácidos grasos libres, monoacilgliceroles y diacilgliceroles. Menos del 10% de los triacilgliceroles originales permanece sin hidrolizar. Durante la absorción a través de las células de la mucosa intestinal, se produce una abundante resíntesis de triacilgliceroles a partir de los productos de hidrólisis. Esta resíntesis tiene lugar en el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi de las células de la mucosa. Los triacilgliceroles van a parar al sistema linfático formando complejos con proteínas para dar lugar a las lipoproteínas denominadas **quilomicrones**. El quilomicrón es básicamente una gota de aceite recubierta por lípidos más polares y una capa externa de proteína que ayuda a dispersar y solubilizar en parte la grasa para su transporte a los tejidos. El quilomicrón constituye también un transportador del colesterol del alimento.

En general, las grasas que contienen cantidades considerables de ácidos grasos insaturados, como los ácidos oleico y linoleico, que tienden a ser líquidas a la temperatura corporal, se absorben con relativa facilidad, mientras que los lípidos que contienen mayoritariamente ácidos grasos saturados, como los ácidos palmítico y esteárico, se digieren y absorben más lentamente.

TRANSPORTE DE LAS GRASAS A LOS TEJIDOS: LIPOPROTEÍNAS

Los quilomicrones son tan sólo una de las clases de lipoproteínas que se encuentran en el torrente sanguíneo. Estos complejos desempeñan un papel esen-

Las sales biliares emulsionan las grasas, con lo que fomentan su hidrólisis en la digestión.

$CH_3—(CH_2)_{14}—COOH$

Ácido palmítico

$CH_3(CH_2)_{16}—COOH$

Ácido esteárico

$CH_3—(CH_2)_4—CH{=}CH—CH_2—CH{=}CH—(CH_2)_7—COOH$

Ácido linoleico

$CH_3—(CH_2)_7—CH{=}CH—(CH_2)_7—COOH$

Ácido oleico

cial en el transporte de los lípidos a los tejidos, ya sea para el almacenamiento de energía, ya sea para su oxidación. Los lípidos libres son todos casi indetectables en la sangre. Las **apoproteínas** o componentes apolipoproteicos, o cadenas polipeptídicas, de las lipoproteínas se sintetizan principalmente en el hígado, aunque alrededor del 20% se producen en las células de la mucosa intestinal.

Clasificación y funciones de las lipoproteínas

Se han descrito diversas familias de lipoproteínas, cada una de las cuales desempeña funciones concretas en el transporte de lípidos. Estas familias se clasifican en función de su densidad, determinada mediante centrifugación (Tabla 18.1). Las lipoproteínas de cada clase contienen apoproteínas características y poseen una composición lipídica distintiva. En las lipoproteínas humanas se encuentran un total de nueve **apolipoproteínas** principales. Sus propiedades se resumen en la Tabla 18.2. Dado que los lípidos tienen una densidad mucho menor que las proteínas, el contenido lipídico de una clase de lipoproteínas está

TABLA 18.1 Propiedades de las principales clases de lipoproteínas plasmáticas humanas

	Quilomicrones	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densidad (g/mL)	<0.95	0.950–1.006	1.006–1.019	1.019–1.063	1.063–1.210
Componentes (% de peso seco)					
Proteínas	2	8	15	22	40–55
Triacilgliceroles	86	55	31	6	4
Colesterol libre	2	7	7	8	4
Ésteres de colesterol	3	12	23	42	12–20
Fosfolípidos	7	18	22	22	25–30
Composición de apoproteínas	A-I, A-II, B-48, C-I, C-II, C-III	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D, E

Fuente: Datos tomados de D. E. Vance y J. E. Vance, eds., *Biochemistry of Lipids and Membranes* (Redwood City, Calif.: Benjamin/Cummings, 1985), y J. F. Mead, R. B. Alfin-Slater, D. R. Howton y G. Popják, *Lipids* (Nueva York: Plenum, 1986).

TABLA 18.2 Apoproteínas de las lipoproteínas plasmáticas humanas

Apoproteína	Peso Molecular	Características
A-I	28 300	Proteína principal de las HDL; activa la LCAT
A-II	17 400	Proteína principal de las HDL
B-48	241 000	Se encuentra exclusivamente en los quilomicrones
B-100	513 000	Proteína principal de las LDL
C-I	7000	Se encuentra en los quilomicrones; activa la LCAT y la LPL
C-II	10 000	Se encuentra principalmente en las VLDL; activa la LPL
C-III	9300	Se encuentra principalmente en los quilomicrones, las VLDL y las HDL; inhibe la LPL
D	35 000	Proteína de las HDL, también denominada proteína de transferencia de los ésteres de colesterol
E	33 000	Se encuentra en las VLDL, LDL y HDL

Fuente: Datos tomados de D. E. Vance y J. E. Vance, eds., *Biochemistry of Lipids and Membranes* (Redwood City, Calif.: Benjamin/Cummings, 1985), y J. F. Mead, R. B. Alfin-Slater, D. R. Howton y G. Popják, *Lipids* (Nueva York: Plenum, 1986).

Nota: LCAT = lecitina:colesterol aciltransferasa, LPL = lipoproteína lipasa.

inversamente relacionado con su densidad. Así, cuanto mayor es la abundancia de lípidos, menor es la densidad. La clasificación estándar de las lipoproteínas incluye, por orden creciente de densidad: *quilomicrones*, **lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL)** y **lipoproteínas de alta densidad (HDL).** Algunos esquemas de clasificación establecen dos clases de HDL, y, además, existe una lipoproteína cuantitativamente menor denominada lipoproteína de muy alta densidad (VHDL).

A pesar de sus diferencias de composición lipídica y proteica, todas las lipoproteínas comparten características estructurales comunes, especialmente una forma esférica que puede detectarse mediante microscopia electrónica. Como se muestra en la Figura 18.5, las partes hidrófobas, tanto los lípidos como los aminoácidos apolares, forman un núcleo interno, y las estructuras proteicas hidrófilas y los grupos de cabeza polares de los fosfolípidos se encuentra en el exterior.

Algunas apolipoproteínas poseen actividades bioquímicas específicas distintas del papel que desempeñan como transportadores pasivos de los lípidos de un tejido a otro. Así, por ejemplo, la apo C-II es un activador de la hidrólisis de los triacilgliceroles por la **lipoproteína lipasa,** una enzima de la superficie celular que hidroliza los triacilgliceroles de las lipoproteínas. Un déficit de apo C-II en el ser humano se asocia con unas concentraciones elevadas de triacilgliceroles en sangre. Otras apoproteínas dirigen determinadas lipoproteínas hacia las células específicas, al ser identificadas por receptores de las membranas plasmáticas de estas células. Tiene gran interés la reciente descripción de la asociación de una forma variante de la apo E con un aumento del riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer. Hay tres formas alélicas comunes de la apo E, y las personas homocigotas para la variante pertinente presentan de forma invariable la enfermedad de Alzheimer a los 80 años.

En conjunto, las lipoproteínas ayudan a mantener en forma solubilizada unos 500 mg de lípidos totales por 100 mL de sangre humana en la fase postabsortiva, tras la digestión y absorción al torrente sanguíneo del contenido de una comida. De estos 500 mg, habitualmente alrededor de unos 120 mg son triacilgliceroles, 220 mg es colesterol (dos terceras partes esterificados con ácidos grasos y una tercera parte libre) y 160 mg son fosfolípidos, principalmente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

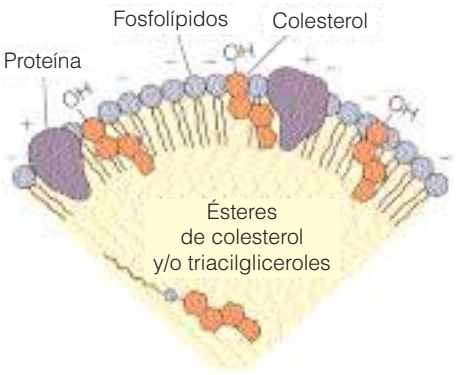


FIGURA **18.5**

Estructura general de una lipoproteína plasmática. La partícula esférica, parte de la cual se muestra en la figura, contiene lípidos neutros en el interior y fosfolípidos, colesterol y proteína en la superficie.

Las lipoproteínas son complejos lípido-proteína que permiten el movimiento de los lípidos apolares a través de los ambientes acuosos.

Transporte y utilización de las lipoproteínas

Como se ha indicado anteriormente, los quilomicrones constituyen la forma en que se transporta la grasa del alimento desde el intestino a los tejidos periféricos, especialmente el corazón, el músculo y el tejido adiposo (véase la Figura 18.3). Las VLDL desempeñan un papel comparable para los triacilgliceroles sintetizados en el hígado. Los triacilgliceroles en ambas lipoproteínas se hidrolizan a glicerol y ácidos grasos en las superficies internas de los capilares de los tejidos periféricos. Esta hidrólisis comporta una activación de la enzima extracelular lipoproteína lipasa por la apoproteína C-II (Figura 18.6). Algunos de los ácidos grasos liberados se absorben por las células próximas, mientras que otros, que continúan siendo bastante insolubles, forman complejos con la albúmina sérica para transportarse a células más distantes. Tras la absorción en la célula, los ácidos grasos procedentes de la acción de la lipoproteína lipasa pueden catabolizarse para generar energía o, en las células adiposas, utilizarse para volver a sintetizar triacilgliceroles. Sin embargo, debido a que los adipocitos carecen de glicerol quinasa, el glicerol-3-fosfato para volver a sintetizar los triacilgliceroles debe proceder de la glucólisis. El glicerol se devuelve desde los adi-

Una consecuencia fundamental de la disfunción hepática es su incapacidad para sintetizar apolipoproteínas y, por tanto, para transportar las grasas fuera del hígado.

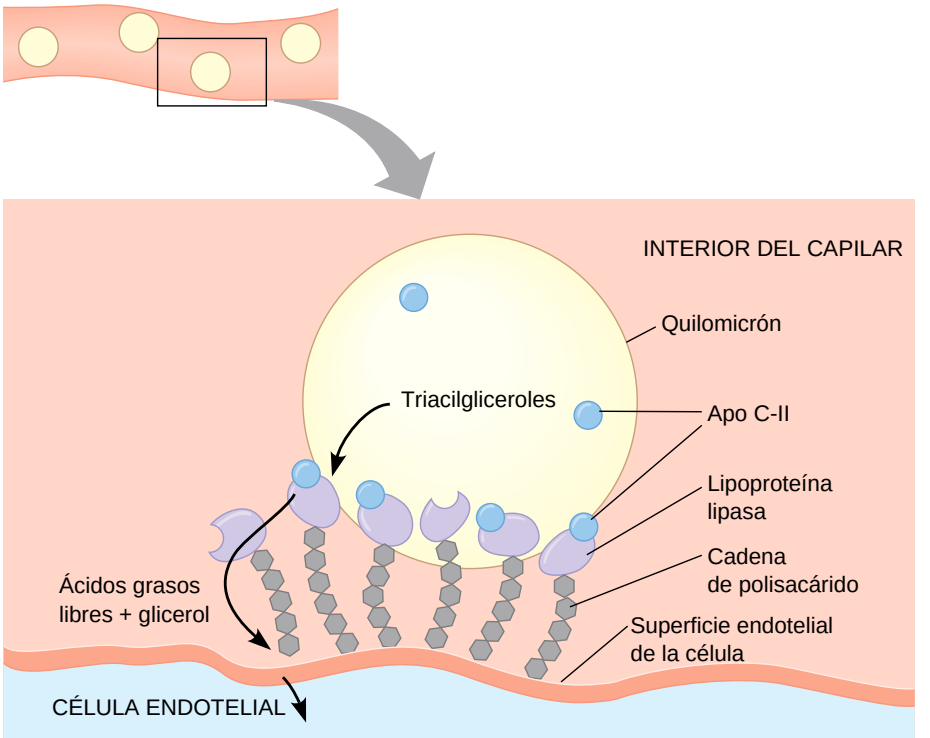


FIGURA **18.6**

Unión de un quilomicrón a la lipoproteína lipasa en la superficie interna de un capilar. El quilomicrón está anclado por la lipoproteína lipasa, que está ligada a la superficie de la célula endotelial por una cadena de polisacárido. Cuando se activa por la apoproteína C-II, la lipasa hidroliza los triacilgliceroles en el quilomicrón, lo cual permite la captura al interior de la célula del glicerol y los ácidos grasos libres.

pocitos al hígado para volver a sintetizar glucosa mediante la gluconeogénesis. En la Figura 18.7 se resumen los aspectos generales del metabolismo y transporte de las lipoproteínas.

Como consecuencia de la hidrólisis de los triacilgliceroles en los capilares, tanto los quilomicrones como las VLDL se degradan para dar lugar a restos con abundantes proteínas. La clase de lipoproteínas IDL procede de las VLDL, y los quilomicrones se degradan para dar lugar a lo que se denominan simplemente restos de quilomicrones. Ambos tipos de restos son captados por el hígado a través de la interacción con receptores específicos y degradados posteriormente en los lisosomas hepáticos. La apoproteína B-100 se reutiliza en la síntesis de las LDL (a través de las IDL). Como se describe en la sección siguiente, las LDL constituyen la principal forma de transporte del colesterol a los tejidos, y las HDL desempeñan el principal papel de devolver el exceso de colesterol de los tejidos al hígado para su metabolismo o excreción. La importancia de las lipoproteínas como vehículos de transporte es evidente por el hecho de que una consecuencia importante de la cirrosis hepática crónica es la degeneración grasa del hígado, en la que el hígado se carga de grasa. Dado que el hígado es el lugar principal de síntesis de las apolipoproteínas, el daño de este órgano hace que la grasa sintetizada endógenamente se acumule aquí, ya que no puede transportarse a los tejidos periféricos.

TRANSPORTE Y UTILIZACIÓN DEL COLESTEROL EN LOS ANIMALES

La acumulación de colesterol en la sangre está correlacionada con la formación de la placa aterosclerótica. Los mecanismos precisos de la aterogénesis no se conocen en la actualidad.

Como indudablemente ya sabe, un factor de riesgo importante que predispone a la cardiopatía es la concentración anormalmente elevada de colesterol en la sangre. La acumulación prolongada de colesterol contribuye a que se formen las **placas ateroscleróticas,** que son depósitos grasos que recubren las superficies internas de las arterias coronarias. Dada la importancia médica de conocer de qué forma contribuye el colesterol en la **aterogénesis,** o formación de las placas, la mayor parte de nuestros conocimientos acerca del metabolismo del colesterol y

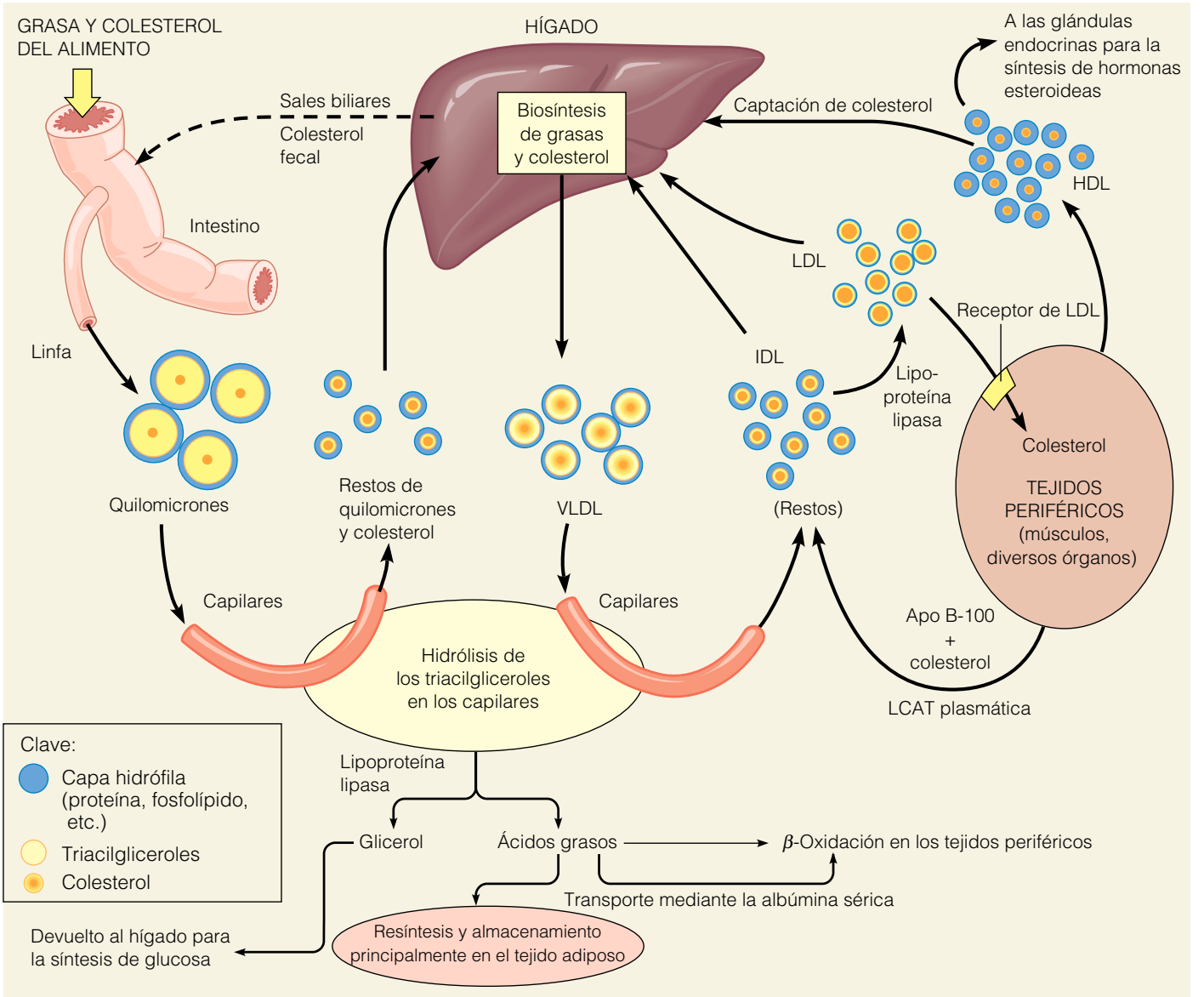
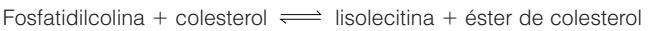


FIGURA **18.7**
Visión general de las rutas de transporte y del destino de las lipoproteínas.

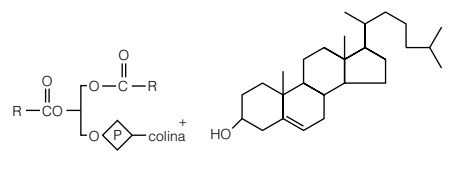
la regulación del mismo procede de los estudios llevados a cabo en los mamíferos.

Recuérdese de la Tabla 18.1 que el colesterol de las lipoproteínas plasmáticas se encuentra en forma de esterol libre y como ésteres de colesterol. La esterificación se produce en la posición hidroxilo del colesterol con un ácido graso de cadena larga, normalmente insaturado. Los ésteres de colesterol se sintetizan en el plasma a partir de colesterol y una cadena acilo de una fosfatidilcolina, mediante la acción de la **lecitina:colesterol aciltransferasa** (LCAT), una enzima que se segrega por el hígado al torrente sanguíneo:

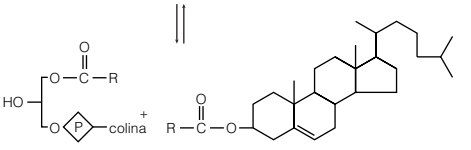


Los ésteres de colesterol son considerablemente más hidrófobos que el propio colesterol.

De las cinco clases de lipoproteínas, la LDL es con mucho la que contiene mayor cantidad de colesterol. Las cantidades de colesterol y ésteres de coleste-



Colesterol



Ésteres de colesterol

rol asociadas con las LDL son habitualmente unas dos terceras partes del colesterol plasmático total (el colesterol plasmático total se sitúa entre 130 y 260 mg/100 mL de plasma humano, siendo las concentraciones deseables de entre 160 y 200). Más del 40% del peso de la partícula de LDL corresponde a ésteres de colesterol, y las cantidades de colesterol esterificado y colesterol libre suponen en total más de la mitad del peso global. La partícula LDL contiene una sola molécula de apoproteína B-100 (M_r = 513 000) como componente proteico principal. Dado que la biosíntesis de colesterol está limitada principalmente al hígado, y sólo se produce algo de ella también en el intestino, las LDL desempeñan un papel importante en el aporte de colesterol a otros tejidos.

El receptor de LDL y la homeostasia del colesterol

La importancia del conocimiento de la homeostasia del colesterol puede comprenderse revisando las consecuencias que tienen las concentraciones plasmáticas elevadas de colesterol cuando se mantienen de forma prolongada. El colesterol es muy insoluble y se acumula en los leucocitos que se depositan en las zonas de lesión sobre las paredes internas de las arterias. Si las concentraciones de colesterol son demasiado altas para su posterior eliminación hacia el torrente sanguíneo, estas células quedan repletas de depósitos grasos, que luego se endurecen, formando una placa; este trastorno, que se denomina aterosclerosis, finalmente obstruye vasos sanguíneos clave causando infartos de miocardio o ataques cardíacos.

Para comprender la relación que existe entre las concentraciones elevadas de colesterol y la aterogénesis, debemos conocer de qué forma se capta el colesterol de las LDL por las células, puesto que los ésteres de colesterol son demasiado hidrófobos para atravesar por sí mismos las membranas celulares. La respuesta a esta cuestión se obtuvo de las investigaciones de Michael Brown y Joseph Goldstein, que a mediados de los años 1970 demostraron que la captación de colesterol por las células es un proceso en el que intervienen receptores y que la cantidad de los propios receptores está regulada.

En 1972, Brown y Goldstein empezaron a estudiar un trastorno hereditario denominado **hipercolesterolemia familiar** o HF. Las personas con la forma homocigota rara de esta enfermedad (aproximadamente 1 de cada millón) presentan unas concentraciones muy elevadas de colesterol en suero, entre 650 y 1000 mg/100 mL (aproximadamente 5 veces el valor normal). Presentan aterosclerosis en una fase temprana de la vida y generalmente fallecen por una enfermedad cardíaca antes de los 20 años de edad. El trastorno heterocigoto más frecuente, que se caracteriza por la presencia de un alelo defectuoso en vez de los dos, afecta a aproximadamente una de cada 500 personas. Estas personas tienen unas concentraciones de colesterol elevadas de forma menos intensa, del orden de 250 a 500 mg/100 mL. Presentan un riesgo elevado de sufrir infartos de miocardio entre los treinta y los cincuenta años de edad, aunque muchos de ellos tienen una vida de duración normal.

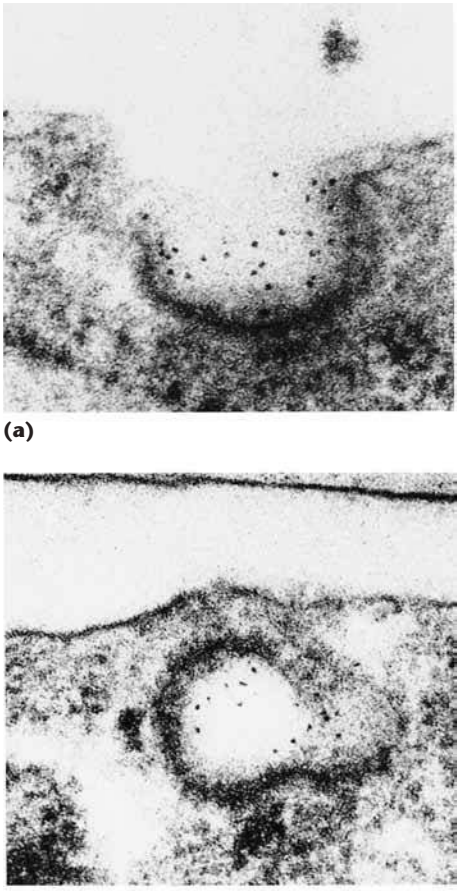
Para el éxito de las investigaciones de Brown y Goldstein fue esencial su capacidad de demostrar la presencia del fenotipo HF defectuoso en cultivos celulares. Los fibroblastos de los pacientes con HF sintetizaban colesterol a un ritmo anormalmente elevado en cultivo, mientras que las células normales presentaban un ritmo de síntesis bajo. Al realizar los cultivos en presencia de LDL, las células normales presentaban una baja actividad de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa, la enzima reguladora principal de la síntesis del colesterol; véase la página 771). En ausencia de LDL, las mismas células presentaban unas actividades reductasa unas 50 a 100 veces superiores. Estos resultados sugirieron que el colesterol se transporta normalmente al in-

terior de la célula, en donde regula su propia síntesis mediante la supresión de la actividad de la enzima limitante de la velocidad. En cambio, las células de las personas con HF mostraban unos niveles altos de actividad reductasa, tanto si se cultivaban en presencia como en ausencia de LDL, lo cual sugería que presentaban un déficit de la capacidad de captar colesterol del medio.

Estas observaciones sugirieron que el colesterol se capta en las células mediante la acción de un receptor específico, que es deficitario o defectuoso en los pacientes con HF. Poco después, Brown y Goldstein y sus colaboradores demostraron la existencia de este receptor, el **receptor de LDL** (véase la Figura 18.7), y pusieron de manifiesto un nuevo mecanismo a través del cual las células pueden interactuar con su entorno: la **endocitosis mediada por el receptor**. Mediante la conjugación de las LDL con un material electrodenso y la unión de este material a las células, los investigadores pudieron visualizar el receptor de LDL en las superficies celulares (Figura 18.8). Estos experimentos indicaron que los receptores están agrupados en una estructura denominada **hoyo revestido,** una invaginación en la que la proteína más abundante es la **clatrina,** una proteína autointeractiva capaz de formar una estructura en forma de jaula (Figura 18.9).

La **endocitosis** es un proceso mediante el cual las células captan moléculas grandes del medio extracelular. Aunque la captación de LDL implica la intervención de un receptor de la superficie celular, la interacción de las LDL con su receptor es distinta de la interacción de las hormonas como la adrenalina con sus receptores. Como se comentó en los Capítulos 12 y 13, la unión de la adrenalina a su receptor en la membrana plasmática desencadena alteraciones metabólicas intracelulares, pero la hormona en sí no entra en la célula. En cambio, cuando la LDL se une a su receptor, mediante la identificación de la apoproteína B-100 por parte del receptor, toda la molécula de LDL se engloba y se capta en la célula, tal como se esquematiza en la Figura 18.10. La membrana plasmática se fusiona en la proximidad del complejo LDL-receptor, y el hoyo revestido se convierte en una vesícula endocitósica. Varias de estas vesículas revestidas de clatrina se fusionan para formar un **endosoma**. El endosoma se fusiona entonces con un lisosoma, con lo que se pone al complejo LDL-receptor en contacto con las enzimas hidrolíticas del lisosoma. La apoproteína de la LDL se hidroliza a aminoácidos, y los ésteres de colesterol se hidrolizan para dar colesterol libre. El receptor se recicla, y vuelve a la membrana plasmática para captar más LDL. Son necesarios unos 10 minutos para cada ciclo de este tipo.

Gran parte del colesterol liberado se desplaza hacia el retículo endoplásmico, en donde se utiliza para la síntesis de las membranas. El colesterol internalizado ejerce tres efectos reguladores. (1) Como se ha indicado antes, suprime la síntesis endógena de colesterol mediante la inhibición de la HMG-CoA reductasa y también mediante la supresión de la transcripción del gen de esta enzima y la aceleración de la degradación de la proteína enzimática. (2) Activa la **acil-CoA:colesterol aciltransferasa** (**ACAT**), una enzima intracelular que sintetiza ésteres de colesterol a partir de colesterol y una acil-CoA de cadena larga. Esto fomenta el almacenamiento del exceso de colesterol en forma de pequeñas gotas de ésteres de colesterol. (3) Regula la síntesis del propio receptor de LDL, reduciendo de algún modo el contenido de mRNA para el receptor. La disminución de la síntesis del receptor garantiza que el colesterol no se capte en las células en una cantidad superior a las necesidades de éstas, a pesar de que las concentraciones extracelulares sean muy altas. Este mecanismo de regulación explica por qué un exceso de colesterol en la alimentación causa directamente elevaciones de las concentraciones sanguíneas de colesterol. Con una regulación tan exacta de las concentraciones intracelulares de colesterol, el colesterol extracelular se acumula puesto que no tiene ningún otro lugar a donde ir.



(a)

(b)

FIGURA **18.8**

Endocitosis de las LDL mediada por el receptor. La lipoproteína de baja densidad (LDL) se conjugó con ferritina para permitir la visualización con el microscopio electrónico. **(a)** La LDL-ferritina (puntos oscuros) se une a un hoyo revestido sobre la superficie de un fibroblasto (un tipo de célula del tejido conjuntivo) humano. **(b)** La membrana plasmática se cierra sobre el hoyo revestido, formando una vesícula endocitósica.

Cortesía de R. G. W. Anderson, M. S. Brown y J. L. Goldstein, *Cell* (1977) 10:351-364. © 1977 Cell Press.

La captación de colesterol de la sangre se produce en los receptores de LDL a través de una endocitosis mediada por el receptor.



FIGURA **18.9**

Estructura de un hoyo revestido. Se visualiza un hoyo revestido sobre la superficie interna de la membrana plasmática de una célula de mamífero en cultivo mediante microscopia electrónica de fractura por congelación. La estructura de jaula del hoyo se debe a la estructura de la clatrina, la principal proteína de estos hoyos.

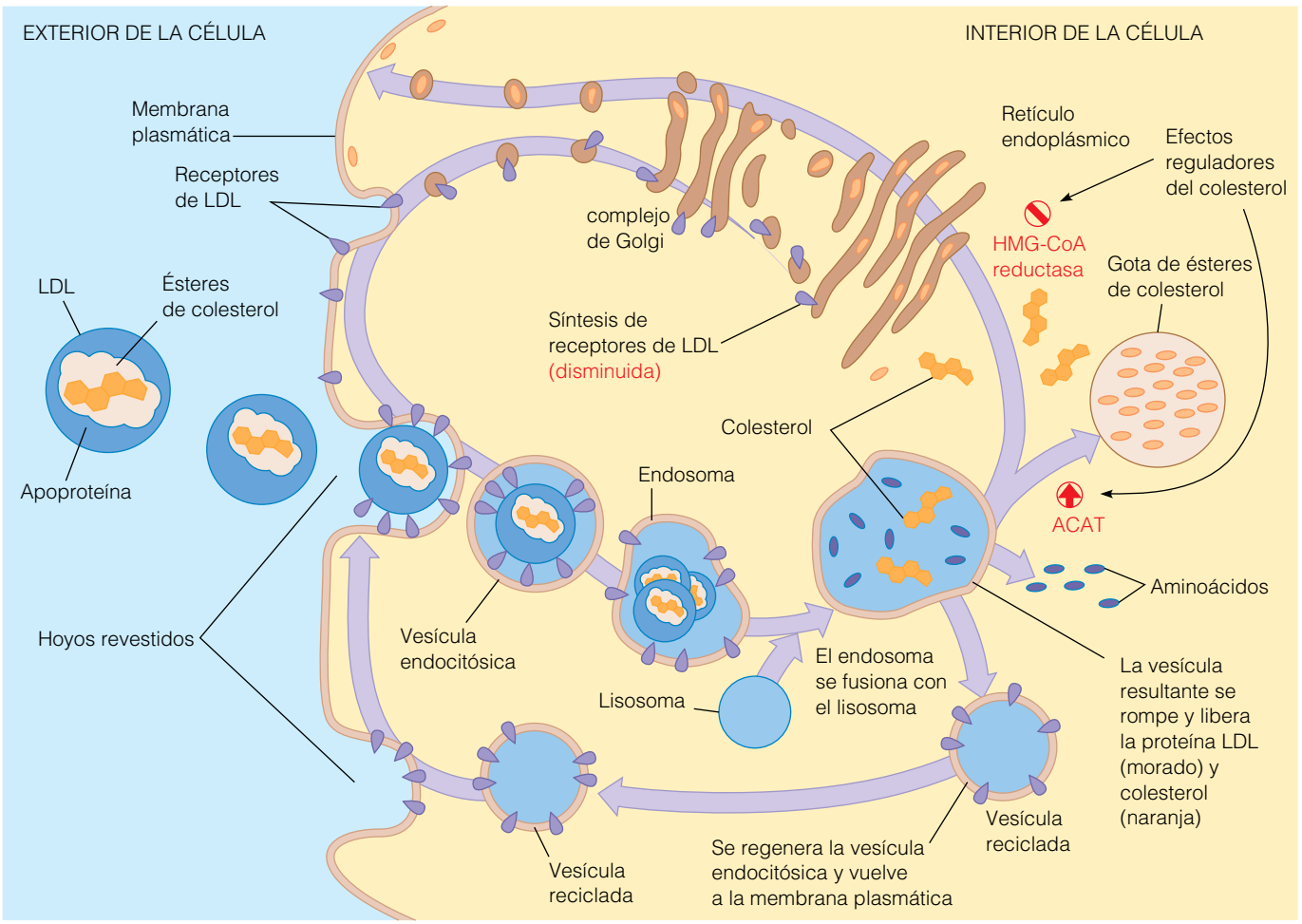
Fotografía microscópica realizada por John Heuser, Washington University School of Medicine.

Los enfoques terapéuticos actuales para reducir las concentraciones de colesterol se centran en la creación de inhibidores de la HMG-CoA reductasa, partiendo del supuesto de que deprimirán la biosíntesis de novo de colesterol y, por tanto, las concentraciones intracelulares de colesterol; consecuentemente aumentará la producción de receptores de LDL para la eliminación del colesterol extracelular de la sangre. Un inhibidor de este tipo, denominado **lovastatina**, fue aprobado en 1987 para el tratamiento de los pacientes con concentraciones de colesterol muy elevadas. En la actualidad, se dispone de varios otros inhibidores de la HMG-CoA reductasa.

Actualmente, sabemos que la endocitosis mediada por el receptor es una ruta muy utilizada para la internalización de sustancias extracelulares, como otras li-

FIGURA **18.10**

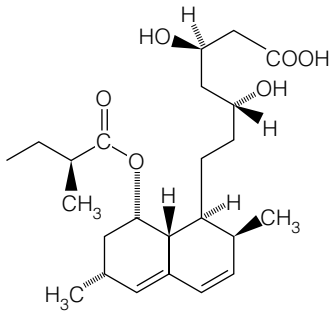
Implicación de los receptores de LDL en la captación y metabolismo del colesterol. Los receptores de LDL se sintetizan en el retículo endoplásmico y maduran en el complejo de Golgi. A continuación, migran a la superficie celular, en donde se agrupan en hoyos revestidos de clatrina. La LDL, formada por ésteres de colesterol y apoproteína, se une a los receptores de LDL y se internaliza en vesículas endocitósicas. Varias de estas vesículas se fusionan para formar un orgánulo denominado endosoma. El bombeo de protones en la membrana del endosoma hace que disminuya el pH, lo cual provoca a su vez que la LDL se disocie de los receptores. El endosoma se fusiona con un lisosoma, y la cubierta de clatrina portadora del receptor se disocia y vuelve a la membrana. El complejo receptor-LDL se degrada en los lisosomas, y el colesterol tiene diversos destinos. Las acciones reguladoras del colesterol se indican en rojo.



poproteínas, factores de crecimiento celular y algunos virus. Además, los estudios realizados en muchas personas con HF han revelado la existencia de cuatro tipos de mutación que generan el fenotipo HF, y estos estudios nos están proporcionando una imagen muy detallada del receptor y su acción. El receptor de LDL es una glucoproteína con una cadena polipeptídica de 839 aminoácidos y 18 cadenas de oligosacáridos enlazados por O. El receptor se une específicamente a las apolipoproteínas B-100 y E. La clonación del gen y el análisis de la secuencia de DNA han permitido identificar cuatro tipos de mutaciones que afectan al receptor y a su metabolismo en el ser humano.

En primer lugar, y con la mayor frecuencia, se encuentran las mutaciones que dan lugar a una síntesis insuficiente del receptor. En segundo lugar, se encuentran las mutaciones en las que el receptor se sintetiza, pero no migra desde el retículo endoplásmico al complejo de Golgi, para su transporte a la membrana citoplasmática. En tercer lugar se encuentran las mutaciones en las que el receptor se sintetiza y se procesa de manera normal y llega a la superficie de la célula pero no puede unir la LDL. Por último, existe una clase de receptores mutantes que llegan a la superficie celular y unen la LDL pero no son capaces de agruparse en hoyos revestidos.

El colesterol intracelular regula su propia concentración mediante el control de: (1) la biosíntesis de colesterol de novo, (2) la formación y almacenamiento de ésteres de colesterol, y (3) la densidad de los receptores de LDL.

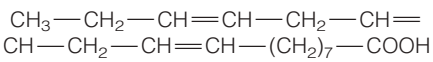


Lovastatina

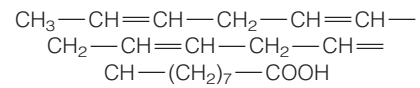
Colesterol, LDL y aterosclerosis

Gracias principalmente a Brown y Goldstein, conocemos mucho sobre los factores genéticos y bioquímicos que controlan las concentraciones séricas de colesterol y, de forma abrumadora, las pruebas epidemiológicas ligan actualmente la hipercolesterolemia prolongada con la aparición de la placa aterosclerótica. Sin embargo, todavía queda mucho que aprender. Por ejemplo, no conocemos por qué las alimentaciones con abundancia de ácidos grasos saturados tienden a elevar la concentración sérica de colesterol. No sabemos por qué un tipo determinado de ácidos grasos poliinsaturados denominados **ácidos grasos *ω*-3** tienden a disminuir las concentraciones tanto de colesterol como de triacilgliceroles. Pero los especialistas en nutrición han encontrado que cuando se añade a una alimentación occidental pescado o aceites de pescado, que tienen gran cantidad de esta clase de ácidos grasos, realmente tienen este efecto, y ésta es la razón por la que se nos recomienda sustituir la carne roja, que tiene gran abundancia de ácidos grasos saturados y colesterol, por el pescado. El ácido graso *ω*-3 más importante es el ácido linolénico, que es un ácido graso 18:3cΔ9,12,15 (los especialistas en nutrición numeran a los ácidos grasos al revés que los bioquímicos, de forma que el término *ω*-3 indica que el doble enlace está sobre el tercer carbono desde el grupo metilo terminal, que nosotros llamaríamos el enlace entre C-15 y C-16 en esta molécula de 18 átomos de carbono). Los datos actuales sugieren que el linolénico y otros ácidos grasos *ω*-3 actúan compitiendo de alguna manera con el metabolismo del ácido araquidónico (20:4cΔ9,12,15,18), el precursor principal de un tipo de reguladores biológicos denominados **prostaglandinas** y **tromboxanos** que se describirán en el Capítulo 19; sin embargo, están aún oscuras las relaciones bioquímicas implicadas.

La ingestión de grasas poliinsaturadas se correlaciona con unas concentraciones plasmáticas de colesterol bajas. No se conocen los mecanismos que explican este hecho.



Ácido linolénico



Ácido araquidónico

Sin embargo, se ha progresado en el conocimiento de cómo las concentraciones elevadas de colesterol llevan a la aterogénesis (formación de placas). Las LDL sufren con bastante facilidad una oxidación, tanto en el plasma como en las células, para dar una mezcla de moléculas que en conjunto se denominan **LDL oxidadas**. Aunque no están bien definidas las reacciones específicas de oxidación, se incluyen la peroxidación de ácidos grasos insaturados (página 618), la hidroxilación del propio colesterol y la oxidación de residuos de aminoácidos de la apoproteína. La LDL se capta por un tipo de leucocitos que se acumulan en los lugares de la lesión arterial. La captura se produce a través de un receptor que

La captación de las LDL oxidadas por el receptor de eliminación es un proceso fundamental en la aterogénesis.

se denomina **receptor de eliminación,** cuyo ligando normal no se ha identificado aún, aunque capta muchas sustancias además de las LDL oxidadas. A diferencia del receptor de LDL, el receptor de eliminación no está regulado por disminución por el colesterol, de forma que la captación de colesterol por estas células se produce virtualmente sin límites, lo cual convierte a estas células en unas especies rellenas de colesterol denominadas **células espumosas.** Estos hechos tienen un efecto quimiotáctico, y hacen que migren más leucocitos a este lugar y que acumulen más colesterol, que finalmente llega a ser uno de los principales constituyentes químicos de la placa que se forma en ese lugar.

Habrá oído probablemente hablar del "colesterol malo" y del "colesterol bueno". Se trata realmente de términos inadecuados, ya que el colesterol en sí mismo es un metabolito natural, un componente esencial de todas las membranas y el precursor de todas las hormonas esteroideas y los ácidos biliares. Sin embargo, el colesterol presente en las LDL se considera "malo", porque la elevación prolongada de la concentración de LDL es lo que conduce a la aterosclerosis. Por el contrario, el colesterol en las HDL se denomina "bueno" porque las concentraciones elevadas de HDL contrarrestan la aterogénesis. Esto se debe a que el colesterol no puede degradarse de forma metabólica y el exceso de colesterol se devuelve desde las células periféricas al hígado, para su paso al intestino a través de la bilis y finalmente su excreción. Como agente de este transporte de vuelta al hígado, las HDL desempeñan una función en el descenso de las concentraciones totales séricas de colesterol, lo cual es "bueno". Los últimos estudios han demostrado que el colesterol de las HDL no se capta en las células por endocitosis, como las LDL, sino mediante una reacción de "ensamblaje", en la cual la HDL interacciona con un receptor de la superficie celular, deposita su colesterol para su captura mediante un mecanismo todavía desconocido, y parte como un remanente sin incorporarse ella misma al interior celular.

MOVILIZACIÓN DE LA GRASA ALMACENADA

La movilización de las grasas en las células adiposas está bajo control hormonal, a través de la fosforilación de la lipasa dependiente de AMP cíclico.

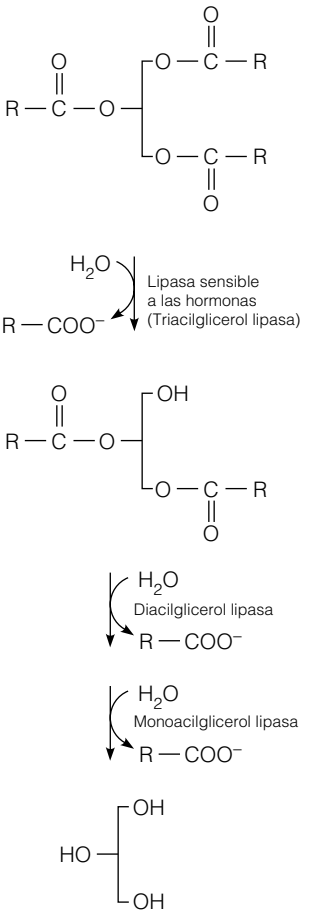
En general, el transporte de la grasa de la alimentación a los lugares de reserva no está regulado. Todo aquello que aparece en el cuerpo procedente de la alimentación se absorbe, y la mayor parte se transporta al tejido adiposo para su almacenamiento. La falta de control de este proceso es tristemente evidente como lo demuestra la prevalencia de la obesidad en el ser humano, en el que la grasa se almacena en exceso respecto a la necesidad de aporte energético. En cambio, la liberación de grasa de los depósitos de almacenamiento del tejido adiposo se controla hormonalmente, para satisfacer las necesidades del organismo en la generación de energía.

El catabolismo de la grasa se inicia con la hidrólisis de los triacilgliceroles para producir glicerol y ácidos grasos libres (que se abrevian con las siglas AGL). Aproximadamente el 95% de la energía procedente de la oxidación posterior de la grasa procede de los ácidos grasos y sólo un 5% procede del glicerol. Todos los carbonos de los ácidos grasos se catabolizan para dar lugar a fragmentos de dos carbonos, en forma de acetil-coenzima A, excepto la pequeña proporción de ácidos grasos que contienen cadenas con un número impar de carbonos.

La liberación de la energía metabólica almacenada en los triacilgliceroles es comparable a la movilización de la energía de los hidratos de carbono almacenada en el glucógeno de los animales, por cuanto el primer paso de la degradación de la grasa, su hidrólisis a glicerol y ácidos grasos, se regula hormonalmente. La primera reacción se controla mediante una cascada en la que interviene el AMP cíclico (Figura 18.11). Según cuál sea el estado fisiológico, el glucagón o la adrenalina, o la β-corticotropina se unen a un receptor de la

membrana plasmática, lo cual conduce a la activación de la adenilato ciclasa, como se ha descrito en el Capítulo 13. Ello activa, a su vez, la proteína quinasa por la liberación de las subunidades catalíticas (C) activas del tetrámero R_2C_2 inactivo. La proteína quinasa A fosforila y, por tanto, activa una enzima denominada **triacilglicerol lipasa,** también llamada **lipasa sensible a las hormonas**. Esta enzima cataliza la liberación hidrolítica del ácido graso de los carbonos 1 ó 3 de la fracción glicerol. La liberación del ácido graso va seguida de la acción de una diacilglicerol lipasa y una monoacilglicerol lipasa, de forma consecutiva. Juntas, estas tres enzimas degradan la molécula original a glicerol y tres ácidos grasos no esterificados. En el tejido adiposo, los efectos hormonales principales están mediados por la adrenalina en las situaciones de estrés, y por el glucagón durante el ayuno.

Los productos de la hidrólisis de los triacilgliceroles salen del adipocito por difusión pasiva y llegan al plasma sanguíneo, en donde los ácidos grasos se unen a la **albúmina**. Ésta es la proteína más abundante del plasma, y constituye alrededor del 50% del total de proteínas plasmáticas en el ser humano. La proteína, con un M_r de 66 200, contiene 17 puentes disulfuro. Cada molécula de albúmina puede unir hasta 10 moléculas de ácido graso libre, aunque la cantidad real unida suele ser muy inferior. Los ácidos grasos se liberan de la albúmina



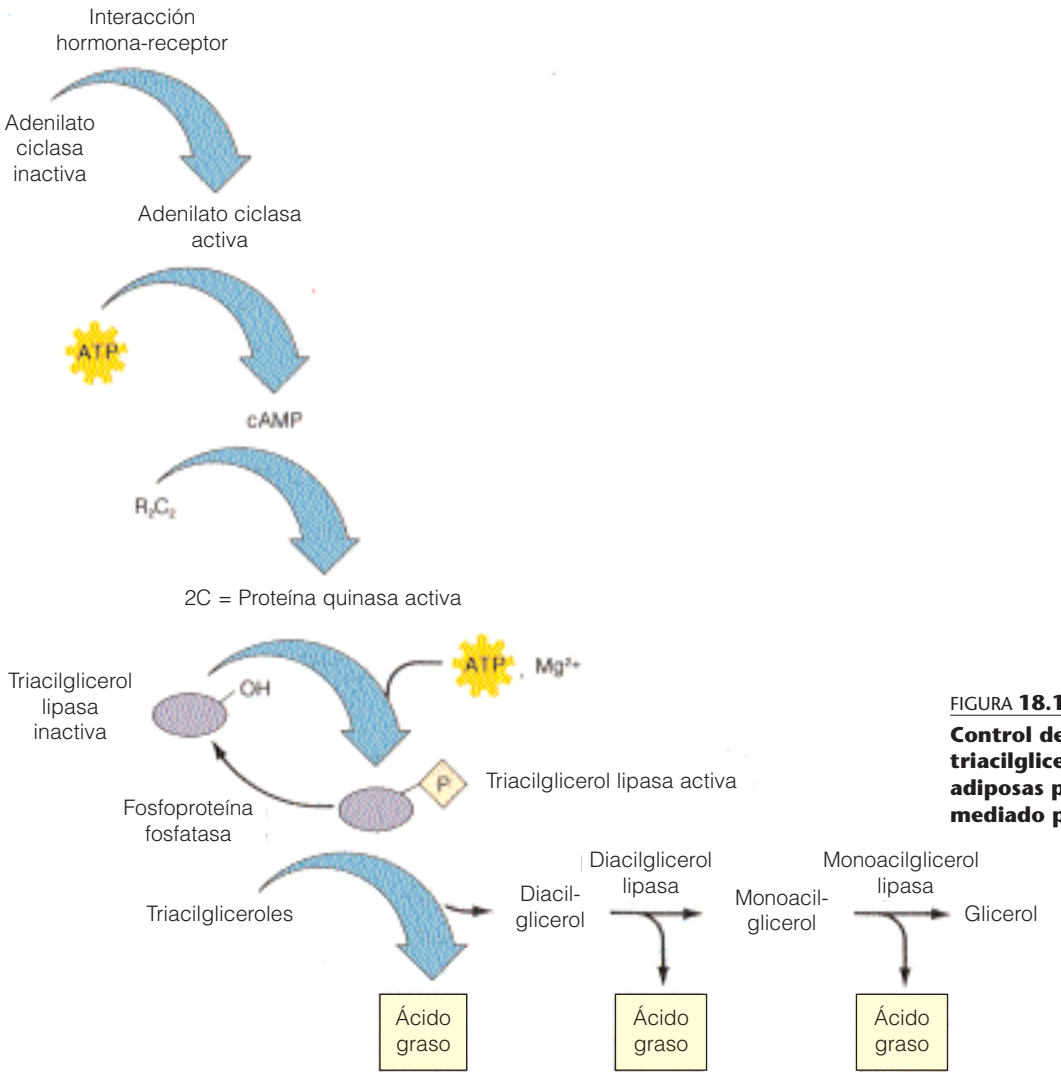


FIGURA **18.11**

Control de la actividad de la triacilglicerol lipasa en las células adiposas por un sistema de cascada mediado por el AMP cíclico.

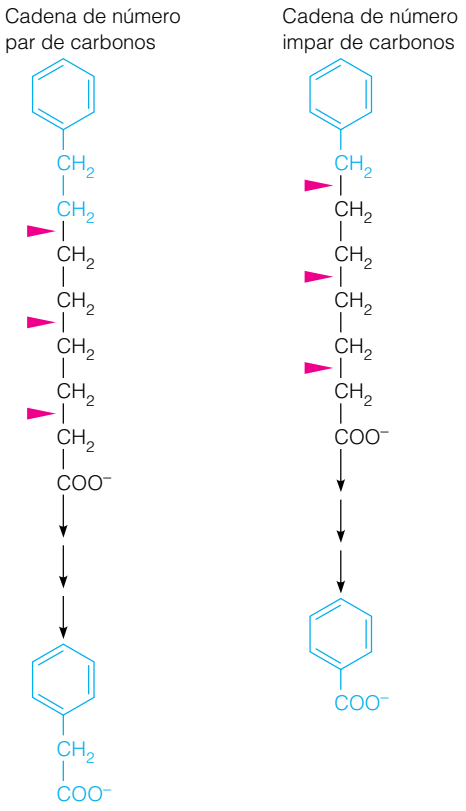


FIGURA **18.12**

Oxidación de derivados fenilos de los ácidos grasos en el experimento de Knoop. Los triángulos rojos corresponden a los supuestos lugares de ruptura de estos ácidos grasos modelo.

y se captan por los tejidos en gran parte mediante difusión pasiva, por lo que la captación de ácidos grasos al interior de las células está dirigida fundamentalmente por su concentración. La mayor parte del glicerol liberado al torrente sanguíneo se capta por las células hepáticas, donde se utiliza como sustrato gluconeogénico que conduce a glucosa.

Oxidación de los ácidos grasos

EXPERIMENTOS INICIALES

La naturaleza de la ruta mediante la cual se oxidan los ácidos grasos fue descubierta ya en 1904, en una serie brillante de experimentos realizados por el químico alemán Franz Knoop. Los experimentos fueron realmente inspirados, puesto que consistieron en la primera utilización conocida de trazadores metabólicos, más de 40 años antes de que se dispusiera de los trazadores radiactivos. Knoop administró a perros una serie de ácidos grasos en los que el grupo metilo terminal se había modificado con un grupo fenilo. Se preveía que estos análogos seguirían unas rutas metabólicas similares a las utilizadas para la oxidación de los ácidos grasos normales. Knoop encontró que cuando el ácido graso administrado tenía una cadena con un número par de carbonos, el producto de degradación final, recuperado en la orina, era ácido fenilacético. Cuando el ácido graso administrado tenía una cadena con un número impar de carbonos, el producto obtenido era ácido benzoico (Figura 18.12).

Estos resultados llevaron a Knoop a proponer que los ácidos grasos se oxidan de una forma escalonada, con un ataque inicial en el carbono 3 (el carbono β con respecto al grupo carboxilo). Este ataque liberaría los dos carbonos terminales y el resto de la molécula de ácido graso podría sufrir una nueva oxidación. La liberación de un fragmento de dos carbonos podría producirse en cada paso de la oxidación. Con los análogos, el proceso se repetiría hasta que el ácido restante, fenilacético o benzoico, no pudiera metabolizarse y se excretara en la orina.

El avance importante siguiente se produjo en los años 1940, cuando Luis Leloir y Albert Lehninger demostraron de manera independiente la oxidación de los ácidos grasos en homogeneizados hepáticos acelulares. Lehninger observó que el ATP era esencial para este proceso, y sugirió que el ATP activa de alguna forma el grupo carboxilo del ácido graso. Trabajando con Eugene Kennedy, Lehninger observó también que el proceso se producía en las mitocondrias y que liberaba fragmentos de dos carbonos que se oxidaban en el ciclo del ácido cítrico. En Munich, Feodor Lynen demostró que la activación dependiente de ATP esterifica el grupo carboxilo del ácido graso con el grupo tiol de la coenzima A, y más tarde se demostró que todos los intermediarios de las reacciones oxidativas posteriores son acil-CoA. Así pues, a mediados de los años 1950 se conocían las líneas básicas de la ruta de oxidación de los ácidos grasos. Como se muestra en la Figura 18.13, la ruta consiste en la activación del grupo carboxilo, el transporte a la matriz mitocondrial y la oxidación escalonada de la cadena carbonada, de dos en dos carbonos, desde el extremo que contiene el grupo carboxilo.

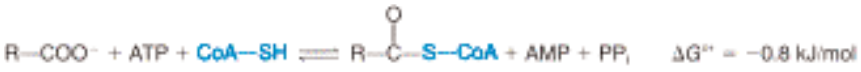
ACTIVACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS Y TRANSPORTE A LAS MITOCONDRIAS

En su mayor parte, los ácidos grasos aparecen en el citosol, ya sea mediante biosíntesis (como se expone más adelante en este capítulo), ya sea a través del transporte de los triacilgliceroles o los ácidos grasos procedentes de los depósitos de grasa del exterior de la célula. Estos ácidos grasos deben transportarse al interior de la matriz mitocondrial para su oxidación. Dado que la membrana in-

terna es impermeable a los ácidos grasos libres de cadena larga y a las acil-CoA, debe intervenir un sistema de transporte específico. Ese sistema de transporte opera en estrecha relación con la activación metabólica necesaria para iniciar la ruta de la β-oxidación.

Una serie de **acil-CoA ligasas**, específicas para los ácidos grasos de cadena corta, cadena media o cadena larga, cataliza la formación de los conjugados tioésteres de acilo con la coenzima A (pasos 1 y 1′ de la parte superior de la Figura 18.13):

Los ácidos grasos se activan para la oxidación mediante la acilación dependiente de ATP de la coenzima A.



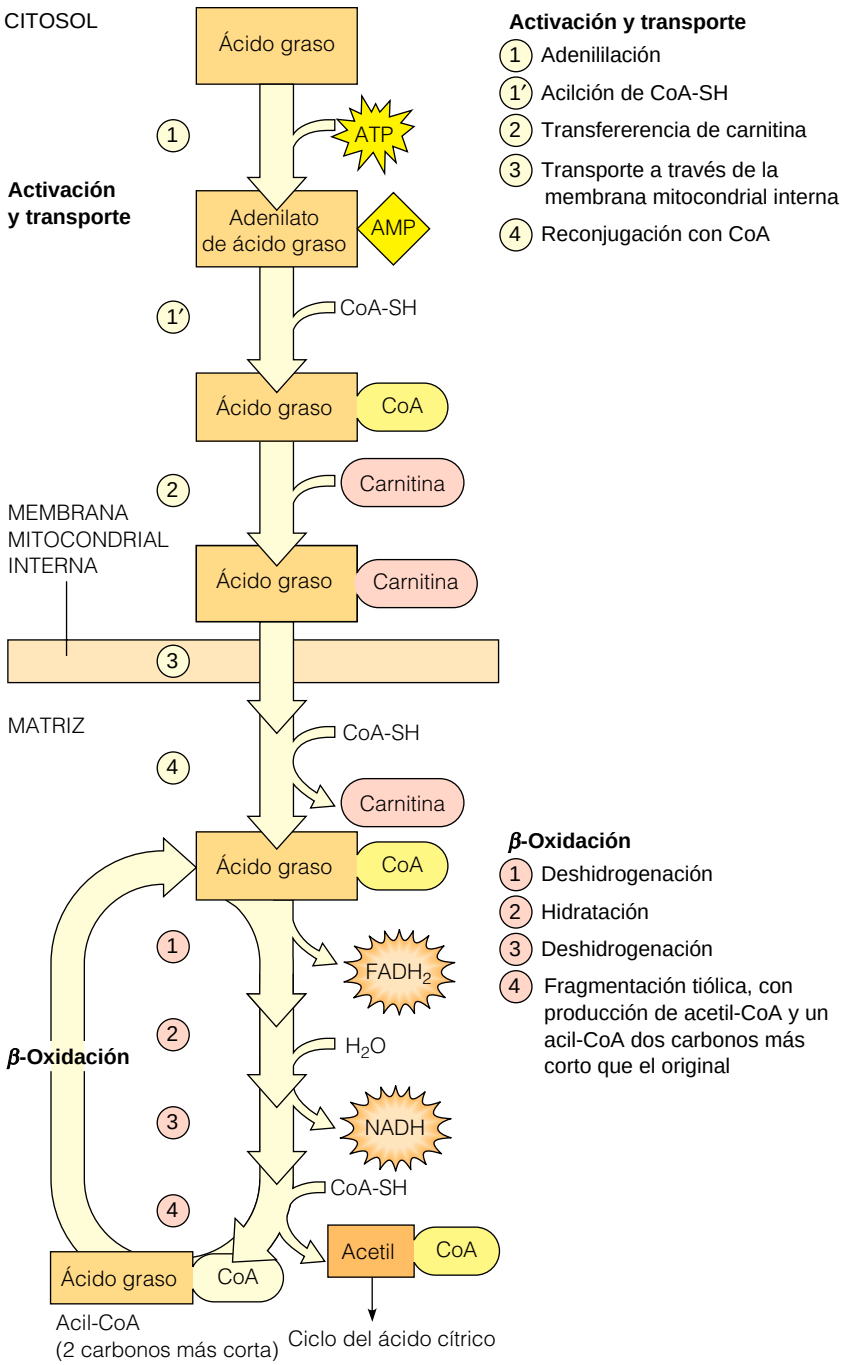


FIGURA **18.13**
Visión general de la ruta de oxidación de los ácidos grasos.

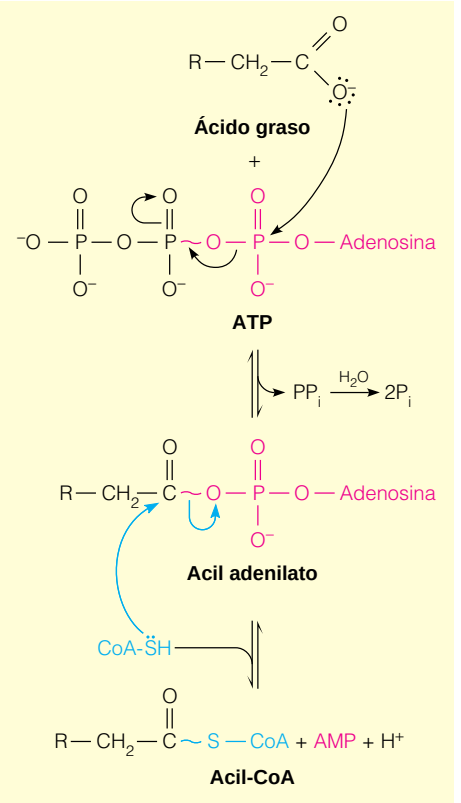


FIGURA **18.14**

Mecanismo de las reacciones de la acil-CoA ligasa. En la figura se muestra la formación reversible del acil adenilato activado, el ataque nucleófilo por el azufre tiólico de la CoA-SH sobre el grupo carboxilo activado, y la reacción de pirofosfatasa casi irreversible, que desplaza la reacción global hacia la acil-CoA.

La ligasa específica para los ácidos de cadena larga es una enzima unida a la membrana, que se encuentra tanto en el retículo endoplásmico como en la membrana mitocondrial externa; las enzimas para las cadenas cortas y las cadenas medias se encuentran fundamentalmente en la matriz mitocondrial. La enzima para las cadenas largas, que es la que tiene la función principal en la iniciación de la oxidación de los ácidos grasos, actúa sobre los ácidos grasos con longitudes de cadena de entre 10 y 20 carbonos; la enzima para las cadenas medias actúa sobre las cadenas de 4 a 12 carbonos, y la enzima para las cadenas cortas tiene una acción preferente sobre el acetato y el propionato.

Desde el punto de vista químico, el enlace tioéster de energía elevada de las acil-CoA de cadena larga es idéntico al de la acetil-CoA (véase el Capítulo 14). Recuérdese que la oxidación del piruvato proporciona la energía necesaria para impulsar la formación de acetil-CoA. Las acil-CoA ligasas utilizan, en cambio, un mecanismo de dos pasos que comporta una degradación de ATP para impulsar la formación endergónica del tioéster (Figura 18.14). Se produce en primer lugar la activación del grupo carboxilo por el ATP para producir un **acil adenilato,** con la liberación simultánea de pirofosfato. A continuación, el grupo carboxilo activado es atacado por el grupo tiol de la CoA, con lo que desplaza al AMP y forma el derivado acil-CoA. Los grupos carboxilo de los aminoácidos se activan para la síntesis proteica de una forma muy similar.

La activación de los ácidos grasos es fácilmente reversible, debido a que cada acil-CoA, como el propio ATP, es un compuesto de energía elevada. Sin embargo, la dirección de esta reacción en las células es claramente hacia la derecha, debido a la pirofosfatasa activa presente en la mayor parte de las células:

$$PP_i + H_2O \longrightarrow 2P_i \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -33 \text{ kJ/mol}$$

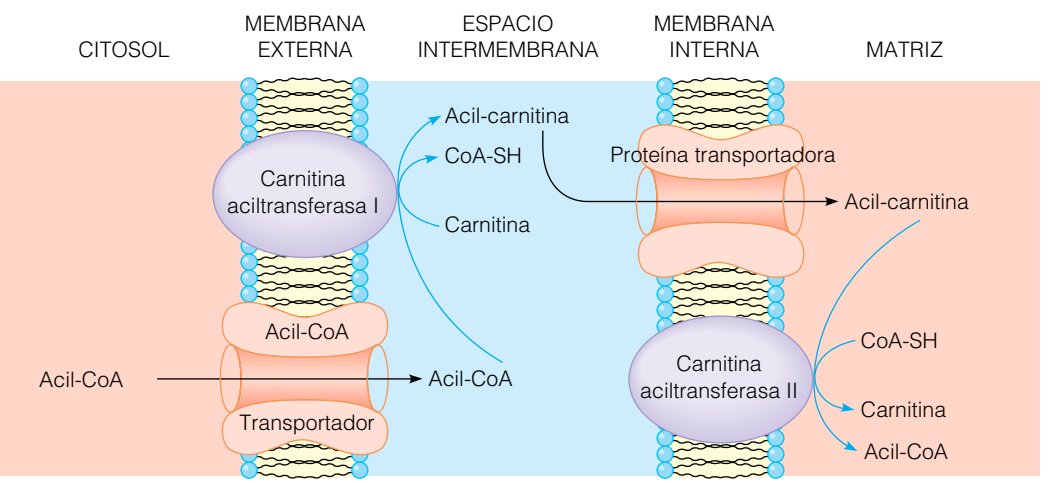
Así pues, la reacción global (suma de las dos reacciones anteriores) va claramente en la dirección de terminación, con un valor neto de $\Delta G^{\circ\prime}$ de –33.8 kJ/mol.

La carnitina transporta las acil-CoA a las mitocondrias para la oxidación.

Las acil-CoA se forman en la membrana mitocondrial externa. En consecuencia, deben desplazarse a través de la membrana mitocondrial interna para oxidarse. Este movimiento comporta la transferencia de la porción acilo a un transportador denominado **carnitina** (paso 2, parte superior de la Figura 18.13). La reacción la cataliza la **carnitina aciltransferasa I,** situada en la superficie externa de la membrana mitocondrial interna, y su resultado es un derivado, **acil-carnitina,** que puede atravesar la membrana interna (Figura 18.15 y paso 3, parte superior de la Figura 18.13). La enzima **carnitina aciltransferasa II,** situada en

FIGURA **18.15**

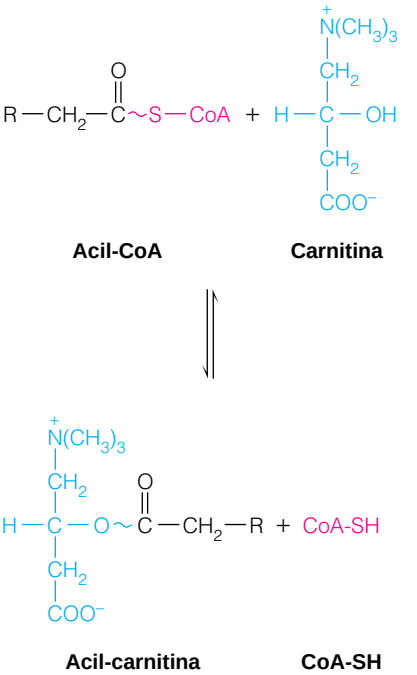
Ciclo de la carnitina para el transporte de las acil-CoA al interior de las mitocondrias.



el lado de la matriz de la membrana interna, completa el proceso de transferencia intercambiando acil-carnitina por carnitina libre y produciendo acil-CoA dentro de la matriz (paso 4, parte superior de la Figura 18.13).

La carnitina libre formada en la matriz regresa con facilidad al espacio intermembrana a través de la proteína transportadora, y de forma semejante, la CoA-SH libre en el espacio intermembrana vuelve al citosol para empezar de nuevo el proceso. Aunque las acil-carnitina son ésteres ordinarios, el enlace éster en estos compuestos está aún algo activado, como lo demuestra la fácil reversibilidad de las reacciones carnitina aciltransferasa.

¿Cuál es la finalidad de este proceso de lanzadera bastante complejo? Probablemente es regular la oxidación de los ácidos grasos evitando el ciclo inútil que se produciría si la oxidación y la nueva síntesis tuvieran lugar en la misma célula. La carnitina aciltransferasa I se inhibe fuertemente por la **malonil-CoA,** el primer compuesto de la síntesis de ácidos grasos (página 729). De esta forma, las condiciones celulares que favorecen la síntesis de ácidos grasos evitan la transferencia de moléculas de acilo a los lugares intracelulares de oxidación, evitando así esa oxidación.



RUTA DE LA β-OXIDACIÓN

Una vez en el interior de la matriz mitocondrial, las acil-CoA se oxidan, tal como predijo Knoop, con una oxidación inicial del carbono β y una serie de pasos en los que se libera cada vez un fragmento de dos carbonos en forma de acetil-CoA, del ácido graso que está siendo oxidado. Cada paso comporta cuatro reacciones (Figura 18.16 y pasos 1-4 de la parte inferior de la Figura 18.13). La ruta es cíclica, por cuanto cada paso termina con la formación de una acil-CoA acortada en dos carbonos, que experimenta el mismo proceso en el paso siguiente o ciclo. Así, por ejemplo, 1 mol de palmitoil-CoA, procedente de un ácido graso de 16 carbonos, sufre siete ciclos de oxidación, para dar 8 moles de acetil-CoA. Cada ciclo libera 1 unidad de dos carbonos, al tiempo que se realizan dos reacciones de oxidación de dos electrones. Dado que cada paso se inicia con la oxidación del carbono β, esta ruta se denomina **β-oxidación**.

Desde el punto de vista del mecanismo, esta ruta es muy similar a la que se utiliza para oxidar el succinato en el ciclo del ácido cítrico. Como se muestra en la Figura 18.16, cada ciclo de oxidación de una acil-CoA saturada comporta las siguientes reacciones: (1) deshidrogenación para dar un derivado enoil, (2) hidratación del doble enlace resultante, de tal manera que el carbono β sufre una hidroxilación, (3) deshidrogenación del grupo hidroxilo, y (4) fragmentación mediante el ataque de una segunda molécula de coenzima A sobre el carbono β, para liberar acetil-CoA y una acil-CoA dos carbonos más corta que el sustrato original. La oxidación de las acil-CoA insaturadas es ligeramente diferente, como se presenta en la página 722.

La acetil-CoA procedente de la β-oxidación entra en el ciclo del ácido cítrico, donde se oxida a CO_2, de la misma forma que la acetil-CoA procedente de la oxidación del piruvato. Como el ciclo del ácido cítrico, la β-oxidación genera transportadores electrónicos reducidos, cuya reoxidación en las mitocondrias genera ATP a través de la fosforilación oxidativa del ADP. Describamos ahora con detalle las diversas reacciones del proceso.

Reacción 1: deshidrogenación inicial

La primera reacción la cataliza una **acil-CoA deshidrogenasa**, que deshidrogena entre el carbono α y el carbono β, para dar como producto una *trans*-Δ2-enoil-CoA.

$$\text{Acil-S-CoA} + \text{E–FAD} \longrightarrow \textit{trans}\text{-}\Delta 2\text{-enoil-S-CoA} + \text{E–FADH}_2$$

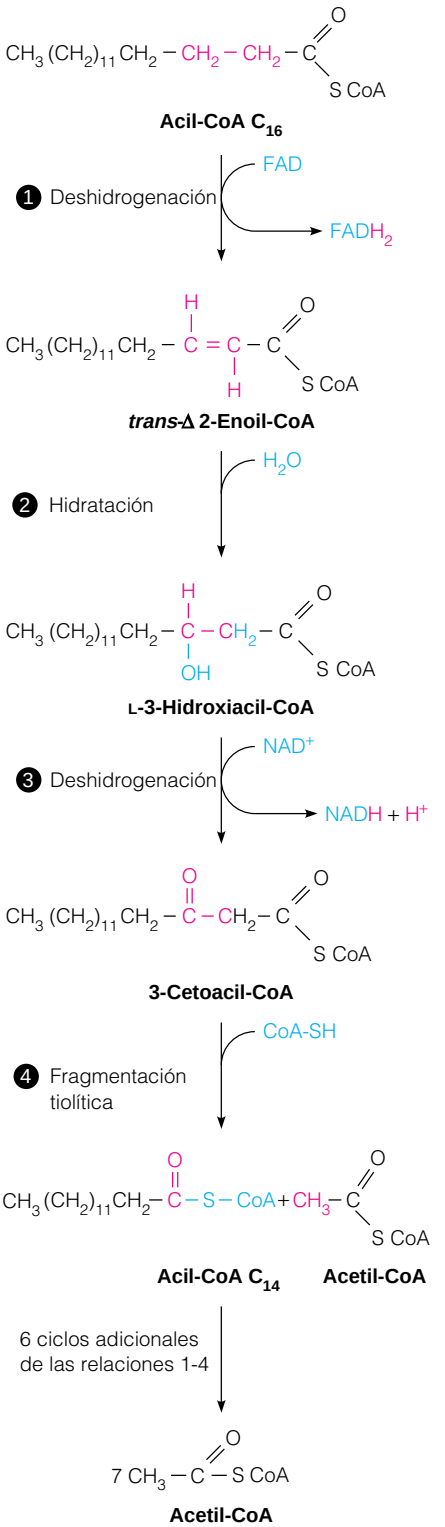


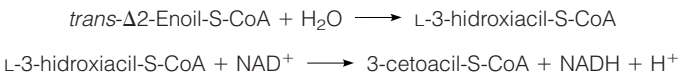
FIGURA **18.16**

Esquema de la *β*-oxidación de los ácidos grasos. En el diagrama, una acil-CoA saturada de 16 carbonos (palmitoil-CoA) sufre siete ciclos de oxidación para dar ocho moléculas de acetil-CoA. Estas reacciones corresponden a los pasos 1-4 de la parte inferior de la Figura 18.13.

Existen tres formas de esta enzima que son específicas para las acil-CoA de cadenas corta, media o larga, respectivamente. Cada enzima contiene un grupo prostético FAD unido estrechamente. Como se observa en la Figura 18.17, la enzima unida al $FADH_2$ aporta un par de electrones a una proteína lanzadera, la **flavoproteína de transferencia de electrones (ETFP).** Estos electrones se transfieren a su vez a la coenzima Q a través de la ETF-Q oxidorreductasa, una proteína integral de membrana, y posteriormente, se transfieren a la cadena respiratoria produciendo dos ATP por la fosforilación oxidativa (Figura 18.17). En este sentido, la ETF-Q oxidorreductasa es comparable a la NADH deshidrogenasa y a la succinato deshidrogenasa. Las tres son flavoproteínas que transfieren electrones al transportador electrónico móvil coenzima Q.

Reacciones 2 y 3: hidratación y deshidrogenación

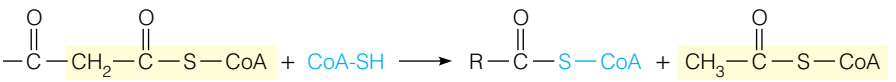
Al igual que en la oxidación del succinato, una oxidación inicial de la acil-CoA dependiente de FAD va seguida de una hidratación y una deshidrogenación dependiente del NAD^+. En la *β*-oxidación las dos últimas reacciones están catalizadas por la **enoil-CoA hidratasa** y la **3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa**, respectivamente. Ambas reacciones son estereoespecíficas.



Dado que el carbono 3 está en *β* con respecto al carbono carboxilo, los productos de estas dos reacciones se denominan L-*β*-hidroxiacil-CoA y *β*-cetoacil-CoA, respectivamente. De ahí el término *β-oxidación.*

Reacción 4: fragmentación tiolítica

La cuarta y última reacción de cada ciclo de la ruta de la *β*-oxidación consiste en un ataque del azufre tiólico nucleófilo de la coenzima A sobre el carbono ceto, pobre en electrones, de la 3-cetoacil-CoA, con fragmentación del enlace *α*—*β* y liberación de acetil-CoA. El otro producto es una acil-CoA acortada, preparada para iniciar un nuevo ciclo de oxidación:



Dado que esta reacción comporta la fragmentación mediante un tiol, se denomina **fragmentación tiolítica**, por analogía con la hidrólisis, que comporta una fragmentación por el agua. La enzima se denomina ***β*-cetotiolasa**, o simplemente **tiolasa.** Un grupo tiol esencial de la enzima (E-SH) ataca al sustrato, con formación de una acil-enzima intermediaria y de acetil-CoA. La CoA-SH libre ataca entonces al intermediario.

Como se ha indicado antes, la ruta global de oxidación que acabamos de describir es aplicable a los ácidos grasos más abundantes: los que contienen un número par de átomos de carbono y están totalmente saturados. Describiremos más tarde las variaciones de esta ruta que permiten la oxidación de otros ácidos grasos. En el caso de las acil-CoA saturadas y de cadena par, la oxidación se produce simplemente de forma escalonada, con la pérdida de dos carbonos en forma de acetil-CoA en cada ciclo. Para la palmitoil-CoA de 16 carbonos, que es el ejemplo que se presenta en la Figura 18.16, el primer ciclo produce acetil-CoA y miristoil-CoA de 14 carbonos. Un segundo ciclo, que actúa sobre este último sustrato, produce acetil-CoA y lauroil-CoA de 12 carbonos. En el séptimo y úl-

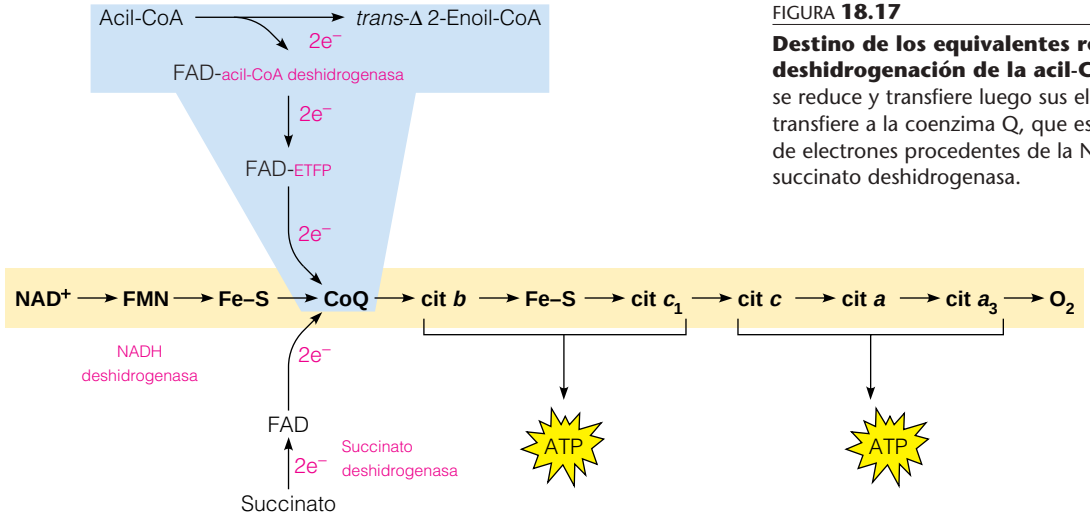


FIGURA **18.17**

Destino de los equivalentes reductores procedentes de la deshidrogenación de la acil-CoA. El FAD ligado a la enzima se reduce y transfiere luego sus electrones al ETFP, que a su vez los transfiere a la coenzima Q, que es también un punto de recogida de electrones procedentes de la NADH deshidrogenasa y de la succinato deshidrogenasa.

timo ciclo, la reacción de la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa produce acetoacetil-CoA. La fragmentación tiolítica de este sustrato da 2 moles de acetil-CoA. Así pues, la oxidación de 1 mol de ácido palmítico comporta seis ciclos sucesivos, en cada uno de los cuales se obtiene 1 mol de acetil-CoA, y un séptimo ciclo, que produce 2 moles. Otros ácidos grasos saturados de cadena par se degradan de una forma idéntica. Así, por ejemplo, la oxidación del ácido esteárico se realiza en ocho pasos, con la producción de dos acetil-CoA en el último ciclo.

Los ácidos grasos se oxidan mediante ciclos repetidos de deshidrogenación, hidratación, deshidrogenación y fragmentación tiolítica, de tal manera que cada ciclo produce acetil-CoA y una acil-CoA dos carbonos más corta que la acil-CoA de entrada.

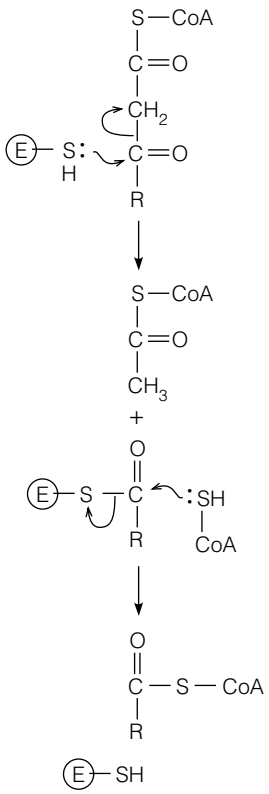
RENDIMIENTO ENERGÉTICO DE LA OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Podemos escribir ahora una ecuación equilibrada para la degradación global de la palmitoil-CoA a 8 moles de acetil-CoA.

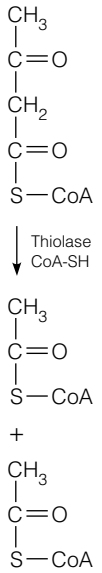
$$\text{Palmitoil-CoA} + 7\text{CoA-SH} + 7\text{FAD} + 7\text{NAD}^+ + 7\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 8\ \text{Acetil-CoA} + 7\text{FADH}_2 + 7\text{NADH} + 7\text{H}^+$$

Cada uno de los productos se metaboliza exactamente como se ha descrito antes para la oxidación de los hidratos de carbono. La acetil-CoA se cataboliza mediante el ciclo del ácido cítrico, y el $FADH_2$ y el NADH transfieren los electrones a la cadena respiratoria a través de la ETFP y la NADH deshidrogenasa, respectivamente. Así pues, podemos calcular con facilidad el rendimiento de energía metabólica que se obtiene con la oxidación de los ácidos grasos en cuanto a moles de ATP sintetizados a partir de ADP. Recuérdese del Capítulo 15 que la oxidación de acetil-CoA en una vuelta del ciclo del ácido cítrico rinde 12 ATP, y que las relaciones P/O para la oxidación de las flavoproteínas y del NADH son 2 y 3, respectivamente. La siguiente suma nos da el rendimiento energético total:

Reacción	Producción de ATP
Activación de palmitato a palmitoil-CoA	−2
Oxidación de 8 acetil-CoA	8 × 12 = 96
Oxidación de 7 $FADH_2$	7 × 2 = 14
Oxidación de 7 NADH	7 × 3 = 21
Neto: Palmitato ⟶ $CO_2 + H_2O$	129



Mecanismo de fragmentación tiolítica



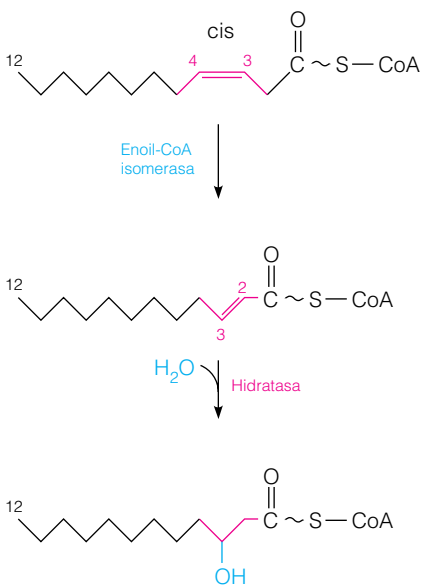
Fragmentación tiolítica final

A partir de estos datos, puede calcularse el rendimiento de ATP por carbono oxidado a CO_2, que es de 129/16, es decir, aproximadamente 8.2. La cifra correspondiente para la glucosa es de 6.3 (38 ATP formados por 6 carbonos oxidados). Así pues, el rendimiento energético de la oxidación de las grasas es superior que el de la oxidación de los hidratos de carbono, mucho menos reducidos, tanto si se mide con relación al peso (véase la página 472) como si se mide en proporción molar.

OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS

Recuérdese del Capítulo 10 que muchos ácidos grasos de los lípidos naturales son insaturados, es decir, contienen uno o varios dobles enlaces (véase la Tabla 10.1, página 355). Dado que estos enlaces se encuentran en la configuración *cis*, no pueden abordarse simplemente por la enoil-CoA hidratasa, que actúa solamente sobre compuestos *trans*. Deben intervenir otras dos enzimas, la **enoil-CoA isomerasa** y la **2,4-dienoil-CoA reductasa,** para que estos ácidos grasos se oxiden. La isomerasa actúa sobre los ácidos grasos monoinsaturados, como el compuesto Δ9 de 18 carbonos, el ácido oleico, que contiene un doble enlace *cis* entre los carbonos 9 y 10. El ácido oleico se activa, se transporta a las mitocondrias, y se lleva a través de tres ciclos de β-oxidación de la misma forma que los ácidos grasos saturados. El producto del tercer ciclo es el éster CoA de un ácido graso de 12 carbonos con un doble enlace *cis* entre los carbonos 3 y 4. El doble enlace no sólo está en la configuración inadecuada para hidratarse, sino que está también en una posición inadecuada. La enzima enoil-CoA isomerasa convierte esta *cis*-Δ3-enoil-CoA a la correspondiente *trans*-Δ2-enoil-CoA, sobre la que puede actuar entonces la enoil-CoA hidratasa (véase el margen de la página). Esta hidratación y todas las reacciones posteriores son idénticas a las que ya se han descrito para los ácidos grasos saturados.

Dos enzimas, la enoil-CoA isomerasa y la 2,4-dienoil-CoA reductasa, desempeñan papeles esenciales en la oxidación de los ácidos grasos insaturados.



La otra enzima auxiliar, la 2,4-dienoil-CoA reductasa, interviene en la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido linoleico. Este ácido graso de 18 carbonos contiene dobles enlaces *cis* entre los carbonos 9 y 10, y entre los carbonos 12 y 13. Como se observa en la Figura 18.18, la linoleil-CoA experimenta tres ciclos de β-oxidación, de la misma forma que ocurre con la oleil-CoA, para dar una acil-CoA de 12 carbonos con dobles enlaces *cis* entre los carbonos 3 y 4, y entre los carbonos 6 y 7. La isomerasa convierte el doble enlace Δ3 de *cis* a *trans*. A continuación, se produce una hidratación, deshidrogenación y fragmentación tiolítica, para dar acetil-CoA y una enoil-CoA de 10 carbonos, insaturada entre los carbonos 4 y 5. La acción de la acil-CoA deshidrogenasa produce una dienoil-CoA, insaturada en C-4—C-5 y en C-2—C-3. La 2,4-dienoil-CoA reductasa dependiente de NADPH convierte ésta en la *cis*-Δ3-enoil-CoA de 10 carbonos. A continuación, vuelve a actuar la isomerasa, que genera una *trans*-Δ2-enoil-CoA, que experimenta los ciclos restantes de β-oxidación de la forma normal.

Mediante las rutas descritas aquí, tanto los ácidos grasos monoinsaturados como los diinsaturados de 18 carbonos pueden degradarse a 9 moles de acetil-CoA. Naturalmente, se produce una ligera reducción del rendimiento energético global debido a que cada doble enlace en el ácido graso original significa un paso menos de la reducción del FAD en el proceso global. Las dos enzimas auxiliares permiten que todos los ácidos grasos poliinsaturados de cadena par se degraden de forma similar, con la siguiente excepción. Una parte importante de los lípidos de la alimentación contiene ácidos grasos insaturados con dobles enlaces en la configuración *trans*. Estos ácidos grasos proceden de la acción microbiana en el aparato digestivo de los mamíferos rumiantes y también tienen

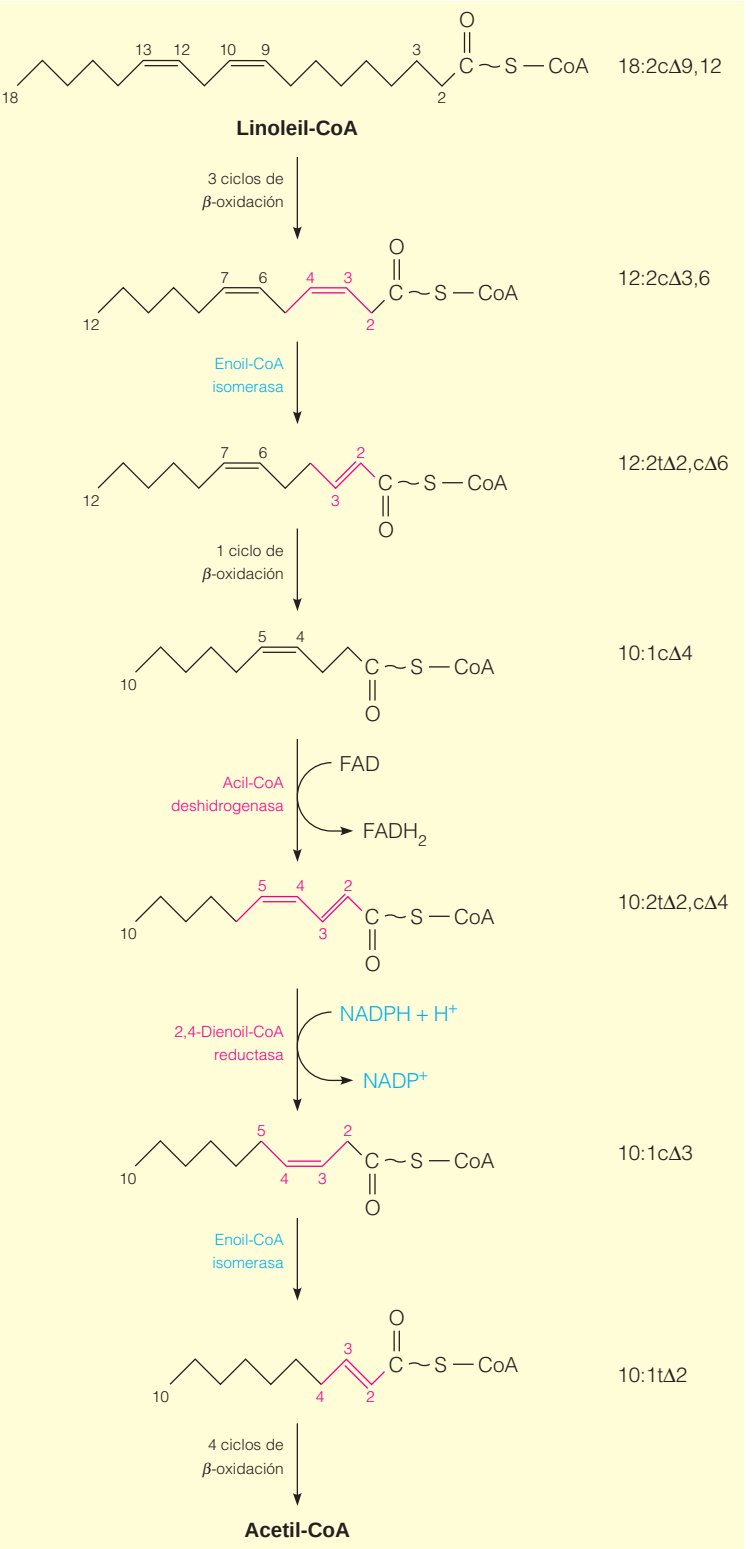


FIGURA **18.18**

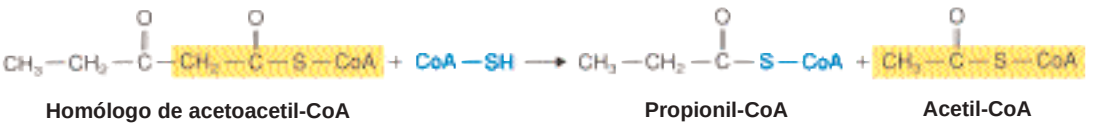
Ruta de la β-oxidación para los ácidos grasos poliinsaturados. En este ejemplo, correspondiente a la linoleil-CoA, se muestran los puntos de la acción de la enoil-CoA isomerasa y la 2,4-dienoil-CoA reductasa. Las enzimas específicas de la oxidación de los ácidos grasos insaturados se identifican con letra roja.

un origen químico, a través de la hidrogenación parcial de grasas y aceites. Así pues, son relativamente abundantes en los productos lácteos y en la margarina. Debido a que se han obtenido algunas pruebas que implican a los ácidos grasos *trans* en la enfermedad arterial coronaria, los fabricantes de margarina están empezando a eliminarlos de sus productos.

Las cadenas de ácidos grasos con un número impar de carbonos producen en la oxidación 1 mol de propionil-CoA, cuya conversión en succinil-CoA implica una carboxilación dependiente de biotina y un reordenamiento dependiente de la coenzima B_{12}.

OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS CON CADENAS CARBONADAS DE NÚMERO IMPAR

Aunque la mayoría de los ácidos grasos de los lípidos naturales contienen cadenas de carbono de número par, una pequeña proporción tiene cadenas de carbono con un número impar. El último grupo plantea un problema metabólico especial, que se resuelve de una forma novedosa. El sustrato del último ciclo de la β-oxidación de una acil-CoA de cadena impar es el homólogo de cinco carbonos de la acetoacetil-CoA. La fragmentación tiolítica de este sustrato produce 1 mol de acetil-CoA y otro de **propionil-CoA**.



A diferencia de la acetil-CoA, que se cataboliza mediante el ciclo del ácido cítrico, la propionil-CoA debe metabolizarse aún más antes de que sus átomos de carbono puedan entrar en el ciclo del ácido cítrico para su completa oxidación a CO_2. Ese metabolismo posterior (Figura 18.19) comporta en primer lugar la carboxilación de la propionil-CoA dependiente de ATP, catalizada por la enzima **propionil-CoA carboxilasa,** que contiene biotina. El producto, la D-metilmalonil-CoA, sufre entonces una epimerización a su estereoisómero L por acción de la metilmalonil-CoA epimerasa. A continuación, este derivado de acil-CoA de cadena ramificada se convierte en el correspondiente compuesto de cadena lineal, que resulta ser la succinil-CoA, mediante una reacción poco común. La enzima, L-metilmalonil-CoA mutasa, requiere un cofactor denominado **adenosilcobalamina,** derivado de la vitamina B_{12}. Desde el punto de vista del mecanismo, la migración de la cadena lateral hace a esta reacción muy interesante; sin embargo, puesto que las coenzimas B_{12} intervienen también en el metabolismo de los aminoácidos, reservaremos el estudio de ésta y otras reacciones dependientes de B_{12} para el Capítulo 20.

La imposibilidad de catabolizar adecuadamente la propionil-CoA tiene consecuencias graves en el ser humano. Si hay una actividad deficiente de la L-metilmalonil-CoA mutasa o de la síntesis de la coenzima adenosilcobalamina, se acumula L-metilmalonil-CoA que sale de las células en forma de ácido metilmalónico. Este proceso causa una acidosis grave (reducción del pH de la sangre) y también daña el sistema nervioso central. Este raro trastorno, denominado **acidemia metilmalónica,** suele ser mortal en una fase temprana de la vida. La enfermedad puede tratarse a veces con la administración de dosis altas de vitamina B_{12}. En estos casos, la mutación reduce la afinidad de la mutasa por su coenzima B_{12}, y puede inducirse la función de la enzima si es posible aumentar la concentración de la coenzima considerablemente.

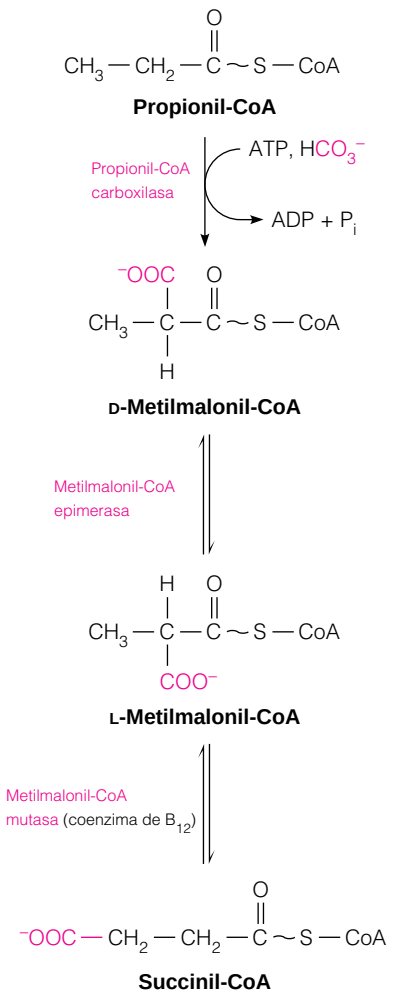


FIGURA **18.19**
Ruta del catabolismo de la propionil-CoA.

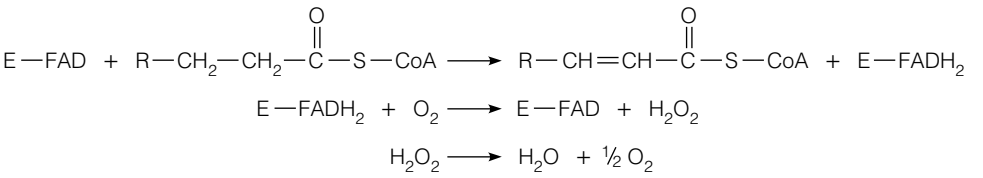
CONTROL DE LA OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

En la mayoría de las células, la oxidación de los ácidos grasos se controla por la disponibilidad de los sustratos para la oxidación, es decir, de los propios ácidos grasos. En los animales, esta disponibilidad se controla a su vez mediante el control hormonal de la movilización de las grasas en los adipocitos. Dado que la función del tejido adiposo consiste en almacenar la grasa para que sea utilizada en otras células, tiene sentido desde el punto de vista metabólico, que la degradación y la liberación de esta grasa almacenada se regule por hormonas, que son mensajeros extracelulares. Recuérdese de la página 715 que la actividad

de la triacilglicerol lipasa se regula mediante cascadas reguladoras iniciadas por intervenciones hormonales, en las que interviene el AMP cíclico. La acción del glucagón o de la adrenalina causa la degradación y liberación de las grasas, que da lugar en última instancia a una acumulación de ácidos grasos en otras células. Asimismo, como se señala en la página 719 la malonil-CoA proporciona otro mecanismo regulador importante, al inhibir el movimiento de las acil-CoA a la mitocondria por la lanzadera de la acil-carnitina.

β-OXIDACIÓN PEROXISÓMICA DE LOS ÁCIDOS GRASOS

En los **peroxisomas** se produce una versión modificada de la ruta de β-oxidación. Los peroxisomas son unos orgánulos que están presentes en la mayoría de las células eucariotas; son muy similares a los glioxisomas de las células vegetales, excepto que los peroxisomas carecen de las enzimas de la ruta del glioxilato (véase el Capítulo 14). Tanto los peroxisomas como los glioxisomas llevan a cabo la ruta de la β-oxidación en la que la acil-CoA deshidrogenasa ligada al FAD transfiere los electrones no a la cadena de transporte electrónico respiratoria sino directamente al oxígeno. Este último se reduce a peróxido de hidrógeno, que a su vez sufre la acción de la catalasa.



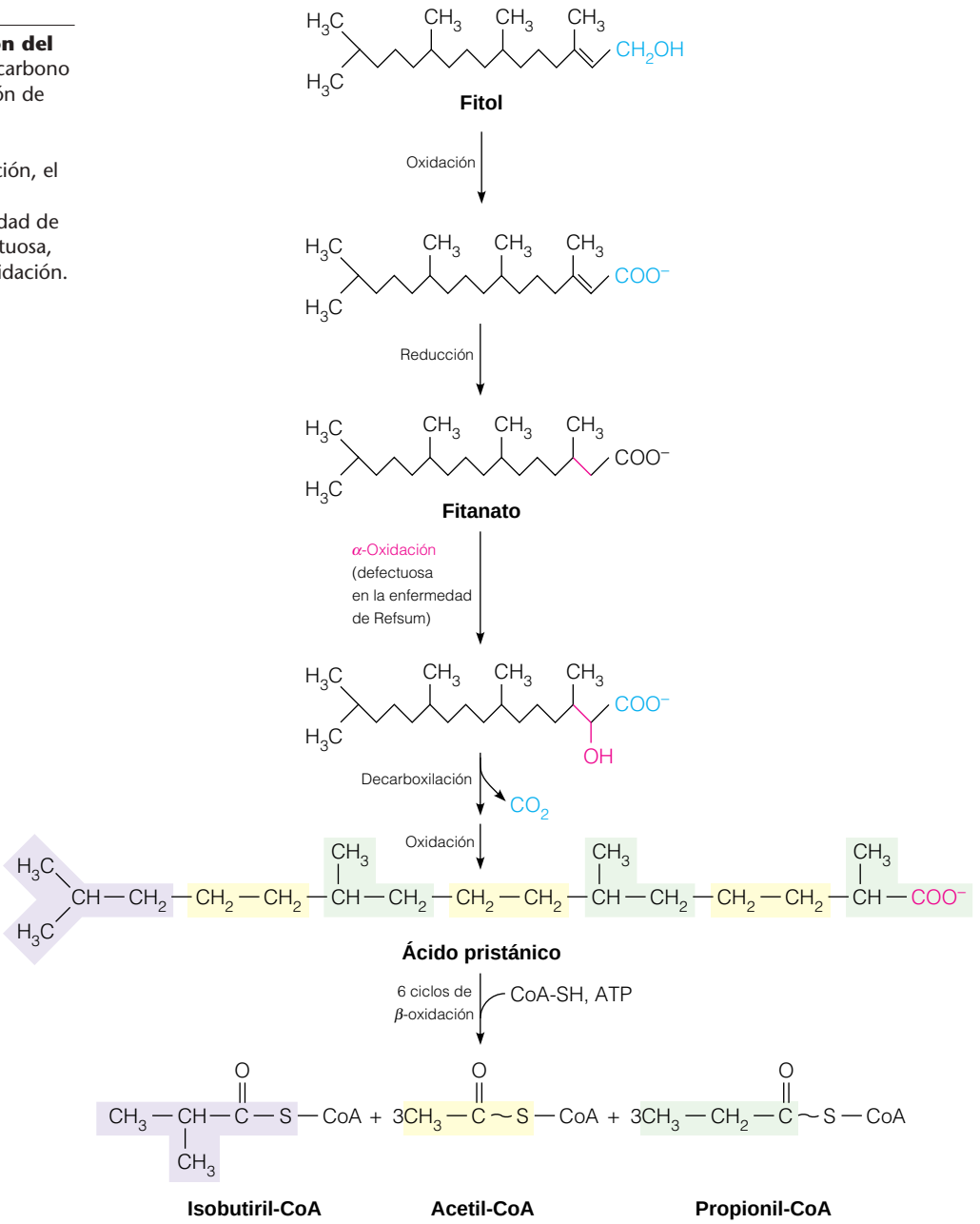
Dado que los electrones no se transfieren a la cadena respiratoria, la ruta peroxisómica no está acoplada con la producción de energía, aunque genera calor. En los peroxisomas de los animales, la ruta llega tan sólo a las acil-CoA de 4 y 6 carbonos. Sin embargo, los grupos acilo pueden transferirse a la carnitina para su transporte a las mitocondrias, en donde puede completarse la oxidación. En cambio, los glioxisomas de las plantas realizan la oxidación hasta la acetil-CoA, que se utiliza para la síntesis de hidratos de carbono a través de la ruta del glioxilato. La función de la ruta peroxisómica no está clara aún, pero es probable que comporte las fases iniciales de la oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga y otros lípidos.

α-OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Aunque la β-oxidación es la principal ruta de degradación de los ácidos grasos, existe una ruta menor que oxida ciertos ácidos grasos, de tal manera que la oxidación inicial se produce en el carbono α en vez de en el carbono β. Esta ruta se descubrió mediante el análisis de un trastorno neurológico congénito grave y poco frecuente, denominado **enfermedad de Refsum**. Los pacientes que padecen este trastorno acumulan grandes cantidades de un ácido graso poco habitual, el **ácido fitánico,** que deriva del **fitol,** un componente de la clorofila (Figura 18.20). El grupo metilo del carbono 3 del fitol impide la β-oxidación de este sustrato. Sin embargo, el carbono α puede experimentar evidentemente la oxidación, para dar lugar al **ácido pristánico,** un sustrato que puede degradarse mediante la β-oxidación. En la enfermedad de Refsum, la ruta de α-oxidación es defectuosa, y el ácido fitánico no se convierte en un compuesto que pueda degradarse. El único tratamiento conocido consiste en seguir una alimentación que contenga poca o ninguna clorofila. Este tratamiento es difícil ya que descarta todos los vegetales de hojas verdes y la carne, así como la leche procedente de

FIGURA **18.20**

Ruta de α-oxidación de la oxidación del ácido fitánico. El grupo metilo del carbono β del ácido fitánico impide la β-oxidación de este compuesto, por lo que entra en funcionamiento una ruta adicional, que comporta una α-oxidación. A continuación, el resto de la molécula puede degradarse mediante la β-oxidación. En la enfermedad de Refsum, la ruta de α-oxidación es defectuosa, por lo que no puede producirse la β-oxidación.



animales herbívoros, ya que todos estos alimentos contienen cantidades considerables de ácido fitánico.

CETOGÉNESIS

Hasta ahora nos hemos referido a la acetil-CoA como si tuviera tan sólo dos destinos metabólicos importantes, la oxidación a CO_2 en el ciclo del ácido cítrico o la biosíntesis de ácidos grasos. En las mitocondrias (fundamentalmente en el hígado) entra en juego otra ruta importante cuando la acetil-CoA se acumula más allá de su capacidad de oxidación o de uso para la síntesis de ácidos grasos. Esta ruta es la **cetogénesis**, y conduce a una clase de compuestos denominados **cuerpos cetónicos**.

Cuando las concentraciones de acetil-CoA son elevadas, 2 moles de acetil-CoA experimentan una inversión de la reacción de la tiolasa para dar acetoa-

cetil-CoA (Figura 18.21). Esto se produce especialmente cuando las concentraciones de oxalacetato son bajas, de forma que el flujo a través de la citrato sintasa está deteriorado. La acetoacetil-CoA puede reaccionar a su vez con un tercer mol de acetil-CoA para dar, **β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA)**, catalizado por la **HMG-CoA sintasa**. Cuando se forma en el citosol, la HMG-CoA es un intermediario inicial en la biosíntesis del colesterol (véase el Capítulo 19). Sin embargo, en las mitocondrias, la HMG-CoA sufre la acción de la **HMG-CoA liasa** para producir **acetoacetato** y acetil-CoA. El acetoacetato experimenta una reducción dependiente de NADH para dar lugar a **β-hidroxibutirato,** o bien, en cantidades muy pequeñas, la descarboxilación espontánea a acetona. En conjunto, el acetoacetato, la acetona y el β-hidroxibutirato se denominan cuerpos cetónicos, a pesar de que el último de estos compuestos no contiene un grupo carbonilo.

En determinadas circunstancias, la cetogénesis puede considerarse una "ruta de rebosamiento". Como se ha indicado antes, se estimula cuando se acumula acetil-CoA a causa de una utilización deficitaria de los hidratos de carbono. La cetogénesis se produce fundamentalmente en el hígado, debido a las elevadas concentraciones de HMG-CoA sintasa en ese tejido. Los cuerpos cetónicos se transportan desde el hígado a otros tejidos, en donde el acetoacetato y el β-hidroxibutirato pueden reconvertirse de nuevo en acetil-CoA para la generación de energía. La reconversión implica la transferencia enzimática de una porción CoA desde la succinil-CoA al acetoacetato para dar acetoacetil-CoA y succinato.

Cuando el catabolismo de los hidratos de carbono está limitado, la acetil-CoA se convierte en cuerpos cetónicos, principalmente acetoacetato y β-hidroxibutirato, que son combustibles metabólicos importantes en algunas circunstancias.



Como se tratará con mayor detalle en el Capítulo 23, la cetogénesis se hace extraordinariamente importante en la inanición, cuando el cerebro, que normalmente utiliza glucosa como su principal combustible, sufre una adaptación metabólica para utilizar cuerpos cetónicos. En condiciones normales, algunos otros tejidos, en especial el corazón, obtienen la mayor parte de su energía metabolizando los cuerpos cetónicos producidos en el hígado.

Biosíntesis de los ácidos grasos

RELACIÓN DE LA SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS CON EL METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

Hemos señalado ya que la inmensa mayoría del combustible almacenado en la mayoría de las células animales se encuentran en forma de grasas. Sin embargo, una gran parte del consumo calórico de muchas alimentaciones de los animales (y ciertamente de la mayor parte de las alimentaciones del ser humano), son hidratos de carbono. Dado que las reservas almacenadas de hidratos de carbono están estrictamente limitadas, deben existir mecanismos eficaces para la conversión de los hidratos de carbono en grasas. En este apartado nos centraremos principalmente en la síntesis de los ácidos grasos.

Como se representa esquemáticamente en la Figura 18.22, un metabolito central es la acetil-CoA, que procede tanto de la reacción de la piruvato deshidrogenasa como de la β-oxidación de los ácidos grasos. En el citosol, la acetil-CoA se convierte a su vez en ácidos grasos. Así pues, la acetil-CoA procede tanto de la degradación de las grasas como de la de los hidratos de carbono y es, además, el principal precursor de las grasas. Sin embargo, *la acetil-CoA no pue-*

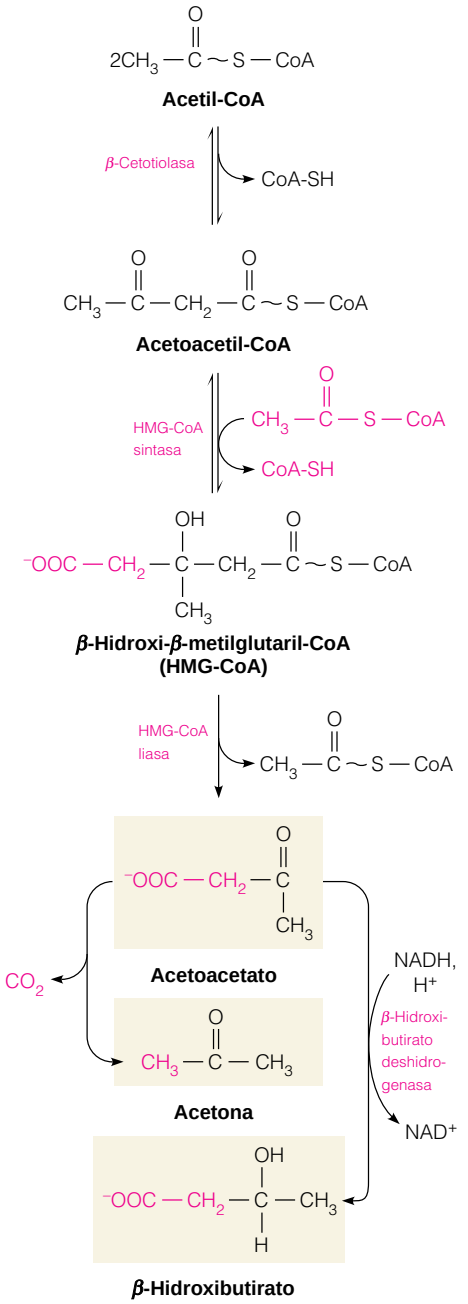


FIGURA **18.22**

La acetil-CoA como intermediario clave entre el metabolismo de las grasas y el de los hidratos de carbono. Las flechas identifican las rutas principales de formación o utilización de la acetil-CoA. El citrato actúa como transportador de unidades acetilo desde la mitocondria al citosol para la síntesis de los ácidos grasos.

FIGURA **18.21**

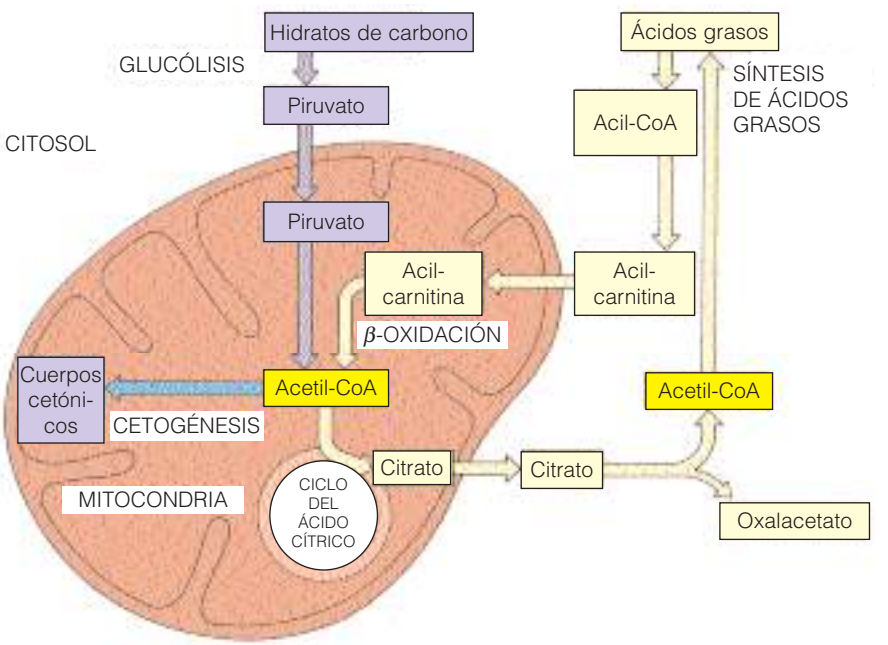
Biosíntesis de los cuerpos cetónicos en el hígado. Los tres compuestos a los que habitualmente se denomina cuerpos cetónicos están marcados con recuadros. La acetona se forma en cantidades muy bajas, posiblemente mediante la descarboxilación no enzimática del acetoacetato.

de experimentar una conversión neta en hidratos de carbono. Ello se debe a la práctica irreversibilidad de la reacción de la piruvato deshidrogenasa. Como se ha señalado en el Capítulo 14, el ciclo del glioxilato de las plantas y de algunos microorganismos permite evitar este paso, con la conversión neta de acetil-CoA en precursores gluconeogénicos. Sin embargo, *en los animales la conversión de los hidratos de carbono en grasas es unidireccional.* Además, aunque la ruta de síntesis de los ácidos grasos está sujeta a regulación, la capacidad total de almacenamiento de grasas no lo está.

ESTUDIOS INICIALES SOBRE LA SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS

A comienzos del siglo XX, cuando se demostró que la mayor parte de los ácidos grasos de los lípidos contenían cadenas de número par de carbonos, se consideró que era razonable prever que el proceso de biosíntesis requiriera la adición escalonada de fragmentos activados de dos carbonos, en el mismo sentido que la oxidación se realizaba con dos carbonos cada vez. De hecho, este proceso se demostró experimentalmente en los años 1940, en uno de los primeros experimentos metabólicos en que se utilizaron trazadores isotópicos. David Rittenberg y Konrad Bloch administraron a ratones acetato marcado con los isótopos estables ^{13}C y deuterio ($^{13}C^{2}H_3{}^{13}COO^-$) y observaron que ambos isótopos se incorporaban a los ácidos grasos.

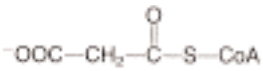
Una vez descubierta la ruta de la β-oxidación, se pensó que la síntesis de los ácidos grasos se produciría simplemente mediante una inversión de su ruta de degradación. Sin embargo, cuando los bioquímicos empezaron a fraccionar los sistemas enzimáticos capaces de sintetizar los ácidos grasos, encontraron que sus fracciones purificadas carecían de las actividades de la β-oxidación. El descubrimiento clave que estableció el mecanismo de síntesis de los ácidos grasos



como una ruta enteramente diferente se debió a la observación de Salih Wakil, a finales de los años 1950, de que la síntesis de los ácidos grasos tenía una necesidad absoluta de bicarbonato. Sin embargo, el carbono del bicarbonato no se incorporaba al producto final. Estas observaciones llevaron al descubrimiento de un compuesto de tres carbonos, la *malonil-CoA*, como primer intermediario en la biosíntesis de los ácidos grasos. En la actualidad sabemos que, aunque la química de la síntesis y la degradación de los ácidos grasos es similar, las rutas difieren en las enzimas que intervienen en ellas, los transportadores del grupo acilo, la estereoquímica de los intermediarios, los transportadores electrónicos, la localización intracelular y la regulación. De hecho, el metabolismo de los ácidos grasos es uno de los mejores ejemplos de la afirmación de que las rutas anabólicas no son nunca la simple inversión de las rutas catabólicas.

El proceso global de la síntesis de los ácidos grasos es similar en todos los sistemas procariotas y eucariotas analizados hasta la fecha. Hay tres sistemas enzimáticos distintos que catalizan, respectivamente, (1) la biosíntesis del palmitato a partir de la acetil-CoA, (2) la elongación de la cadena a partir del palmitato, y (3) la desaturación. En las células eucariotas, la primera ruta tiene lugar en el citosol, la elongación de la cadena se produce tanto en las mitocondrias como en el retículo endoplásmico, y la desaturación tiene lugar en el retículo endoplásmico.

Los hidratos de carbono se convierten con facilidad en grasas, pero los animales no pueden realizar una conversión neta de grasas en hidratos de carbono.



Malonil-CoA

La síntesis de los ácidos grasos se realiza a través de intermediarios similares a los de la oxidación de los ácidos grasos, pero con diferencias en cuanto a los transportadores electrónicos, la activación del grupo carboxilo, la estereoquímica y la localización celular.

BIOSÍNTESIS DEL PALMITATO A PARTIR DE LA ACETIL-COA

Como se ha indicado antes y se ilustra en la Figura 18.23, la química de la síntesis de palmitato es muy similar a la de la oxidación de palmitato en sentido inverso. El proceso de síntesis comprende la adición escalonada de unidades de

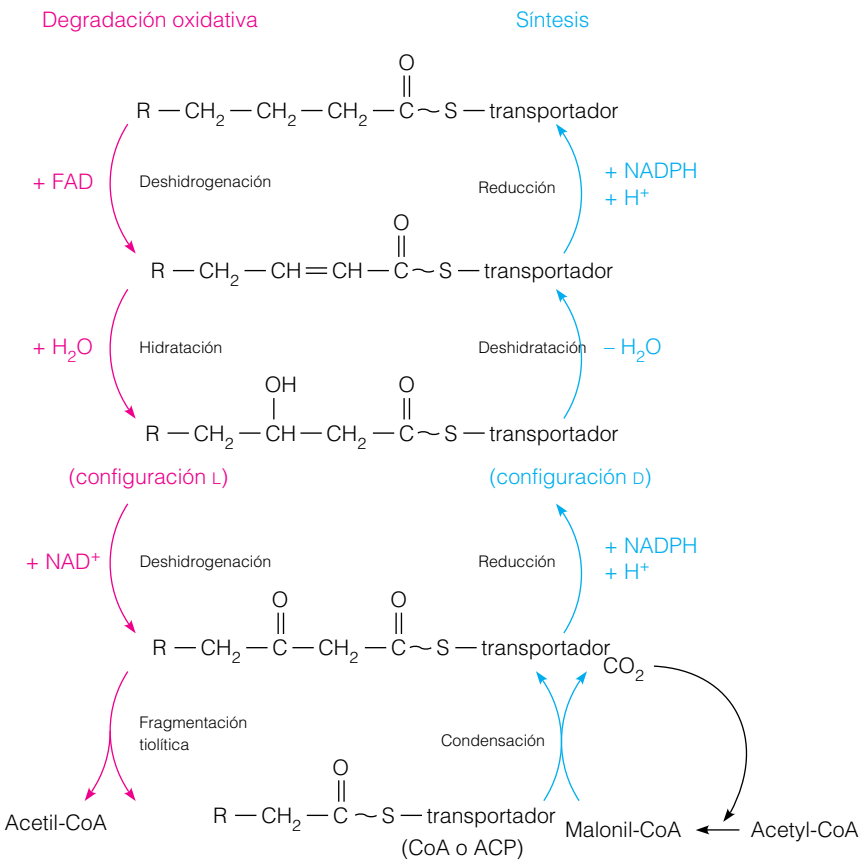


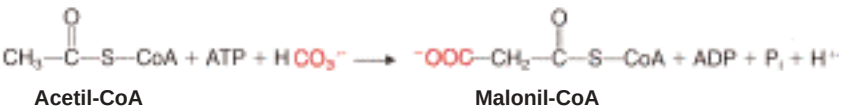
FIGURA **18.23**

Semejanzas químicas entre la oxidación y la síntesis de un ácido graso. La figura muestra un solo ciclo de oxidación (abajo) o de adición (arriba) de un fragmento de dos carbonos. La coenzima A es el transportador de grupos acilo para la oxidación, y la proteína transportadora de acilo (ACP) es el transportador para la síntesis.

dos carbonos, de tal manera que cada paso tiene lugar mediante una condensación, reducción, deshidratación y una nueva reducción. Las principales diferencias son la necesidad de un intermediario activado, la malonil-CoA, en cada paso de adición de dos carbonos, la naturaleza del transportador del grupo acilo y el empleo de enzimas que requieren NADPH en las reacciones de reducción. Se presenta, a continuación, una descripción detallada de estas reacciones y las siguientes.

Síntesis de malonil-CoA

El primer paso en la biosíntesis de los ácidos grasos es la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA y bicarbonato, catalizada por la **acetil-CoA carboxilasa** (Figura 18.24, reacción 1).



Al igual que ocurre en otros pasos de las rutas de biosíntesis, esta reacción es tan exergónica que resulta prácticamente irreversible. Al igual que otras enzimas que catalizan reacciones de carboxilación (véase la página 566), la acetil-CoA carboxilasa tiene un cofactor de biotina, unido covalentemente mediante un grupo ε-amino de lisina. La reacción se produce a través de un intermediario de *N*-carboxibiotina ligado covalentemente.

$$\text{E-biotina} + \text{ATP} + HCO_3^- \longrightarrow \text{E-}N\text{-carboxibiotina} + \text{ADP} + P_i$$

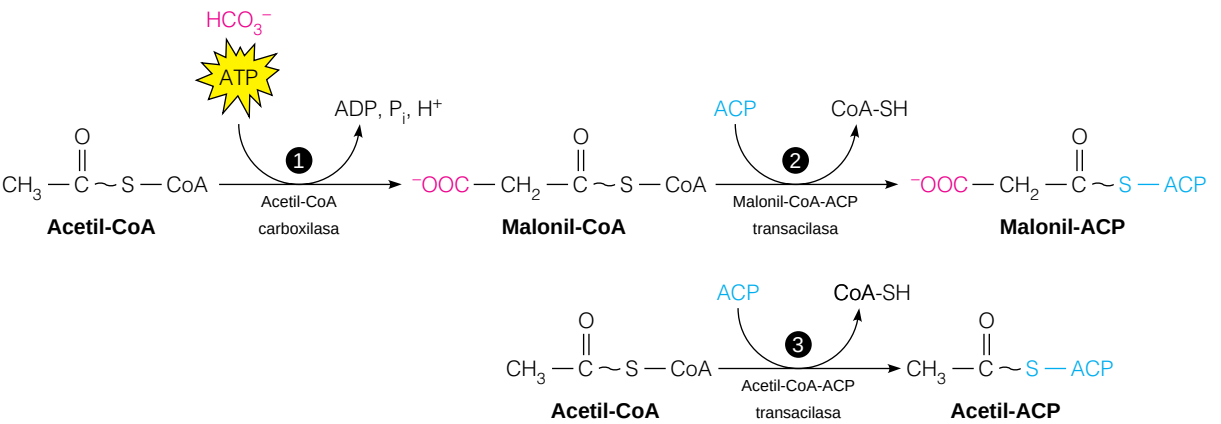
$$\text{E-}N\text{-carboxibiotina} + \text{acetil-CoA} \longrightarrow \text{malonil-CoA} + \text{E-biotina}$$

La forma procariota de esta enzima, por ejemplo la enzima purificada de *E. coli*, está formada por tres proteínas distintas: (1) una pequeña proteína transportadora que contiene la biotina unida, (2) una **biotina carboxilasa**, que cataliza la formación de *N*-carboxibiotina, y (3) una **transcarboxilasa**, que transfiere el grupo carboxilo activado desde la *N*-carboxibiotina a la acetil-CoA. Las cadenas hidrocarbonadas de la biotina y de su residuo de lisina asociado actúan como un brazo de oscilación flexible, que permite a la biotina interactuar con los lugares catalíticos de ambas subunidades catalíticas.

En cambio, la acetil-CoA carboxilasa de los eucariotas consiste en una sola proteína que contiene dos cadenas polipeptídicas idénticas, cada una de ellas con un M_r de aproximadamente 230 000. La proteína dimérica en sí es inactiva, pero en presencia de citrato sufre una polimerización para adoptar una forma fila-

FIGURA **18.24**

Las tres primeras reacciones de cada ciclo de adición de la síntesis de los ácidos grasos. Las reacciones que se muestran aquí producen malonil-ACP y acetil-ACP, que se utilizan en las reacciones restantes del ciclo.



mentosa, con un M_r de 4-8 $\times$ 10^6, que puede verse fácilmente con el microscopio electrónico (Figura 18.25). El equilibrio entre los dímeros de proteína inactivos y la forma filamentosa activa, así como su control mediante intermediarios metabólicos, constituye probablemente un mecanismo de regulación de la biosíntesis de los ácidos grasos. El regulador fisiológico principal no parece ser el citrato sino las acil-CoA de cadena larga, que fomentan la despolimerización de la forma activa.



FIGURA **18.25**

Forma filamentosa activa de la acetil-CoA carboxilasa de los eucariotas.

Reproducido con permiso de M. D. Lane, J. Moss y S. E. Polakis, *Curr. Top. Cell Regul.* (1974) 15:144-145. Academic Press, Inc.

Proteína transportadora del acilo

Todos los intermediarios de la oxidación de los ácidos grasos se activan mediante su unión a una molécula portadora, la coenzima A. Se utiliza una activación similar en la síntesis de los ácidos grasos, pero el transportador es diferente. Se trata de una proteína pequeña (77 aminoácidos en *E. coli*) denominada **proteína transportadora del acilo** (**ACP**). La química de la activación es idéntica a la de las acil-CoA. Recuérdese del Capítulo 14 que el grupo sulfhidrilo reactivo de la CoA forma parte de una porción de fosfopanteteína, que deriva del ácido pantoténico. De igual modo, en la ACP, una porción de fosfopanteteína está unida a un grupo de serina del polipéptido (Figura 18.26). No estuvo clara de forma inmediata la razón por la que la ruta de síntesis debería utilizar una proteína transportadora, pero las investigaciones posteriores señalaron que es posible que intervenga un brazo oscilante formado con parte de una proteína en los pasos posteriores de la síntesis de los ácidos grasos, así como en la formación de la malonil-CoA.

La ACP interviene en la síntesis de los ácidos grasos a través de las acciones de la **malonil-CoA-ACP transacilasa** y de la **acetil-CoA-ACP transacilasa** (véase la Figura 18.24, reacciones 2 y 3). En ambos casos, el grupo acilo se transfiere desde la acil-CoA a la ACP. Dado que los enlaces de energía elevada en las acil-CoA y en las acil-ACP son idénticos, estas reacciones son fácilmente reversibles.

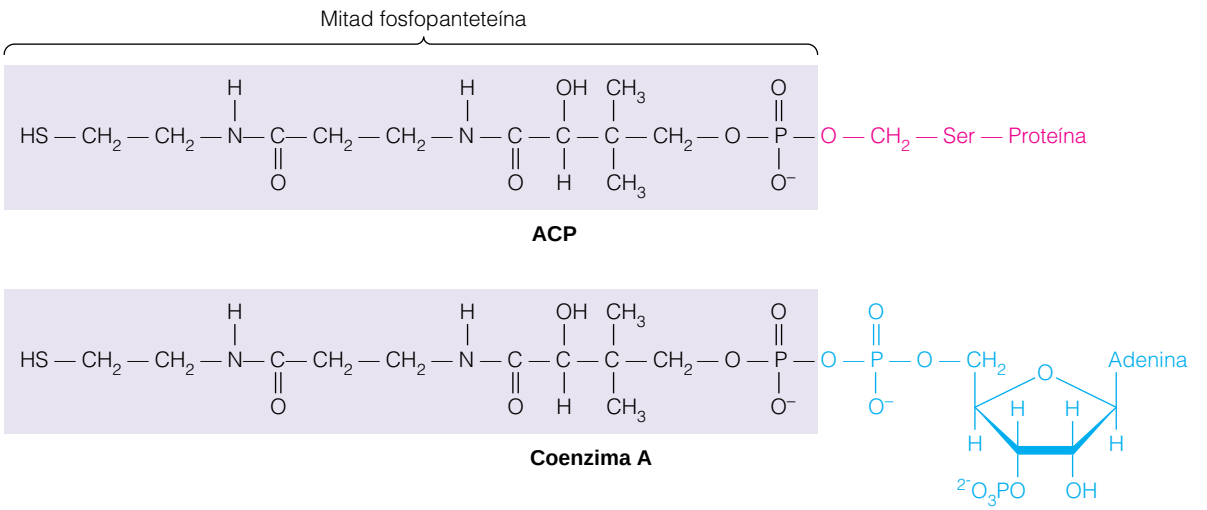
$$\text{Acetil-CoA} + \text{ACP} \rightleftharpoons \text{acetil-ACP} + \text{CoA-SH}$$

$$\text{Malonil-CoA} + \text{ACP} \rightleftharpoons \text{malonil-ACP} + \text{CoA-SH}$$

Aunque la malonil transacilasa es muy específica, la acetil transacilasa puede reaccionar en cierto grado con otros sustratos acil-CoA. De hecho, ésta es la forma de inicio de la síntesis de los ácidos grasos de cadena impar, con la propionil-CoA como sustrato, en vez de la acetil-CoA.

FIGURA **18.26**

Fosfopanteteína como unidad reactiva en la ACP y la CoA.



De la malonil-ACP al palmitato

Como se ha indicado antes, la cadena de ácido graso se construye mediante las adiciones sucesivas de unidades de dos carbonos. Cada ciclo de adición consiste en siete reacciones, que se inician con la acetil-CoA carboxilasa. La ruta de reacción es idéntica en todos los organismos conocidos, pero la química proteica que interviene en ella es sorprendentemente variable. En *E. coli*, en otras bacterias y en las plantas, las reacciones las catalizan siete enzimas diferentes, que pueden purificarse por separado. En cambio, en los animales y en los eucariotas inferiores todas las actividades están asociadas en un complejo multienzimático muy estructurado al que se denomina **ácido graso sintasa**. Analicemos primero las siete reacciones y consideremos luego la naturaleza del complejo ácido graso sintasa.

Las tres primeras reacciones las hemos presentado ya y corresponden a las catalizadas por la acetil-CoA carboxilasa, la malonil-CoA-ACP transacilasa, y la acetil-CoA-ACP transacilasa (véase la Figura 18.24). Estas reacciones son idénticas en cada ciclo de adición de dos carbonos. Para el primer ciclo de síntesis (Figura 18.27, reacciones 4-7), empezamos con 1 mol de malonil-ACP y 1 mol de acetil-ACP, y en cuatro reacciones generamos 1 mol de butiril-ACP. Éstas son las reacciones que se asemejan a las reacciones (invertidas) de la oxidación de los ácidos grasos (véase la Figura 18.23). El ciclo de síntesis transcurre mediante *condensación*, *reducción*, *deshidratación*, *reducción*, mientras que la oxidación (inversa) incluye *fragmentación tiolítica*, *deshidrogenación*, *hidratación*, *deshidrogenación*. Algunas de las diferencias principales se ponen claramente de manifiesto en la Figura 18.23. La ACP es el transportador del acilo en la síntesis, y el NADPH es el transportador de electrones para los dos pasos de reducción. Además, el empleo de un grupo malonilo no tiene equivalente en la oxidación de los ácidos grasos.

La malonil-CoA constituye una fuente activada de fragmentos de dos carbonos para la biosíntesis de los ácidos grasos, de forma que la pérdida de CO_2 impulsa la formación del enlace C—C.

¿Cuál es la lógica molecular del empleo de malonil-ACP como donador de una unidad acetilo? Probablemente es que la condensación de dos unidades acetilo activadas es muy endergónica. Una reacción comparable en sentido inverso, la de la fragmentación tiolítica de la acetoacetil-CoA, es fuertemente exergónica. Sin embargo, el grupo carboxilo de la malonil-ACP es un buen grupo de salida. En la reacción de la β-cetoacil-ACP sintasa (Figura 18.27, reacción 4), el grupo acetilo se transfiere primero desde la ACP a un tiol de cisteína de la enzima. A continuación, el grupo carboxilo de la malonil-ACP activa su carbono metileno para que actúe como nucleófilo y ataque al carbono ceto electrófilo del grupo acetilo. La intervención del ATP para impulsar esta reacción endergónica es manifiesta, aunque indirecta, puesto que el ATP ha participado en la síntesis original de la malonil-CoA a partir de la acetil-CoA. Este proceso de condensación explica la observación inicial de que el bicarbonato no se incorpora al producto final. De hecho, todos los carbonos de los ácidos grasos proceden del acetato.

El producto de condensación, un tioéster β-cetoacil-ACP, se reduce a continuación a D-3-hidroxiacil-ACP (Figura 18.27, reacción 5). En cambio, la 3-hidroxiacil-CoA producida en la *oxidación* de los ácidos grasos tiene la configuración L. La deshidratación de la 3-hidroxiacil-ACP (reacción 6) produce una *trans*-Δ2-enoil-ACP, que sufre una segunda reducción (reacción 7) para dar una acil-ACP, la butiril-ACP en el primer ciclo de síntesis. Para iniciar el segundo ciclo, la butiril-ACP reacciona con otra molécula de malonil-ACP y el producto del segundo ciclo es la hexanoil-ACP. El mismo patrón continúa hasta que el producto del séptimo ciclo, la palmitoil-ACP sufre una hidrólisis para producir palmitato y ACP libre.

Al igual que en la mayor parte de las rutas de biosíntesis, ésta requiere tanto *energía* (en forma de ATP) como *equivalentes reductores* (en forma de

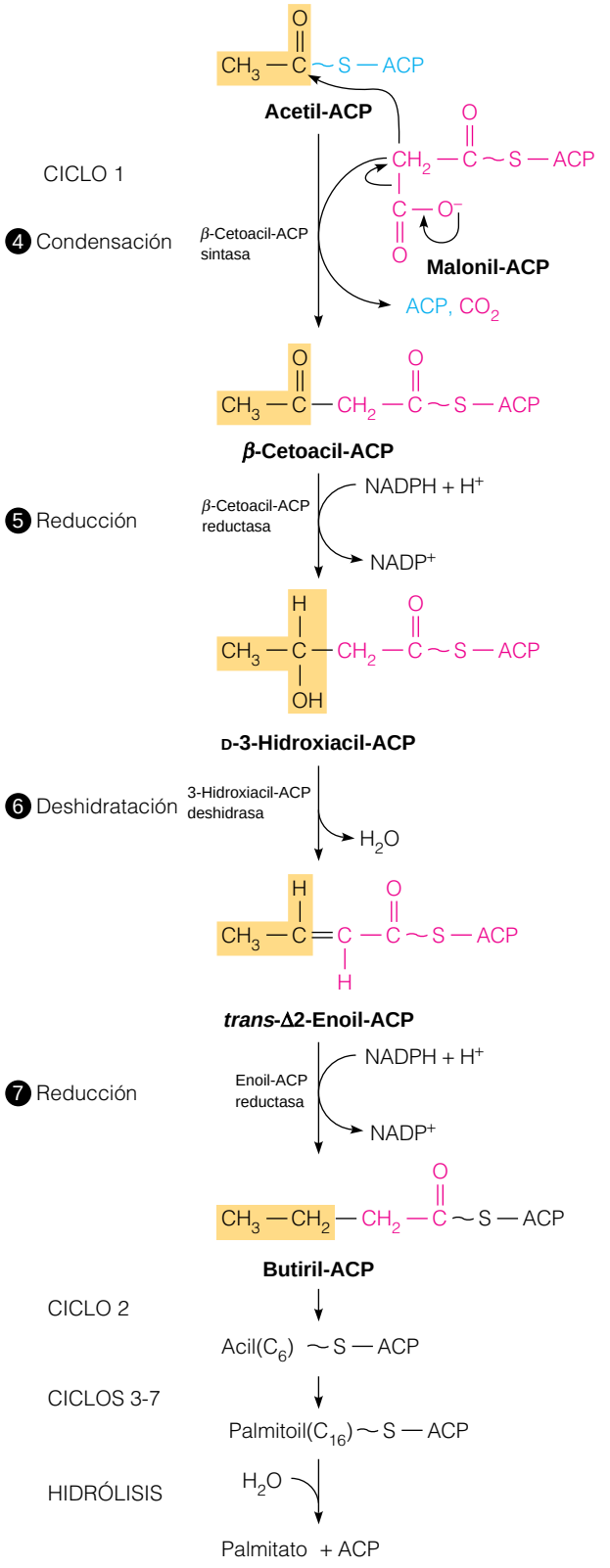


FIGURA **18.27**

Síntesis de palmitato, que se inicia con la malonil-ACP y la acetil-ACP. El primer ciclo de cuatro reacciones genera butiril-ACP, que reacciona con un segundo mol de malonil-ACP, que da lugar a un segundo ciclo de adición de dos carbonos. Un total de siete ciclos de este tipo genera la palmitoil-ACP. La hidrólisis de este producto libera el palmitato. Cuando la síntesis de ácidos grasos la realiza un complejo multienzimático, como sucede en eucariotas, el grupo acilo (acetilo en el ciclo 1, butirilo en el ciclo 2, etc.) no se transporta en la ACP, como se presenta aquí, sino en el dominio cetoacil-ACP sintasa del complejo.

NADPH). Las necesidades cuantitativas pueden deducirse de la estequiometría del proceso completo de siete ciclos:

$$\text{Acetil-CoA} + 7\ \text{malonil-CoA} + 14\text{NADPH} + 20\text{H}^+ \longrightarrow \text{palmitato} + 7\text{CO}_2 + 14\text{NADP}^+ + 8\text{CoA-SH} + 6\text{H}_2\text{O}$$

Para ver las necesidades de ATP, debemos considerar la síntesis de los 7 moles de malonil-CoA:

$$7\ \text{Acetil-CoA} + 7CO_2 + 7\text{ATP} \longrightarrow 7\ \text{malonil-CoA} + 7\text{ADP} + 7P_i + 7H^+$$

Así pues, la siguiente ecuación describe el proceso global.

$$8\ \text{Acetil-CoA} + 7\text{ATP} + 14\text{NADPH} + 13H^+ \longrightarrow \text{palmitato} + 14\text{NADP}^+ + 8\text{CoA-SH} + 6H_2O + 7\text{ADP} + 7P_i$$

En los eucariotas, la síntesis de los ácidos grasos la realiza un complejo multienzimático organizado que contiene proteínas multifuncionales.

Proteínas multifuncionales en la síntesis de los ácidos grasos

Como se ha indicado anteriormente, las enzimas de la síntesis de los ácidos grasos constituyen un complejo multienzimático estrechamente acoplado en las células eucariotas. A mediados de los años 1970, los estudios bioquímicos y genéticos realizados en levaduras indicaron que el complejo contenía realmente dos cadenas polipeptídicas multifuncionales. Este complejo tiene una masa de unos 2.2 millones de dalton y puede verse con facilidad con el microscopio electrónico (Figura 18.28). El complejo contiene seis moléculas de cada una de las dos cadenas polipeptídicas, que se denominan subunidad A y subunidad B. La subunidad A (M_r = 185 000) contiene la proteína transportadora del acilo, la enzima condensante y la β-cetotioéster reductasa, y la subunidad B (M_r = 175 000) contiene las cuatro actividades restantes; se trata realmente de una proteína *multifuncional*. En los tejidos de los vertebrados el complejo es más pequeño, con dos subunidades idénticas de unos 240 000 dalton cada una. Evidentemente, cada subunidad contiene una región ACP además de todas las actividades enzimáticas implicadas. También está presente una actividad que cataliza la liberación final del palmitato. El complejo de levaduras carece de esta última actividad, ya que el producto final de la actividad ácido graso sintasa en las levaduras no es el palmitato sino la palmitoil-CoA.

Es interesante que en los complejos eucariotas, la ACP no es una proteína pequeña, como en el caso de las bacterias, sino al parecer un dominio específico de la cadena polipeptídica mucho más grande que forma el complejo. Parece probable que la fosfopanteteína unida actúe como brazo de oscilación para poner en contacto la porción acilo con los diversos lugares activos, como acabamos de comentar para la acetil-CoA carboxilasa y para el complejo piruvato deshidrogenasa (Figura 18.29). Disponemos ya de una cantidad de información considerable sobre la arquitectura de la proteína multifuncional. La proteólisis limitada de la ácido graso sintasa de hígado de pollo da lugar a productos que corresponden a los dominios globulares de la proteína multifuncional, cada uno de ellos con actividades catalíticas específicas. Éstos y otros estudios físicos más recientes han dado origen a un modelo de la ácido graso sintasa, que se muestra en la Figura 18.30.

Se sabe desde hace tiempo que los intermediarios entre la acetil-CoA y el palmitato no se acumulan en las células que están sintetizando ácidos grasos. El motivo es claro, teniendo en cuenta que los intermediarios están unidos covalentemente al dominio ACP de una proteína multifuncional, como ocurre en las células eucariotas. Esta disposición garantiza que los sustratos no tengan que buscar los lugares catalíticos mediante una difusión aleatoria. Además, puesto que el aparato genético tiene que regular la síntesis de tan sólo una o dos cadenas polipeptídicas en vez de siete, este tipo de organización es atractivo desde el punto de vista de la coordinación de las actividades implicadas. Se han descrito ya proteínas multifuncionales en la mayoría de los procesos metabólicos importantes, aunque otras pocas enzimas llevan hasta cuatro actividades en una sola cadena polipeptídica.

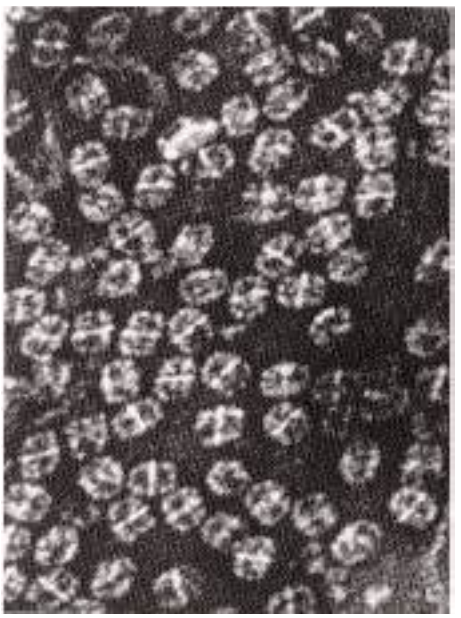


FIGURA **18.28**

Complejo ácido graso sintasa de levaduras. La fotografía de microscopia electrónica está ampliada × 200 000.

Cortesía de S. J. Wakil, J. K. Stoops y el fallecido V. C. Joshi, reproducido con permiso de *Annu. Rev. Biochem.* (1983) 52:537-580. © 1983 Annual Reviews, Inc.

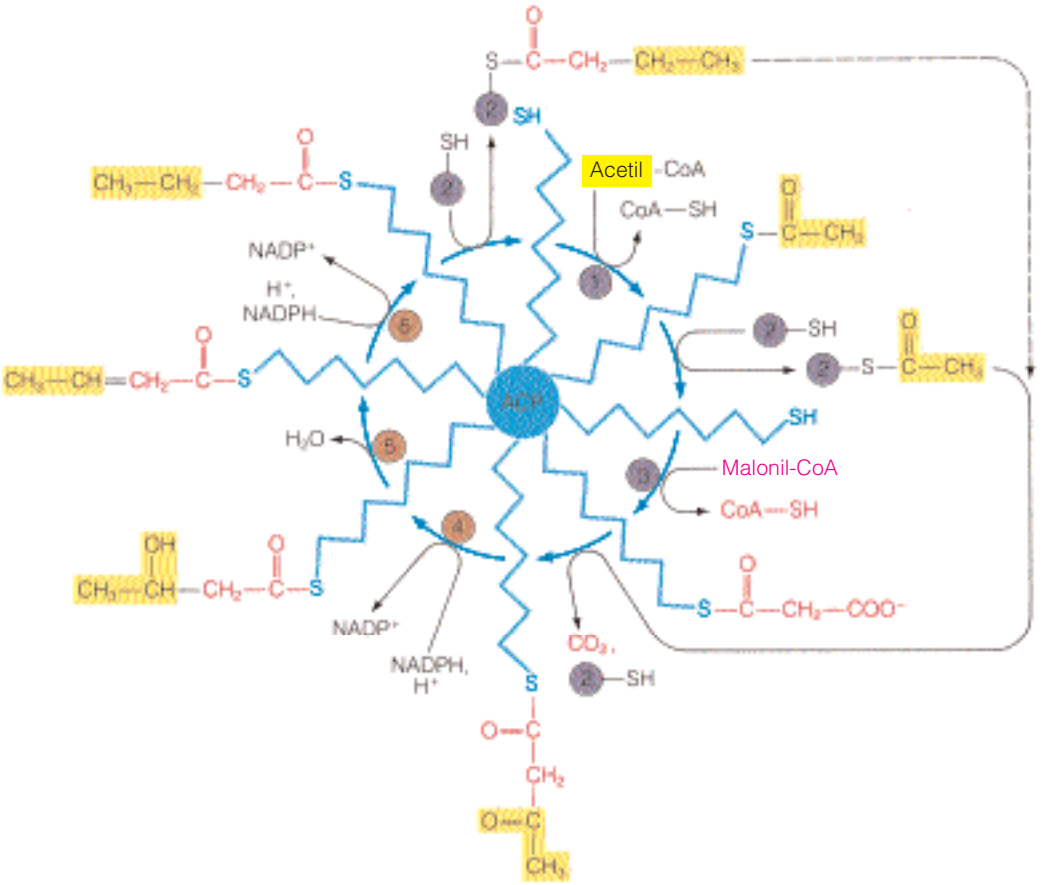


FIGURA **18.29**

Mecanismo de brazo oscilante del complejo ácido graso sintasa de los eucariotas. Un brazo oscilante de fosfopanteteína actúa como mecanismo de aproximación de los grupos acilo para ponerlos en contacto con todos los lugares activos de la síntesis de los ácidos grasos. Los diversos lugares activos (círculos con números) son: (1) acetil-CoA-ACP transacilasa, (2) β-cetoacil-ACP sintasa, (3) malonil-CoA-ACP transacilasa, (4) β-cetoacil-ACP reductasa, (5) β-hidroxiacil-ACP deshidrasa, y (6) enoil-ACP reductasa. El ciclo se inicia con la transferencia del grupo acetilo desde la acetil-CoA al brazo de oscilación de fosfopanteteína (lugar 1). El grupo acetilo se transfiere luego a un grupo tiol de cisteína en la β-cetoacil-ACP sintasa (lugar 2). Al final del primer ciclo, el grupo butirilo resultante se transfiere al mismo grupo tiol de la cisteína, de manera que puede iniciarse otro ciclo (línea discontinua) mediante la transferencia de un grupo malonil de la malonil-CoA al brazo oscilante de fosfopanteteína.

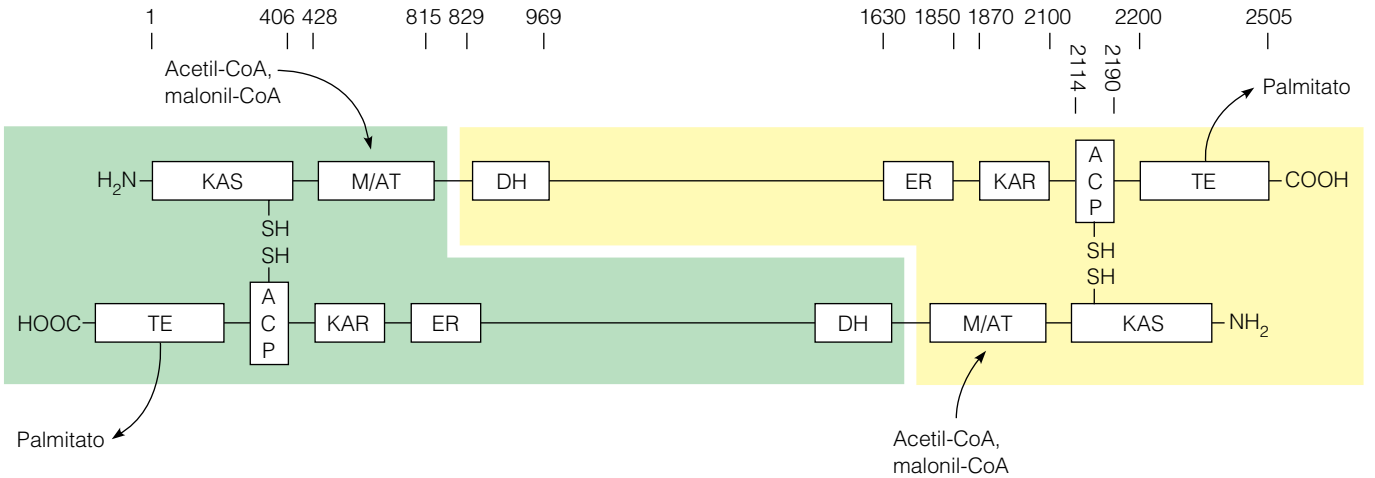


FIGURA **18.30**

Estructura de dominios del complejo ácido graso sintasa de vertebrados. En la enzima de rata, están alineadas cabeza con cola dos subunidades idénticas de 2505 residuos. En la parte superior de la figura se presentan los números de los residuos que comprende cada dominio funcional. Abreviaturas (dadas en orden de la secuencia de reacción en la ruta de síntesis): M/AT = malonil/acetil transacilasa; ACP = proteína transportadora del acilo; KAS = cetoacil-ACP sintasa; KAR = cetoacil-ACP reductasa; DH = hidroxiacil-ACP deshidrasa; ER = enoil-ACP reductasa; TE = tioesterasa (la enzima hidrolítica que convierte la palmitoil-CoA en palmitato). El complejo incluye dos unidades funcionales, cada una con dominios, como indican las líneas coloreadas que rodean cada unidad funcional, en cada una de las dos cadenas polipeptídicas. Obsérvese que la estructura tridimensional del complejo es bastante diferente de la representación simple de este diagrama, ya que cada dominio deshidrasa N-terminal (DH) debe interactuar con intermediarios unidos a más de 1000 residuos de distancia.

Adaptado de A. K. Joshi, A. Witkowski y S. Smith, *Biochemistry* (1997) 36:2316-2322. © 1997 American Chemical Society.

El citrato actúa como transportador de fragmentos de dos carbonos desde las mitocondrias al citosol para la biosíntesis de los ácidos grasos.

Transporte de las unidades acetilo y de los equivalentes reductores al citosol

Dado que la acetil-CoA se genera en la matriz mitocondrial, debe transportarse al citosol para su uso en la síntesis de los ácidos grasos. Al igual que las acil-CoA de cadena más larga, la acetil-CoA no puede atravesar la membrana interna. Se utiliza un sistema de lanzadera, que es interesante tanto porque proporciona un mecanismo de control para la síntesis de los ácidos grasos, como porque genera gran parte del NADPH que es necesario para el proceso. En esta lanzadera interviene el citrato, que se forma en las mitocondrias a partir de la acetil-CoA y el oxalacetato en el primer paso del ciclo del ácido cítrico (Figura 18.31, paso 1). Cuando se genera citrato en exceso respecto a la cantidad que se necesita para la oxidación en el ciclo del ácido cítrico, se transporta a través de la membrana mitocondrial hasta el citosol. Allí sufre la acción de la **citrato liasa** que regenera la acetil-CoA y el oxalacetato con el gasto de un ATP (paso 2):

$$\text{Citrato} + \text{ATP} + \text{CoA-SH} \longrightarrow \text{acetil-CoA} + \text{ADP} + P_i + \text{oxalacetato}$$

El oxalacetato no puede regresar directamente a la matriz mitocondrial, puesto que la membrana interna carece de transportador para este compuesto. Primero se reduce por la malato deshidrogenasa citosólica a malato (paso 3), y parte del malato se descarboxila oxidativamente por la enzima málica para dar piruvato (paso 4; la enzima málica está funcionando aquí en la dirección opuesta a la que se presentó en el Capítulo 14, página 567). Sin embargo, parte del malato formado vuelve a la mitocondria y se intercambia por citrato.

$$\text{Oxalacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{malato} + \text{NAD}^+$$

$$\text{Malato} + \text{NADP}^+ \longrightarrow \text{piruvato} + \text{CO}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

El piruvato resultante se transporta de nuevo a las mitocondrias, en donde se reconvierte en oxalacetato por la piruvato carboxilasa (paso 5).

$$\text{Piruvato} + \text{CO}_2 + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{oxalacetato} + \text{ADP} + P_i + \text{H}^+$$

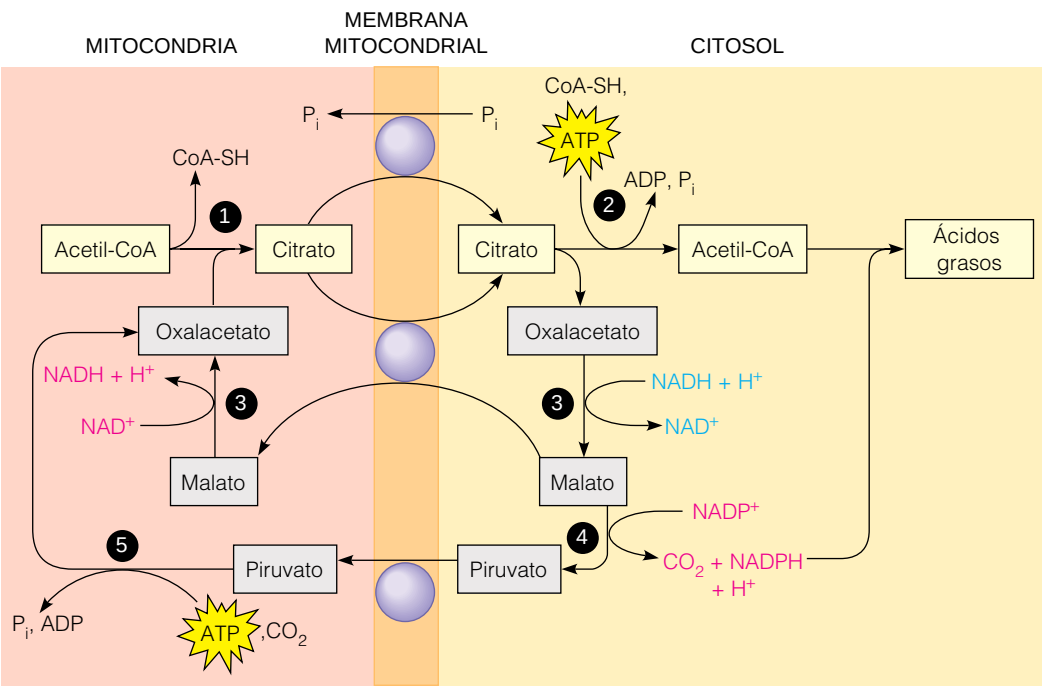


FIGURA **18.31**

Transporte de las unidades acetilo y los equivalentes reductores utilizados en la síntesis de los ácidos grasos. Este diagrama muestra el mecanismo de lanzadera para transferir las unidades acetilo y los equivalentes reductores desde las mitocondrias al citosol, para su uso en la síntesis de los ácidos grasos. El citrato debe intercambiarse por un transportador al salir de la mitocondria. Parte del citrato se intercambia evidentemente por ortofosfato y parte por malato. El malato que no se intercambia genera parte del NADPH para la síntesis de los ácidos grasos, a través de la acción de la enzima málica. Los círculos de color púrpura corresponden a sistemas de transporte situados en la membrana mitocondrial. 1 = citrato sintasa; 2 = citrato liasa; 3 = malato deshidrogenasa; 4 = enzima málica; 5 = piruvato carboxilasa.

La reacción neta catalizada por estas tres enzimas es la siguiente:

$$NADP^+ + NADH + ATP + H_2O \longrightarrow NADPH + NAD^+ + ADP + P_i + H^+$$

Por cada mol de malato que queda en el citosol, se genera 1 mol de NADPH. La mayor parte del resto de 14 moles de NADPH necesarios para sintetizar 1 mol de palmitato se generan en el citosol a través de la ruta de las pentosas fosfato.

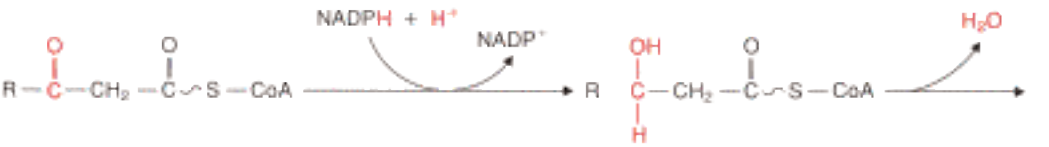
ELONGACIÓN DE LAS CADENAS DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Dado que la acción de la ácido graso sintasa da lugar fundamentalmente a palmitato, debemos considerar los procesos que conducen del palmitato a las variaciones que se observan entre los ácidos grasos en cuanto a la longitud de la cadena y el grado de insaturación. En las células eucariotas, la elongación se produce tanto en las mitocondrias como en el retículo endoplásmico. Este último, denominado sistema microsómico, tiene una actividad mucho mayor y es el que se describe aquí. Es similar a la secuencia de la ácido graso sintasa que conduce a palmitato, pero con la intervención de derivados acil-CoA y enzimas separadas. La primera reacción es una condensación entre la malonil-CoA y un sustrato acil-CoA de cadena larga.

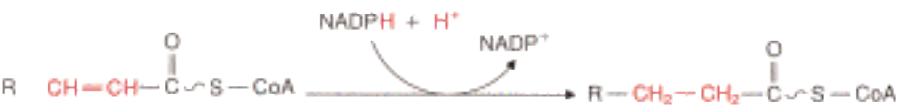


Acil-CoA **Malonil-CoA** ***β*-Cetoacil-CoA**

La *β*-cetoacil-CoA resultante experimenta una reducción dependiente de NADPH, una deshidratación de la hidroxiacil-CoA resultante, y otra reducción dependiente de NADPH para dar una acil-CoA saturada dos carbonos más larga que el sustrato original.



***β*-Cetoacil-CoA** ***β*-Hidroxiacil-CoA**



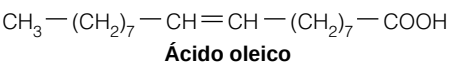
Enoil-CoA **Acil-CoA**

Existen al menos dos enzimas condensantes diferentes en el retículo endoplásmico, una de ellas actúa sobre las acil-CoA insaturadas. Al parecer un solo conjunto de enzimas lleva a cabo las tres reacciones restantes.

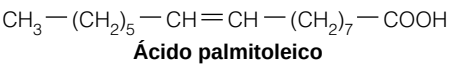
DESATURACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos monoinsaturados más frecuentes en los lípidos de los animales son el ácido oleico, un ácido 18:1ΔA9, y el ácido palmitoleico, un compuesto 16:1cΔ9 (véase la Tabla 10.1). Estos compuestos se sintetizan a partir de estearato y palmitato, respectivamente, mediante un sistema microsómico denominado **acil-CoA desaturasa** (Figura 18.32). La reacción global para la desaturación de la estearoil-CoA es la siguiente:

$$\text{Estearoil-CoA} + NADH + H^+ + O_2 \longrightarrow \text{oleil-CoA} + NAD^+ + 2H_2O$$



Ácido oleico



Ácido palmitoleico

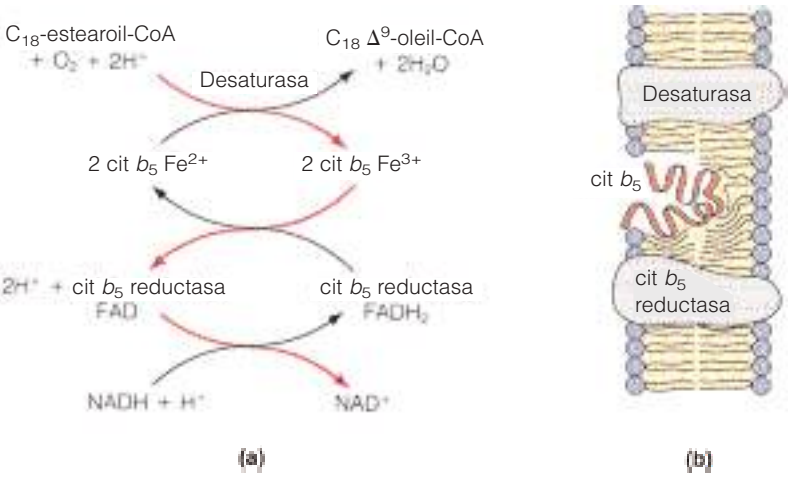


FIGURA **18.32**

Sistema de desaturación de los ácidos grasos. **(a)** Reacciones redox que intervienen en el proceso. **(b)** Un modelo para las localizaciones de las tres proteínas que intervienen en la membrana.

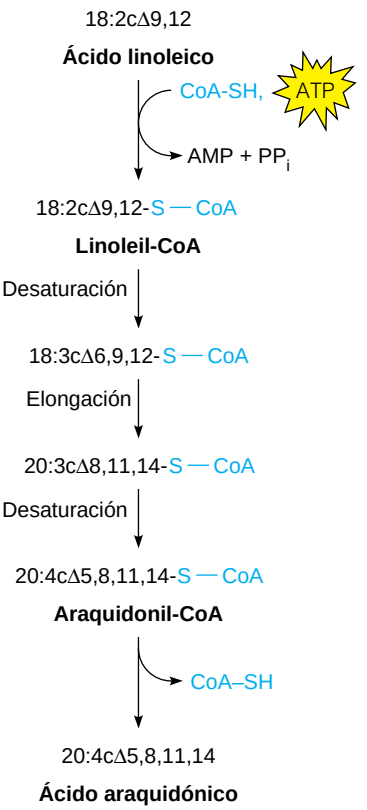


FIGURA **18.33**

Ruta para la conversión del ácido linoleico en ácido araquidónico en los mamíferos. Aunque la araquidonil-CoA puede fragmentarse como se indica en la figura para dar ácido araquidónico, la mayor parte de la araquidonil-CoA producida en esta ruta se utiliza para la síntesis de fosfolípidos. El ácido araquidónico para la biosíntesis de eicosanoides procede de la hidrólisis de estos fosfolípidos.

Obsérvese que ambos sustratos sufren oxidaciones de dos electrones en esta reacción. La transferencia electrónica global en esta reacción implica otra enzima, la **citocromo b_5 reductasa** dependiente de la flavina.

Además del sistema de desaturación Δ9 que se acaba de describir, las células de los mamíferos contienen desaturasas Δ5 y Δ6. Las actividades de estas enzimas están sujetas a un control hormonal complejo. Las tres actividades son potenciadas por la insulina, mientras que otras hormonas tienen efectos diferenciales, como la activación de una desaturasa y la inhibición de las demás. La trascendencia de estos efectos continúa siendo objeto de una investigación activa.

Los mamíferos no son capaces de introducir dobles enlaces más allá de Δ9 en la cadena de ácido graso. En consecuencia, no pueden sintetizar el ácido linoleico (18:2cΔ9,12) ni el ácido linolénico (18:3cΔ9,12,15). Éstos se denominan **ácidos grasos esenciales**, ya que son componentes lipídicos esenciales que han de suministrarse en el alimento. Tras la ingestión en los mamíferos, pasan a ser, a su vez, sustratos de posteriores reacciones de desaturación y elongación. Es especialmente importante la ruta que se resume en la Figura 18.33, que va del ácido linoleico al **ácido araquidónico** (20:4cΔ5,8,11,14). Éste es el precursor de una clase de compuestos denominados *eicosanoides*. Como se tratará en el Capítulo 19, los eicosanoides incluyen dos clases importantes de reguladores metabólicos, las prostaglandinas y los tromboxanos.

CONTROL DE LA SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS GRASOS

La biosíntesis de los ácidos grasos se controla en gran medida mediante mecanismos hormonales. Gran parte de la síntesis de los ácidos grasos de los animales tiene lugar en el tejido adiposo, en donde la grasa se almacena para su liberación y transporte a otros tejidos según la demanda, con objeto de satisfacer sus necesidades energéticas. Como mensajeros extracelulares, las hormonas son muy adecuadas para estos papeles reguladores entre los diversos órganos.

En la Figura 18.34 se resumen los principales efectos en la regulación de la síntesis de los ácidos grasos en las células de los animales. La insulina actúa de diversas formas para estimular la síntesis de los ácidos grasos. Uno de sus efectos consiste en estimular la entrada de glucosa en las células. Este efecto aumenta el flujo a través de la glucólisis y la reacción de la piruvato deshidrogenasa, que proporciona acetil-CoA para la síntesis de los ácidos grasos. La insulina activa también el complejo piruvato deshidrogenasa, mediante la estimulación de su desfosforilación a la forma activa (véase la página 547). El mecanismo de este

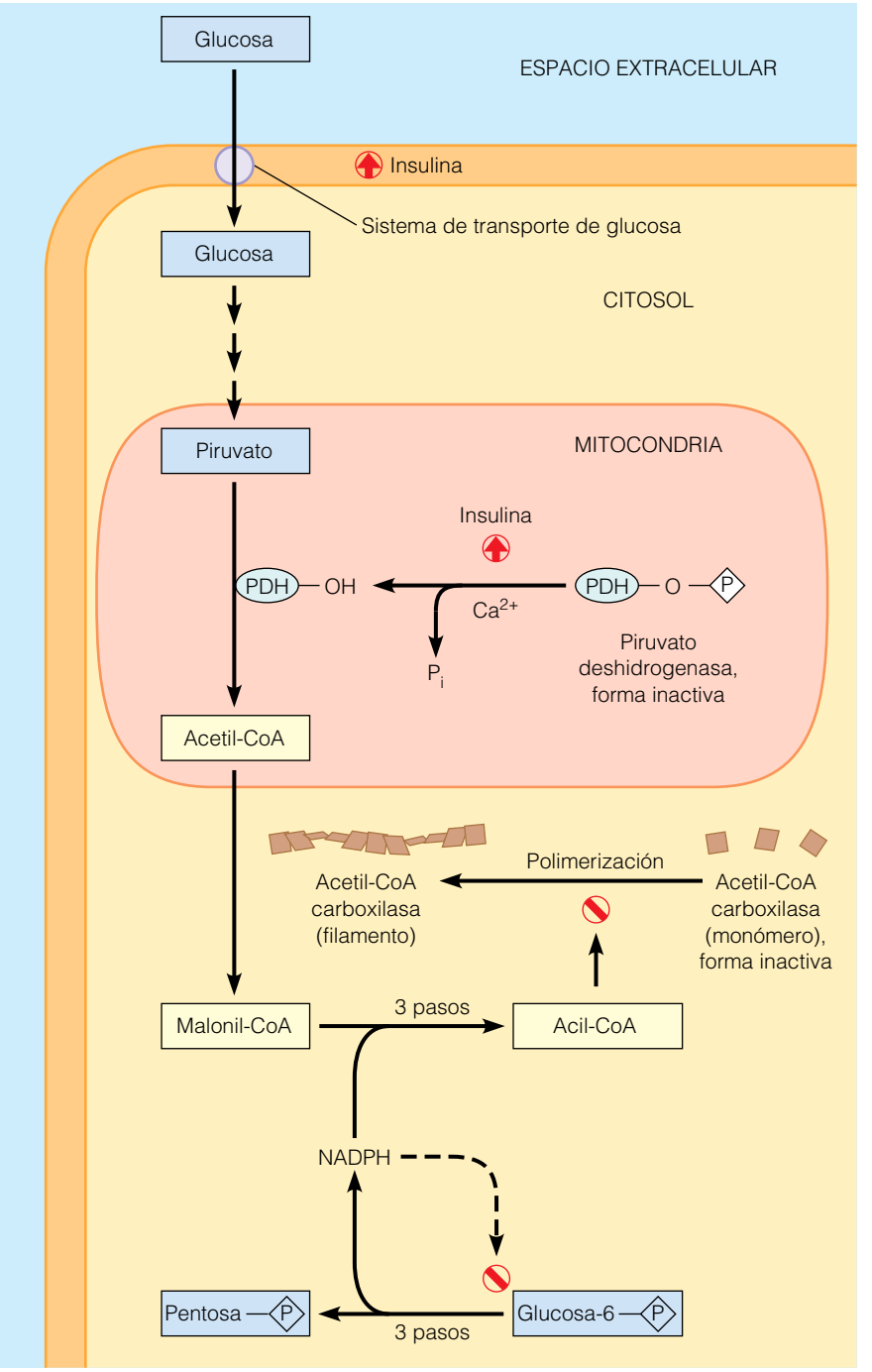


FIGURA **18.34**

Regulación de la síntesis de los ácidos grasos en las células animales, como las células hepáticas. La forma desfosforilada de la piruvato deshidrogenasa es la forma activa enzimáticamente. En los adipocitos, la carencia de glicerol quinasa hace esencial la captura de glucosa controlada por la insulina, para generar glicerol-3-fosfato para la síntesis de triacilgliceroles.

efecto de la insulina no está claro, pero puede comportar incrementos de las concentraciones de Ca^{2+}, que estimulan la piruvato deshidrogenasa fosfatasa.

Otro lugar de regulación (que no se muestra en la figura) es la transferencia de unidades acetilo desde la matriz mitocondrial al citosol, en donde tiene lugar la síntesis de los ácidos grasos. Existen pruebas que indican que la actividad de la citrato liasa, una enzima clave de este proceso (página 736), se controla por la fosforilación y desfosforilación de la proteína enzimática, pero no se conocen aún los mecanismos fisiológicos que intervienen en ello.

La primera enzima cuya acción se dirige específicamente a la síntesis de los ácidos grasos es la acetil-CoA carboxilasa. Las actividades de esta enzima son

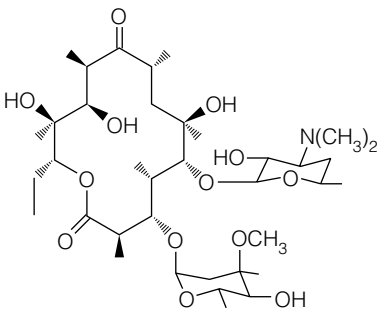
La acetil-CoA carboxilasa es la enzima de comienzo y el principal punto de control de la síntesis de los ácidos grasos.

bastante bajas en los animales que no ingieren alimento, lo que refleja probablemente un control hormonal a través del AMP cíclico. La fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa por la proteína quinasa dependiente del AMP cíclico tiende a inactivar la enzima. Además, como se ha indicado antes, la acetil-CoA carboxilasa debe sufrir una polimerización reversible para ser activa. Las acil-CoA de cadena larga a bajas concentraciones impiden la polimerización, con lo que inactivan la enzima y proporcionan una aparente retroinhibición de la ruta. Las concentraciones de acil-CoA se reducen por la insulina, otro mecanismo mediante el cual la insulina estimula la síntesis de los ácidos grasos.

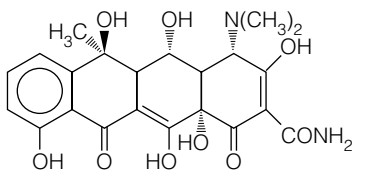
Por último, existen pruebas que indican que la síntesis de los ácidos grasos se controla por la disponibilidad de equivalentes reductores. Recuérdese que el NADPH procede tanto del transporte de citrato fuera de las mitocondrias (véase la página 736) como de la ruta de las pentosas fosfato (véase el Capítulo 14). La ruta de las pentosas fosfato se controla a su vez mediante la inhibición de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa por el NADPH. Habitualmente, alrededor de un 60% del NADPH para la síntesis de los ácidos grasos procede de la ruta de las pentosas fosfato. Cuando se añade acetato a una preparación experimental de tejido, esa proporción puede aumentar hasta un 80%, lo cual indica que el flujo a través de la ruta de las pentosas fosfato puede aumentar cuando aumenta la demanda de NADPH.

RUTAS DIFERENTES DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS QUE CONDUCEN A ANTIBIÓTICOS

Nos desviamos del metabolismo lipídico para presentar diversas rutas relacionadas en bacterias y hongos, que participan en la biosíntesis de un tipo de antibióticos denominados **poliquétidos,** de los que un ejemplo es la eritromicina que sintetiza la bacteria *Saccharopolyspora erythraea*. En el margen se presenta otro ejemplo que es la oxitetraciclina producida por *Streptomyces rimosus*. Estos antibióticos se sintetizan mediante complejos enzimáticos gigantes que hace poco se ha comprobado que están formados por módulos individuales que realizan ciclos de adición de carbono, donde cada módulo se asemeja al proceso mediante el cual se añaden dos carbonos en un ciclo de la ruta de síntesis de ácidos grasos. Sin embargo, alguno de los módulos carece de una o varias de las actividades de la síntesis de ácidos grasos, un factor que conduce a una gran diversidad estructural entre los productos. Por ejemplo, en la Figura 18.35 se presenta la ruta que conduce a la eritromicina A. Esta ruta comienza con propionil-CoA (en lugar de acetil-CoA) y malonil-CoA y realiza siete ciclos de adición de dos carbonos, exactamente igual que la síntesis de palmitoil-ACP. Sin embargo, sólo uno de los siete módulos contiene un dominio deshidratasa y dos de los módulos carecen del dominio cetoacil reductasa. De esta forma, el producto distinto de los ácidos grasos contiene átomos de oxígeno ceto e hidroxilo. Las investigaciones actuales tratan de modificar y reagrupar los módulos individuales mediante mutagénesis de lugar dirigida de los genes clonados, lo cual conduce a una mayor diversificación de las rutas involucradas y probablemente a antibióticos nuevos más útiles.



Eritromicina A



Oxitetraciclina

Biosíntesis de los triacilgliceroles

Los acil-CoA, junto con el glicerol-3-fosfato, son los principales precursores de los triacilgliceroles. El glicerol-3-fosfato procede de la reducción del intermediario glucolítico dihidroxiacetona fosfato, catalizada por la **glicerol fosfato**

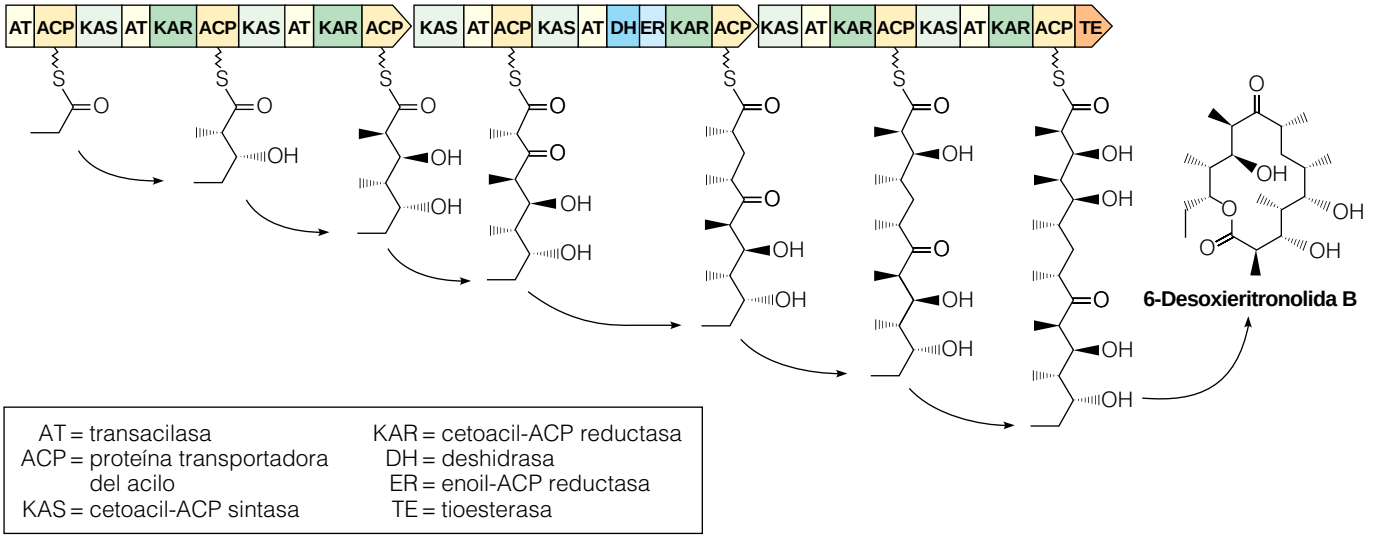


FIGURA **18.35**

Ruta de biosíntesis de la eritromicina y otros antibióticos relacionados. Este proceso, tal como tiene lugar en *Saccharopolyspora erythraea*, utiliza tres proteínas multifuncionales, cada una de las cuales se muestra con una flecha separada y con las actividades enzimáticas implicadas. Las abreviaturas son las mismas que las de la Figura 18.30, excepto la actividad final. Esta actividad **tioesterasa** (TE) cicla el producto durante el proceso de separación del dominio ACP al que está unido. La conversión del producto, la 6-desoxieritronolida B, en eritromicina A necesita dos pasos de glucosilación.

Modificado de R. L. Rawls, *Chem. Eng. News* (1998) 76(10), pp. 29-32. © 1998 American Chemical Society.

deshidrogenasa, o de la fosforilación del glicerol, dependiente de ATP, por la **glicerol quinasa:**

$$\text{Dihidroxiacetona fosfato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{L-glicerol-3-fosfato} + \text{NAD}^+$$

$$\text{Glicerol} + \text{ATP} \longrightarrow \text{L-glicerol-3-fosfato} + \text{ADP}$$

La ruta que utiliza la DHAP predomina en el tejido adiposo, debido a que los adipocitos carecen de la glicerol quinasa. Sea cual sea su mecanismo de formación, el glicerol-3-fosfato sufre dos esterificaciones sucesivas con acil-CoA, para producir **diacilglicerol-3-fosfato:**

$$\text{Acil-S-CoA} + \text{glicerol-3-fosfato} \longrightarrow \text{monoacilglicerol-3-fosfato} + \text{CoA-SH}$$

$$\text{Monoacilglicerol-3-fosfato} + \text{acil-S-CoA} \longrightarrow \text{diacilglicerol-3-fosfato} + \text{CoA-SH}$$

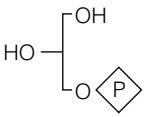
El diacilglicerol-3-fosfato, también denominado **ácido fosfatídico**, es precursor tanto de los fosfolípidos como de los triacilgliceroles. La ruta hacia los triacilgliceroles implica la eliminación hidrolítica del fosfato, seguida de una transferencia de otro grupo acilo procedente de una acil-CoA:

$$\text{Ácido fosfatídico} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{1,2-diacilglicerol} + \text{P}_i$$

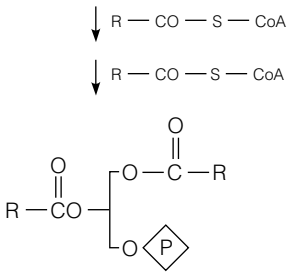
$$\text{1,2-Diacilglicerol} + \text{acil-CoA} \longrightarrow \text{triacilglicerol} + \text{CoA-SH}$$

Como hemos indicado, los triacilgliceroles constituyen la principal forma de almacenamiento de energía. Normalmente, en un animal adulto, la síntesis y la degradación están equilibradas, por lo que no se produce un cambio neto de la cantidad corporal total de triacilgliceroles. Si el consumo de alimento supera a las necesidades calóricas, las proteínas, los hidratos de carbono o las grasas pueden producir con facilidad acetil-CoA que impulsa la síntesis de ácidos grasos y triacilgliceroles. Por otra parte, las reservas de grasa permiten a los animales pasar períodos de tiempo bastante prolongados sin comer, manteniendo unos niveles adecuados de energía. Este ayuno genera algunas tensiones metabólicas, como comentaremos en el Capítulo 23.

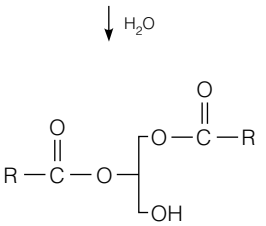
Los animales que hibernan se han adaptado especialmente bien para hacer frente a estas tensiones. Así, por ejemplo, los osos almacenan cantidades enormes de grasa inmediatamente antes de iniciar la hibernación, que puede durar hasta 7 meses. Durante este período de tiempo toda la energía del oso procede



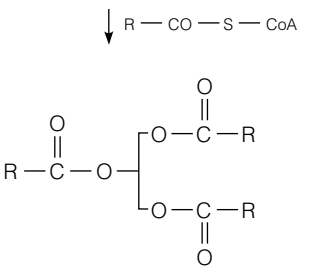
Glicerol-3-fosfato



Diacilglicerol-3-fosfato (ácido fosfatídico)



1,2-Diacilglicerol



Triacilglicerol

de la degradación de la grasa almacenada. Además, el oso excreta tan poca agua que la que se libera de la oxidación de la grasa permite satisfacer las necesidades del animal. De manera análoga, el glicerol liberado de los triacilgliceroles proporciona los precursores necesarios para la gluconeogénesis.

Conocimientos bioquímicos sobre la obesidad

Alrededor de un tercio de los americanos tienen sobrepeso, lo que hace de la obesidad uno de nuestros problemas de salud pública más significativos. Hasta hace poco, la obesidad se consideraba simplemente una consecuencia de la sobrealimentación, que llevaba a la acumulación en exceso de triacilgliceroles en los adipocitos. Está claro que los factores bioquímicos hacen que algunas personas sean más propicias que otras a la obesidad. En 1995 se identificó en el ratón el producto del gen *ob* (*ob*, abreviatura de *obeso*). Los ratones que portan dos alelos defectuosos del gen *ob* crecen hasta pesos corporales tres veces superiores al normal. El gen *ob* codifica una proteína de 16 kDa denominada **leptina**, que se sintetiza en los adipocitos y actúa como una hormona, uniéndose a un receptor específico en el cerebro. La leptina actúa como un "lipostato", que detecta la cantidad de grasa almacenada en los adipocitos. Cuando los depósitos grasos son adecuados, la concentración de leptina es elevada y los sistemas de señalización controlan el comportamiento alimenticio para limitar la deposición de grasa. Durante el ayuno prolongado, la concentración de leptina disminuye, lo que estimula la alimentación y el almacenamiento de grasa en los adipocitos. Los ratones *obesos* que carecen de leptina funcional actúan como si estuvieran siempre en ayuno y su sobrealimentación los hace obesos. Las inyecciones de leptina disminuyen sus tasas de alimentación y los hace perder peso de forma dramática. Sin embargo, las personas obesas son diferentes de los ratones obesos, ya que no contienen concentraciones elevadas de leptina. La investigación actual está impulsada por la premisa de que estas personas de alguna manera no responden a la señalización normal de la leptina.

Se están acumulando pruebas de otros factores bioquímicos que pueden ser elementos significativos en el control del peso. Diversas hormonas, como la **serotonina** (página 875), controlan la saciedad, la sensación de plenitud tras la comida. El fármaco contra la obesidad **fenfluoramina**, que actúa aumentando la concentración de serotonina y afectando al apetito, se estaba haciendo muy popular hasta que se encontró que producía daños severos al corazón y se retiró del mercado. En la actualidad la atención bioquímica se centra en las proteínas desacoplantes, proteínas intramitocondriales semejantes a las encontradas en las mitocondrias de la grasa parda (página 612), que actúan desacoplando la fosforilación oxidativa y, de esta forma, disminuyen la cantidad de ATP que se sintetiza durante el metabolismo oxidativo. También está centrada la atención en otros factores hormonales y en las proteínas ligadoras de los ácidos grasos, que participan en el transporte de los ácidos grasos a diferentes localizaciones dentro de las células. La investigación bioquímica sobre la obesidad es una de las fronteras de la investigación más activa en el momento actual.

RESUMEN

Los triacilgliceroles constituyen la principal forma de almacenamiento de energía biológica. En los animales, los triacilgliceroles del alimento se digieren y sintetizan de nuevo para formar complejos con proteínas que dan lugar a los quilomicrones, para su transporte a los tejidos. Los triacilgliceroles sintetizados

en el hígado se transportan a los tejidos periféricos en forma de lipoproteínas de muy baja densidad. Las lipoproteínas de baja densidad constituyen el principal vehículo para el transporte del colesterol a los tejidos periféricos. Las concentraciones de colesterol en sangre están reguladas mediante el control de la síntesis de los receptores de LDL, que intervienen en la captación celular de las LDL por endocitosis. Un control defectuoso de la concentración de las LDL contribuye a la aparición de la placa aterosclerótica.

Las reservas de grasa se movilizan mediante la hidrólisis enzimática de los triacilgliceroles a ácidos grasos y glicerol. El proceso se controla hormonalmente a través del AMP cíclico. La mayor parte de la degradación de los ácidos grasos se produce mediante la β-oxidación, un proceso mitocondrial que comporta la oxidación escalonada y la eliminación de fragmentos de dos carbonos en forma de acetil-CoA. El procesamiento de los ácidos grasos insaturados es algo más complicado, debido a la estereoquímica que interviene en él, pero las rutas son directas. En condiciones en las que la oxidación de la acetil-CoA a través del ciclo del ácido cítrico está limitada, la acetil-CoA se utiliza para sintetizar cuerpos cetónicos, que son sustratos energéticos excelentes o satisfactorios para algunos órganos.

La biosíntesis de los ácidos grasos se realiza mediante la adición escalonada de fragmentos de dos carbonos, en un proceso que se parece superficialmente a la inversión de la β-oxidación. La activación metabólica comporta la intervención de una proteína transportadora del acilo, y el poder reductor procede del NADPH. En las células eucariotas, las siete actividades enzimáticas están ligadas covalentemente en enzimas multifuncionales o complejos multienzimáticos. La elongación de los ácidos grasos más allá del estadio de C_{16} es semejante, desde el punto de vista del mecanismo, pero participan derivados de CoA en lugar de la proteína transportadora del acilo. Los ácidos grasos insaturados se forman principalmente por un sistema de desaturación asociado al RE. Los triacilgliceroles se sintetizan mediante rutas sencillas en las que los grupos acilo de las acil-CoA se transfieren a los grupos hidroxilo del glicerol-3-fosfato y el diacilglicerol. El control hormonal defectuoso de la deposición de los triacilgliceroles, junto con una ingestión excesiva en el alimento, pueden ser responsables de la obesidad.

BIBLIOGRAFÍA

General

Mead, J. F., R. B. Alfin-Slater, D. R. Howton y G. Popják (1986) *Lipids: Chemistry, Biochemistry, and Nutrition.* Plenum, Nueva York. Un libro detallado y razonablemente actualizado.

Töpfer, R., N. Martini y J. Schell (1995) Modification of plant lipid synthesis. *Science* 268:681-686. La ingeniería genética de las plantas está creando fábricas para la producción de ácidos grasos y aceites adecuados nutricional e industrialmente.

Vance, D. E. y J. E. Vance, eds. (1985) *Biochemistry of Lipids and Membranes.* Benjamin/Cummings, Redwood City, Calif. Este texto de múltiples autores contiene varias revisiones detalladas. Son especialmente relevantes para este capítulo los siguientes artículos: Oxidation of fatty acids, pp. 116-142; Fatty acid synthesis in eucaryotes, pp. 143-180; Fatty acid desaturation and chain elongation in eucaryotes, pp. 181-212; Metabolism of triacylglycerols, pp. 213-241; Metabolism of cholesterol and lipoproteins, pp. 404-474.

Metabolismo de los lípidos y las lipoproteínas en los animales

Brown, M. y J. L. Goldstein (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47. Presentación del Premio Nobel de Brown y Goldstein en la que se describe la historia del descubrimiento y las acciones del receptor de LDL.

Derewenda, Z. y A. M. Sharp (1993) News from the interface: The molecular structures of triacylglyceride lipases. *Trends Biochem. Sci.* 18:20-25. Describe el cambio conformacional que expone un lugar catalítico en una interfase de separación aceite-agua.

Diaz, M. N., B. Frei, J. A. Vita y J. F. Keaney, Jr. (1997) Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N. Engl. J. Med.* 337:408-416. Una revisión de los procesos que conducen a la oxidación de las LDL y de los efectos protectores de los antioxidantes.

Havel, R. J. y J. P. Kane (1995) Introduction: Structure and metabolism of plasma lipoproteins. En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7.ª ed., editado por C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle, pp. 1841-1852. McGraw-Hill, Nueva

York. Primero de una serie de 10 capítulos que describen los trastornos clínicos del metabolismo de los lípidos y las lipoproteínas.

Hodges, P. y J. Scott (1992) Apolipoprotein B mRNA editing: A new tier for the control of gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 17:77-81. Las dos apoproteínas B son productos del mismo gen, y el mRNA de la proteína de menor tamaño se forma mediante una nueva modificación del mRNA de la proteína grande.

Nestel, P. J. (1990) Effects of n-3 fatty acids on lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutrition* 10:149-167. Un resumen de los aspectos bioquímicos y nutritivos de los ácidos grasos ω-3 y sus efectos sobre el metabolismo lipídico.

Schmid, S. L. (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: An integrated process. *Annu. Rev. Biochem.* 66:511-548. Una revisión de la bioquímica de la endocitosis y de la clasificación de las proteínas.

Steinberg, D. S. (1996) A docking receptor for HDL cholesterol esters. *Science* 271:460-461. Un artículo de "Perspectivas" que resume los acontecimientos de la interacción de las HDL con las células.

Steinberg, D. S. (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 272:20963-20966. Un tratamiento bioquímico de la oxidación de las LDL.

Metabolismo de los ácidos grasos

Joshi, A. K., A. Witkowski y S. Smith (1997) Mapping of functional interactions between domains of the animal fatty acid synthase by mutant complementation *in vitro*. *Biochemistry* 36:2316-2322. Un análisis de las relaciones funcionales de los diversos dominios de esta proteína multifuncional.

Reynolds, K. A. (1998) Combinatorial biosynthesis: Lesson learned from nature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12744-12746. Una mini-revisión que describe la naturaleza modular de la síntesis de antibióticos poliquétidos y las aplicaciones potenciales para la producción de nuevos antibióticos.

Somerville, C. y J. Browse (1991) Plant lipids: Metabolism, mutants, and membranes. *Science* 252:80-87. La ingeniería genética se utiliza para hacer que las plantas sinteticen triacilgliceroles y otros lípidos importantes desde el punto de vista nutritivo o industrial.

Tolbert, N. E. (1981) Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Annu. Rev. Biochem.* 50:133-157. Una completa descripción de la enzimología y de las funciones de la β-oxidación peroxisómica.

Wakil, S. J., J. K. Stoops y V. C. Joshi (1983) Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 52:537-579. Un tratamiento detallado de la química proteica de las proteínas multifuncionales eucariotas que interviene en la síntesis de los ácidos grasos.

Conocimientos bioquímicos de la obesidad

Campfield, L. A., F. J. Smith y P. Burn (1998) Strategies and potential molecular targets for obesity treatment. *Science* 280:1383-1387. Uno de una serie de artículos sobre la regulación del peso corporal de un número especial de *Science*.

Friedman, J. M. y J. L. Halaas (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770. Una revisión de la leptina y su papel en la prevención de la obesidad.

Rawls, R. L. (1999) Weighing in on obesity. *Chem. Eng. News*, número del 21 de junio, pp. 35-44. Una descripción legible de los mecanismos y las estrategias terapéuticas.

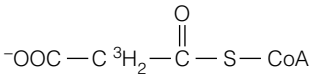
PROBLEMAS

1. Calcule el rendimiento de energía metabólica que se obtiene con la oxidación del ácido palmítico, teniendo en cuenta la energía necesaria para activar el ácido graso y transportarlo al interior de las mitocondrias. Realice el mismo cálculo para el ácido esteárico, el ácido linoleico y el ácido oleico.
2. Si se somete el ácido palmítico a una combustión completa en una bomba calorimétrica, puede calcularse una energía libre estándar de combustión de 9788 kJ/mol. A partir del rendimiento de ATP de la oxidación del palmitato, ¿cuál es la eficacia metabólica de este proceso, tanto en kilojulios ahorrados como en ATP por kilojulio liberado?
3. Calcule el número de ATP que se generan en la oxidación metabólica completa de la tripalmitina (tripalmitoilglicerol). La hidrólisis del triacilglicerol se produce en la superficie celular. Considere el rendimiento energético del catabolismo del glicerol, así como el de los ácidos grasos. Calcule el rendimiento de ATP por átomo de carbono oxidado y compárelo con el rendimiento energético de la glucosa.
4. Escriba una ecuación equilibrada para la oxidación metabólica *completa* de cada uno de los siguientes productos. Incluya O_2, ADP y P_i como reactantes y ATP, CO_2 y H_2O como productos.
   (a) Ácido esteárico
   (b) Ácido oleico
   (c) Ácido palmítico
   (d) Ácido linoleico
5. Calcule el número de ATP generados a partir de la oxidación metabólica de los cuatro carbonos de la acetoacetil-CoA a CO_2. Considere ahora el homólogo que deriva de la oxidación de una cadena con un número impar de carbonos, es decir, la propionoacetil-CoA. Calcule el rendimiento neto de ATP de la oxidación de los cinco carbonos de este compuesto a CO_2.
6. La 2-bromopalmitoil-CoA inhibe la oxidación de la palmitoil-CoA por las mitocondrias aisladas, pero no tiene efecto alguno sobre la oxidación de la palmitoilcarnitina. ¿Cuál es el lugar más probable de inhibición por la 2-bromopalmitoil-CoA?

*7. Cuando las subunidades idénticas de la ácido graso sintasa de hígado de pollo se disocian in vitro, todas las actividades pueden detectarse en las subunidades separadas excepto la de la reacción de la β-cetoacil sintasa y la síntesis global de palmitato. Explique estas observaciones.

8. Los mamíferos no pueden realizar una síntesis *neta* de hidratos de carbono a partir de la acetil-CoA, pero los carbonos de la acetil-CoA pueden incorporarse a la glucosa y a los aminoácidos. Presente las rutas a través de las cuales podría producirse este hecho.
9. Describa una ruta mediante la cual parte del carbono de un ácido graso con una cadena de número impar de carbonos pueda sufrir una conversión neta en hidratos de carbono.

10. ¿Cuántos átomos de tritio (^3H) se incorporan al palmitato cuando la síntesis de los ácidos grasos se realiza in vitro con el siguiente sustrato marcado?



11. ¿Cuál sería el efecto sobre la síntesis de los ácidos grasos de un aumento de la concentración intramitocondrial de oxalacetato? Explique brevemente su respuesta.

*12. La secreción de glucagón produce la inhibición de la actividad intracelular de la acetil-CoA carboxilasa mediante varios mecanismos. Indique los que se le ocurran.

13. Se ha observado que la malonil-CoA inhibe la oxidación del ácido palmítico en las mitocondrias aisladas, pero tiene un efecto escaso o nulo sobre la oxidación del ácido octanoico (C_8, saturado). Explique esta observación.

14. Identifique y comente brevemente cada mecanismo que asegura frente a la síntesis y oxidación simultáneas de los ácidos grasos en la misma célula.

15. Comente la justificación metabólica de la fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa por la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico.

16. Describa el efecto probable en los adipocitos de la captura de glucosa estimulada por la insulina en estas células.

CAPÍTULO 19

Metabolismo lipídico II: lípidos de membrana, esteroides, isoprenoides y eicosanoides

En el Capítulo 18 nos hemos referido fundamentalmente a los aspectos energéticos del metabolismo lipídico, síntesis y oxidación de los ácidos grasos, transporte de las lipoproteínas entre los órganos y metabolismo de los triacilgliceroles. Además de su papel en el almacenamiento de energía, los lípidos actúan como componentes de la membrana y como reguladores biológicos. Nuestra atención se traslada ahora hacia las funciones que desempeñan estos lípidos más complejos, así como a las rutas para su síntesis y degradación. En la Figura 19.1 se presenta esquemáticamente la biología celular de algunos de estos procesos.

Este capítulo se centra en las siguientes clases principales de lípidos: los *glicerofosfolípidos* (también denominados *fosfoglicéridos*), que son fundamentalmente componentes de la membrana pero que desempeñan también algunas funciones reguladoras especializadas; los *esfingolípidos*, que en los animales se encuentran fundamentalmente en el tejido nervioso; los *esteroides* y otros compuestos *isoprenoides*, que actúan como hormonas, vitaminas y componentes de la membrana, y los *eicosanoides*, una clase de reguladores biológicos que se sintetizan a partir del ácido araquidónico. Otros dos temas importantes que implican a los lípidos y a la regulación se consideran más adelante en este libro: las acciones de las hormonas esteroideas (en los Capítulos 23 y 28) y la función reguladora como segundos mensajeros de los fosfolípidos de inositol (en el Capítulo 23).

Metabolismo de los glicerofosfolípidos

Los fosfolípidos más abundantes son los derivados del glicerol. Estos **glicerofosfolípidos** se encuentran fundamentalmente como componentes de las membranas. Los fosfolípidos de la membrana son también precursores metabólicos de diversos elementos reguladores de las rutas de transducción de señal. En los animales, los fosfolípidos participan también en el transporte de los triacilgliceroles y del colesterol, como se consideró en el Capítulo 18, mediante la formación de la superficie de las lipoproteínas. Además, los fosfolípidos desempeñan funciones específicas en procesos tan diversos como la coagulación de la sangre y la función pulmonar. Las rutas de síntesis de los glicerofosfolípidos se indican en la Figura 19.2 y se presentan con mayor detalle en los aparta-

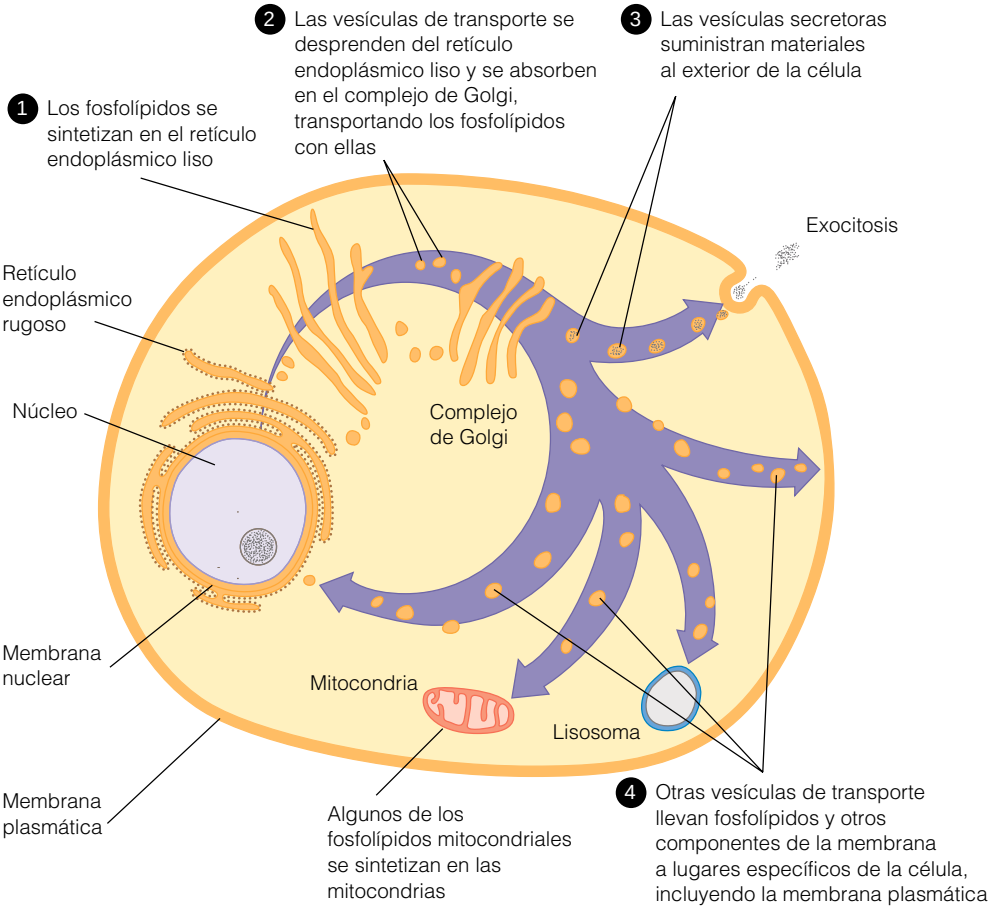


FIGURA **19.1**
Síntesis intracelular y transporte de los fosfolípidos de la membrana.

dos siguientes. Los principales fosfolípidos, aparte de los glicerofosfolípidos, son los esfingolípidos.

BIOSÍNTESIS DE LOS GLICEROFOSFOLÍPIDOS EN LAS BACTERIAS

Las membranas de *E. coli* contienen tan sólo tres fosfolípidos diferentes que incluyen predominantemente tres ácidos grasos distintos.

Iniciamos nuestro estudio del metabolismo de los fosfolípidos en el reino de los procariotas, debido en parte a la relativa simplicidad de los sistemas biológicos que se dan en ellos. En las bacterias, los fosfolípidos pueden constituir un 10% del peso seco de la célula, aunque su única función conocida es la de ser componentes de las membranas. En *E. coli*, que es el microorganismo más estudiado, las membranas contienen tan sólo tres fosfolípidos en cantidades significativas: fosfatidiletanolamina (75-85%), fosfatidilglicerol (10-20%) y cardiolipina (5-15%). El contenido de ácidos grasos de estos lípidos es también sencillo, con tres tipos dominantes: palmitato (16:0), palmitoleato (16:1cΔ9) y *cis*-vacenato (18:1cΔ11).

Dado que son fáciles de cultivar en grandes cantidades, las bacterias proporcionan una fuente abundante para el aislamiento a gran escala de las enzimas que intervienen en el metabolismo lipídico. Gran parte de la información inicial sobre la síntesis de los fosfolípidos y la síntesis de los ácidos grasos se obtuvo en estudios realizados con *E. coli*. Más recientemente, los estudios fisiológicos efectuados en mutantes bacterianos han aportado nuevas perspectivas respecto al control de la síntesis de los lípidos de la membrana y, en concreto, sobre los mecanismos utilizados para la regulación por la temperatura del contenido de ácidos grasos de estos lípidos. Recuérdese del Capítulo 10 que, cuando se cultivan a temperaturas bajas, las bacterias aumentan la insaturación de

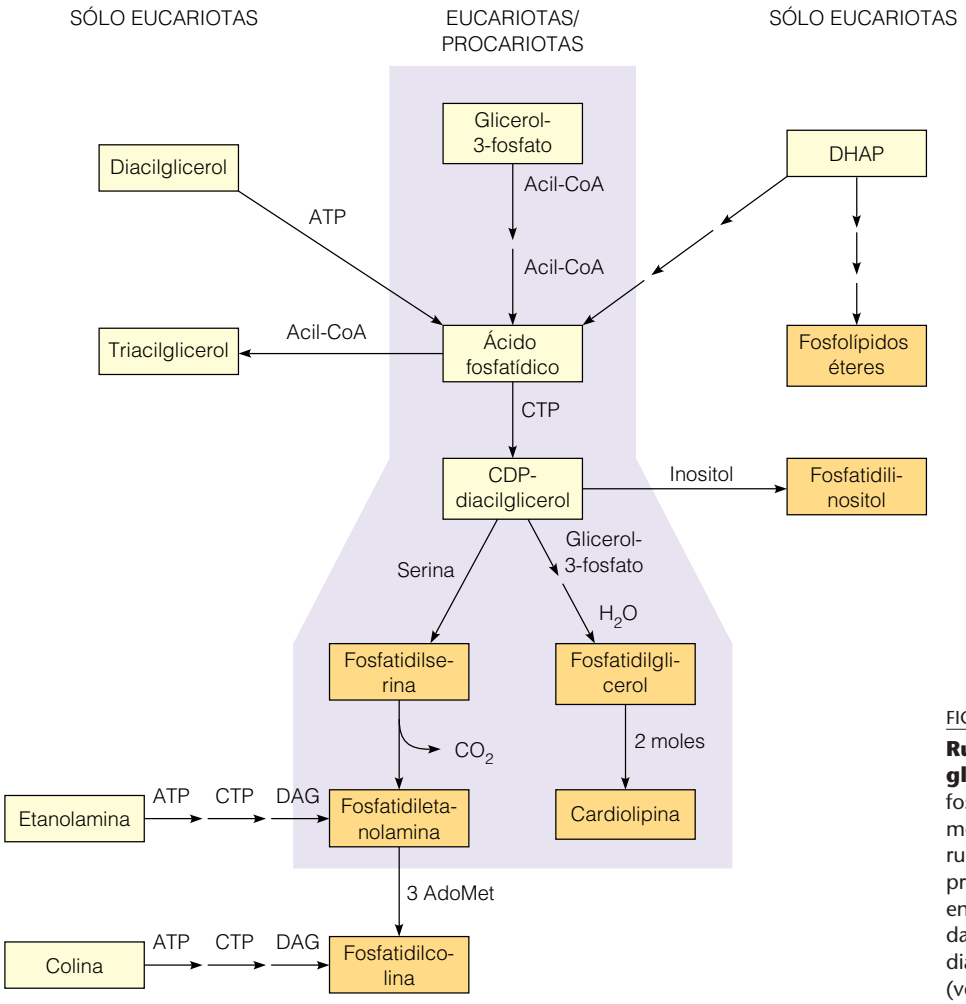


FIGURA **19.2**

Rutas de biosíntesis de los glicerofosfolípidos. Los principales fosfolípidos que se encuentran en las membranas se indican en color naranja. Las rutas que se encuentran tanto en las células procariotas como en las eucariotas se resaltan en color púrpura claro. Las demás reacciones se dan tan sólo en las células eucariotas. DAG = diacilglicerol; AdoMet = *S*-adenosilmetionina (véase la página 755).

sus ácidos grasos de membrana para mantener una fluidez óptima. Uno de los campos más interesante de la bioquímica lipídica contemporánea es el del análisis genético de los mecanismos que mantienen el patrón óptimo de insaturación a una temperatura dada.

Biosíntesis del ácido fosfatídico y de los grupos de cabeza polares

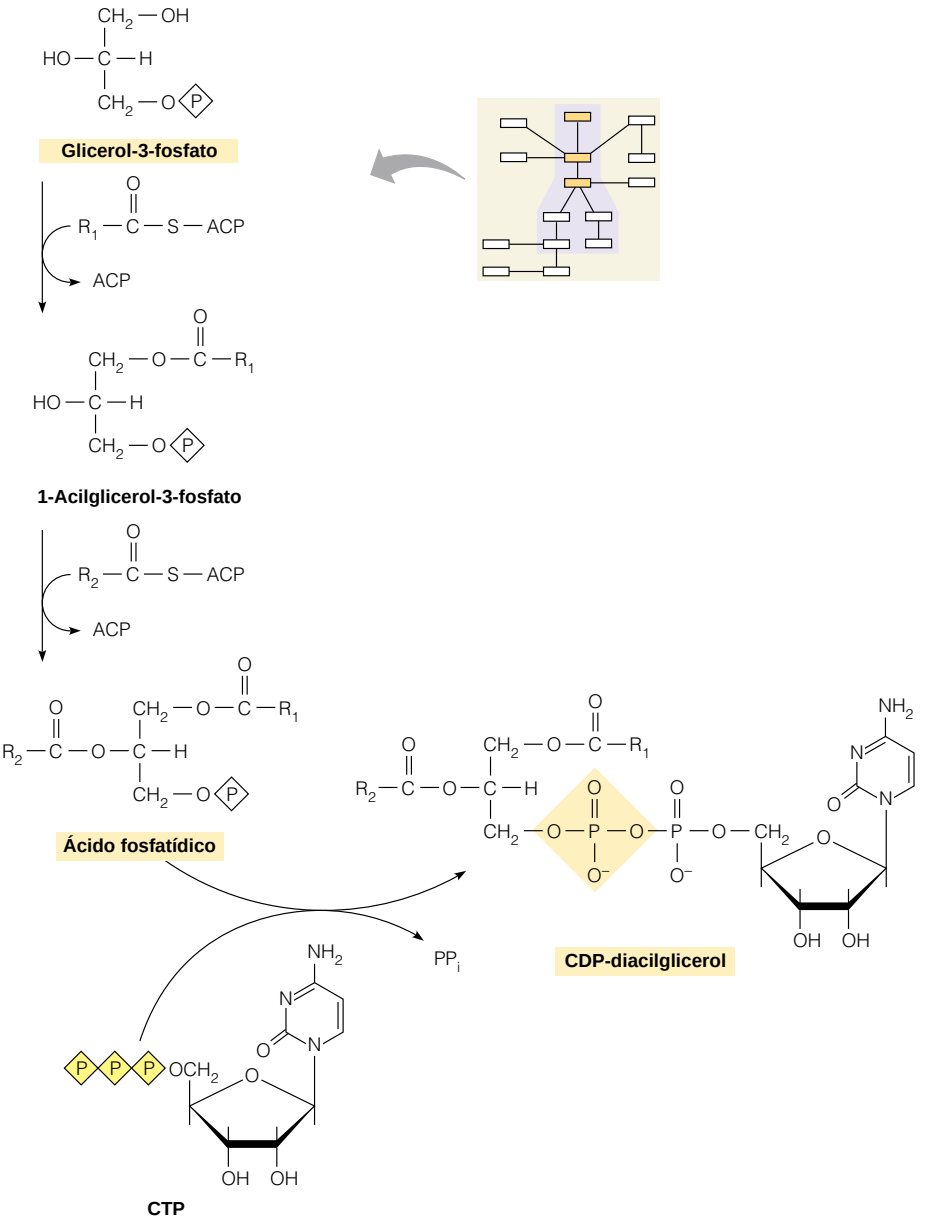
El ácido fosfatídico es un metabolito de ramificación entre la biosíntesis de los triacilgliceroles y la biosíntesis de los fosfolípidos.

En el Capítulo 18 hemos descrito la síntesis del ácido fosfatídico (diacilglicerol-3-fosfato), partiendo del L-*sn*-glicerol-3-fosfato (véase el pie de la Figura 19.3). Como se ha indicado allí, y como se muestra en la Figura 19.2, el ácido fosfatídico constituye un punto de ramificación entre la síntesis de los triacilgliceroles y la de los fosfolípidos. El cofactor energético para la biosíntesis de los fosfolípidos es la citidina trifosfato (CTP), cuyo papel es similar al de la UTP en la síntesis de polisacáridos.

Recuérdese que el ácido fosfatídico se sintetiza mediante dos acilaciones sucesivas del glicerol-3-fosfato. En las bacterias, los grupos acilo se transportan por la proteína transportadora del acilo (Figura 19.3). Intervienen en el proceso dos enzimas aciltransferasa diferentes, como ponen de manifiesto en parte sus diferencias de especificidad por los acil ACP: aproximadamente el 90% de los grupos acilo esterificados en la posición 1 están saturados, mientras que el 90% de los de la posición 2 están insaturados. El ácido fosfatídico a continuación se activa metabólicamente mediante la reacción con CTP. Esta reacción produce **CDP-diacilglicerol**, que contiene un enlace anhídrido que une los fosfatos de los

FIGURA **19.3**

Síntesis del ácido fosfatídico y del CDP-diacilglicerol en las bacterias. En la síntesis del ácido fosfatídico intervienen dos aciltransferasas distintas. Aunque el glicerol es una molécula simétrica, la mayor parte de los metabolitos que contienen glicerol poseen sustituyentes diferentes en cada hidroxilo, lo que hace que el C-2 sea asimétrico. En la configuración que se presenta, el glicerol se denomina "*sn*-glicerol" (numeración estereoespecífica), con el C-1 arriba y el C-3 abajo (véase también la Figura 10.6). La reacción del CTP con el ácido fosfatídico se presenta a la derecha por la hidrólisis enzimática del pirofosfato.



La activación metabólica de los precursores de los fosfolípidos se realiza mediante una reacción con CTP.

ácidos citidílico y fosfatídico. Desde el punto de vista del mecanismo, esta reacción recuerda a la activación de la glucosa-1-fosfato por el UTP para producir UDP-glucosa (Capítulo 16).

El CDP-diacilglicerol está ya activado para la síntesis de los grupos de cabeza polares. En una secuencia de reacción (Figura 19.4, lado izquierdo), el CMP se intercambia por serina, dando **fosfatidilserina,** que sufre inmediatamente una descarboxilación a fosfatidiletanolamina. Consecuentemente, la fosfatidilserina no se acumula en las bacterias. La otra ruta (Figura 19.4, lado derecho) transfiere el glicerol-3-fosfato al ácido fosfatídico, seguido de una reacción fosfatasa para producir fosfatidilglicerol. La reacción con otro mol de fosfatidilglicerol da **difosfatidilglicerol** o **cardiolipina.** La cardiolipina, que es especialmente abundante en las membranas de las espiroquetas, es el principal componente antigénico médico en la prueba de Wassermann, que se utilizaba antiguamente para el diagnóstico de la sífilis. En *E. coli* el fosfatidilglicerol y la cardiolipina desempeñan funciones específicas en la activación del producto

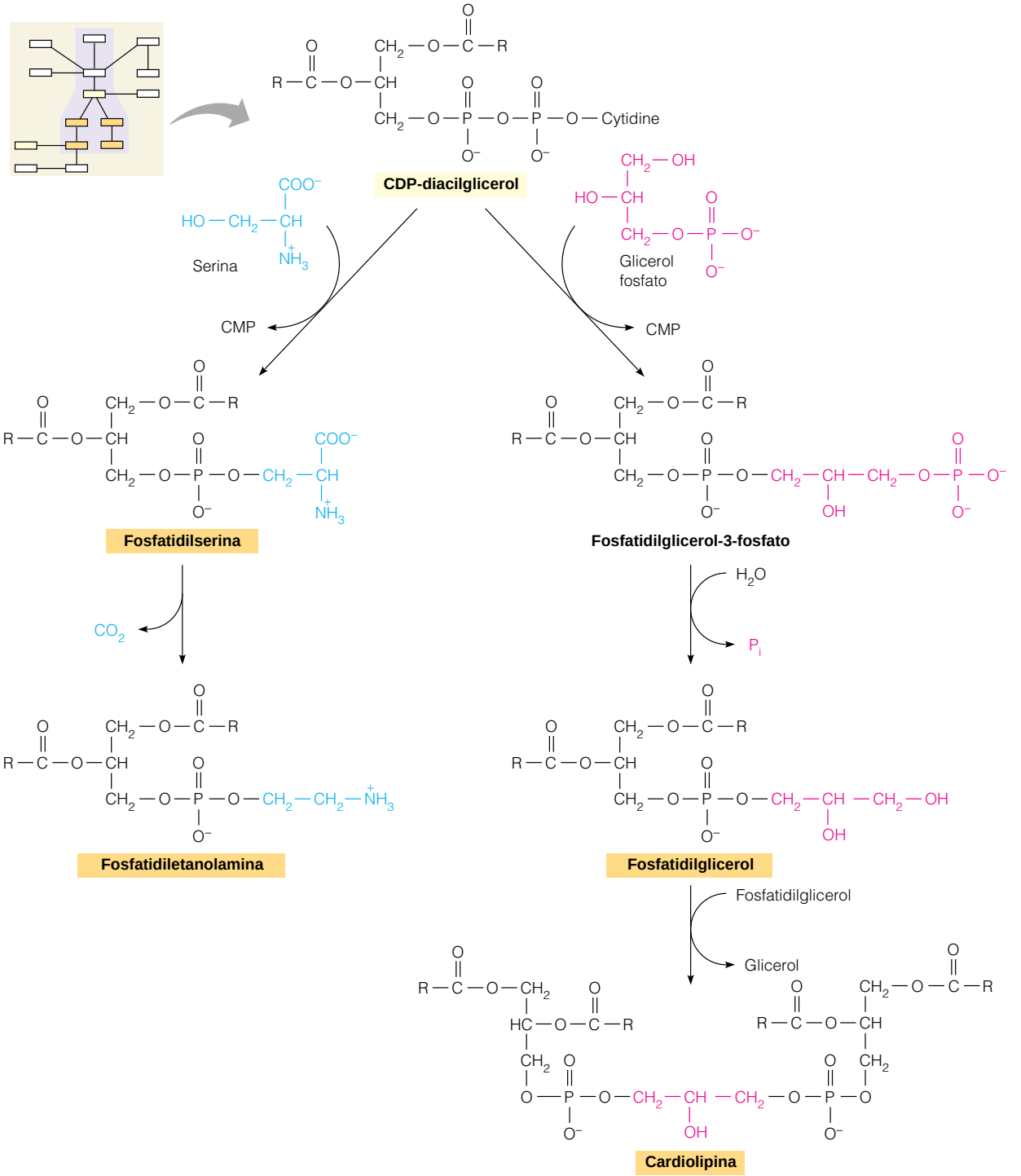


FIGURA **19.4**

Síntesis de los grupos de cabeza polares de los fosfolípidos bacterianos.

proteico del gen *dnaA* que participa en la iniciación de la replicación del DNA en un lugar de la membrana (página 1024, Capítulo 24).

En la Figura 19.2 no se muestra el hecho de que la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilglicerol se recambian ambos con relativa rapidez mediante la transferencia de los fragmentos etanolamina fosfato y glicerofosfato, respectivamente, a las proteínas y los oligosacáridos de la membrana. En ambos casos, el otro producto del recambio es el diacilglicerol, que puede posteriormente convertirse en ácido fosfatídico.

Control de la síntesis de fosfolípidos en los procariotas

El análisis genético del metabolismo de los fosfolípidos en *E. coli* está muy avanzado, en el sentido de que se han identificado y se han cartografiado los genes estructurales correspondientes a la mayoría de las enzimas que intervienen en el proceso, se han analizado detalladamente los fenotipos mutantes y se han clonado y secuenciado todos los genes. Sin embargo, todavía es bastante poco lo que conocemos acerca de la forma en que se regula la síntesis de fosfolípidos. Las pruebas de que actualmente se dispone sugieren que la velocidad de la síntesis de los fosfolípidos se controla principalmente a nivel de la síntesis de los ácidos grasos. Esto lo sugiere en parte el hecho de que las células que producen un exceso de las enzimas de biosíntesis de los fosfolípidos no presentan una sobreproducción de fosfolípidos, lo cual sugiere que el control está situado en un paso anterior. Dado que en las bacterias los ácidos grasos se utilizan fundamentalmente para la síntesis de la membrana, y no como sustratos energéticos, desde el punto de vista metabólico tiene sentido limitar la síntesis de los fosfolípidos en los primeros pasos dirigidos específicamente a la formación de la membrana.

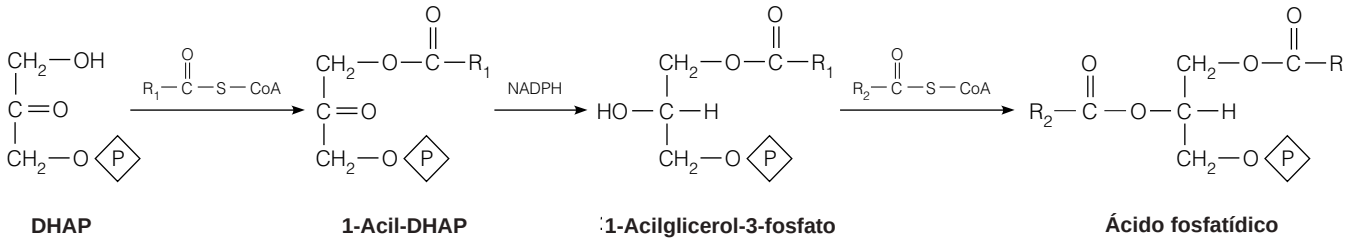
METABOLISMO DE LOS GLICEROFOSFOLÍPIDOS EN LOS EUCARIOTAS

La mayor parte de las células eucariotas contienen seis clases de glicerofosfolípidos: los mismos fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL) que se encuentran en las bacterias, más la fosfatidilserina (PS), la fosfatidilcolina (PC) y el fosfatidilinositol (PI). Como se esquematiza en la Figura 19.2, el ácido fosfatídico constituye el precursor principal de los seis compuestos, y las rutas hacia PE, PS, PG y CL son prácticamente idénticas a las que ya se han presentado para las bacterias. Sin embargo, las células eucariotas poseen otras rutas adicionales que parten de la base libre, colina y etanolamina, respectivamente, para producir PC y PE. Estas rutas se bosquejan también en la Figura 19.2 y se comentarán en un apartado posterior.

Síntesis del ácido fosfatídico

En los eucariotas, el ácido fosfatídico tiene tres orígenes diferentes: glicerol-3-fosfato, dihidroxiacetona fosfato y diacilglicerol.

Las células eucariotas presentan tres rutas de biosíntesis del ácido fosfatídico. La ruta principal, que se inicia con el glicerol-3-fosfato, es similar a la que se emplea en las bacterias (véase la Figura 19.3), excepto que las aciltransferasas utilizan como sustratos acil-CoA en vez de acil-ACP. Una segunda ruta se inicia con la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), que acepta una porción acilo en la posición 1 procedente de una acil-CoA, seguido de una reducción a 1-acilglicerol-3-fosfato y una segunda acilación.



La tercera ruta comporta simplemente la fosforilación por una quinasa específica del diacilglicerol, que procede del recambio metabólico de los fosfolípidos (véase la página 959).

Sea cual sea la ruta utilizada, el ácido fosfatídico se convierte en CDP-diacilglicerol tal como se ha descrito anteriormente para las bacterias. El CDP-diacilglicerol actúa, a su vez, como precursor de PS, PE, PG y CL. Otra serie de rutas se inician a partir de las bases libres, como se describe en el apartado siguiente.

Rutas hacia la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina

Las rutas de salvamento en la síntesis de fosfolípidos, que se inician con la colina o la etanolamina, son cuantitativamente importantes en las células eucariotas.

Los fosfolípidos más abundantes en la mayor parte de las células eucariotas son la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina. Ambas sustancias pueden sintetizarse a partir de fosfatidilserina o mediante otras rutas alternativas que empiezan con la colina o la etanolamina libres, respectivamente. Dado que la colina y la etanolamina proceden en gran parte del recambio metabólico de los fosfolípidos preexistentes, esas últimas rutas pueden considerarse como "rutas de salvamento" para la reutilización de estos productos de degradación. La importancia de reutilizar la colina radica en el hecho de que los tres grupos metilo de la colina proceden del aminoácido metionina. Como comentaremos en el Capítulo 20, la metionina es esencial desde el punto de vista nutricional para muchos animales, y ello hace que sea esencial la reutilización de los metabolitos escasos, como la colina. De hecho, la colina constituye de por sí un componente esencial de las alimentaciones de la mayoría de los animales.

La ruta de utilización de la colina preformada, que predomina en la mayor parte de las células animales, se resume en la Figura 19.5. La colina se fosforila

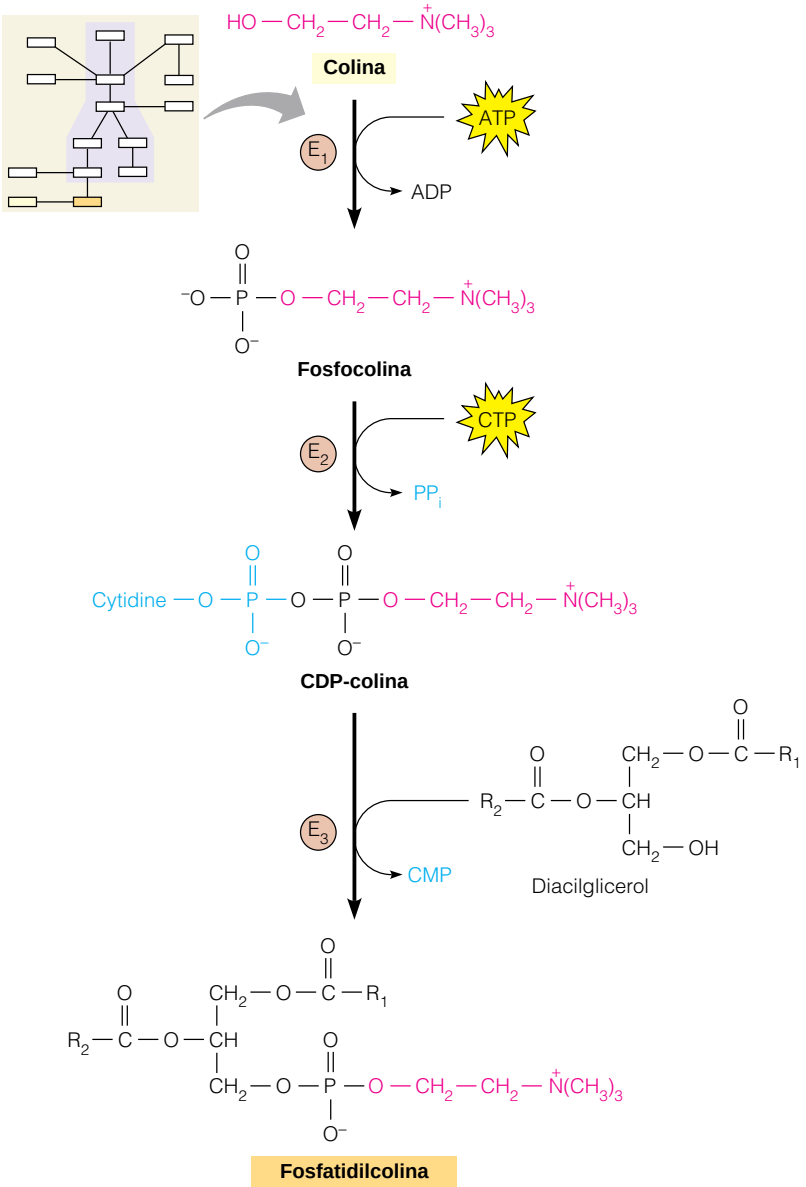


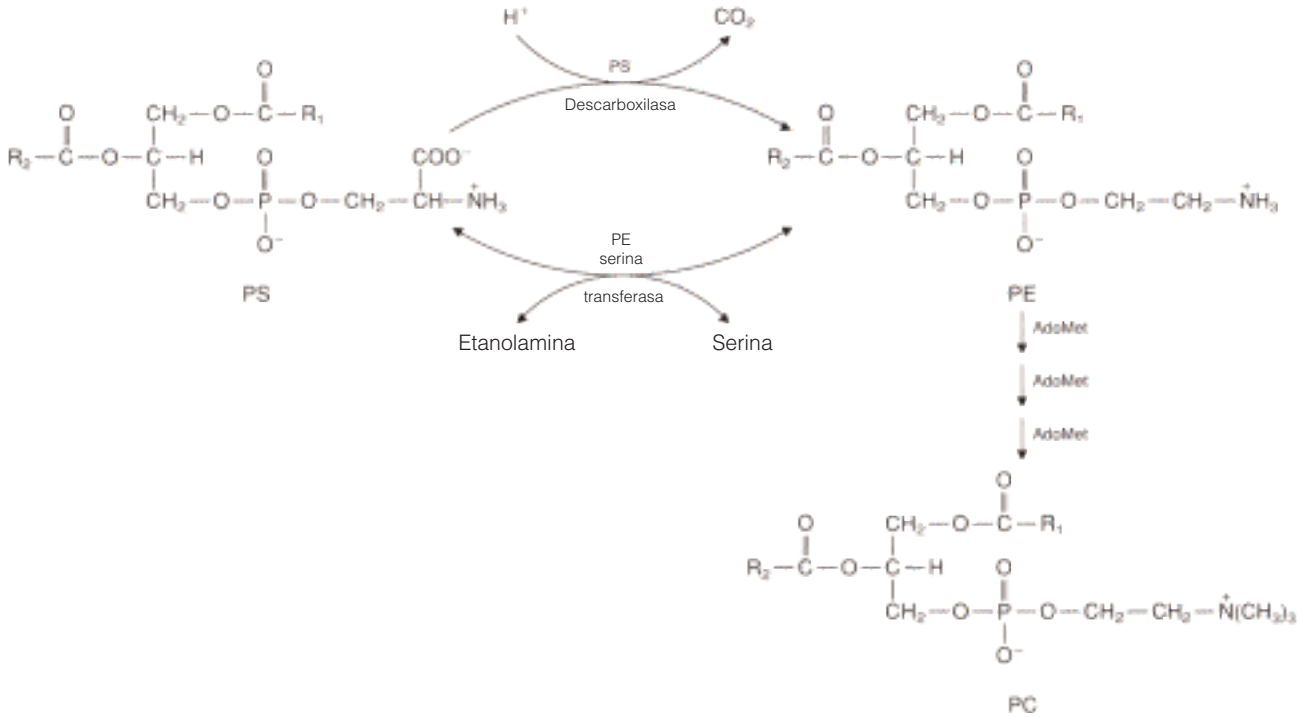
FIGURA **19.5**

Síntesis de la fosfatidilcolina a partir de la colina. Esta ruta para la reutilización de la colina en la síntesis de fosfatidilcolina se produce en las células animales. La misma serie de reacciones convierte la etanolamina en fosfatidiletanolamina, pero las enzimas de la segunda y la tercera reacción son diferentes. E_1 = colina quinasa; E_2 = CTP:fosfocolina citidililtransferasa; E_3 = CDP-colina:1,2-diacilglicerol colina fosfotransferasa.

y la **fosfocolina** resultante reacciona con CTP, de forma similar a la descrita en el metabolismo del diacilglicerol bacteriano, para dar **CDP-colina**. La porción fosfocolina de este intermediario se transfiere al diacilglicerol, dando fosfatidilcolina. La primera enzima de la ruta, la **colina quinasa** (E_1 en la figura) es citosólica, mientras que la segunda enzima, la **CTP:fosfocolina citidililtransferasa** (E_2) se encuentra tanto en la fracción citosólica como en la microsómica. La última enzima, la **CDP-colina:1,2-diacilglicerol colina fosfotransferasa** (E_3), está unida a la membrana en el retículo endoplásmico. Algunos datos recientes sugieren que tan sólo la forma unida a la membrana de la citidililtransferasa (E_2) es activa y que la velocidad de síntesis de la fosfatidilcolina se controla en parte por la translocación de esta enzima entre las formas citosólica y membranosa. Al parecer, la translocación se controla, a su vez, por la fosforilación y desfosforilación reversibles de la enzima, pero no se conocen aún las señales reguladoras últimas.

La ruta de salvamento de la fosfatidiletanolamina utiliza las mismas reacciones, partiendo de la etanolamina en vez de la colina. La misma enzima realiza la fosforilación de la colina y de la etanolamina, pero las reacciones posteriores las efectúan enzimas diferentes en las dos rutas.

La ruta alternativa para PE y PC empieza con la conversión de la fosfatidilserina (PS) en PE, catalizada por una de dos enzimas diferentes. La **fosfatidilserina descarboxilasa** es una enzima mitocondrial que, como la correspondiente enzima bacteriana, descarboxila la fosfatidilserina a fosfatidiletanolamina. La otra enzima es una transferasa activada por el calcio, la **fosfatidiletanolamina serinatransferasa**, que intercambia la etanolamina libre por la porción serina de la fosfatidilserina, produciendo fosfatidiletanolamina y serina.

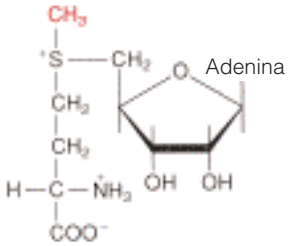


La PE serinatransferasa se encuentra en el retículo endoplásmico y en el complejo de Golgi. Puede catalizar también fácilmente esta reacción reversible en la otra dirección, para sintetizar fosfatidilserina a partir de PE.

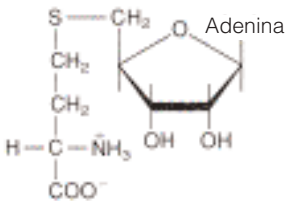
Sea cual sea su mecanismo de formación, la fosfatidiletanolamina sufre tres metilaciones sucesivas, catalizadas probablemente todas ellas por la misma en-

zima, para dar fosfatidilcolina. En los animales, esta ruta tiene lugar fundamentalmente en el hígado. El donador del grupo metilo de estas reacciones es un derivado activado de la metionina, la ***S*-adenosilmetionina** (AdoMet). El producto de la transferencia del grupo metilo es la ***S*-adenosilhomocisteína** (AdoHcy).

La *S*-adenosilmetionina es el donador de grupos metilo en la síntesis de la fosfatidilcolina y otros numerosos metabolitos metilados.

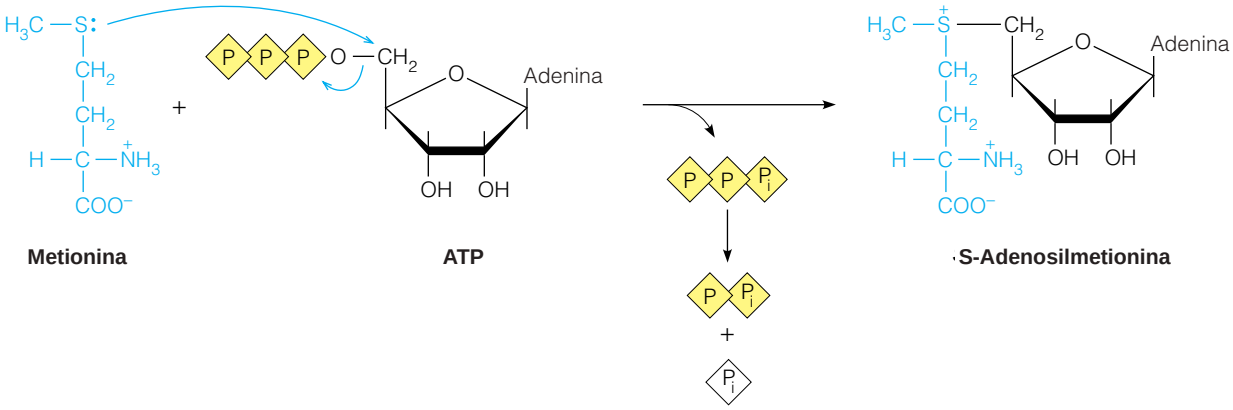


S-Adenosilmetionina (AdoMet)



S-Adenosilhomocisteína (AdoHcy)

La *S*-adenosilmetionina participa en numerosas reacciones de transferencia de grupos metilo en el metabolismo de lípidos, proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos. La AdoMet se forma a partir de metionina y ATP en una reacción poco habitual, en la que el ATP se fragmenta para dar trifosfato inorgánico (PPP_i) y un grupo adenosilo ligado directamente a través de C-5′ con el azufre de la metionina. Esto crea un **ion sulfonio** inestable, que tiene una elevada tendencia termodinámica a transferir su grupo metilo y a perder su carga. El trifosfato se hidroliza por la enzima a pirofosfato (PP_i) y ortofosfato (P_i).



Metionina **ATP** **S-Adenosilmetionina**

Redistribución de los ácidos grasos de los fosfolípidos: agente tensioactivo pulmonar y fosfolipasas

Una vez descrita la biosíntesis de los grupos de cabeza polares, pasemos ahora a los ácidos grasos componentes de los fosfolípidos, tras lo cual volveremos a un grupo de cabeza polar de mayor importancia, el inositol de los fosfoinosítidos. Diversos experimentos de marcaje isotópico ponen de relieve que los fosfolípidos, incluso después de su inserción en las membranas, no son metabólicamente inertes. En concreto, las cadenas de ácidos grasos pueden modificarse en respuesta a diversas condiciones o necesidades ambientales. ¿Comporta esta respuesta una modificación de las cadenas de los ácidos grasos residentes o una sustitución por ácidos grasos nuevos? Para responder a esta cuestión, los investigadores han explorado la biosíntesis del componente fosfolipídico del **agente tensioactivo pulmonar**, una sustancia que contiene lípidos y proteínas que segrega el pulmón y que, gracias al mantenimiento de una tensión superficial elevada, evita que los alvéolos se colapsen al expulsar el aire. El agente tensioactivo pulmonar contiene entre un 50% y un 60% de **dipalmitoilfosfatidilcoli-**

La fosfatidilcolina, que contiene dos grupos palmitoilo, desempeña un cometido indispensable en la prevención del colapso de los pulmones tras la exhalación.

na, una forma de fosfatidilcolina en la que las cadenas palmitoilo ocupan las posiciones 1 y 2. Los recién nacidos que presentan el **síndrome disneico neonatal** tienen defectos del metabolismo del agente tensioactivo pulmonar, a causa del déficit aún no identificado de la síntesis o de la secreción de esta sustancia. La síntesis de este fosfolípido en el tejido pulmonar se activa mucho después del nacimiento, como resultado de la translocación de la CTP:fosfocolina citidililtransferasa (E_2 en la Figura 19.5) del citosol al retículo endoplásmico (RE) y su consiguiente activación. Esta translocación la controla la fosforilación de la citidililtransferasa dependiente del AMP cíclico. La forma desfosforilada de la enzima está unida preferentemente a la membrana y es activa en el RE, mientras que la fosforilación produce la disociación de la membrana. Estas observaciones apuntan hacia la citidililtransferasa como punto de control importante en la síntesis de los fosfolípidos en los eucariotas. Debido a que este sistema se activa tras el nacimiento, los niños prematuros se tratan con frecuencia con un agente tensioactivo.

Dado que los fosfolípidos suelen sintetizarse con una cadena insaturada en la posición 2, podemos plantearnos cómo aparece la cadena saturada en esta posición del agente tensioactivo. Aunque la cuestión no se ha resuelto aún, los datos actualmente existentes descartan la posibilidad de que una cadena de ácido graso insaturada que se encuentre en la posición 2 se modifique *in situ* a una cadena palmitoilo. Quedan dos posibilidades, que son: (1) la transferencia de cadenas palmitoilo desde un donador acilo como la palmitoil-CoA a la glicerofosforilcolina, y (2) la fragmentación hidrolítica de las cadenas acilo de la fosfatidilcolina, seguida de una transferencia de cadenas palmitoilo procedentes de un donante adecuado de grupos acilo.

Los estudios de la biosíntesis del agente tensioactivo pulmonar aclaran los mecanismos mediante los cuales se reajustan las cadenas de los ácidos grasos de los fosfolípidos para satisfacer las necesidades del organismo.

Sea cual sea la ruta real para la síntesis del agente tensioactivo pulmonar, parece que las moléculas de fosfolípido en general pueden reajustarse mediante la rotura y la sustitución de cadenas acilo en los carbonos 1 y 2. La ruptura hidrolítica puede producirse mediante la acción de la **fosfolipasa A_2,** y la reacilación se produciría muy probablemente a partir de una acil-CoA. El remodelado de los fosfolípidos mediante este mecanismo tiene lugar en los fosfolípidos de la membrana, al igual que en los compuestos lipídicos especializados como el agente tensioactivo.

Las fosfolipasas participan en la transducción de señal y en la reparación de la membrana.

La fosfolipasa A_2 es una de las cuatro clases de enzimas que hidrolizan enlaces específicos de los fosfolípidos; las otras son las fosfolipasas A_1, C y D (Figura 19.6). Las fosfolipasas han sido reactivos útiles en los estudios de las estructuras lipídicas y de la membrana. Los estudios estructurales sobre la fosfolipasa A_2 han tenido un interés especial, debido en parte a que la enzima es activa en la interfase membrana-agua y actúa como una sonda de la estructura de la membrana, y en parte debido a que las acciones de la fosfolipasa conducen a las prostaglandinas (página 785) y a segundos mensajeros (véase el Capítulo 23). La fosfolipasa A_2 presenta un grado de conservación notable de la estructura tridimensional a lo largo de la evolución, como se muestra en la Figura 19.7. Una forma de la enzima que se muestra en la figura procede del veneno de la cobra, que es capaz de causar hemólisis o ruptura de los hematíes. La liberación de una cadena de ácido graso de la fosfatidilcolina produce 1-acilglicerofosforilcolina, a la que se denomina con mayor frecuencia **lisolecitina** (la fosfatidilcolina también se denomina con frecuencia lecitina). La lisolecitina recibe ese nombre por el hecho de que, como excelente detergente que es, solubiliza las membranas y, por tanto, causa la lisis de las células; los eritrocitos son especialmente sensibles a esta acción.

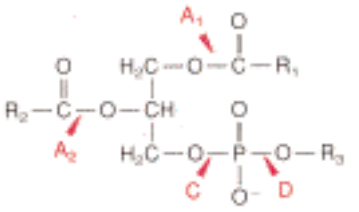


FIGURA **19.6**
Especificidades de las fosfolipasas A_1, A_2, C y D.

Otra función propuesta para la fosfolipasa A_2 es la reparación de los fosfolípidos de la membrana dañados. Como se explicó en el Capítulo 15, los ácidos

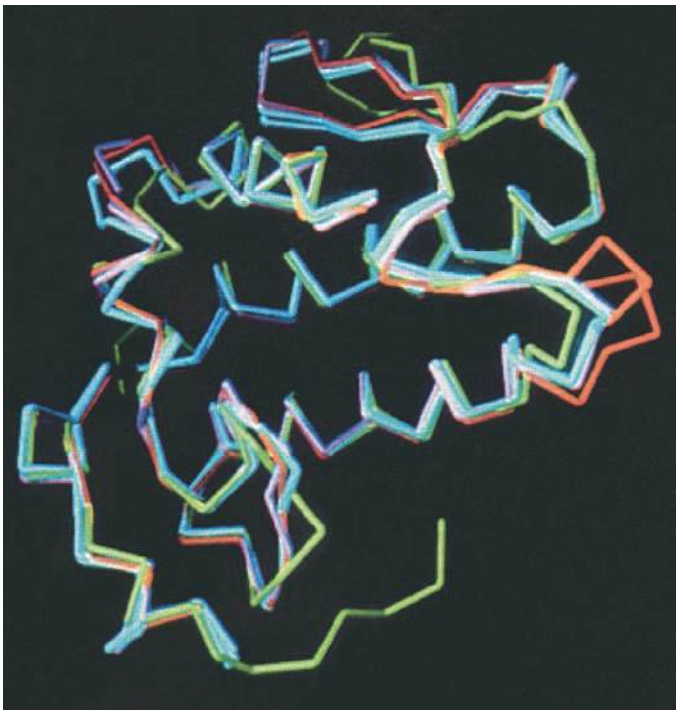


FIGURA **19.7**

Estructura de la fosfolipasa A_2, una enzima que metaboliza los fosfolípidos de la membrana. El catabolismo de los fosfolípidos en las interfases membrana-agua es importante en la modificación de la estructura de la membrana y también como fuente de segundos mensajeros y otros reguladores. Las estructuras cristalinas de la fosfolipasa A_2 de orígenes tan diversos como la cobra india (azul claro), la serpiente de cascabel (verde), el páncreas bovino (rojo) y el páncreas porcino (morado) muestran una superposición completa de los esqueletos de su cadena α. Para esta comparación se eliminó un bucle de la estructura de la enzima porcina.

Cortesía de E. A. Dennis, *J. Biol. Chem.* (1994) 269:13057-13061. Reproducido con permiso de The American Society for Biochemistry & Molecular Biology.

grasos son susceptibles al ataque no enzimático del oxígeno o de las especies reactivas del oxígeno, como el superóxido para dar hidroperóxidos de ácidos grasos. Cuando un fosfolípido de la membrana sufre la peroxidación de la cadena de un ácido graso, la estructura de la membrana se distorsiona y puede afectarse su función. Los datos actualmente existentes sugieren que la fosfolipasa A_2 puede eliminar estos ácidos grasos anormales de los fosfolípidos que todavía se encuentran en la doble capa lipídica, lo cual conduce a la sustitución de las cadenas acilo dañadas por ácidos grasos normales.

El "lisolípido" más simple de este tipo es el **ácido lisofosfatídico,** formado por la acción de la fosfolipasa A_2 sobre el ácido fosfatídico, que libera un ácido graso de la posición 2. Recientemente se ha identificado al ácido lisofosfatídico como un agente biológico de señalización. Su liberación por las células activadas, como las plaquetas, estimula la proliferación de otros tipos celulares a través de la interacción con receptores específicos, evidentemente como parte del proceso de cicatrización.

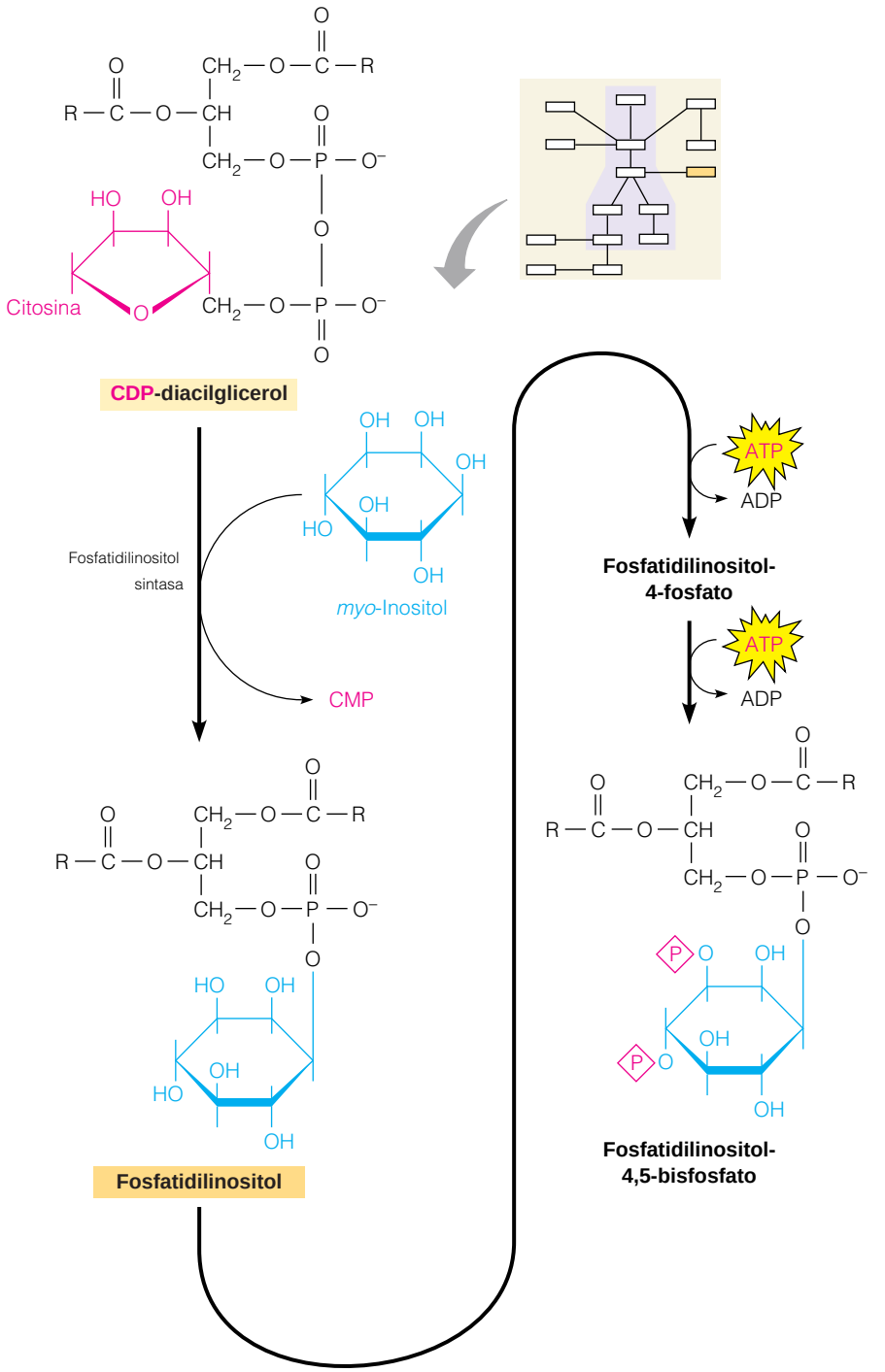
Biosíntesis de otros glicerofosfolípidos acilados

Las restantes rutas principales que se indican en la Figura 19.2 corresponden a la síntesis de fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, cardiolipina y fosfatidilinositol. En las levaduras, predomina la ruta del CDP-diacilglicerol para la producción de fosfatidilserina. En los animales, la fosfatidilserina se sintetiza fundamentalmente mediante el intercambio, activado por el calcio, entre la fosfatidiletanolamina y la serina. Sin embargo, el origen último de la etanolamina para este proceso no se conoce aún. En los animales, la síntesis de fosfatidilglicerol, que está limitada en gran parte a las mitocondrias, es idéntica a la ruta utilizada en las bacterias. Sin embargo, su conversión en cardiolipina se basa en el CDP-diacilglicerol, en vez de en un segundo mol de fosfatidilglicerol, como segundo sustrato.

En la biosíntesis del fosfatidilinositol, catalizada por la **fosfatidilinositol sintasa,** interviene el CDP-diacilglicerol y el L-*mio*-inositol (Figura 19.8). Este último es uno de los nueve estereoisómeros posibles del hexahidroxiciclohexano

FIGURA **19.8**

Biosíntesis de los fosfoinosítidos.



y se sintetiza a partir de la D-glucosa-6-fosfato. El fosfatidilinositol sufre dos fosforilaciones sucesivas para dar fosfatidilinositol-4-fosfato y fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, que se encuentran ambos en cantidades pequeñas pero apreciables. Estos tres lípidos, a los que se denomina colectivamente **fosfoinosítidos,** están enriquecidos en ácido araquidónico en la posición 2. Este enriquecimiento se produce evidentemente a través del proceso de desacilación-reacilación que hemos comentado antes (véase la página 757).

Se sabe desde hace tiempo, gracias a los estudios de marcaje con ^{32}P, que los fosfoinosítidos se encuentran en un estado de flujo metabólico activo. Se sinte-

tizan y degradan rápidamente, en especial en el tejido nervioso y, sobre todo, en respuesta a la unión de neurotransmisores. Los fosfoinosítidos desempeñan papeles importantes como precursores de segundos mensajeros en la **señalización transmembrana,** la transmisión de una señal extracelular a algún elemento del aparato metabólico intracelular. Nuestro conocimiento actual de estos fenómenos se presentará en el Capítulo 23.

El fosfatidilinositol y sus derivados fosforilados desempeñan funciones importantes como precursores de segundos mensajeros.

Modificación proteica posterior a la traducción mediante lípidos

Recientemente se ha descubierto otra función metabólica del fosfatidilinositol, mediante los estudios realizados sobre formas variantes de una glucoproteína de la superficie celular del parásito protozoo *Trypanosoma brucei* que causa la enfermedad del sueño africana. El organismo escapa a la detección inmunológica mediante un cambio rápido de la estructura de esta glucoproteína de superficie. La glucoproteína está ligada, a través de su grupo carboxilo terminal, a una forma glucosilada del fosfatidilinositol. Esta ligazón le confiere un anclaje, unión de la proteína a la membrana, y un lugar de ruptura, cuando el organismo sustituye una glucoproteína de su superficie por otra. En la Figura 19.9 se muestra un modelo de cómo podrían producirse estos hechos. Existen datos que indican que este mecanismo lo utilizan otras células eucariotas para controlar las concentraciones de determinadas proteínas unidas a la superficie celular. Los glucolípidos que contienen glucosamina, como la proteína del tripanosoma, se han descrito en otras membranas celulares eucariotas.

La modificación del glucosilfosfatidilinositol no es más que una de las tres modificaciones lipídicas de las proteínas descritas recientemente. Dos de las otras (en las que no intervienen los fosfoinosítidos) son la *acilación* y la *prenilación*. La acilación comporta la transferencia de grupos acilo saturados únicos, principalmente miristato (C_{14}) ligado como una amida a la glicina N-terminal, y palmitato (C_{16}) ligado como un tioéster a la cisteína. Un gran número de proteínas víricas, proteínas de la membrana y proteínas que intervienen en la transducción de señal están aciladas. La prenilación comporta la transferencia de grupos C_{15} o C_{20} desde intermediarios de la síntesis de colesterol (véase la página 771) a residuos de cisteína a cuatro posiciones del C-terminal. Las modifica-

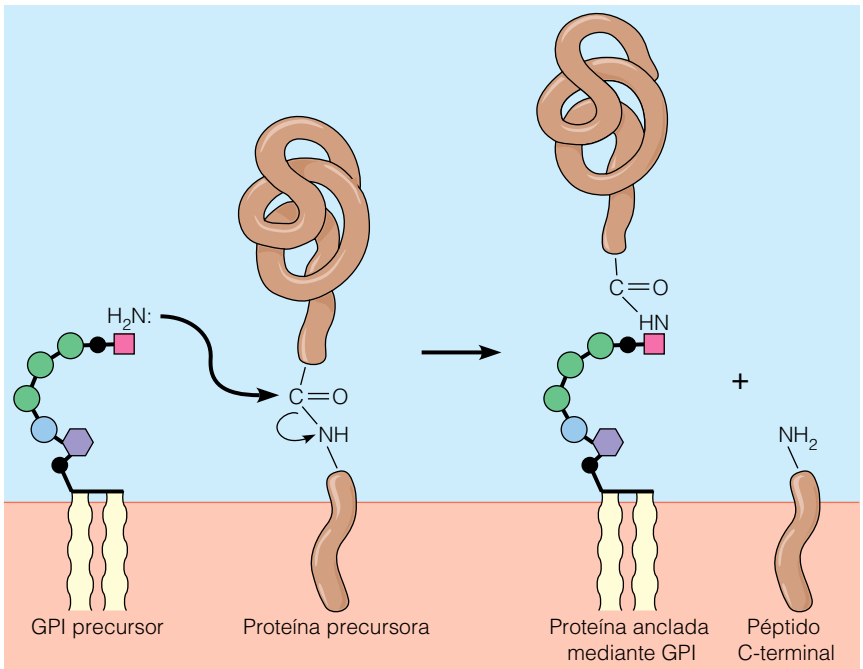


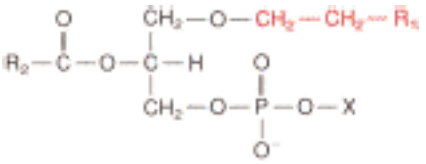
FIGURA **19.9**

Anclaje de las proteínas en las membranas mediante un glucolípido que contiene fosfatidilinositol. La unión de este tipo permite un rápido intercambio de glucoproteínas unidas. En el protozoo *Trypanosoma brucei*, el glucolípido de membrana (glucosilfosfatidilinositol o GPI) contiene inositol (púrpura), glucosamina (azul), manosa (verde), fosfato (negro) y etanolamina (rosa). La etanolamina está unida a través de su grupo amino al residuo C-terminal de la proteína.

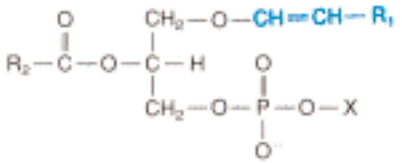
Cortesía de T. L. Doering, W. J. Masterson, G. W. Hart y P. T. Englund, *J. Biol. Chem.* (1990) 265:611-614, reproducido con permiso de The American Society for Biochemistry & Molecular Biology.

ciones subsiguientes eliminan los tres residuos C-terminales y la metilación del carboxilo terminal. Esto da lugar a un residuo de cisteína C-terminal prenilado y metilado, que es muy hidrófobo. La proteína del oncogén *ras* (véase la página 970) es la más destacada de la familia de proteínas preniladas. Recientemente, se ha admitido que la enzima **farnesiltransferasa,** que transfiere una unidad C_{15} desde el **farnesil pirofosfato** a una proteína sustrato (Figura 19.10), es una diana atractiva para la inhibición en la quimioterapia del cáncer. Los inhibidores de esta enzima interfieren con el crecimiento de las células cancerosas en cultivo. Aunque no se conoce el mecanismo preciso de inhibición del crecimiento, se trata de un área prometedora de la farmacología molecular.

En la mayor parte de los casos, la acilación y la prenilación proporcionan anclajes a la membrana, como la modificación GPI. Sin embargo, algunas proteínas citosólicas contienen modificaciones lipídicas, y allí los lípidos pueden estabilizar las interacciones proteína-proteína. Recientemente, se ha visto que la familia de proteínas "erizo", que regulan la diferenciación, están esterificadas con colesterol cerca del C-terminal, una nueva modificación lipídica.



Fosfolípido con un éter alquilo en posición *sn*-1



Fosfolípido con un éter alquenilo en posición *sn*-1

Fosfolípidos éteres

Los lípidos éteres son lípidos que contienen un grupo alquilo, en vez de un grupo acilo, ligado a uno de los átomos de oxígeno del glicerol. Los fosfolípidos alquilo y alquenilo están muy extendidos, aunque su abundancia en los tejidos varía grandemente. Así, por ejemplo, los **plasmalógenos** o **éteres de vinilo,** son fosfolípidos que contienen un éter alquenilo en la posición *sn*-1 del glicerol. Estos compuestos constituyen alrededor del 50% del total de fosfolípidos de colina que se encuentran en el tejido cardíaco, pero son prácticamente indetectables en otros muchos tejidos. Por el momento se sabe poco de la trascendencia funcional de esta clase de lípidos. Sin embargo, un déficit genético de la síntesis de plasmalógeno tiene consecuencias graves. La biosíntesis de los lípidos éteres tiene lugar en los peroxisomas, orgánulos que también llevan a cabo una ruta de β-oxidación (véase la página 725) y una ruta de α-oxidación (véase la página 725). En un trastorno autosómico recesivo raro denominado **síndrome de Zellweger,** hay una ausencia de peroxisomas, y la síntesis de plasmalógeno es muy deficitaria. Las personas afectadas por este trastorno sufren lesiones cerebrales, hepáticas y renales, antes de fallecer a una edad temprana.

La biosíntesis de los fosfolípidos éteres (Figura 19.11) se inicia con la 1-acildihidroxiacetona fosfato (véase la página 752). Este producto sufre el intercambio de un grupo alquilo por un grupo acilo; el alcohol graso saturado que se utiliza en esta reacción procede de la reducción, dependiente de NADPH, de la correspondiente acil-CoA. Se reduce luego el carbono 2 del nivel ceto al hidroxilo y se acila. Ello da lugar al análogo 1-alquilo del ácido fosfatídico (última estructura de la figura), que se convierte en fosfolípidos éteres saturados, o **éteres de glicerilo,** mediante las rutas que se han presentado en la Figura 19.2 para la biosíntesis de los fosfolípidos. La ruta principal conduce al éter de glicerilo de la fosfatidiletanolamina; los análogos de serina y colina proceden de un intercambio de bases y una metilación, respectivamente. La síntesis de plasmalógenos a partir de éteres de glicerilo utiliza posteriormente la desaturación del grupo alquilo de la posición *sn*-1 (Figura 19.12). El sistema enzimático microsómico que participa, al igual que el utilizado para la desaturación de la estearoil-CoA (véase la página 737 en el Capítulo 18), requiere O_2, NADH y citocromo b_5.

Un lípido éter poco habitual, denominado **factor activador de plaquetas,** tiene la estructura **1-alquil-2-acetilglicerofosfocolina.** Fisiológicamente, este compuesto es tal vez el más potente que se conoce. A concentraciones de tan sólo 1

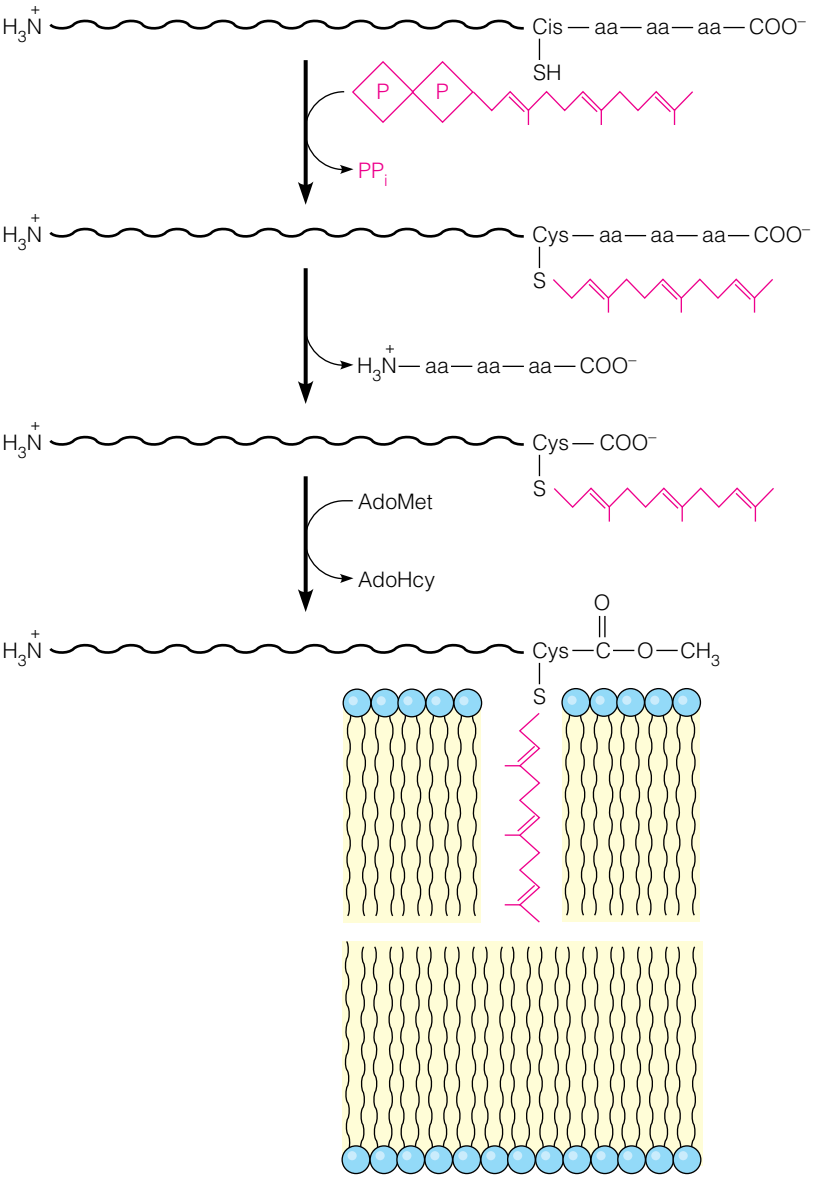


FIGURA **19.10**

Reacción de la proteína farnesiltransferasa.
aa = resto de aminoácido.

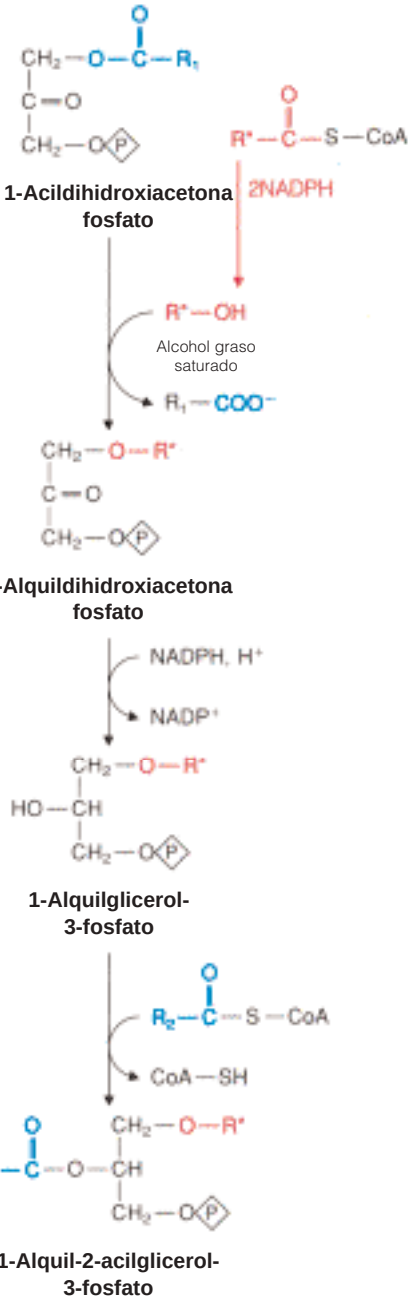
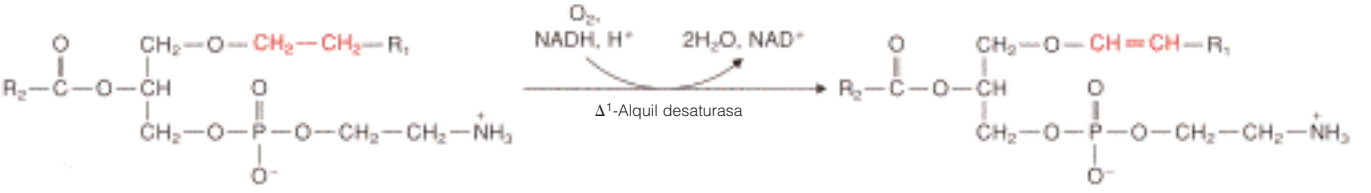


FIGURA **19.11**

Rutas de biosíntesis de los fosfolípidos éter alquilo.

FIGURA **19.12**

Síntesis de un plasmalógeno a partir de un éter de glicerilo. La desaturación de la 1-alquil-2-acilglicerofosfoetanolamina (el análogo alquílico de la fosfatidiletanolamina) produce el correspondiente éter de vinilo o plasmalógeno.

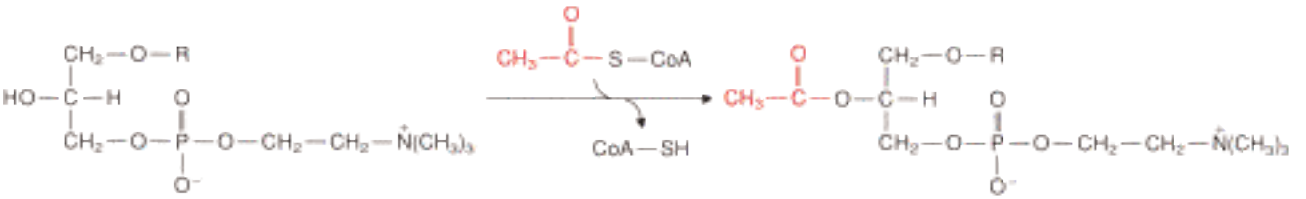


1-Alquil-2-acilglicerofosfoetanolamina

Plasmalógenos

El factor activador de plaquetas es un gliceril éter con propiedades fisiológicas potentes.

picomolar (10^{-12} M), tiene numerosos efectos, tanto en la fisiología normal como en las reacciones inflamatorias, incluyendo la estimulación de la agregación plaquetaria, la reducción de la presión sanguínea, la activación de varias clases de leucocitos, la reducción del gasto cardíaco, la estimulación de la glucogenólisis y la estimulación de la contracción uterina. Este lípido se sintetiza a través de la acetilación de la correspondiente 1-alquilglicerofosfocolina por la acetil-CoA.



1-Alquilglicerofosfocolina **1-Alquil-2-acetilglicerofosfocolina**

El descubrimiento de un fosfolípido con una actividad biológica tan notable fue un hecho sin precedentes, y ha abierto un nuevo campo fascinante de la bioquímica. El factor actúa a través de su unión a un receptor de alta afinidad de la membrana de las células susceptibles. Los receptores interaccionan con los sistemas de transducción de señal a través de las proteínas G (véase el Capítulo 23).

Los lípidos que contiene éter son bastante abundantes en las membranas de los microorganismos halófilos ("amantes de la sal"). Estas bacterias y protozoos crecen en medios de cultivo con concentraciones de NaCl de hasta 4 M. Aunque no conocemos la relación existente entre los lípidos éteres y la capacidad de crecer en un medio con abundante sal, es posible que intervenga en ello la mayor estabilidad de los éteres de alquilo frente a la hidrólisis, en comparación con los ésteres de acilo.

Transporte intracelular de los fosfolípidos de membrana

De las seis clases principales de glicerofosfolípidos de los lípidos de la membrana, el fosfatidilglicerol y la cardiolipina se encuentran fundamentalmente en las membranas mitocondriales y se sintetizan en las mitocondrias. Las cuatro clases restantes se sintetizan simultáneamente con su inserción en el lado citosólico de las membranas del retículo endoplásmico. A partir de allí, sufren una translocación hacia el lado luminal de la membrana y finalmente se transportan a otras membranas, la cubierta nuclear, las membranas mitocondriales y la membrana plasmática. La manera en que se producen estos fenómenos es uno de los temas que están motivando una investigación más activa en la biología celular contemporánea. Las tres preguntas principales son las siguientes: (1) ¿cómo pasan las moléculas de fosfolípido de un lado de una membrana al otro? (2) ¿cómo se desplazan las moléculas de fosfolípido de un lugar a otro dentro de la célula? (3) ¿de qué manera explica el transporte de fosfolípidos dirigido a orgánulos específicos las diferencias de composición de fosfolípidos que existen en las membranas dentro de una misma célula?

Las investigaciones sobre el movimiento transmembrana de los fosfolípidos (pregunta 1) utilizan sondas lipídicas específicas que permiten la detección de un lípido en un solo lado de la bicapa. Como se ha indicado en Herramientas de la Bioquímica 10A, un método de este tipo es el que utiliza el **marcaje de espín,** un análogo lipídico que es detectable por su espectro de resonancia paramagnética electrónica. Estas medidas indican que el movimiento a través de la doble capa, o "flip-flop", se produce de manera espontánea pero es muy lento. Las medidas in vivo indican un movimiento a través de la doble capa mucho

más rápido, de forma que las proteínas u otros factores pueden fomentar el "flip-flop" en las células vivas.

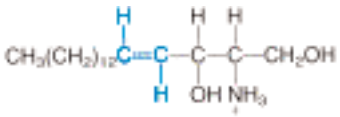
El transporte de fosfolípidos dentro de la célula (pregunta 2) se basa en gran parte en la transferencia de fragmentos de membrana del RE al complejo de Golgi, como se muestra en la Figura 19.1. Las vesículas de membrana se desprenden de manera constante del complejo de Golgi, y estas vesículas que contienen productos secretores, se fusionan con la membrana plasmática para la secreción de sus contenidos mediante **exocitosis** (transporte fuera de la célula). Parece probable que esta ruta se utilice no sólo para la secreción extracelular, sino también para el transporte de los lípidos de la membrana a la membrana plasmática. Es probable que existan procesos comparables para el transporte de los lípidos de la membrana a las mitocondrias, los cloroplastos de las plantas y los núcleos, aunque estos procesos no se conocen bien todavía.

Para explicar la variabilidad de la composición lipídica de la membrana dentro de una determinada célula (pregunta 3), podemos proponer la existencia en las membranas del Golgi de proteínas de direccionamiento específicas, es decir, proteínas que se asocian preferentemente con determinados lípidos y que tienen afinidad por determinados orgánulos. Otro mecanismo es el que se basa en la acción de **proteínas intercambiadoras de fosfolípidos,** que son proteínas citosólicas que unen un fosfolípido y pueden catalizar su intercambio por un lípido correspondiente de la membrana. El lípido unido a la proteína pasa a la membrana y el lípido de la membrana queda unido a la proteína citosólica. Este mecanismo no proporciona una transferencia neta de lípidos a una membrana, pero permite la modulación de la composición lipídica de una membrana determinada.

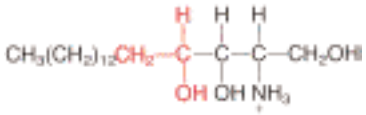
Las membranas se ensamblan mediante el movimiento de vesículas de membrana que proceden de los lugares de síntesis en el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi y van a parar a las membranas ya existentes, con las que se fusionan.

Metabolismo de los esfingolípidos

El interés por los esfingolípidos se centra, en gran parte, en su papel importante en el tejido nervioso y, en relación con ello, en numerosos defectos genéticos humanos del metabolismo de los esfingolípidos. Los esfingolípidos están también muy extendidos en las membranas de las células vegetales y en los eucariotas inferiores, como las levaduras.



Esfingosina



Fitoesfingosina

Recuérdese del Capítulo 10 que los esfingolípidos son derivados de la base *esfingosina.* Los esfingolípidos de las plantas contienen una forma ligeramente diferente de este compuesto, denominada **fitoesfingosina.** Los esfingolípidos incluyen la *ceramida* (*N*-acilesfingosina), la *esfingomielina* (*N*-acilesfingosina fosforilcolina) y una familia de esfingolípidos que contienen hidratos de carbono denominados **glucoesfingolípidos** neutros y ácidos; estas últimas sustancias incluyen los *cerebrósidos* y los *gangliósidos* (que también contienen ácido siálico). La ceramida actúa como precursor tanto de la esfingomielina como de los glucoesfingolípidos.

En los animales, la ruta de la ceramida se inicia con la síntesis de un derivado de la esfingosina, la **esfinganina,** a partir de palmitoil-CoA y serina (Figura 19.13). Tras la reducción del grupo ceto resultante, el grupo amino de la esfinganina se acila para dar una ceramida. La unidad esfinganina de este compuesto se desatura a continuación para dar una ceramida con una base esfingosina. La transferencia de una unidad fosfocolina procedente de la fosfatidilcolina da esfingomielina y diacilglicerol.

Las rutas que conducen a los glucoesfingolípidos son más numerosas, pero las estrategias metabólicas son comparables a las que hemos visto anteriormente en la síntesis de las cadenas de oligosacáridos de las glucoproteínas (véase el Capítulo 16). En estas rutas se produce una adición escalonada de unida-

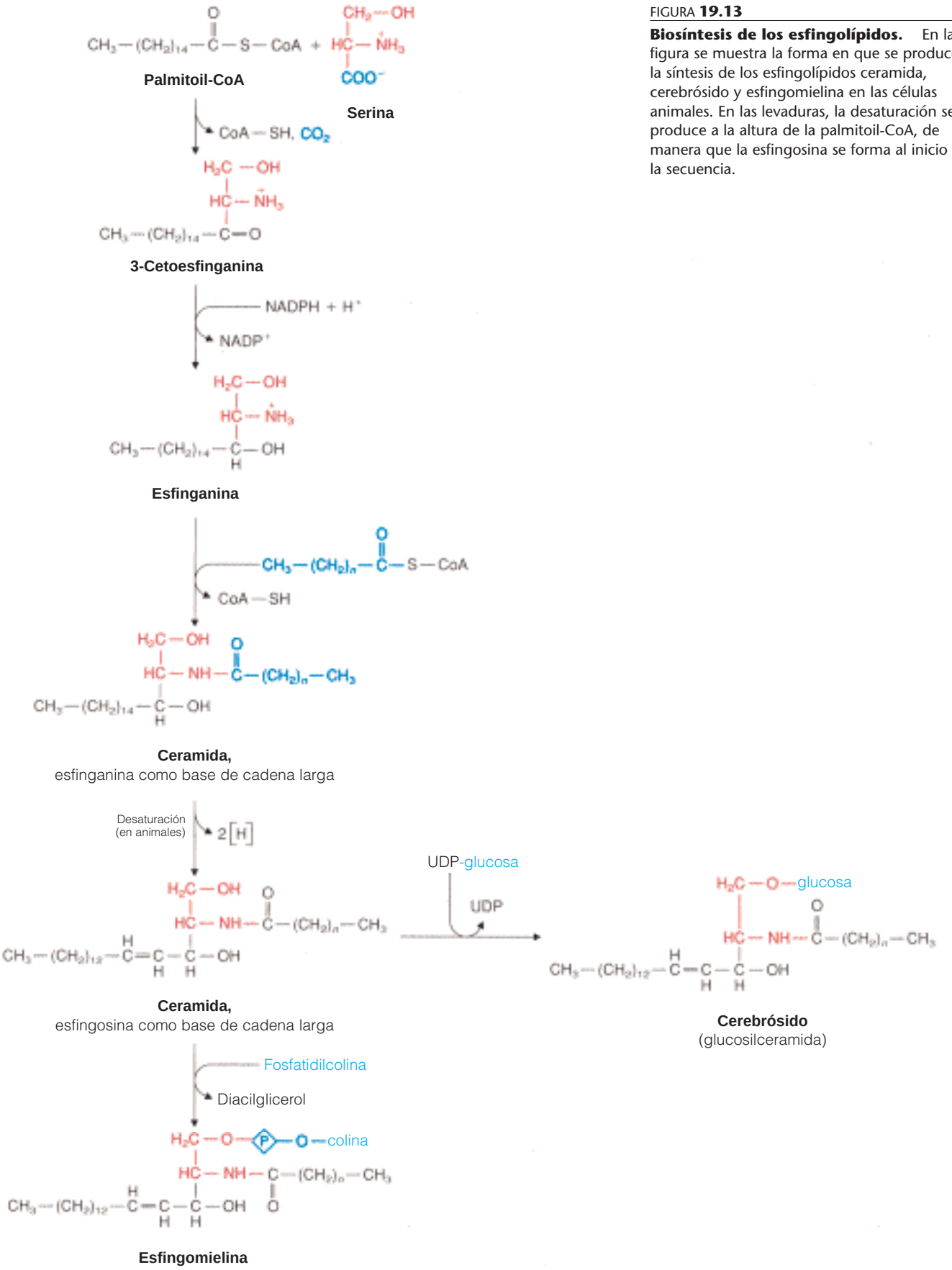


FIGURA **19.13**

Biosíntesis de los esfingolípidos. En la figura se muestra la forma en que se produce la síntesis de los esfingolípidos ceramida, cerebrósido y esfingomielina en las células animales. En las levaduras, la desaturación se produce a la altura de la palmitoil-CoA, de manera que la esfingosina se forma al inicio de la secuencia.

des de monosacárido, con el empleo de azúcares ligados a nucleótidos como sustratos biosintéticos activados, y con la ceramida como el aceptor inicial de los monosacáridos. Los azúcares nucleótidos que intervienen en la síntesis de los glucoesfingolípidos son la UDP-glucosa (UDP-Glc), la UDP-galactosa (UDP-Gal), la UDP-*N*-acetilgalactosamina (UDP-GalNac) y el CMP-ácido *N*-acetilneuramínico (CMP-Sia o CMP-ácido siálico). En la Figura 19.14 se indican las rutas que conducen a algunos de los glucoesfingolípidos más abundantes.

Los esfingolípidos y, especialmente la esfingomielina, son componentes abundantes de la *vaina de mielina*, una estructura de múltiples capas que protege y aísla a las células del sistema nervioso central (Figura 19.15; véase también la Figura 10.34). En la mielina humana, los esfingolípidos constituyen alrededor del 25% del total de lípidos. Los esfingolípidos se encuentran en un estado de recambio metabólico continuo, tanto de síntesis como de degradación. La degradación se produce en los lisosomas, por la acción de una familia de enzimas hidrolíticas. Estas rutas tienen un gran interés médico dada su relación con un grupo de enfermedades congénitas denominadas **esfingolipidosis** (también co-

Los azúcares ligados a los nucleótidos y las glucosiltransferasas intervienen en la biosíntesis de los glucoesfingolípidos.

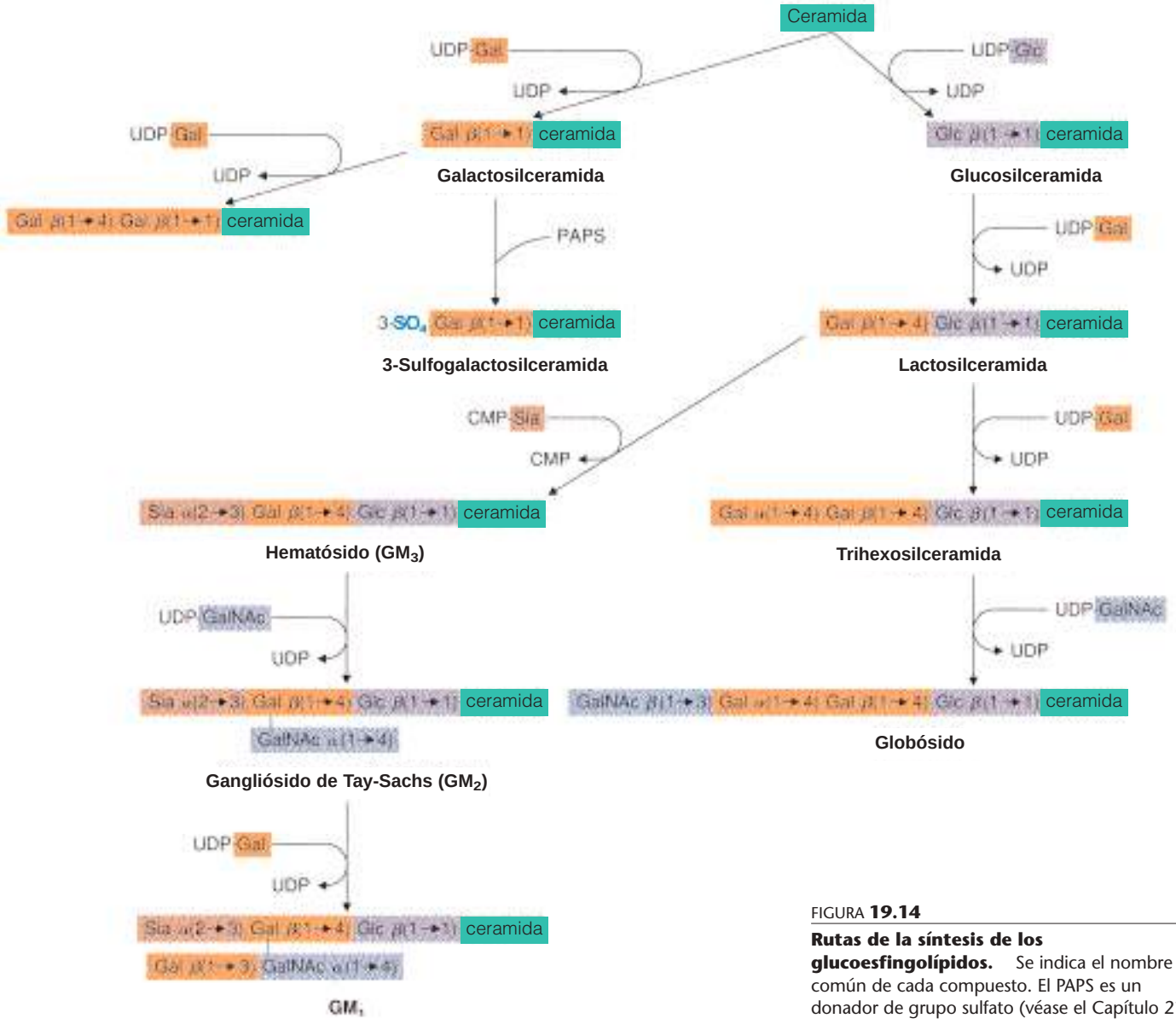


FIGURA **19.14**

Rutas de la síntesis de los glucoesfingolípidos. Se indica el nombre común de cada compuesto. El PAPS es un donador de grupo sulfato (véase el Capítulo 21).

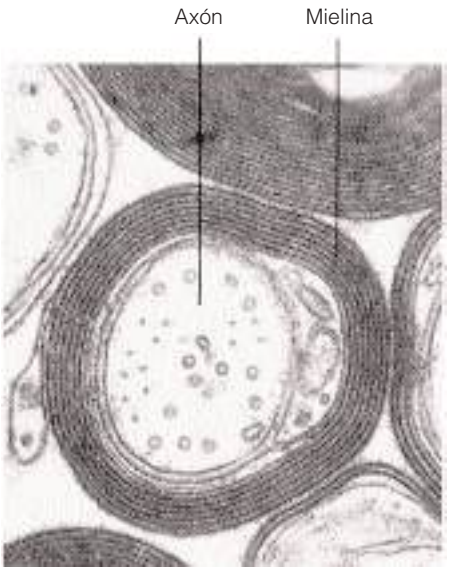


FIGURA **19.15**

Un axón mielinizado de la médula espinal. La mielina, una envoltura aislante que recubre el axón, contiene abundante esfingomielina.

Cortesía del Dr. Cedric Raine.

Los defectos genéticos del catabolismo de los glucoesfingolípidos dan lugar a intermediarios de degradación que se acumulan en el tejido nervioso, con consecuencias graves.

nocidas como **enfermedades de almacenamiento de lípidos**). Cada uno de estos trastornos se caracteriza por el déficit de una de las enzimas de degradación, con la acumulación concomitante dentro del lisosoma del sustrato de la enzima deficitaria (Tabla 19.1). De hecho, el análisis estructural de los metabolitos anormales que se acumulan ayudó a establecer las rutas degradativas, que se indican en la Figura 19.16. La mayoría de estas enfermedades son autosómicas recesivas, lo cual significa que deben estar presentes dos alelos defectuosos del gen que codifica una determinada enzima para que una persona manifieste los síntomas de la enfermedad. Debido a la gran cantidad de esfingolípidos existente en el tejido nervioso, tal vez no deba resultar extraño que la mayoría de las esfingolipidosis comporten un deterioro grave de la función del sistema nervioso central.

La mejor conocida de las esfingolipidosis es la **enfermedad de Tay-Sachs,** que fue descrita por primera vez en 1881, y en la que hay un déficit de la ***N*-acetilhexosaminidasa A** lisosómica. El déficit enzimático causa la acumulación del ganglíosido denominado GM_2, especialmente en el cerebro (véase la Figura 19.16; se muestra también en la Figura 10.8). La enfermedad es devastadora y causa la degeneración del sistema nervioso central, retraso mental, ceguera y la muerte, generalmente antes de los cuatro años de edad.

Aunque la enfermedad de Tay-Sachs es rara en la población general, el gen defectuoso es relativamente frecuente en los judíos ashkenazi (los procedentes del centro y del este de Europa). En los judíos norteamericanos, aproximadamente 1 de cada 30 es portador del gen defectuoso. Así pues, dos progenitores judíos llevan un riesgo apreciable de tener un niño con la enfermedad de Tay-Sachs. Dado que no hay ninguna forma de curación conocida de la enfermedad, se ha centrado la atención en la detección prenatal. De hecho, ésta fue una de las primeras enfermedades genéticas que se diagnosticó con éxito gracias a la amniocentesis. Dos padres heterocigotos para esta enfermedad deben recibir la información de que tienen una posibilidad del 25% de concebir un hijo con la enfermedad de Tay-Sachs.

Es poco lo que se sabe acerca de las funciones bioquímicas específicas de los esfingolípidos, pero su presencia en la superficie externa de las membranas plasmáticas de las células animales aporta algunas pistas de gran interés. Los

TABLA **19.1 Enfermedades hereditarias del catabolismo de los esfingolípidos**

Enfermedad	Enzima[a] deficitaria	Intermediario acumulado
Gangliosidosis GM_1	❶ β-Galactosidasa	Ganglíosido GM_1
Enfermedad de Tay-Sachs	❷ β-*N*-Acetilhexosaminidasa A	Ganglíosido GM_2 (Tay-Sachs)
Enfermedad de Fabry	❸ α-Galactosidasa A	Trihexosilceramida
Enfermedad de Gaucher	❹ β-Glucosidasa	Glucosilceramida
Enfermedad de Niemann-Pick	❺ Esfingomielinasa	Esfingomielina
Lipogranulomatosis de Farber	❻ Ceramidasa	Ceramida
Leucodistrofia de células globoides (enfermedad de Krabbe)	❼ β-Galactosidasa	Galactosilceramida
Leucodistrofia metacromática	❽ Arilsulfatasa A	3-Sulfogalactosil-ceramida
Enfermedad de Sandhoff	❾ *N*-Acetilhexosaminidasas A y B	Ganglíosido GM_1 y globósido

[a] Los números hacen referencia a las enzimas que se indican en la Figura 19.16.

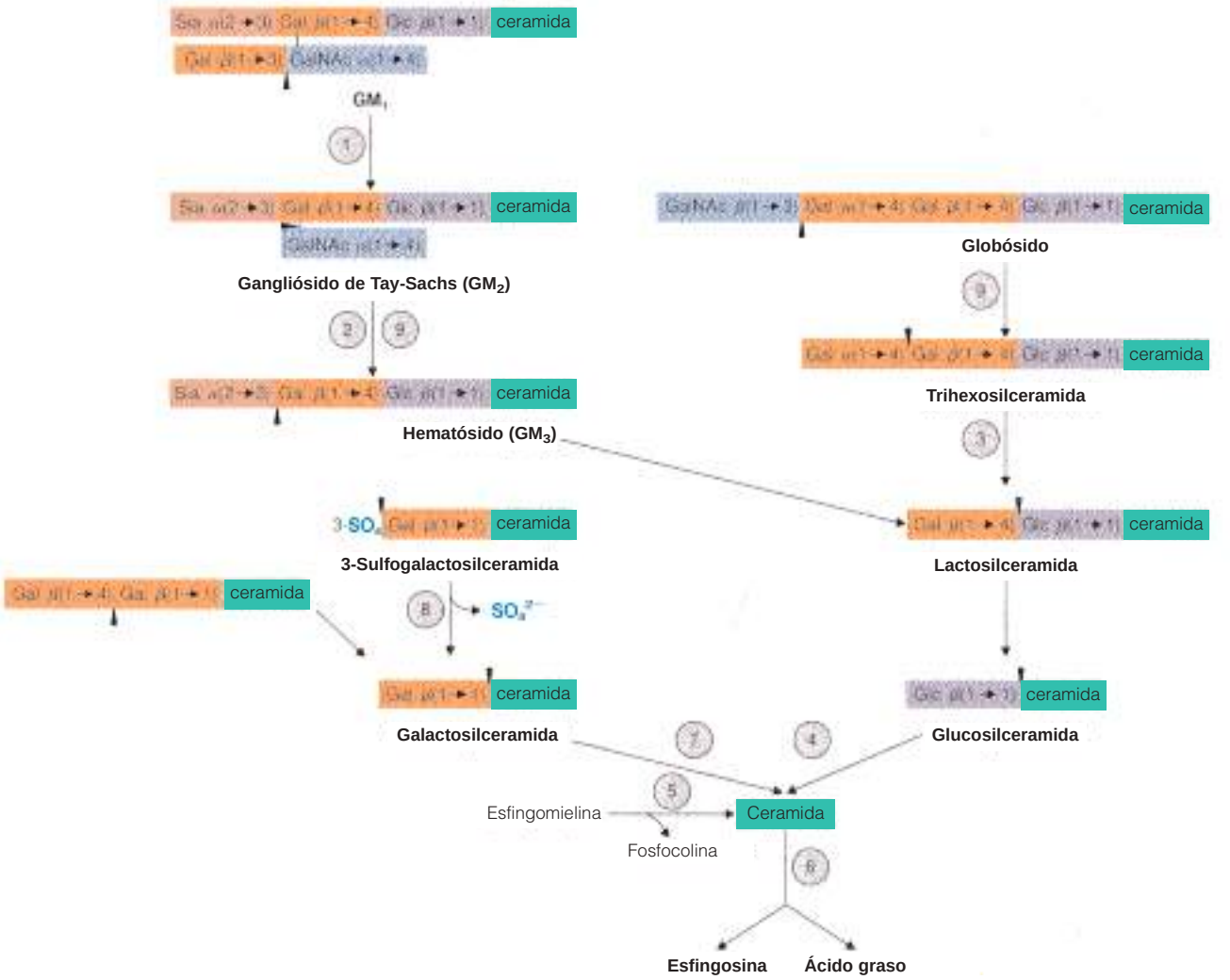


FIGURA **19.16**

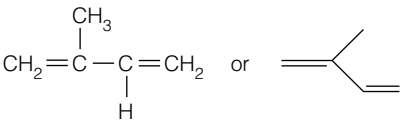
Rutas lisosómicas para la degradación de los esfingolípidos. Los números dentro de los círculos hacen referencia a las enzimas que se identifican en la Tabla 19.1 y que son deficitarias en las enfermedades de almacenamiento de lípidos.

gangliósidos son receptores de agentes específicos, como la toxina del cólera, que se une al ganglиósido GM_1, o el virus de la gripe, que reconoce la porción de ácido siálico de ciertos gangliósidos. El virus de la gripe codifica una neuraminidasa que rompe estos gangliósidos como parte del proceso vírico de entrada en las células. Se están elaborando inhibidores de esta enzima como posibles fármacos para tratar o prevenir la gripe. También es de gran interés la observación de que algunos gangliósidos estimulan el crecimiento del tejido nervioso en cultivos celulares, lo cual sugiere que podrían utilizarse para estimular la regeneración del tejido nervioso tras la lesión de la médula espinal. De hecho, el "lineman" Dennis Byrd de los New York Jets fue tratado con el ganglиósido GM_1, así como quirúrgicamente, tras romperse el cuello en un partido de fútbol americano en 1992, y esto puede haber sido responsable en parte de su extraordinaria recuperación.

Los lípidos parecen tener un gran número de funciones como agentes biológicos de señalización. Entre los ejemplos que hemos presentado, se encuentran el factor activador de plaquetas y el ácido lisofosfatídico. Entre los esfingolípidos, se ha propuesto a la ceramida, aunque no ha quedado establecido, como participante en una ruta que conduce a la **apoptosis** o muerte celular programada. Este proceso, que se presentará con mayor detalle en el Capítulo 28, implica la muerte de determinadas células como parte del desarrollo normal o tras

el daño ambiental a una célula, de forma tan grave que la supervivencia de la célula sería perjudicial para el organismo. Los factores extracelulares que activan esta fragmentación enzimática de la esfingomielina dentro de las membranas, y la ceramida que se libera, activan diversas proteína quinasas y fosfatasas, una parte de una ruta de transducción de señal que no se comprende aún con detalle.

Metabolismo de los esteroides



Isopreno

Ahora pasamos a un grupo extraordinariamente amplio y diverso de lípidos, los **isoprenoides** o **terpenos.** Estos compuestos se forman a partir de una o varias unidades de cinco carbonos, derivados activados del **isopreno.** La familia incluye los esteroides y los ácidos biliares; las vitaminas liposolubles; el dolicol y los undecaprenol fosfatos que hemos visto en la síntesis de las glucoproteínas; el fitol, el alcohol de cadena larga de la clorofila, las **giberelinas,** una familia de hormonas de crecimiento de las plantas; las hormonas juveniles de los insectos; los principales componentes del caucho; la coenzima Q, y otros muchos compuestos.

Gran parte de nuestro estudio sobre los isoprenoides se centra en un único compuesto esteroideo, el colesterol. Como se ha comentado en el Capítulo 10, este lípido es un componente principal de las membranas de las células animales en donde participa en la modulación de la fluidez de la membrana. En los animales también actúa como precursor de todas las hormonas esteroideas, de la vitamina D, y de los ácidos biliares, que facilitan la digestión de las grasas. Como hemos señalado en el Capítulo 18, existe un gran interés médico por el colesterol debido a las relaciones entre la alimentación, las concentraciones de colesterol en sangre, la aterosclerosis y la enfermedad cardíaca. Estas relaciones biológicas, junto con la compleja estereoquímica de su estructura y la elegancia de su ruta de biosíntesis a partir de un único precursor de bajo peso molecular, han centrado la atención sobre este compuesto desde que fuera aislado por primera vez a partir de los cálculos biliares en 1784. Michael Brown y Joseph Goldstein han indicado que el colesterol es "la molécula pequeña más condecorada de la biología", puesto que se han concedido 13 Premios Nobel a científicos, entre ellos los propios Brown y Goldstein, que han dedicado una parte importante de sus carreras al colesterol.

ALGUNAS CONSIDERACIONES ESTRUCTURALES

Los **esteroides** constituyen una clase de lípidos derivados del hidrocarburo tetracíclico saturado **ciclopentanoperhidrofenantreno** (Figura 19.17; véase también el Capítulo 10, página 362). Obsérvense las letras utilizadas para indicar los cuatro anillos, A, B, C y D, siendo D el anillo de cinco carbonos, y el sistema de numeración de los carbonos. El colesterol difiere del sistema de anillo básico en que posee una cadena alifática en C-17, grupos metilo axiales en C-10 y C-13, un doble enlace en el anillo B y un grupo hidroxilo en el anillo A. El grupo funcional alcohol y la cadena de carbono de C-17 hacen que el colesterol sea un **esterol,** que es el término genérico que se utiliza para identificar a los alcoholes esteroideos.

Los anillos de ciclohexano de los esteroides adoptan unas conformaciones fruncidas, siendo la más estable la forma de silla (Capítulo 10, Figura 10.9), que predomina sobre la forma de bote. Esto da al colesterol una estructura molecular rígida, con sólo el grupo hidroxilo que genera una pequeña polaridad en un extremo (véase la Figura 10.9). Gran parte del colesterol de las lipoproteínas

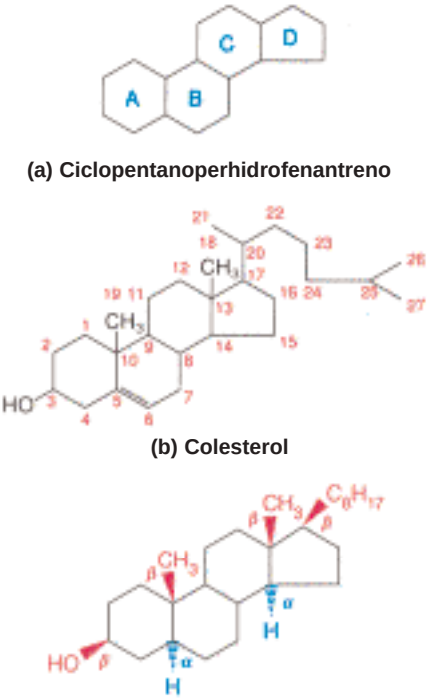


FIGURA **19.17**

Sistema de identificación de anillos (a) y sistema de numeración de los carbonos (b) que se utilizan para los esteroides. (c) Convenios estructurales, tomando como ejemplo el colestanol. Los sustituyentes α se proyectan por debajo del plano del sistema de anillos del esteroide (cuñas azules rayadas) y los sustituyentes β se proyectan por encima de ese plano (cuñas rojas rellenas). Los hidrógenos de las posiciones 5 y 14 tienen la configuración α, mientras que el hidroxilo, los dos grupos metilo y la cadena lateral alifática de C-17 son todos sustituyentes β.

y de las gotitas de almacenamiento intracelular está esterificado en esta posición con un ácido graso de cadena larga, lo cual hace que el colesterol esterificado resultante sea mucho más hidrófobo que el propio colesterol. La estructura pone de manifiesto cómo los aumentos de las concentraciones de colesterol en una membrana pueden reducir la fluidez de esa membrana, al reducir la proporción de lípidos totales que pueden sufrir una transición de fase y al reducir la movilidad lateral de los lípidos polares dentro de la membrana.

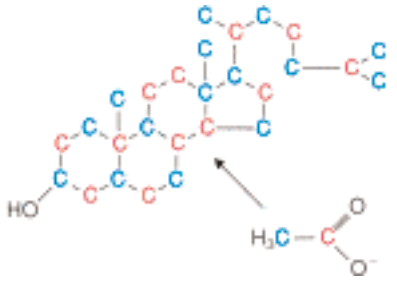
En la mayor parte de nuestro análisis del metabolismo de los esteroides, utilizaremos representaciones estructurales, como las de la Figura 19.17c, en vez de los modelos de configuración tridimensional. Por convenio, el grupo metilo de la posición 10 se proyecta *por encima* del plano de los anillos. Éste y otros sustituyentes que se proyectan por encima del plano se designan como β y se dibujan con una cuña rellena. Los grupos que se proyectan *por debajo* del plano del anillo se denominan α y se indican con una cuña rayada. Se ilustran estos convenios en la Figura 19.17c para el **colestanol,** uno de los dos derivados totalmente saturados del colesterol.

BIOSÍNTESIS DEL COLESTEROL

Vale la pena estudiar la ruta mediante la cual se sintetiza el colesterol, dada la diversidad de metabolitos sintetizados a través de ella y la elegancia de la propia ruta. Los estudios realizados con trazadores isotópicos han demostrado que los 27 carbonos del colesterol proceden de un precursor de dos carbonos, el acetato. ¿Cómo puede utilizarse un compuesto tan sencillo para construir una estructura de la enorme complejidad del colesterol? Esto es lo que analizaremos a continuación.

Estudios iniciales de la biosíntesis del colesterol

La mayor parte de nuestra perspectiva inicial respecto a la biosíntesis del colesterol procedió del laboratorio de Konrad Bloch en los años 1940. Al observar



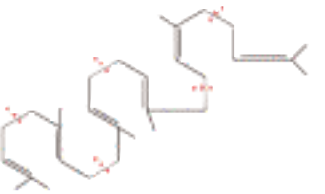
El colesterol, que es el precursor de todos los esteroides, obtiene todos sus átomos de carbono del acetato.

que la biosíntesis del colesterol en los vertebrados estaba limitada en gran parte al hígado, Bloch administró a ratas acetato marcado con ^{14}C en la posición del grupo metilo o en la del grupo carboxilo. Tras cada administración, se aislaba el colesterol del hígado y se sometía a una degradación química, con el contaje radiactivo de los fragmentos. Este método permitió establecer el patrón que se muestra en el margen, en el que cada carbono del colesterol tenía su origen o bien en el carbono metilo (azul) o bien en el carbono carboxilo (rojo) del acetato (en realidad, la acetil-CoA).

Otros datos iniciales procedieron de la observación de que los cinco carbonos del isopreno podían obtenerse metabólicamente a partir de tres moléculas de acetato, y de la predicción de que el colesterol era un producto de la ciclación del hidrocarburo lineal C_{30}, **escualeno**. El escualeno contiene seis unidades isopreno (delineadas mediante marcas rojas en las estructuras de abajo) y su configuración hace que sea un precursor verosímil de los esteroides.



Escualeno



Configuración propuesta del escualeno previa a la ciclación

En 1956 se produjo otro avance importante, cuando Karl Folkers descubrió que el ácido orgánico C_6, **ácido mevalónico**, podía permitir el crecimiento de determinadas cepas de *Lactobacillus* que requerían acetato. Folkers comprobó que el ácido mevalónico se convertía con facilidad en un compuesto isoprenoide C_5 activado, el **isopentenil pirofosfato**. Es interesante señalar que el *Lactobacillus* no sintetiza esteroides, pero utiliza los primeros pasos de la ruta para la síntesis de otros compuestos isoprenoides. En los animales, el mevalonato se convierte con facilidad en escualeno. Una vez establecido este hecho, se habían sentado las bases para considerar la biosíntesis del colesterol como tres procesos diferenciados.

La hidroximetilglutaril-CoA reductasa, que cataliza una de las primeras reacciones de la biosíntesis del colesterol, constituye el principal punto de control de todo el proceso.

1. Conversión de fragmentos C_2 (acetato) en un precursor isoprenoide C_6 (mevalonato)
2. Conversión de seis mevalonatos C_6, a través de intermediarios C_5 activados, en el escualeno C_{30}
3. Ciclación del escualeno y su transformación en colesterol C_{27}

Consideremos ahora estos tres procesos de manera detallada.

Fase 1: formación del mevalonato

La primera parte de la ruta es idéntica a las reacciones utilizadas en la cetogénesis (véase el Capítulo 18), aunque se produce en un compartimiento celular diferente. La cetogénesis tiene lugar en las mitocondrias, mientras que la biosíntesis del colesterol se produce en el citosol y el retículo endoplásmico.

La fase 1 se inicia con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para dar acetoacetil-CoA. En la Figura 19.18 se muestra el resto de esta fase. La acetoacetil-CoA reacciona con una tercera molécula de acetil-CoA para dar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Recuérdese de la Figura 18.21 que, durante la cetogénesis, la HMG-CoA se rompe para dar acetoacetato y acetil-CoA en la matriz mitocondrial. Sin embargo, la HMG-CoA liasa que realiza esta ruptura no se encuentra en el retículo endoplásmico, en donde se inicia la biosíntesis del colesterol. En su lugar, la **HMG-CoA reductasa** cataliza la reducción

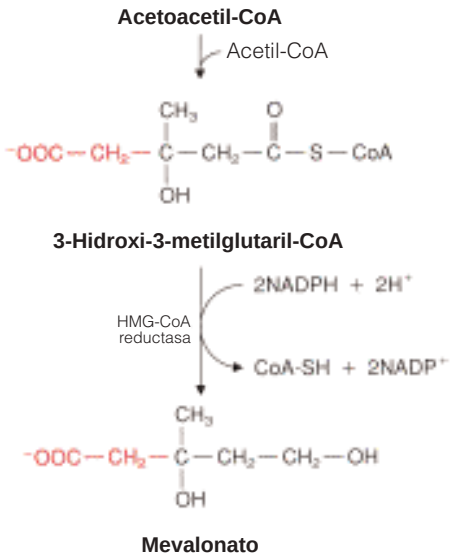


FIGURA **19.18**
Biosíntesis del mevalonato.

de cuatro electrones, dependiente de NADPH, que transforma la HMG-CoA en mevalonato. Éste es el principal paso que regula toda la ruta.

Fase 2: síntesis de escualeno a partir de mevalonato

Las reacciones siguientes, que se muestran en las Figuras 19.19 y 19.20, se producen en el citosol. En primer lugar se activa el mevalonato mediante tres fosforilaciones sucesivas (Figura 19.19). La tercera fosforilación, en la posición 3, sienta las bases para una descarboxilación a través de una eliminación *trans* para dar isopentenil pirofosfato. Una molécula de esta sustancia se isomeriza al C_5 **dimetilalil pirofosfato**. Este último compuesto, como se muestra en la Figura 19.20, reacciona con una segunda molécula de isopentenil pirofosfato para dar C_{10} **geranil pirofosfato**, y otra molécula más de isopentenil pirofosfato reacciona con este producto para dar el C_{15} **farnesil pirofosfato**.

En la Figura 19.21 se presentan las reacciones finales de la síntesis de escualeno. La primera de estas reacciones la cataliza la **farnesil transferasa** (también denominada escualeno sintasa), que está unida a las membranas del retículo endoplásmico. Esta enzima dependiente de NADPH junta 2 moléculas de farnesil pirofosfato para dar **preescualeno pirofosfato**, que sufre a continuación la eliminación del pirofosfato y un reordenamiento a través de un catión intermediario ciclopropilo para dar escualeno. Todas las reacciones posteriores se producen en el retículo endoplásmico.

Una característica notable de esta parte de la ruta es su estereoquímica. En los años 1960, dos científicos británicos, George Popják y John Cornforth, identificaron 14 "ambigüedades estereoquímicas", es decir, 14 pasos en el proceso general que podían ir en cualquiera de las dos direcciones. Así, por ejemplo, el derivado de mevalonato trifosforilado que se muestra en la Figura 19.19 puede sufrir una descarboxilación mediante la eliminación *cis* o *trans* de los grupos carboxilo y fosforilo. Así pues, había 2^{14}, es decir, 16 384 posibles rutas estereoquímicas *diferentes* para la conversión del mevalonato en escualeno. Es de destacar que estos científicos y sus colegas lograron identificar la única ruta estereoquímica que realmente se produce de entre estas 16 384 posibilidades.

Fase 3: ciclación del escualeno a lanosterol y su conversión en colesterol

La ciclación del escualeno a lanosterol y la conversión del lanosterol en colesterol se presentan en la Figura 19.22. La formación de lanosterol, que tiene el núcleo esterol de cuatro anillos, se produce en dos pasos. En primer lugar, una oxidasa de función mixta introduce una función epóxido en los carbonos 2 y 3. La protonación de este grupo funcional inicia una serie de cambios *trans* 1,2 de los grupos metilo y los iones hidruro, para producir el lanosterol. A continuación se producen una serie de unas 20 reacciones, en las que intervienen reducciones de dobles enlaces y tres desmetilaciones; se elimina un grupo metilo de C-14 y dos de C-4. El penúltimo producto es el 7-deshidrocolesterol, que sufre una reducción final para dar colesterol.

Control de la biosíntesis del colesterol

Como se ha indicado antes, la HMG-CoA reductasa, que cataliza la reacción dirigida hacia la biosíntesis del colesterol, constituye el principal objetivo de la regulación de toda la ruta. Se sabe desde hace tiempo, a partir de los estudios de nutrición, que el colesterol del alimento suprime de manera eficaz la síntesis endógena de colesterol. Este control se produce a ambos niveles de transcripción y traducción, con el propio colesterol o uno de sus derivados, desempeñando un papel activo en el control de la traducción. Además, la enzima se regula de forma hormonal por la insulina y el glucagón. Las primeras pruebas sugerían que en este control participaba la fosforilación dependiente del AMP cíclico de la

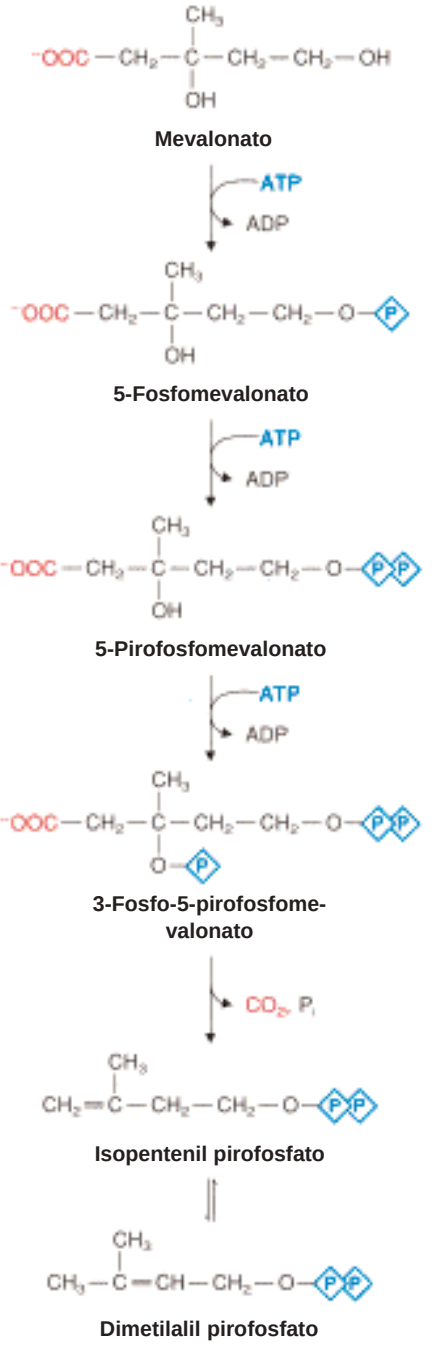


FIGURA **19.19**

Conversión del mevalonato en isopentenil pirofosfato y dimetilalil pirofosfato. El carbono carboxilo del mevalonato (rojo) se pierde en forma de CO_2. Existen pruebas que indican que se produce una descarboxilación dependiente de ATP como reacción de conversión, sin el intermediario 3-fosfato.

La ciclación del escualeno, un hidrocarburo C_{30}, crea el núcleo esterol de cuatro anillos.

FIGURA **19.20**

Conversión del isopentenil pirofosfato y del dimetilalil pirofosfato en farnesil pirofosfato.

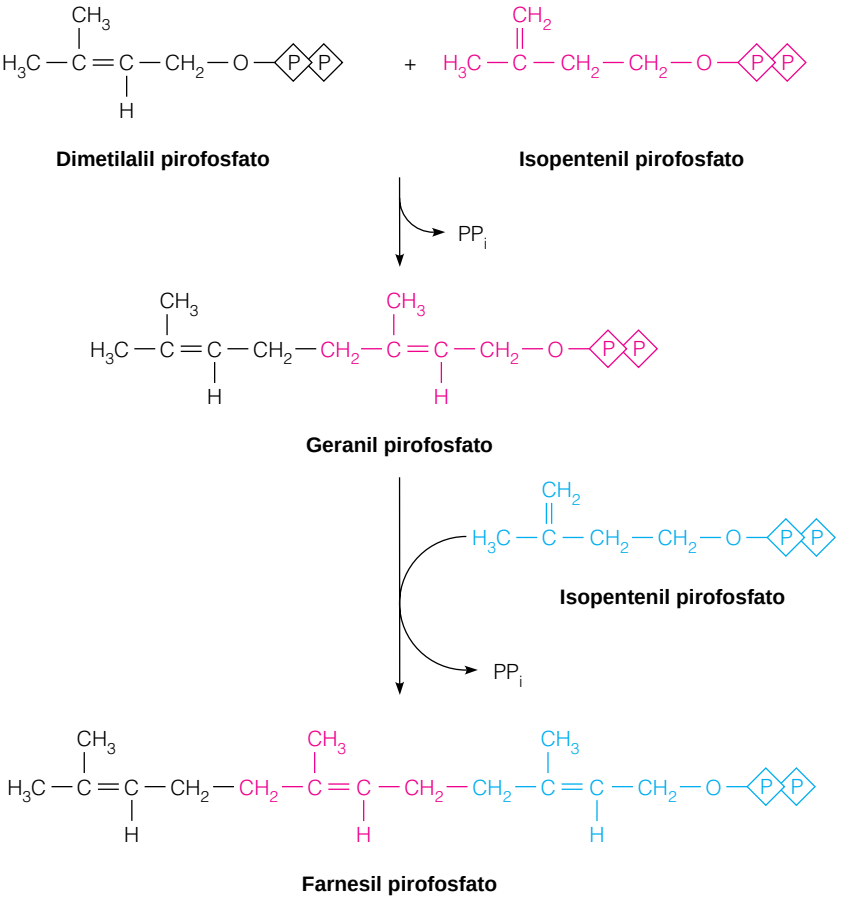
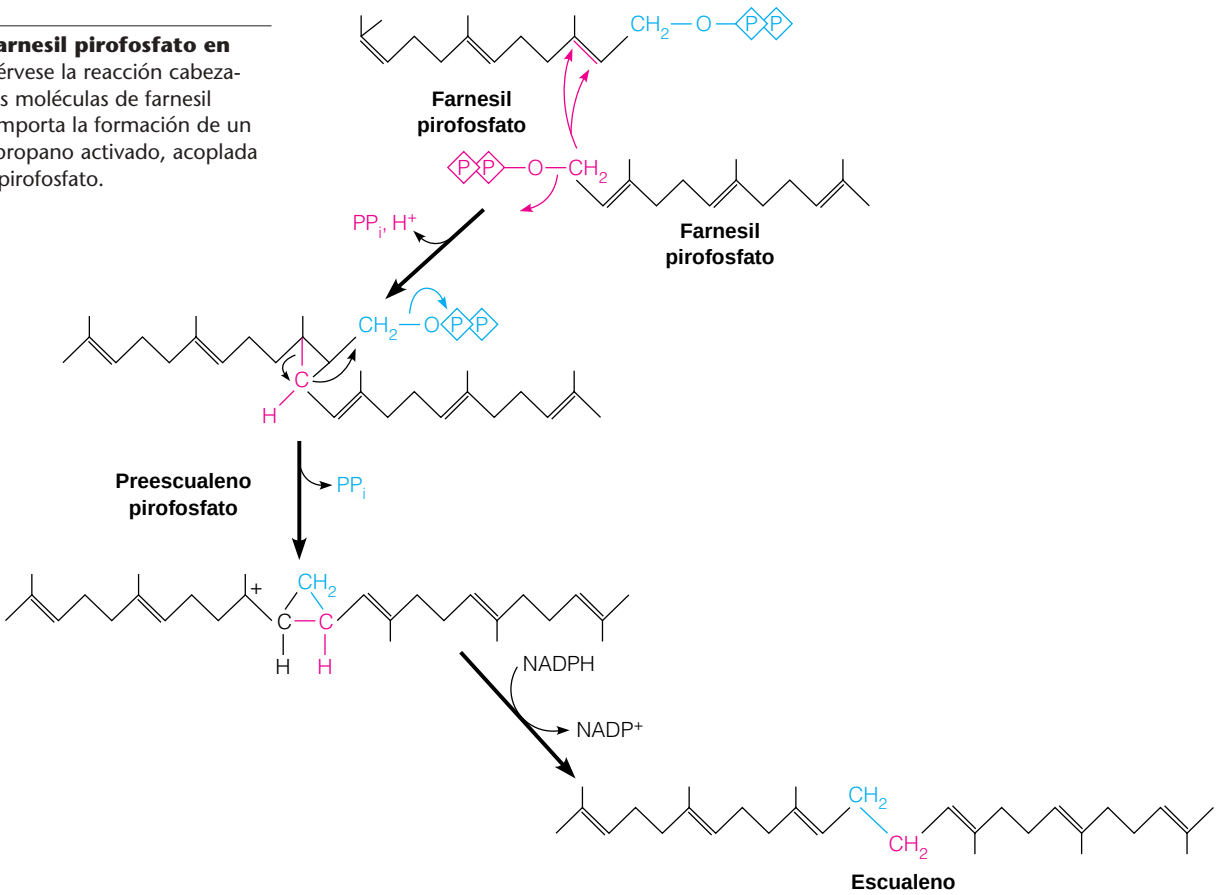


FIGURA **19.21**

Conversión del farnesil pirofosfato en escualeno. Obsérvese la reacción cabeza-cabeza entre las dos moléculas de farnesil pirofosfato, que comporta la formación de un intermediario ciclopropano activado, acoplada a la pérdida de un pirofosfato.



proteína enzimática, pero las pruebas más recientes apoyan la idea de que estas hormonas afectan la síntesis de la enzima a nivel de la transcripción. La enzima de los mamíferos está sometida a una fosforilación reversible, aunque no está claro el significado regulador de esta reacción.

En los vertebrados, la síntesis de colesterol está controlada de manera elegante, mediante la velocidad a la que el colesterol entra en las células procedente del torrente sanguíneo. Como se ha comentado en el Capítulo 18, la homeostasia se mantiene mediante un mecanismo que coordina el consumo de colesterol en el alimento, la tasa de síntesis de colesterol endógeno en el hígado (y en menor grado en el intestino), y la tasa de utilización de colesterol por las células. En este mecanismo interviene el receptor de LDL, que es el agente principal encargado del transporte de colesterol en el torrente sanguíneo.

ÁCIDOS BILIARES

Pasemos ahora a la utilización del colesterol para la síntesis de otros metabolitos importantes, los ácidos biliares y las hormonas esteroideas. Como se ha indicado en el Capítulo 18, los ácidos biliares son derivados esteroideos con propiedades detergentes, que emulsionan los lípidos del alimento en el intestino, facilitando con ello la digestión y absorción de las grasas. Se segregan desde el hígado, se almacenan en la vesícula biliar y se trasladan al intestino a través del conducto biliar. La biosíntesis de los ácidos biliares es el destino metabólico principal del colesterol, y representa más de la mitad de los 800 mg/día que se metabolizan en un ser humano adulto normal. En cambio, la síntesis de hormonas esteroideas supone tan sólo 50 mg del colesterol metabolizado al día.

Aunque se sintetizan diariamente unos 400 mg de ácidos biliares, se segregan al intestino mucho más de 400 mg. La mayoría de los ácidos biliares segregados al intestino delgado superior se absorben en el intestino delgado inferior y vuelven al hígado para reutilizarse, a través de la sangre portal. Este proceso, que maneja entre 20 y 30 g de ácidos biliares al día, se denomina **circulación enterohepática**. La eliminación diaria de ácidos biliares en las heces asciende tan sólo a 0.5 g/día o menos.

Los ácidos biliares más abundantes en el ser humano son el **ácido cólico** y el **ácido quenodesoxicólico** (que se muestran en la Figura 19.23 como sus sales biliares respectivas, el colato y el quenodesoxicolato). Generalmente están conjugados por un enlace amida con el aminoácido **glicina** o **taurina**, dando lugar a compuestos denominados **sales biliares**. Los conjugados de ácido cólico con glicina y taurina se denominan **glucocolato** y **taurocolato**, respectivamente. Otro ácido biliar, el **desoxicolato**, se encuentra en abundancia en la bilis de algunos otros mamíferos. Se utiliza mucho como reactivo de laboratorio para solubilizar las proteínas de las membranas.

En las rutas de biosíntesis del colato, glucocolato y taurocolato que se indican en la Figura 19.23, se producen una serie de hidroxilaciones, catalizadas por oxidasas de función mixta P450 microsómicas. La primera de ellas, que se produce en C-7, es la determinante de la velocidad y desempeña, por tanto, un papel importante en el control de toda la ruta. La deshidrogenación del hidroxilo a una cetona en el carbono 3, seguida de una reducción a hidroxilo, invierte su configuración y une a los anillos A y B en una configuración *cis*, dando lugar al 3,7,12-trihidroxiprostanoato. En la actualidad sabemos poco acerca de los mecanismos de modificación de la cadena lateral que convierten el hidrocarburo saturado de ocho carbonos en una cadena de cinco carbonos con un carboxilato terminal.

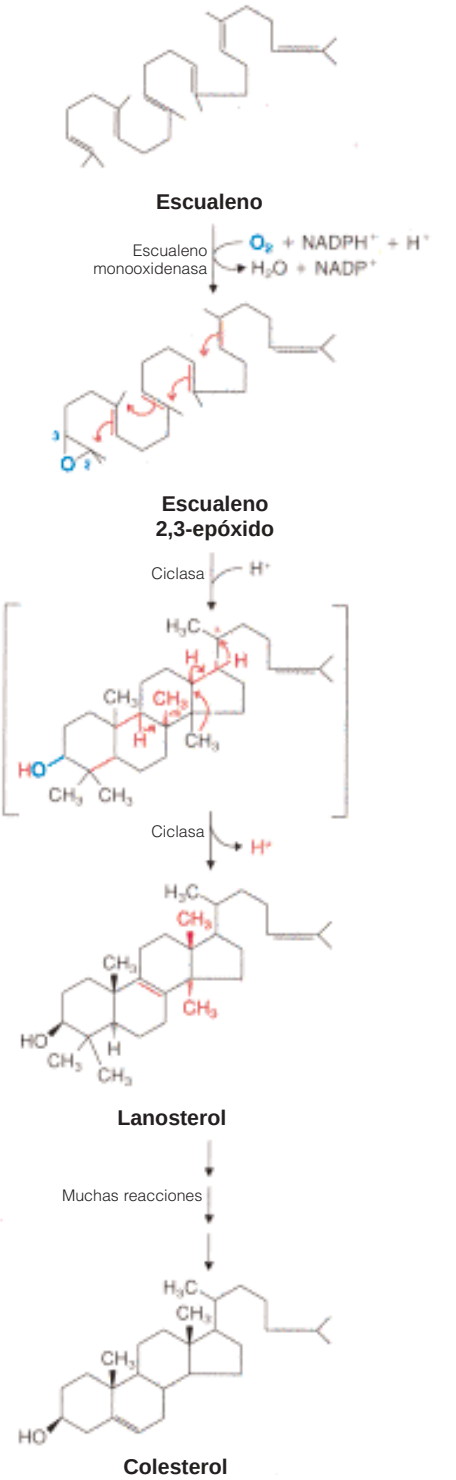
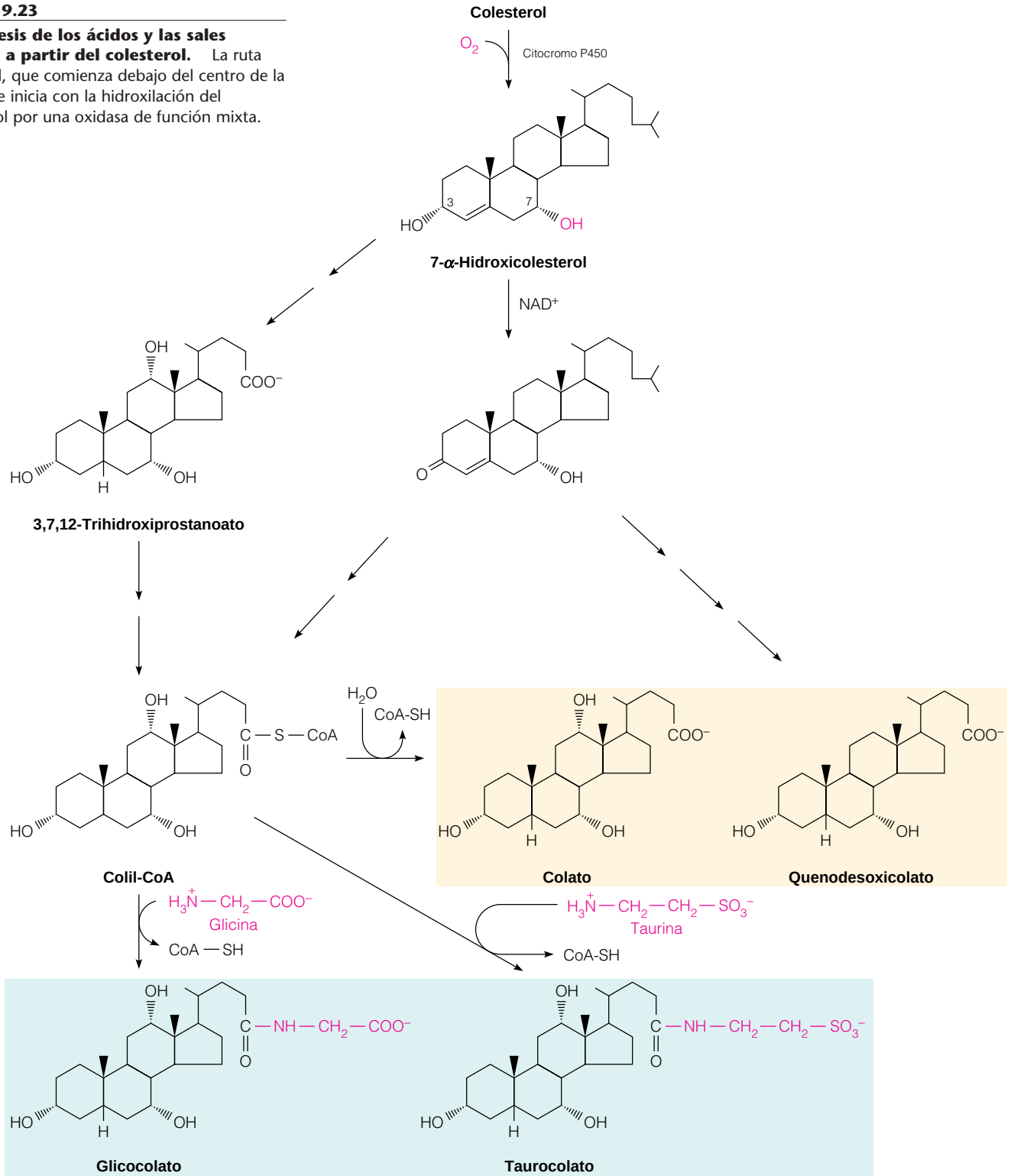


FIGURA **19.22**

Conversión del escualeno en colesterol. La formación de epóxido de escualeno da lugar a una serie de desplazamientos electrónicos de dobles enlaces que cierran los cuatro anillos, y una migración de un átomo de carbono desde C-14 a C-13 produce el primer intermediario esteroideo, el lanosterol. Muchas reacciones posteriores conducen al 7-deshidrocolesterol, que sufre una reducción a colesterol.

FIGURA **19.23**

Biosíntesis de los ácidos y las sales biliares a partir del colesterol. La ruta principal, que comienza debajo del centro de la figura, se inicia con la hidroxilación del colesterol por una oxidasa de función mixta.



HORMONAS ESTEROIDEAS

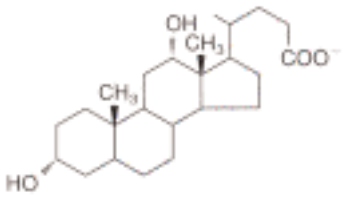
El colesterol es el origen biosintético de todas las hormonas esteroideas, los mensajeros extracelulares elaborados por las gónadas y la corteza suprarrenal, más la placenta en las mujeres embarazadas. En este capítulo revisamos las rutas de biosíntesis de las hormonas esteroideas, mientras que sus acciones se

considerarán en el Capítulo 23. En general, las hormonas esteroideas controlan el metabolismo a nivel de los genes. Reaccionan con receptores proteicos intracelulares, y los complejos hormona-receptor se unen a lugares específicos del genoma y afectan a la transcripción de los genes próximos.

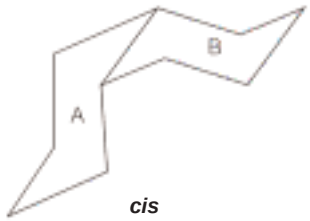
Consideraremos cinco clases principales de hormonas: (1) los **progestágenos** (progesterona), que regulan los fenómenos que se producen durante el embarazo y son los precursores de todas las demás hormonas esteroideas; (2) los **glucocorticoides** (cortisol y corticosterona), que estimulan la gluconeogénesis y, a dosis farmacológicas, suprimen las reacciones inflamatorias; (3) los **mineralocorticoides** (aldosterona), que regulan el equilibrio iónico mediante la activación de la reabsorción de Na^+, Cl^- y HCO_3^- en el riñón; (4) los **andrógenos** (androstenediona y testosterona), que favorecen el desarrollo sexual masculino y mantienen los caracteres sexuales masculinos; y (5) los **estrógenos** (estrona y estradiol) u hormonas sexuales femeninas, que mantienen las características sexuales femeninas. La mayor parte de estas hormonas se presentan en la Figura 19.24, que también resume sus rutas de síntesis. En todos los casos, la cadena lateral del colesterol se acorta notablemente o desaparece.

Una característica general de las hormonas esteroideas es que no se almacenan para su liberación tras la síntesis. En consecuencia, la concentración de una hormona circulante se controla fundamentalmente mediante su tasa de síntesis, la cual en última instancia se controla por señales procedentes del cerebro. Normalmente estas señales actúan a través de hormonas intermediarias. Así, por ejemplo, la neurohormona **factor liberador de corticotropina** (**CRF**) se libera por las células del hipotálamo en respuesta a los estímulos procedentes del sistema nervioso central (véase el Capítulo 23). La CRF estimula la liberación de **corticotropina** u **hormona adrenocorticotropa** (**ACTH**) por la glándula hipofisaria, que a su vez estimula la síntesis de mineralocorticoides y glucocorticoides en la corteza suprarrenal.

La activación de la síntesis de las hormonas esteroideas comporta la estimulación de la hidrólisis de los ésteres de colesterol y una captación de colesterol en las mitocondrias de las células del órgano diana. Allí, una enzima citocromo P450 denominada **colesterol desmolasa** hidroxila la cadena lateral en C-20 y C-22 y la rompe, para dar **pregnenolona**, la precursora de todas las demás hormonas esteroideas. La pregnenolona se convierte en la hormona esteroidea progesterona mediante una deshidrogenación y la isomerización de un doble enlace.



Desoxicolato

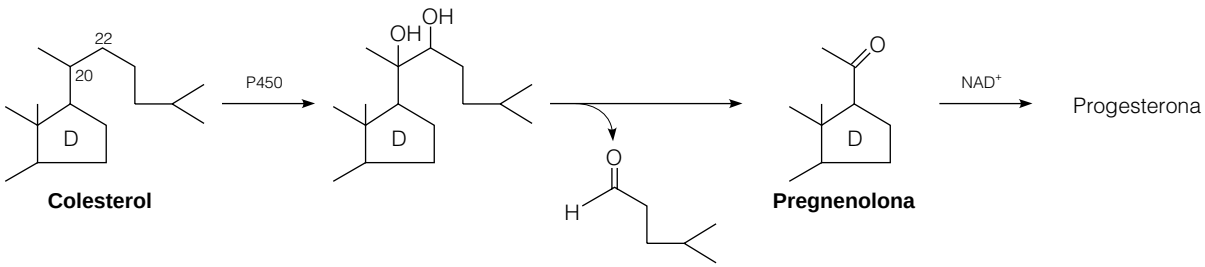


cis

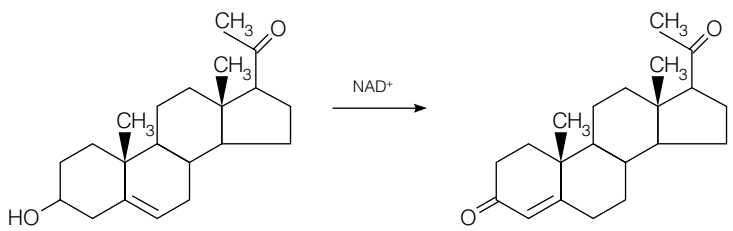


trans

Las principales categorías de hormonas esteroideas en los vertebrados son los progestágenos, los glucocorticoides, los mineralocorticoides, los andrógenos y los estrógenos.



Colesterol **Pregnenolona**



Pregnenolona **Progesterona**

La pregnenolona es un intermediario en la ruta que conduce del colesterol a todos los demás compuestos esteroideos conocidos.

La conversión de la progesterona en otras hormonas esteroideas se muestra en la Figura 19.24. La hidroxilación en C-21 por una enzima de la corteza suprarrenal, seguida de otras dos hidroxilaciones y una deshidrogenación para formar un grupo aldehído, da aldosterona, un mineralocorticoide. La hidroxilación de la progesterona en C-17 da 17 α-hidroxiprogesterona, el precursor de todos los demás

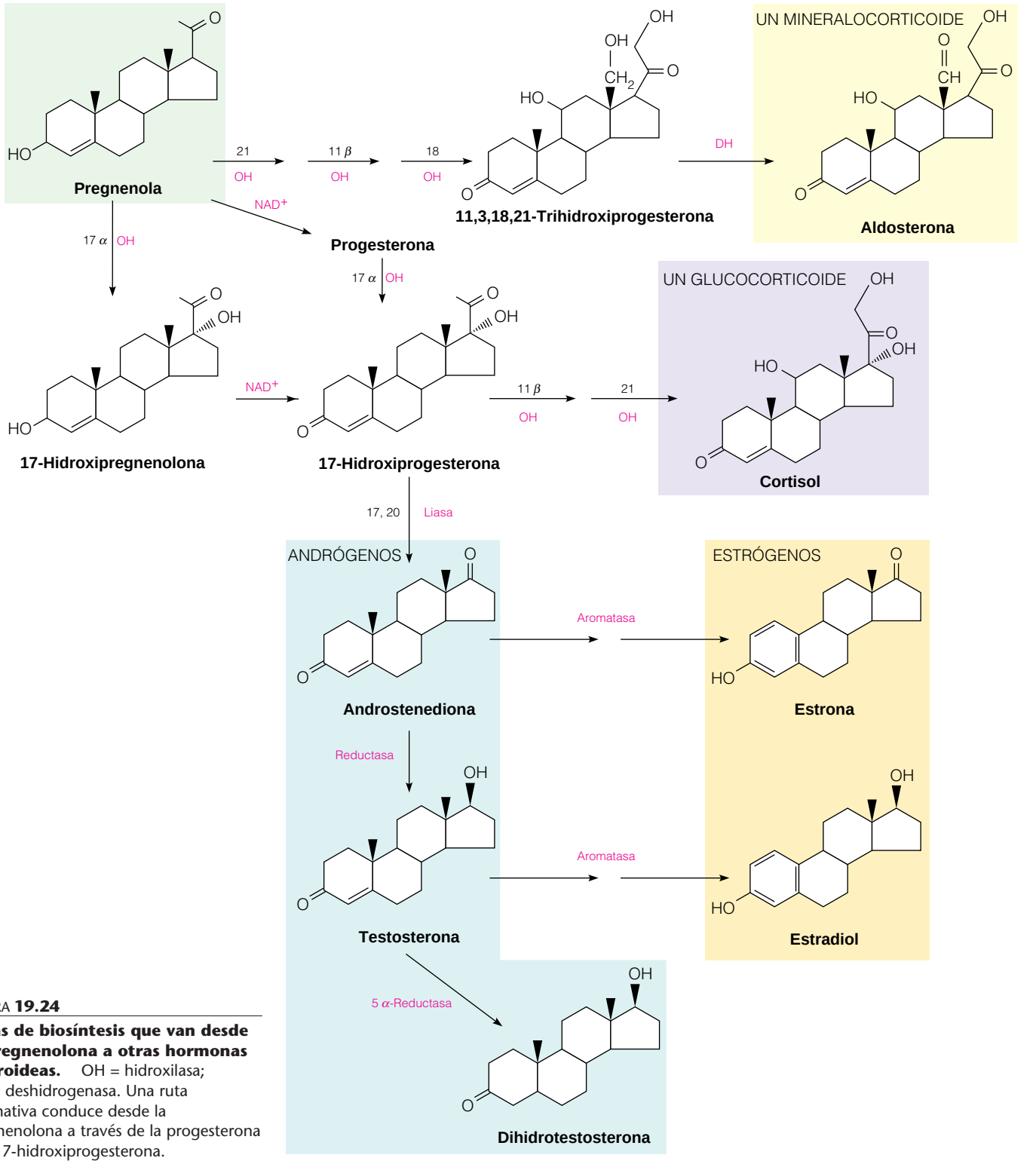


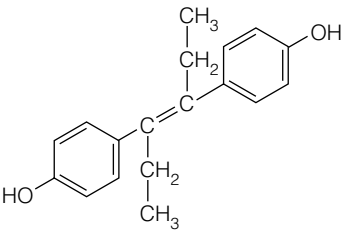
FIGURA **19.24**

Rutas de biosíntesis que van desde la pregnenolona a otras hormonas esteroideas. OH = hidroxilasa; DH = deshidrogenasa. Una ruta alternativa conduce desde la pregnenolona a través de la progesterona a la 17-hidroxiprogesterona.

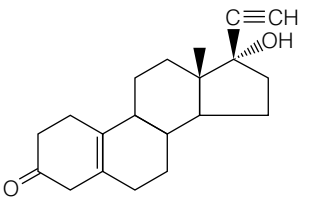
esteroides. Dos hidroxilaciones de este intermediario dan cortisol (un glucocorticoide), fundamentalmente en la glándula suprarrenal. Una enzima de la corteza suprarrenal y de las gónadas rompe la cadena lateral de la 17-hidroxiprogesterona en C-17, dando **androstenediona**, un precursor de los andrógenos y los estrógenos (y un suplemento alimenticio legal para los jugadores profesionales de béisbol, entre ellos Mark McGwire). Las enzimas de estos procesos forman un complejo denominado **aromatasa**. Obsérvese que las reacciones catalizadas por este complejo constituyen la única ruta de síntesis de los anillos aromáticos que se conoce en las células animales. La testosterona sufre una reducción en C-5, dando 5α-dihidrotestosterona, que es un andrógeno algo más potente.

Se han descrito deficiencias enzimáticas humanas para cada una de las enzimas citadas. Un déficit de la 17-hidroxilasa reduce las concentraciones de cortisol, andrógenos y estrógenos, con efectos graves en la maduración sexual. Un déficit de la 21-hidroxilasa inhibe la síntesis de los glucocorticoides y los mineralocorticoides, dando lugar a una sobreproducción de testosterona en las glándulas suprarrenales. Al mismo tiempo, la producción insuficiente de cortisol interfiere en un bucle de retroacción del control hormonal en el que interviene el factor liberador de corticotropina (Capítulo 23) y la ACTH; el aumento de la secreción de ACTH estimula el crecimiento de las glándulas suprarrenales y la síntesis en ellas de esteroides, lo cual exacerba la sobreproducción de testosterona. Esto produce la virilización (masculinización) de las mujeres. Un déficit de la 5α-reductasa hace que disminuyan las concentraciones efectivas de andrógenos y da lugar a la feminización de los varones. Por fortuna, éstas y otras anomalías de los esteroides pueden tratarse mediante reposición hormonal, si se detectan en una fase temprana de la vida.

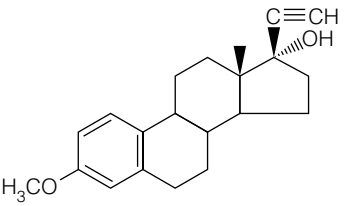
Se han valorado centenares de compuestos sintéticos con actividad del tipo de las hormonas esteroideas, para su uso con diversos fines. Unos esteroides sintéticos muy utilizados son los glucocorticoides antiinflamatorios. El **dietilestilbestrol**, un estrógeno sintético, se utilizó mucho para fomentar el crecimiento del ganado bovino, hasta que se comprobó que podía ser cancerígeno a las concentraciones existentes en la carne del ganado tratado. Los anticonceptivos orales se elaboran con compuestos que contienen actividad de progesterona y de estrógeno. Dos estrógenos sintéticos muy utilizados son el **noretinodrel** y el **mestranol**.



Dietilestilbestrol



Noretinodrel



Mestranol

Las combinaciones de uno de estos fármacos con la progesterona inhiben la secreción hipofisaria de las hormonas que controlan el ciclo reproductor de la mujer. Esta inhibición suprime la maduración del folículo ovárico y la ovulación.

Un interés reciente se ha centrado en las sustancias ambientales producidas por la actividad humana, como determinados pesticidas, que tienen una actividad semejante a los estrógenos. Algunos de ellos se ha demostrado que interaccionan con receptores de estrógenos y que estimulan respuestas bioquímicas semejantes. Aunque es difícil obtener pruebas sólidas, estos "desorganizadores endocrinos" se cree que son responsables de los descensos de la fertilidad de diversas especies animales, entre las que puede encontrarse el ser humano.

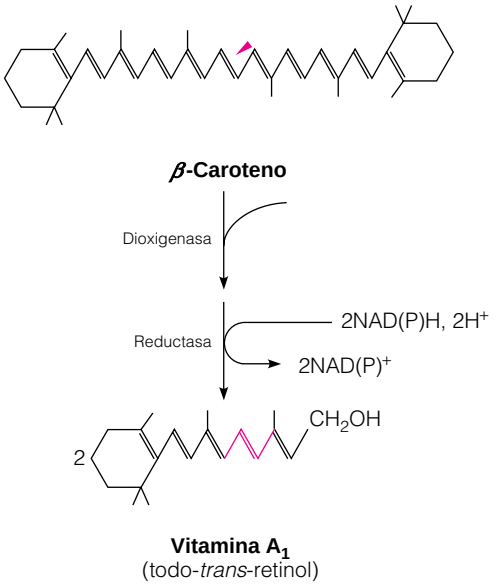
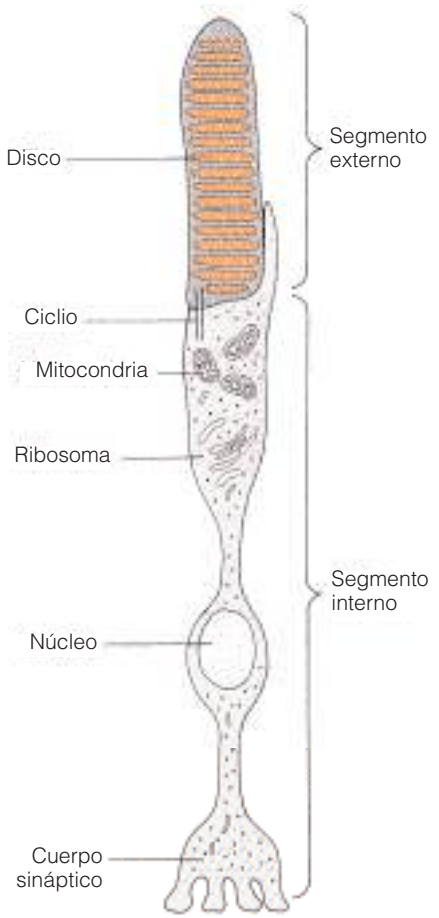


FIGURA **19.25**

Síntesis de la vitamina A_1, todo-*trans*-retinol. El derivado 11-*cis* del todo-*trans*-retinol es un componente del pigmento visual rodopsina. El color rojo identifica el enlace que sufre la isomerización *cis-trans* en el proceso visual.



Las células de los mamíferos carecen de la capacidad de degradar por completo los compuestos esteroideos. Aunque se producen varias reacciones catabólicas, la mayor parte de los esteroides y sus metabolitos se conjugan, a través de sus grupos hidroxilo, con glucuronato o sulfato. Ambas modificaciones aumentan enormemente la solubilidad del esteroide y facilitan su eliminación en la orina.

Otros compuestos isoprenoides

VITAMINAS LIPOSOLUBLES

Las cuatro vitaminas liposolubles, A, D, E y K, son todas ellas compuestos isoprenoides. Están formadas, como los esteroides, por unidades activadas de cinco carbonos. Así pues, como grupo tienen una relación estructural que no se da en las vitaminas hidrosolubles. En cambio, las vitaminas hidrosolubles tienen una uniformidad *funcional*, por cuanto todas ellas están diseñadas para transportar grupos metabólicos móviles, mientras que las vitaminas liposolubles son diversas en sus funciones.

Vitamina A

La vitamina A, también denominada ***trans*-retinol**, es un alcohol isoprenoide que desempeña un papel clave en la visión. También interviene en el control del crecimiento animal, estimulando de alguna manera el desarrollo del sistema nervioso. La vitamina puede ingerirse con el alimento o puede biosintetizarse a partir del **β-caroteno**, un compuesto isoprenoide especialmente abundante en las zanahorias. La biosíntesis de la vitamina A se muestra en la Figura 19.25.

La vitamina A interviene de manera importante en el proceso visual en los bastones de la retina, células que son las responsables principales de la visión con poca luz, con una detección relativamente escasa del color (Figura 19.26). Los segmentos externos del bastón contienen discos de proteína lamelar con un contenido abundante de la proteína **opsina**. El *trans*-retinol de los discos sufre una isomerización y deshidrogenación para dar **11-*cis*-retinal**. Los cambios químicos que se producen en la fotorrecepción se indican en la Figura 19.27. El 11-*cis*-retinal forma una base de Schiff con un residuo de lisina de la opsina, dando **rodopsina** (paso 1). La rodopsina tiene una fuerte absorción de luz entre 400 y 600 nm (la longitud de onda visible del espectro). La absorción de un fotón de luz desencadena una cadena de fenómenos que conducen a la activación nerviosa. El retinal excitado de la rodopsina se isomeriza a una forma todo-*trans* (paso 2), seguido de varios cambios conformacionales y de la liberación del todo-*trans*-retinal (pasos 3 y 4). Tras la isomerización (paso 5), el proceso puede iniciarse de nuevo. El paso 3 de la Figura 19.27 es el paso clave para la transducción de la recepción de un fotón a un potencial de acción nervioso. En este proceso interviene el GMP cíclico y una proteína G denominada **transducina**. En el Capítulo 23 se presentará una información más detallada sobre este proceso.

Como reguladores del desarrollo, los retinoides (derivados del retinol) actúan de una forma algo parecida a las hormonas esteroideas (véase la página 963).

FIGURA **19.26**

Representación esquemática de un bastón. El segmento externo es un apilamiento de discos membranosos, que contiene los pigmentos fotorreceptores. Este segmento está conectado mediante un cilio fino al segmento interno, que contiene el núcleo de la célula, el citosol y el cuerpo sináptico. El cambio de potencial producido en el segmento externo viaja hasta el cuerpo sináptico y se transmite a una o más neuronas de la retina.

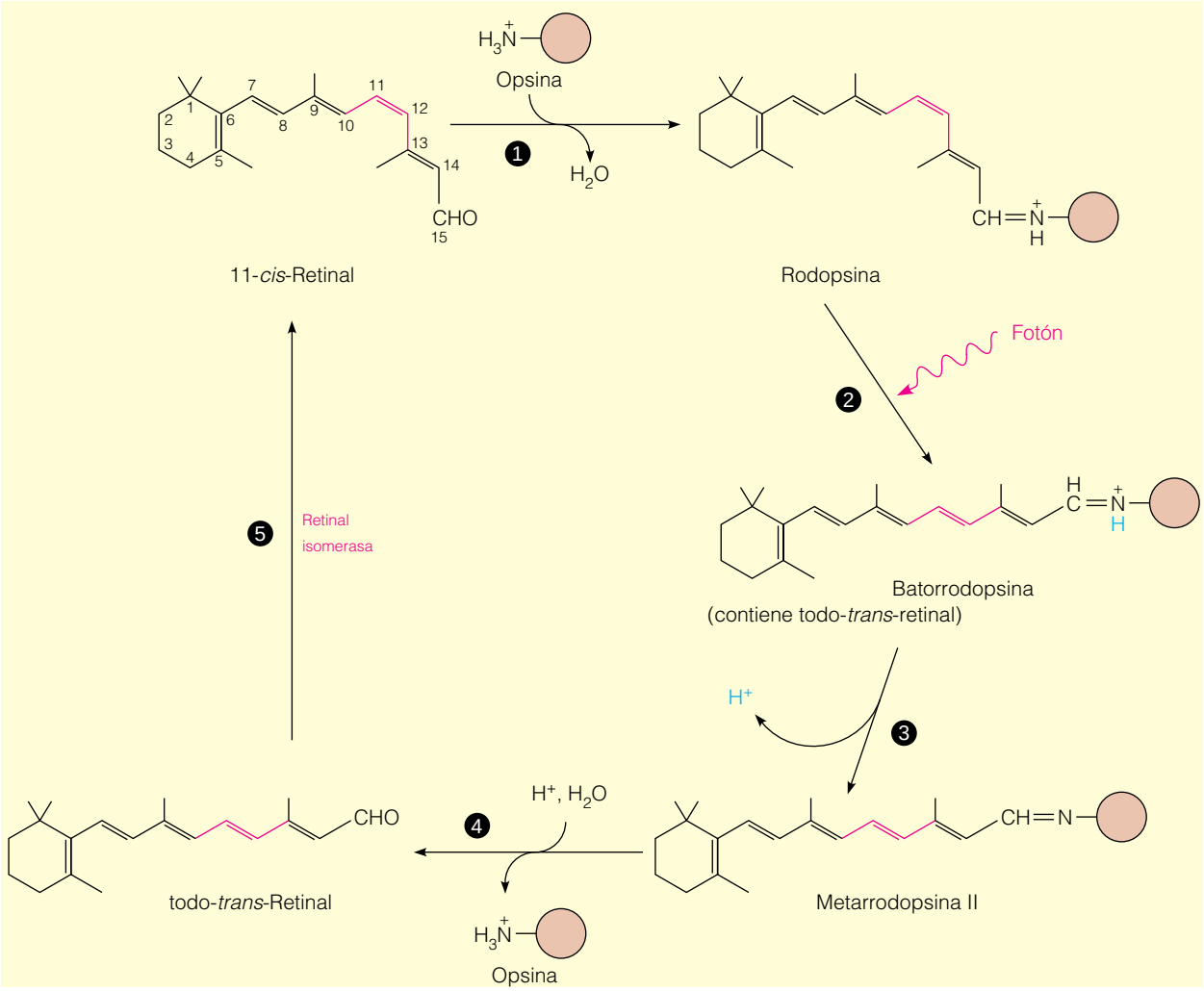


FIGURA **19.27**

Cambios químicos de la fotorrecepción. El 11-*cis*-retinal y la opsina de un bastón se combinan para formar la rodopsina. La absorción de un fotón de luz da lugar a los cambios químicos que se muestran en los pasos 2 y 3. La metarrodopsina II es la molécula que activa la transducina (no mostrada) para iniciar la cascada visual que se describirá en el Capítulo 23. Al cabo de aproximadamente 1 segundo, la metarrodopsina II se disocia en todo-*trans*-retinal, que se isomeriza al iniciarse de nuevo el ciclo.

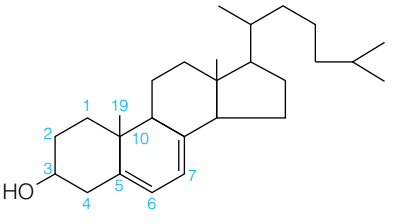
Interaccionan con proteínas receptoras específicas del núcleo celular. Los complejos ligando-receptor se unen a secuencias específicas del DNA, en donde controlan la transcripción de determinados genes. La identificación de esos genes es un campo de intensa investigación en la actualidad.

La isomerización en la retina de una forma de vitamina A unida a proteínas es el mecanismo mediante el cual se recibe la energía luminosa en el ojo.

Vitamina D

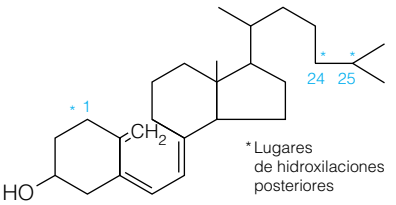
La forma más abundante de la vitamina D es la vitamina D_3, o **colecalciferol**. No se trata realmente de una vitamina, puesto que no es necesario ingerirla en el alimento. De hecho, se obtiene mediante síntesis a partir del 7-deshidrocolesterol, un intermediario de la síntesis de colesterol. Es más exacto considerar la vitamina D_3 como una prohormona, puesto que se convierte en un metabolito que actúa de manera análoga a una hormona esteroidea. Su acción afecta a la regulación del metabolismo del calcio y el fósforo, en especial en cuanto a la síntesis de la matriz inorgánica del hueso, que está formada en gran parte por fosfato cálcico.

El 1,25-dihidroxicolecalciferol controla el metabolismo óseo mediante la regulación de la absorción intestinal de calcio.

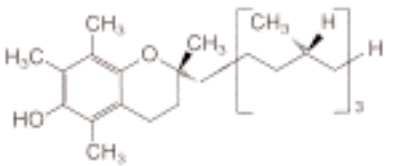


7-Deshidrocolesterol

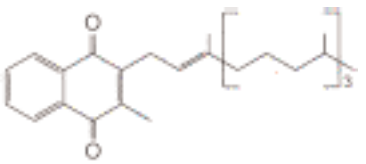
UV



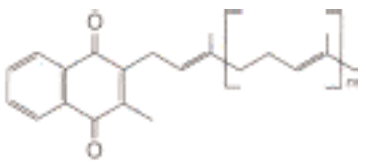
Colecalciferol (vitamina D_3)



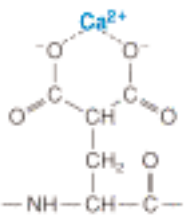
***α*-Tocoferol (vitamina E)**



Filoquinona (vitamina K_1)



Menaquinona (vitamina K_2)



Residuo de *γ*-carboxiglutamato que forma complejos con el calcio

En las células de la piel, el 7-deshidrocolesterol sufre una fotólisis por la acción de la radiación ultravioleta para dar colecalciferol. Como los rayos UV proceden de la luz solar, una exposición insuficiente al sol puede causar un déficit de vitamina D_3, y dar lugar a la malformación ósea denominada **raquitismo**. Con frecuencia se añade vitamina D_3 a los productos lácteos como suplemento de la alimentación, puesto que la exposición a la luz solar es limitada en muchas zonas durante gran parte del año.

El colecalciferol sufre dos hidroxilaciones sucesivas, cada una de ellas catalizada por una oxidasa de función mixta. En la primera, en el carbono 25, interviene un sistema enzimático microsómico del hígado. El 25-hidroxicolecalciferol se transporta posteriormente al riñón, en donde una enzima mitocondrial lo hidroxila en el carbono 1. Esta reacción se activa por la **hormona paratiroidea**, que se segrega por la glándula paratiroides cuando las concentraciones de calcio son bajas. Cuando las concentraciones de calcio son adecuadas, se produce la segunda hidroxilación en C-24, en vez de en C-1, para dar un metabolito inactivo.

El 1,25-dihidroxicolecalciferol, o 1,25(OH)D_3, es la forma de la vitamina D con actividad hormonal. Este compuesto se desplaza a las células diana del intestino y de los osteoblastos (células óseas), en donde se une a receptores proteicos que migran al núcleo celular. En el intestino, el complejo hormona-receptor estimula la transcripción, dando lugar a la síntesis de una proteína que estimula la absorción de calcio al torrente sanguíneo. En los osteoblastos, la 1,25(OH)D_3 estimula la captación de calcio para que se deposite en forma de fosfato cálcico.

Vitamina E

La vitamina E, también llamada ***α*-tocoferol**, se identificó inicialmente en los estudios nutricionales como un agente que prevenía la esterilidad en las ratas. Esta vitamina parece tener una función antioxidante, en especial para evitar la agresión de los peróxidos sobre los ácidos grasos insaturados de los lípidos de la membrana (véase también, Capítulo 15). El *α*-tocoferol impide la peroxidación de los ácidos grasos in vitro. Sin embargo, el déficit de vitamina E da lugar a otros síntomas que no se alivian por otros antioxidantes. Así pues, parecen probables otras funciones biológicas de esta vitamina.

Vitamina K

La vitamina K se descubrió inicialmente como una sustancia liposoluble que participaba en la coagulación de la sangre. La vitamina K_1, o **filoquinona**, se encuentra en las plantas; la parte de quinona de esta molécula posee una cadena lateral saturada en gran parte. Otra forma de la vitamina, la vitamina K_2, o **menaquinona**, se encuentra fundamentalmente en los animales y las bacterias. La menaquinona posee una cadena lateral parcialmente insaturada. En los animales, la vitamina K_2 es esencial para la carboxilación de los residuos de glutamato en determinadas proteínas para dar ***γ*-carboxiglutamato**. Esta modificación permite a la proteína unir calcio, fenómeno que es esencial en la cascada de la coagulación de la sangre (que se consideró en el Capítulo 11). Los niños recién nacidos reciben habitualmente inyecciones de vitamina K, debido a que la mayoría de nuestra vitamina K procede de las bacterias intestinales que aún no han colonizado los intestinos de los recién nacidos.

La carboxilación de los residuos de glutamato se produce en otras proteínas que son activas en la movilización o el transporte de calcio. La enzima carboxiladora utiliza la forma reducida de la vitamina K, la hidroquinona. Durante la reacción, la hidroquinona se oxigena a un epóxido de quinona, y esta reacción facilita el ataque del CO_2 sobre el C-4 de un residuo de glutamato, desprotonando ese carbono.

OTROS TERPENOS

Terpeno es una denominación genérica que se aplica a todos los compuestos que se biosintetizan a partir de precursores isoprenos. Así pues, los compuestos que hemos considerado, colesterol, ácidos biliares, esteroides y vitaminas liposolubles, son terpenos; se les presta una especial atención por su gran importancia en el metabolismo animal. Nos referiremos aquí muy brevemente a la amplia gama de otros compuestos terpénicos. Entre ellos se encuentran las hormonas de los insectos y las hormonas de crecimiento de las plantas, así como los transportadores de azúcares ligados a lípidos que hemos visto en el Capítulo 16.

Los terpenos se biosintetizan en última instancia a partir del isopentenil pirofosfato (C_5) y del dimetilalil pirofosfato (C_5). Cuando éstos se combinan para producir el geranil pirofosfato (C_{10}), los terpenos formados se denominan **monoterpenos**. Cuando se forma un compuesto a partir de 1 mol de farnesil pirofosfato (C_{15}), el producto se denomina un **sesquiterpeno**. Los **triterpenos** (C_{30}) se forman a partir de 2 moles de farnesil pirofosfato. El geranilgeranil pirofosfato (C_{20}) produce o bien **diterpenos** (C_{20}) o bien **tetraterpenos** (C_{40}). Los dolicoles y el undecaprenol, que se han presentado en el Capítulo 16, son ejemplos de **poliprenoles** (alcoholes poliisoprenoides), que tienen más de 50 carbonos. En la Figura 19.28 se muestran las estructuras de algunos terpenos frecuentes.

Eicosanoides: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos

Los eicosanoides biológicamente activos, derivados del ácido araquidónico, son las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos.

Llegamos finalmente a una clase de lípidos que se caracterizan por sus potentes propiedades fisiológicas, sus bajas concentraciones en los tejidos, su rápido recambio metabólico y su origen metabólico común. Los más importantes de estos compuestos son las **prostaglandinas**; otras sustancias de esta clase son los **tromboxanos** y los **leucotrienos**. En conjunto se les denomina **eicosanoides**, debido a su origen común a partir de los ácidos grasos poliinsaturados C_{20}, los ácidos eicosaenoicos, en especial el ácido araquidónico, que es el ácido todo-*cis*-5,8,11,14-eicosatetraenoico. Recuérdese del Capítulo 18 que el ácido araquidónico se sintetiza a partir del ácido linolénico. Los ácidos C_{20} relacionados, trienoico y pentaenoico, actúan como precursores menores de algunas prostaglandinas y sustancias emparentadas. Además de los compuestos que se consideran aquí, los ácidos eicosaenoicos son precursores de otra clase de compuestos, los ácidos hidroxieicosaenoicos y los ácidos hidroperoxieicosaenoicos. Estos últimos compuestos son los precursores metabólicos de los leucotrienos. Hay otros compuestos relacionados que proceden de ácidos grasos poliinsaturados más cortos o más largos que los C_{20}, y se ha propuesto el término **oxilipina** como denominación genérica para esta clase de lípidos, englobando todas las longitudes de cadena.

Los eicosanoides biológicamente activos son hormonas de efectos locales y de corta duración.

Las prostaglandinas y los tromboxanos estrechamente relacionados con ellas proceden de una ruta común; existe una ruta diferente que va del ácido araquidónico a los leucotrienos. Como las hormonas, los eicosanoides ejercen efectos fisiológicos específicos sobre las células diana. Sin embargo, se diferencian de la mayoría de las hormonas en que actúan localmente, cerca de sus lugares de síntesis, y se catabolizan de manera extremadamente rápida; se les considera hormonas de acción local. Además, las acciones de una determinada prostaglandina parecen variar en distintos tejidos. Las propiedades biológicas de los eicosanoides han motivado un gran interés por su uso médico y por el empleo de sus análogos.

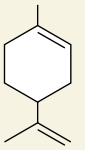
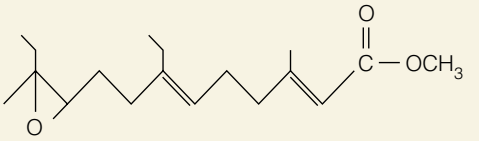
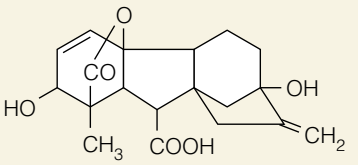
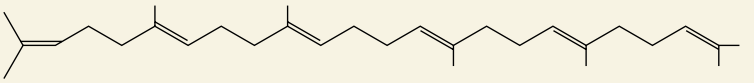
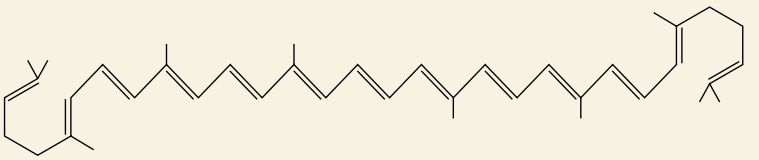
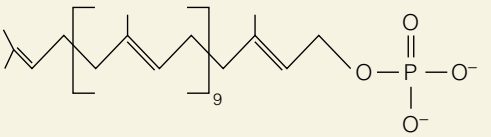
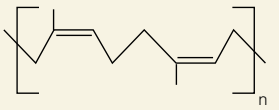
Clase	Ejemplo	Función
Monoterpenos	 **Limoneno**	Responsable del olor característico de los limones
Sesquiterpenos	 **Hormona juvenil I**	Controla la metamorfosis de los insectos
Diterpenos	 **Ácido giberélico**	Hormona de crecimiento de las plantas
Triterpenos	 **Escualeno**	Precursor del colesterol
Tetraterpenos	 **Licopeno**	Pigmento del tomate
Poliprenoles	 **Undecaprenol fosfato**	Transportador de azúcar para la síntesis de oligosacáridos
	 ***cis*-Poliisopreno**	Caucho natural

FIGURA **19.28**

Algunos compuestos terpenos. Estos ejemplos son representativos de una clase muy amplia de productos naturales.

ALGUNOS ASPECTOS HISTÓRICOS

Los capítulos iniciales de mayor importancia en la investigación de las prostaglandinas se escribieron en Suecia. A mediados de los años 1930, Ulf von Euler descubrió que los extractos lipídicos del semen humano contenían compuestos activos que, al inyectarse en animales, estimulaban la contracción o relajación del músculo liso e influían en la presión sanguínea. Dado que se supuso que su origen estaba en la glándula prostática, denominó a estos compuestos *prostaglandinas*. Posteriormente se comprobó que estas sustancias están muy extendidas en los tejidos animales. Las primeras determinaciones estructurales se publicaron a finales de los años 1950, bajo la dirección de Sune Bergström y

Bengt Samuelsson, y las rutas de biosíntesis se describieron en Suecia y en Holanda a mediados de los años 1960.

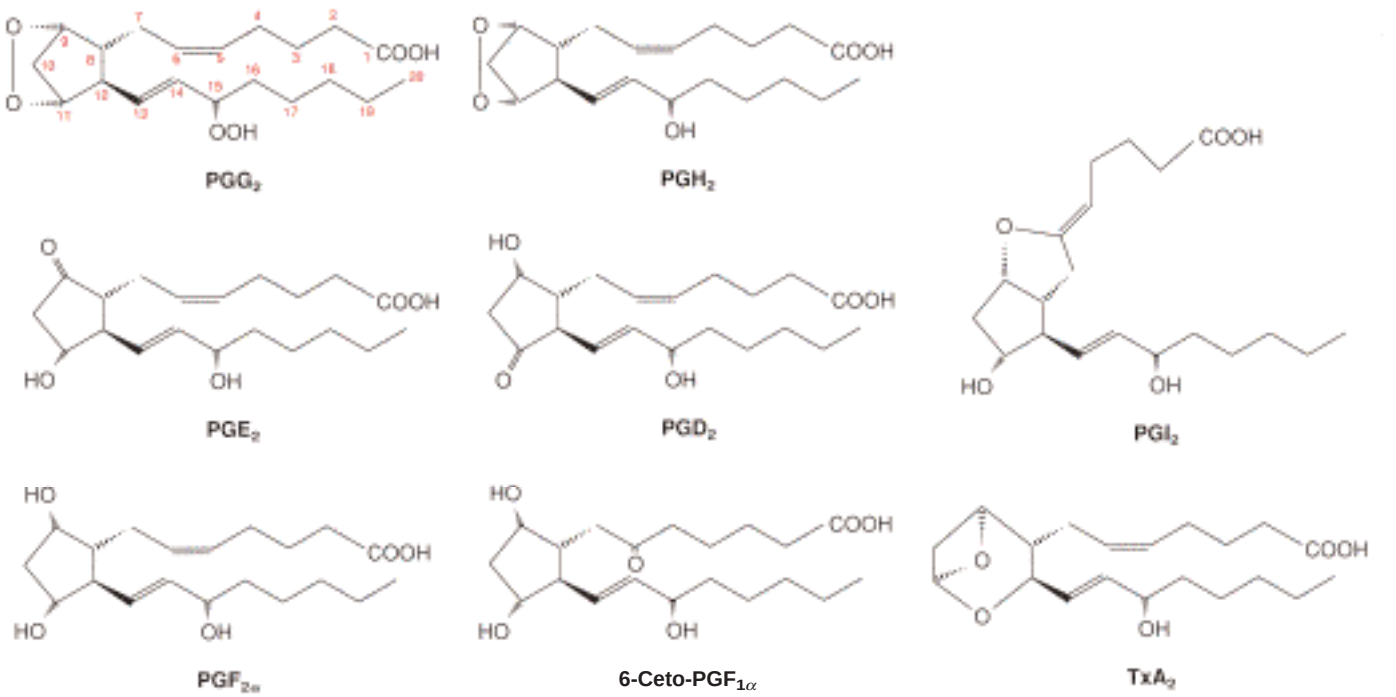
Las propiedades biológicas de las prostaglandinas motivaron un gran interés por parte de la industria farmacéutica, pero los avances iniciales fueron limitados como consecuencia de la baja disponibilidad de estos compuestos. El interés alcanzó un máximo en 1971 con el descubrimiento de que la aspirina inhibe una de las enzimas de la biosíntesis de las prostaglandinas. Actualmente se sabe que esta inhibición constituye el principal lugar de acción de la aspirina y de otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos. Más tarde, durante los años 1970, se descubrieron los tromboxanos y los leucotrienos.

ESTRUCTURA

Las dos primeras prostaglandinas que se aislaron se denominaron prostaglandinas E y F, respectivamente, debido a su solubilidad preferente en éter (E) o en amortiguador fosfato (F por *fosfat*, la palabra sueca). Actualmente denominamos a estos compuestos PGE y PGF, respectivamente. Todas las demás prostaglandinas se designan con una letra, por ejemplo PGA y PGH. Cada prostaglandina posee un anillo de ciclopentano y dos cadenas laterales, con un grupo carboxilo en una cadena lateral. Un subíndice indica el número de dobles enlaces en las dos cadenas. Las prostaglandinas más abundantes, que son las que se sintetizan a partir del ácido araquidónico, contienen dos dobles enlaces; así pues, la PGE_2 sería la prostaglandina E procedente del ácido araquidónico. Por último, en la serie PGF, un subíndice α indica que el grupo hidroxilo de C-9 es *cis* para el grupo 11-hidroxilo, y β significa una configuración *trans*. En la Figura 19.29 se presentan las estructuras de las prostaglandinas más comunes, junto con la del tromboxano A_2 (TxA_2). El TxA_2 se aisló inicialmente de los trombocitos o plaquetas sanguíneas, como un compuesto que estimulaba la agregación plaquetaria, un paso inicial de la coagulación sanguínea. Obsérvese su semejanza estructural con la PGE_2, excepto por el anillo de éter cíclico. Otro tromboxano, el TxB_2, es un producto de la hidrólisis del TxA_2.

FIGURA **19.29**

Estructuras de las principales prostaglandinas y del tromboxano A_2. La figura muestra las prostaglandinas más abundantes, las de la serie 2. Proceden del ácido araquidónico, al igual que el tromboxano A_2. La numeración de los átomos de carbono empieza en el grupo carboxilo, como se muestra para la estructura de la PGG_2.



BIOSÍNTESIS Y CATABOLISMO

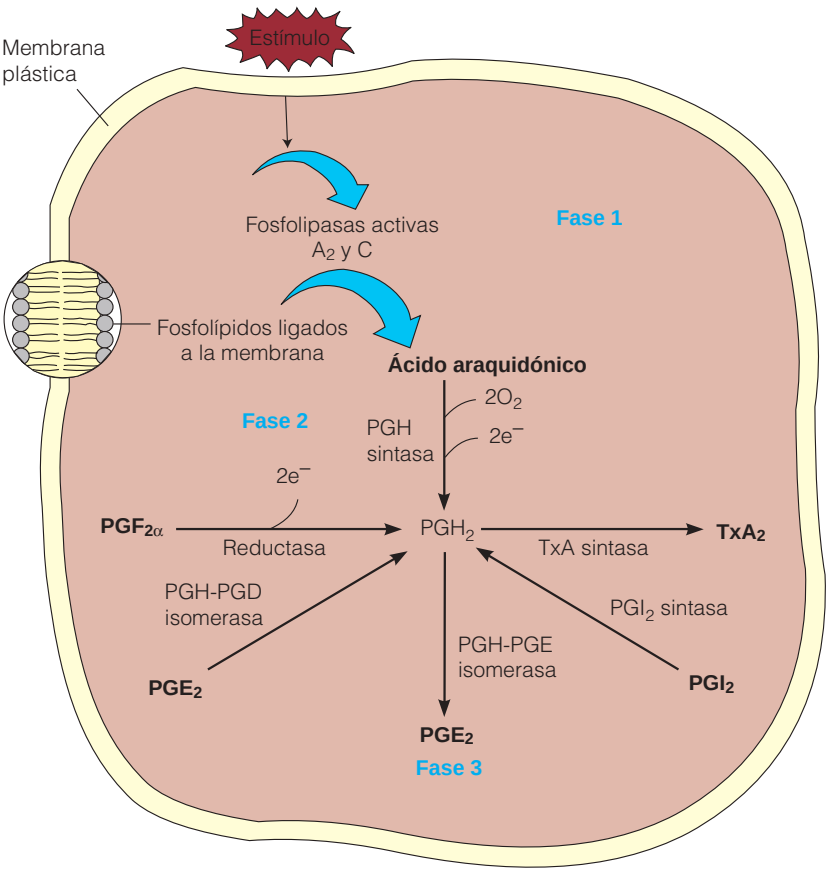
Consideramos aquí únicamente la biosíntesis de la serie 2 de las prostaglandinas. Las prostaglandinas de las series 1 y 3 se sintetizan de manera idéntica, a partir de los ácidos grasos C_{20} relacionados. Las rutas de biosíntesis, que tienen lugar en el retículo endoplásmico, se muestran en la Figura 19.30. Podemos considerar que estas rutas se producen en tres fases diferentes: (1) liberación del ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de la membrana, (2) oxigenación del araquidonato para producir PGH_2, un endoperóxido de prostaglandina que actúa como precursor de otras prostaglandinas, y (3) en función de las enzimas existentes en una células, la conversión de la PGH en otras prostaglandinas o en TxA_2.

La liberación de ácido araquidónico en la fase 1 se produce como consecuencia de estímulos específicos de los tejidos por hormonas como la **bradiquinina** o la adrenalina, o por proteasas como la trombina. Puede producirse una liberación patológica si se alteran las membranas. Así, por ejemplo, la inflamación producida por las picaduras de las abejas se debe probablemente a la liberación de araquidonato estimulada por la proteína **melitina.** La liberación comporta evidentemente la acción de una fosfolipasa A_2 específica sobre la fosfatidilcolina o la fosfatidiletanolamina, dando araquidonato, o la acción de una fosfolipasa C sobre el fosfatidilinositol dando un diacilglicerol, que a su vez sufre una rotura para dar araquidonato libre.

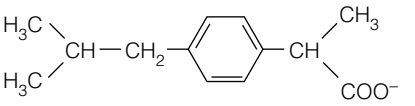
En la fase 2, el araquidonato libre sufre la acción de la **PGH sintasa,** una enzima bifuncional con dos actividades en una única cadena polipeptídica que contiene hemo. La primera, una **ciclooxigenasa,** introduce dos moléculas de O_2, una para formar el anillo y otra para formar un grupo hidroperoxido en C-15. La segunda actividad comporta una reducción de dos electrones del peróxido,

FIGURA **19.30**

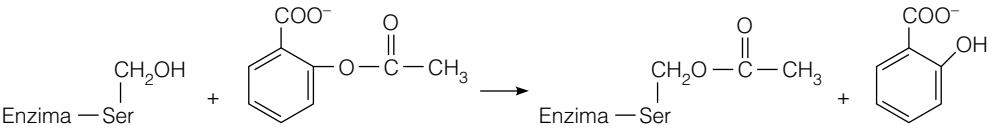
Resumen de las rutas de biosíntesis que conducen a la formación de las principales prostaglandinas y del tromboxano A_2.



para dar PGH_2, con un grupo hidroxilo en C-15, como se muestra en la Figura 19.31. Las células de los mamíferos contienen dos formas distintas de PGH sintasa, denominadas PGHS-1 y PGHS-2 (o Cox-1 y Cox-2, donde Cox se refiere a ciclooxigenasa). Ambas isoformas se modifican de forma covalente y, por tanto, se inactivan por la reacción con la aspirina (ácido acetilsalicílico). Como se muestra, la aspirina acetila un residuo de serina específico, que a su vez bloquea el acceso del ácido graso sustrato al lugar activo.



Ibuprofeno



PGHS **Ácido acetilsalicílico** **PGHS acetilado** **Ácido salicílico**

Las propiedades antiinflamatorias y analgésicas de la aspirina derivan de la inhibición de la PGHS-2. Sin embargo, la inhibición de la PGHS-1 tiene efectos secundarios indeseables sobre el aparato digestivo, entre ellos, la ulceración. Otro fármaco muy utilizado, el **ibuprofeno,** actúa de forma más específica sobre la PGHS-2, pero es un inhibidor menos eficaz que la aspirina. Empleando datos estructurales de las dos isoformas, los farmacólogos moleculares han diseñado recientemente análogos de la aspirina que acilan la PGHS-2 de forma selectiva y éstos tienen las propiedades deseables de la aspirina sin los efectos secundarios. Un fármaco denominado Celebrex, lanzado a finales de 1998 para el alivio del dolor de la artritis, se une 400 veces más fuertemente a la PGHS-2 que a la PGHS-1.

En la fase 3, una serie de enzimas específicas convierten la PGH_2 en otras prostaglandinas y en el tromboxano A_2. Otra ruta conduce desde el araquidonato a los leucotrienos. El leucotrieno C se descubrió inicialmente en la clase de leucocitos denominados polimorfonucleares, y se le dio este nombre por el origen (*leucocitos*) y la estructura de *trieno* (tres dobles enlaces). Tiene un efecto de contracción muscular potente que se cree interviene en la patogenia del asma, como consecuencia de la constricción de las vías respiratorias pequeñas del pulmón. Como se indica en la Figura 19.32, los leucotrienos se forman a partir del ataque inicial sobre el araquidonato de una **lipooxigenasa,** que añade O_2 a C-5, dando ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE). Una deshidratación para dar el epóxido acoplada con la isomerización de los dobles enlaces da el leucotrieno A_4. La hidrólisis del anillo epóxido produce el leucotrieno B_4. La transferencia del grupo tiol del glutatión produce el leucotrieno C_4. Otras modificaciones posteriores de la cadena peptídica (que no se muestran) dan compuestos relacionados, los leucotrienos D y E.

Todos los eicosanoides se metabolizan de manera extraordinariamente rápida, y la mayoría de ellos no superan más que un solo paso por el sistema circulatorio. El pulmón es un lugar importante del catabolismo de las prostaglandinas. Las múltiples rutas catabólicas parecen iniciarse siempre con la conversión en derivados 15-ceto-13,14-dihidro.

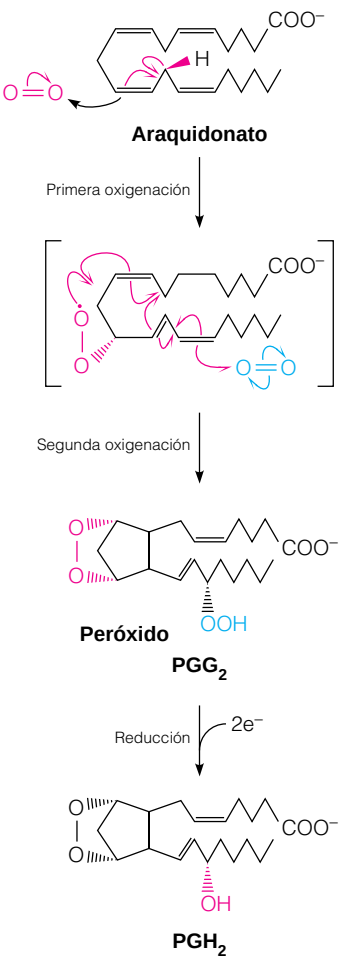


FIGURA **19.31**

Mecanismo probable de la ciclooxigenación del ácido araquidónico por la acción de la PGH sintasa. Este mecanismo de radicales libres implica sólo desplazamientos de un electrón.

ACCIONES BIOLÓGICAS

Como se ha indicado antes, las prostaglandinas y los productos relacionados pueden considerarse hormonas de acción local. Evidentemente, actúan a través de la unión a receptores celulares específicos. Es relativamente poco lo que sabemos acerca de sus efectos posteriores a nivel molecular, aunque está claro que existen interacciones con el metabolismo de los nucleótidos cíclicos. La PGE estimula la adenilato ciclasa en algunas células, y se ha descrito que la PGF_2 ele-

La reacción de la ciclooxigenasa, uno de los primeros pasos en la síntesis de los eicosanoides, es el objetivo de la acción de la aspirina.

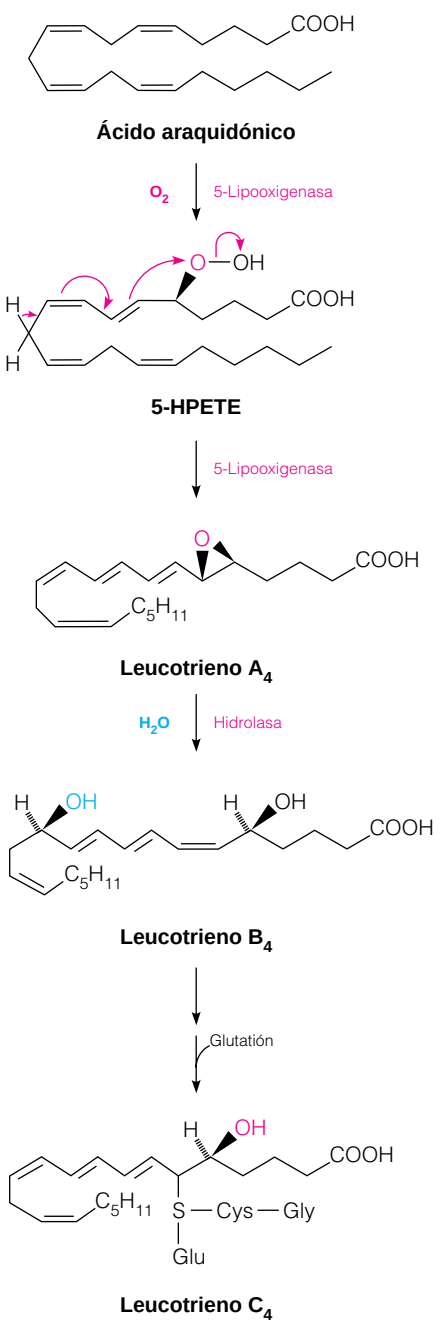


FIGURA **19.32**
Biosíntesis de los leucotrienos.

va las concentraciones de GMP cíclico en las células diana. Aunque los receptores para estos compuestos no se han caracterizado aún de manera detallada, en la actualidad se están estudiando clínicamente varios compuestos antiinflamatorios que actúan evidentemente uniéndose a receptores del leucotrieno B_4. Diversos eicosanoides desempeñan un papel evidente en el proceso de la inflamación, como lo demuestra el hecho de que los efectos antiinflamatorios de la aspirina deriven, al menos en parte, de la inhibición de la ciclooxigenasa.

Otros efectos biológicos son la inhibición de la agregación plaquetaria y la relajación de las arterias coronarias por la PGI_2, efectos que son contrarrestados por el TxA_2. Parece probable que la acción de la PGI_2 pueda evitar la unión de las plaquetas a las paredes arteriales. En las áreas dañadas, la inhibición de la síntesis de PGI_2 podría permitir la unión del TxA_2 y causar la agregación plaquetaria, con lo que se fomentaría la formación de un coágulo.

Aunque es poco lo que se sabe hasta el momento sobre las acciones moleculares de los eicosanoides, el conocimiento de su fisiología se está aplicando de varias formas útiles. Algunos estudios recientes indican que la administración de aspirina a largo plazo reduce el riesgo de ataques cardíacos. Presumiblemente, este efecto esté relacionado con la reducción de la síntesis de eicosanoides (especialmente TxA_2) que induce la agregación plaquetaria, un paso inicial en la formación del coágulo que participa en el infarto de miocardio. Debido a que la liberación de prostaglandinas interviene en la contracción de la musculatura uterina que se produce en el parto, la $PGF_{2\alpha}$ se ha utilizado para inducir el parto, en caso necesario, en las madres que han llegado a término. En relación con este efecto, cabe citar que la $PGF_{2\alpha}$ inhibe la secreción de progesterona y la regresión del cuerpo lúteo. La $PGF_{2\alpha}$ y la PGE_2 se utilizan también para inducir el aborto en el segundo trimestre o para inducir el parto en caso de muerte fetal. Los derivados de prostaglandinas se utilizan en la cría de animales, para hacer coincidir el celo de un grupo de animales hembras. La PGI_2 se emplea para reducir el riesgo de coagulación de la sangre durante las operaciones con derivación cardiopulmonar. La PGE_1, un producto vasodilatador, está siendo estudiado como tratamiento de diversos trastornos circulatorios, y algunas formas de PGE, que inhiben también la secreción gástrica, se utilizan en el tratamiento experimental de las úlceras de estómago. La industria farmacéutica está trabajando intensamente en la obtención de análogos de las prostaglandinas de mayor duración.

RESUMEN

Los glicerofosfolípidos, los lípidos predominantes de las membranas, se sintetizan mediante rutas que parten del ácido fosfatídico y con intermediarios activados mediante la reacción con la citidina trifosfato. La redisposición de las cadenas laterales de los ácidos grasos de los fosfolípidos, el intercambio de grupos de cabeza polares y las acciones de las proteínas de intercambio de fosfolípidos, que insertan los fosfolípidos en las membranas, son procesos que intervienen en la conformación de la composición lipídica de las diversas membranas. La *S*-adenosilmetionina es el donador de grupos metilo para la síntesis de fosfatidilcolina.

Los glucoesfingolípidos se forman a partir de ceramida y la adición sucesiva de azúcares mediante la acción de glucosiltransferasas y azúcares ligados a nucleótidos. La ruta para el recambio metabólico de estos compuestos en el tejido nervioso se determinó mediante el análisis de los productos que se acumulaban en las células de las personas con defectos enzimáticos de la ruta.

Todos los compuestos esteroideos y, de hecho todos los compuestos isoprenoides, se sintetizan a partir de acetato, mediante una ruta que pasa por el áci-

do mevalónico de seis carbonos y en la que intervienen intermediarios C_5, C_{10} y C_{15}. La ciclación del hidrocarburo C_{30} escualeno da lugar al colesterol, que es el precursor de todos los ácidos biliares y las hormonas esteroideas. La síntesis de las hormonas esteroideas se produce en las glándulas endocrinas y comporta hidroxilaciones, reacciones de oxidorreducción y reacciones de fragmentación de cadenas laterales. La síntesis de todas las hormonas esteroideas se produce a partir de colesterol a través de la pregnenolona.

El ácido araquidónico y otros ácidos grasos insaturados C_{20} son los precursores de hormonas de acción local, fisiológicamente potentes, que incluyen las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos. Aunque no se conocen aún a nivel molecular las acciones de estos reguladores biológicos, el metabolismo de estos eicosanoides proporciona objetivos terapéuticos para los fármacos que se utilizan en el control de la inflamación, la coagulación de la sangre y la secreción gástrica y en la manipulación de los procesos reproductivos de diversas formas.

BIBLIOGRAFÍA

Referencias generales

Johnson, D. R., R. S. Bhatnagar, L. J. Knoll y J. I. Gordon (1994) Genetic and biochemical studies of protein *N*-myristoylation. *Annu. Rev. Biochem.* 63:869-914. Una revisión contemporánea de una reacción de modificación de proteínas posterior a la traducción.

Norman, A. W. y G. Litwack (1987) *Hormones.* Academic Press, Orlando, Fla. Un libro de texto muy claro de endocrinología bioquímica, con buenas secciones sobre el metabolismo esteroideo.

Vance, D. E. y J. E. Vance, eds. (1985) *Biochemistry of Lipids and Membranes*, Benjamin/Cummings, Redwood City, Calif. Este libro de múltiples autores contiene varias revisiones detalladas. Son especialmente relevantes para este capítulo los siguientes artículos: Lipid metabolism in prokaryotes, pp. 73-115; Phospholipid metabolism in eukaryotes, pp. 242-270; Metabolism, regulation, and function of ether-linked glycerolipids, pp. 271-298; Sphingolipids, pp. 361-403; The eicosanoids, pp. 325-360.

Vance, J. E. (1998) Eukaryotic lipid-biosynthetic enzymes: The same but not the same. *Trends Biochem. Sci.* 23:423-428. Un artículo de revisión que propone que las isoformas de algunas enzimas que sintetizan lípidos participan en los procesos de compartimentalización.

Metabolismo de los fosfolípidos

Chao, W. y M. S. Olson (1993) Platelet-activating factor: Receptors and signal transduction. *Biochem. J.* 292:617-629. Una descripción de una de las sustancias fisiológicamente más potente que se conocen.

Dowhan, W. (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* 66:199-232. Se está haciendo posible, utilizando genética de bacterias y hongos, enumerar funciones específicas de los lípidos de estructura muy semejante.

Downes, C. P (1998) Lipids in signaling and recognition. *Biochim. Biophys. Acta* 1436:1-261. Un número especial del "BBA" dedicado por completo a los lípidos y a la transducción de señal.

Gelb, M. H., M. K. Jain, A. M. Hanel y O. G. Berg (1995) Interfacial enzymology of glycerolipid hydrolases: Lessons from secreted phospholipase A_2. *Annu. Rev. Biochem.* 64:654-688. Las enzimas que actúan sobre sustratos lipídicos en las membranas operan en interfases y siguen expresiones cinéticas bastante diferentes.

Kuroki, Y. y D. R. Voelker (1994) Pulmonary surfactant proteins. *J. Biol. Chem.* 269:25943-25946. Descripción de las proteínas que interactúan con dipalmitoilfosfatidilcolina en su papel de agente tensioactivo pulmonar.

Moolenaar, W. H. (1995) Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J. Biol. Chem.* 270:12949-12952. Descripción de una de las moléculas lipídicas de señalización identificada más recientemente.

Prescott, S. M. (1997) A thematic series on phospholipases. *J. Biol. Chem.* 272:15043. Introducción de una serie de siete mini-revisiones de la biología y la bioquímica de las fosfolipasas.

Snyder, F. (1995) Platelet-activating factor and its analogs: Metabolic pathways and related intracellular processes. *Biochim. Biophys. Acta* 1254:231-249. Una revisión actual de este potente regulador.

Udenfriend, S. y K. Kodukula (1995) How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* 64:563-591. Revisión de este tipo de modificación lipídica de las proteínas descubierto recientemente.

van den Bosch, H., R. B. H. Schutgens, R. J. A. Wanders y J. M. Tager (1992) Biochemistry of peroxisomes. *Annu. Rev. Biochem.* 62:157-197. Estos orgánulos realizan diversas rutas del metabolismo lipídico, en especial las de síntesis de los fosfolípidos éteres.

Wilson, D. W., S. W. Whiteheart, L. Orci y J. E. Rothman (1991) Intracellular membrane fusion. *Trends Biochem. Sci.* 16:334-337. ¿De qué manera dan lugar los fenómenos de fusión de membrana a la especificidad de la composición de las membranas? Esta mini-revisión describe los enfoques iniciales a esta cuestión.

Wirtz, K. W. A. (1991) Phospholipid transfer proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 60:73-99. Una revisión que describe un proceso importante que da forma a las membranas.

Esfingolípidos

Hoffmann, K. y V. M. Dixit (1998) Ceramide in apoptosis—does it really matter? *Trends Biochem. Sci.* 23:374-377. Un artículo bre-

ve que cuestiona las pruebas que adjudican un papel de señalización a la ceramida.

Moser, H. W. (1995) Ceramidase deficiency: Farber lipogranulomatosis. En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7ª ed., editado por C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle, pp. 2589-2600. McGraw-Hill, Nueva York. El primero de 10 artículos sobre las enfermedades de almacenamiento de lípidos en esta serie de tres volúmenes sobre las enfermedades metabólicas hereditarias.

van Echten, G. y K. Sandhoff (1993) Ganglioside metabolism: Enzymology, topology, and regulation. *J. Biol. Chem.* 268:5341-5344. Una mini-revisión de la biología celular y la bioquímica de estos procesos.

Esteroides e isoprenoides

Gelb, M. H. (1997) Protein prenylation, et cetera: Signal transduction in two dimensions. *Science* 275:1750-1751. Un artículo de "Perspectivas" en *Science* que considera el significado de los hallazgos recientes en este campo.

Oliff, A. (1999) Farnesyltransferase inhibitors: Targeting the molecular basis of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1423:C19-C30. La información sobre la prenilación de proteínas tiene consecuencias prácticas importantes.

Simons, S. S., Jr. (1996) Environmental estrogens: Can two "Alrights" make a wrong? *Science* 272:1451. Un artículo de noticias, con referencias, que trata los desorganizadores endocrinos.

Tabernero, L., D. A. Bochar, V. W. Rodwell y C. V. Stauffacher (1999) Substrate-induced closure of the flap domain in the ternary complex structures provides insight into the mechanism of catalysis by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7167-7171. El conocimiento del mecanismo de esta enzima importante procede de la cristalografía.

Vitaminas liposolubles

Brigelius-Flohé, R. y M. G. Traber (1999) Vitamin E: Function and metabolism. *FASEB J.* 13:1145-1156. Revisa las propiedades antioxidantes y otras más de esta vitamina.

Dowd, P., R. Hershline, S. W. Ham y S. Naganathan (1995) Vitamin K and energy transduction: A base strength amplification mechanism. *Science* 269:1684-1691. Explicación del mecanismo sorprendentemente complejo de la síntesis de carboxiglutamato.

Means, A. L. y L. J. Gudas (1995) The roles of retinoids in vertebrate development. *Annu. Rev. Biochem.* 64:201-233. Revisión de las actividades de los compuestos relacionados con la vitamina A en la regulación de los genes.

Eicosanoides

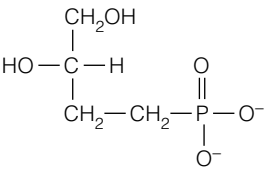
Needleman, P., J. Turk, B. A. Jakschik, A. R. Morrison y J. B. Lefkowith (1986) Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 55:69-102. Varias moléculas reguladoras importantes, como las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos, proceden metabólicamente del ácido araquidónico. En esta revisión se cubre este campo de manera eficaz y completa.

Samuelsson, B. y C. D. Funk (1989) Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B_4. *J. Biol. Chem.* 264:19469-19472. Esta mini-revisión describe el progreso realizado en la clonación de genes de estas enzimas.

Smith, W. L., R. M. Garavito y D. L. DeWitt (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases) -1 and -2. *J. Biol. Chem.* 271:33157-33160. Una revisión reciente de la estructura y función de las primeras enzimas de la síntesis de eicosanoides.

PROBLEMAS

1. ¿Sería de prever que la reacción catalizada por la cardiolipina sintasa fuera fuertemente exergónica o fuertemente endergónica? Explique su razonamiento.
2. *La fosfatidilserina (PS) se considera un intermediario de la biosíntesis de la fosfatidiletanolamina (PE) en *E. coli*, pero la PS no se encuentra en cantidades apreciables en los fosfolípidos de la membrana de *E. coli*. Dado que la PS debe estar presente en la membrana para actuar como un intermediario, ¿cómo podría explicarse esta falta de acumulación en una cantidad significativa? ¿Qué tipos de experimentos podrían poner a prueba la explicación que propone?
3. La melitina es una proteína del veneno de las abejas que activa la fosfolipasa A_2. ¿Cómo podría contribuir este efecto a producir la inflamación local que causan las picaduras de abeja?
4. ¿Qué cabría prever que ocurriera a las concentraciones de mevalonato del plasma humano si una persona pasara de una alimentación con carne a una alimentación vegetariana?
5. Escriba una ecuación equilibrada para la síntesis de *sn*-1-estearoil-2-oleil-glicerofosforilserina, partiendo de glicerol, los ácidos grasos involucrados y serina.
6. Si se administrara a ratas mevalonato marcado con ^{14}C en el carbono carboxilo, ¿qué carbonos del colesterol quedarían marcados?
7. ¿Qué paso del metabolismo lipídico cabría prever que se viera afectado por el ácido 3,4-dihidroxibutil-1-fosfónico (que se muestra aquí)? Explique su respuesta.



8. *Se inyectó a ratas [^{14}C]metionina marcada en el metilo con una actividad específica de 2.0 milicurios por milimol. Se sacrificó a los animales al cabo de seis horas. Se aisló la fosfatidilcolina del hígado y se encontró que tenía una actividad específica de 1.5 milicurios por milimol. Calcule las proporciones de fosfatidilcolina sintetizadas a través de la ruta de la fosfatidilserina y a través de la ruta que parte de la colina libre. ¿Qué información adicional necesitaría para que los valores calculados reflejaran la contribución real de estos procesos?
9. Identifique una ruta para la utilización de los cuatro carbonos del acetoacetato en la biosíntesis del colesterol. Lleve la ruta hasta llegar a la reacción determinante de la velocidad en la biosíntesis del colesterol.
10. Explique por qué un déficit de la 21-hidroxilasa esteroidea da lugar a una producción excesiva de esteroides sexuales (andrógenos y estrógenos).
11. El *cis*-vacenato es un ácido graso insaturado de 18 carbonos que es abundante en los lípidos de la membrana de *E. coli*.

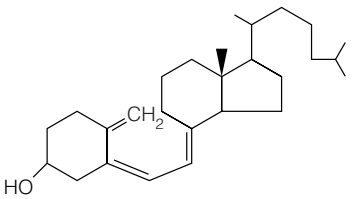
Proponga una ruta metabólica para la síntesis de este ácido graso, basándose en el hecho de que el ácido esteárico, el ácido graso C_{18} análogo saturado, está prácticamente ausente de los lípidos de *E. coli*.

12. La síntesis de la fosfatidilcolina a partir de fosfatidiletanolamina se produce a través de tres reacciones de metilación sucesivas dependientes de AdoMet. ¿Cómo podría determinar experimentalmente si estas tres reacciones están catalizadas por la misma enzima o por tres enzimas diferentes?
13. Describa brevemente de qué manera controla el AMP cíclico la síntesis de fosfolípidos.
*14. Suponiendo que todos los compuestos terpenos se sintetizan por la ruta del HMG-CoA/mevalonato, elija un terpeno simple (limoneno, retinol, filoquinona o similar) y proponga una ruta para su síntesis a partir de isopentenil pirofosfato y dimetilalil pirofosfato.
15. Cada estructura de la columna A está identificada correctamente por un término de la columna B. Cada descripción de la columna C es adecuada para uno de los compuestos de A y de B, pero con un error deliberado en cada proposición. Rellene el cuadro siguiente emparejando cada estructura, nombre y frase descriptiva y corrija cada frase cambiando una o dos palabras.

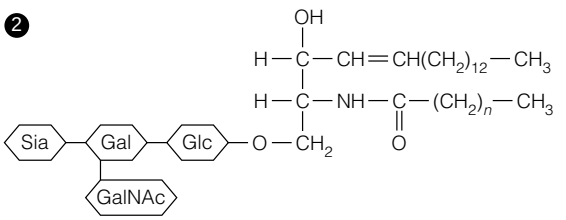
A	1	2	3	4	5	6
B						
C						

A

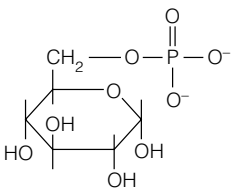
❶



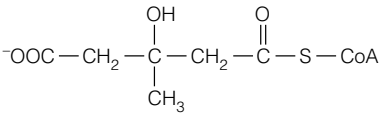
❷



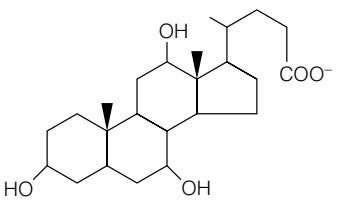
❸



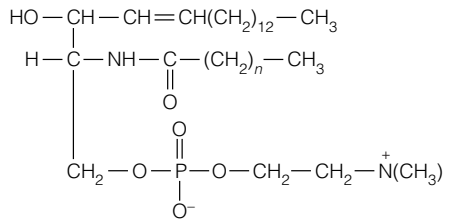
❹



❺



❻



B

1. Glucosa-6-fosfato
2. Escualeno
3. Colecalciferol
4. *N*-Acetilglucosamina
5. Esfingomielina
6. Colesterol
7. Gangliósido de Tay-Sachs
8. Acetoacetil-CoA
9. 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA
10. Ácido cólico

C

1. Glicerofosfolípido abundante en la vaina de mielina que rodea las células nerviosas
2. Sintetizado a partir del colesterol, emulsiona los triacilgliceroles en los quilomicrones
3. Producto de la reacción que controla principalmente la biosíntesis de colesterol
4. Se acumula en el hígado produciendo un déficit grave de glucógeno en la enfermedad de von Gierke, la primera enfermedad conocida de almacenamiento de glucógeno
5. Se acumula en las membranas celulares debido a un defecto de la biosíntesis de glucolípidos
6. Requiere radiación UV para su rotura a 7-deshidrocolesterol

CAPÍTULO 20

Metabolismo de los compuestos nitrogenados: principios de la biosíntesis, la utilización y el recambio

HASTA AHORA NUESTRO ESTUDIO DEL METABOLISMO SE HA INTERESADO fundamentalmente por los compuestos que pueden degradarse por completo a dióxido de carbono y agua, es decir, los compuestos que sólo contienen carbono, hidrógeno y oxígeno. Pasamos ahora a los compuestos que contienen nitrógeno: los aminoácidos y sus derivados, los nucleótidos, y los polímeros ácidos nucleicos y proteínas. Este capítulo y los dos siguientes están dedicados al metabolismo de los compuestos nitrogenados de bajo peso molecular (Figura 20.1). El metabolismo de los aminoácidos específicos se presenta en el Capítulo 21, y el metabolismo de los nucleótidos se aborda en el Capítulo 22. Los Capítulos 24-28 tratan la forma en que se utilizan estos compuestos para la biosíntesis de las proteínas y de los ácidos nucleicos. Dado que la disponibilidad biológica de nitrógeno es limitada, y puesto que la degradación de los compuestos nitrogenados conduce a menudo a productos tóxicos, en esta parte del escenario bioquímico encontraremos algunos principios metabólicos nuevos.

La existencia de 20 aminoácidos diferentes en las proteínas implica la existencia de 20 rutas de biosíntesis y 20 rutas de degradación. Aunque a primera vista esto puede resultar intimidatorio, las características comunes de las rutas de diversos aminoácidos deben facilitar la tarea de aprendizaje. No obstante, más importante que muchos de los detalles de la biosíntesis y la degradación, son las numerosas funciones de los aminoácidos, aparte de las de constituyentes de las proteínas, entre ellas sus funciones como precursores de hormonas, vitaminas, coenzimas, porfirinas, pigmentos y neurotransmisores.

Los Capítulos 20-22 también señalan lo mucho que hemos aprendido a partir de las mutaciones que se producen de manera natural en el ser humano y las generadas en el laboratorio en células en cultivo o en bacterias. Mientras que una mutación que inactiva una enzima de una de las rutas centrales de generación o de almacenamiento de energía es probable que sea mortal y que, por tanto, no se exprese en las personas vivas, las mutaciones que afectan al metabolismo de los aminoácidos con frecuencia no resultan mortales y *sí* se encuentran en los seres humanos vivos. Las consecuencias clínicas de estas mutaciones son con frecuencia trágicas, pero estas enfermedades metabólicas hereditarias han aumentado en gran manera nuestro conocimiento de la bioquímica humana.

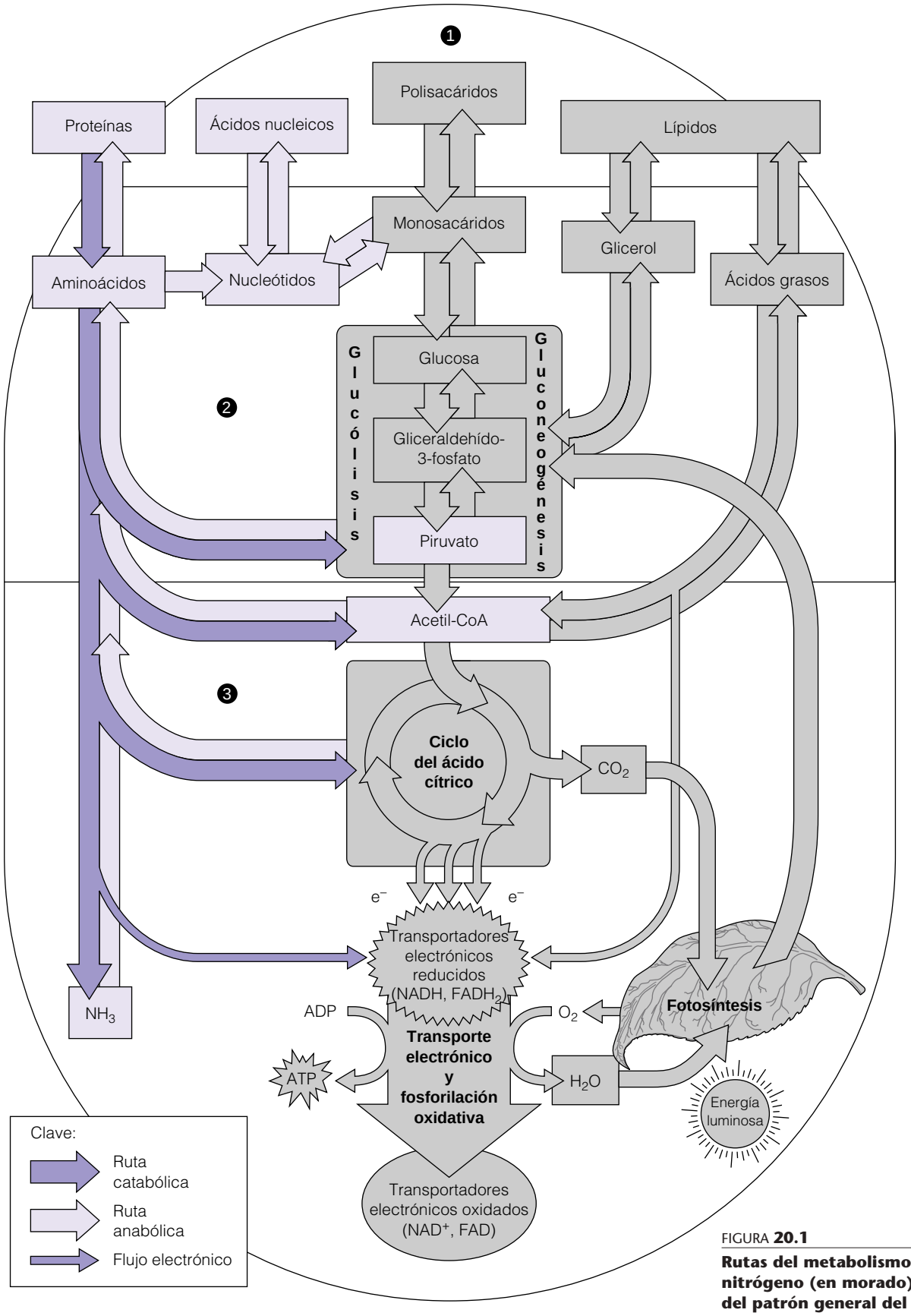


FIGURA **20.1**

Rutas del metabolismo del nitrógeno (en morado) dentro del patrón general del metabolismo intermediario.

Utilización del nitrógeno inorgánico: ciclo del nitrógeno

Dado que son pocos los organismos que pueden utilizar el N_2 del aire, y muchos suelos tienen un contenido bajo de nitrato, la biodisponibilidad del nitrógeno limita el crecimiento de la mayor parte de los organismos.

Para muchos organismos, el crecimiento y la reproducción están limitados por la disponibilidad del nitrógeno utilizable, que a su vez está limitada por la capacidad de los organismos para utilizar diferentes formas inorgánicas del nitrógeno. Todos los organismos pueden convertir el amoníaco (NH_3) en compuestos de nitrógeno orgánicos, es decir, sustancias que contienen enlaces C—N. Sin embargo, no todos los organismos pueden sintetizar amoníaco a partir de las formas mucho más abundantes de nitrógeno inorgánico, el gas nitrógeno (N_2), el componente más abundante de la atmósfera terrestre, y el ion nitrato (NO_3^-), una sustancia del suelo esencial para el crecimiento de la mayoría de las plantas. La reducción del N_2 a NH_3, denominada **fijación biológica del nitrógeno,** la realizan tan sólo determinados microorganismos, a veces en una relación simbiótica con las plantas. La reducción del NO_3^- a NH_3 es, en cambio, un proceso muy difundido entre las plantas y los microorganismos.

Igual que cuando se considera cualquier recurso limitado, es útil pensar sobre el metabolismo del nitrógeno en términos de economía, la **economía del nitrógeno,** que se centra en cuestiones de aporte, demanda, recambio, reutilización, crecimiento y mantenimiento de un estado estacionario. En la biosfera se mantiene un equilibrio entre las formas inorgánicas totales y las formas orgánicas totales de nitrógeno. La conversión del nitrógeno inorgánico en orgánico, que se inicia con la fijación del nitrógeno y la reducción del nitrato, se contrarresta por el catabolismo, la **desnitrificación** y la desintegración (Figura 20.2). El catabolismo produce amoníaco y diversos productos finales orgánicos nitrogenados, que pueden metabolizarse a su vez por diversas bacterias: las especies *Nitrosomonas* oxidan el amoníaco para producir nitrito (NO_2^-), y las especies *Nitrobacter* oxidan el nitrito a nitrato. Estas oxidaciones generan energía biológica, de la misma forma que otros organismos obtienen energía de la oxidación de los hidratos de carbono o las grasas a CO_2. Otras bacterias, las **bacterias desnitrificantes,** catabolizan el amoníaco para dar lugar a N_2. Debido a la toxicidad del amoníaco, hay un gran interés en utilizar las bacterias desnitrificantes y sus enzimas en la **biorremediación,** el uso de los organismos vivos para purificar y destoxificar los residuos ambientales de la actividad humana, como los de la fabricación, o en la eliminación de residuos. Nuestro interés

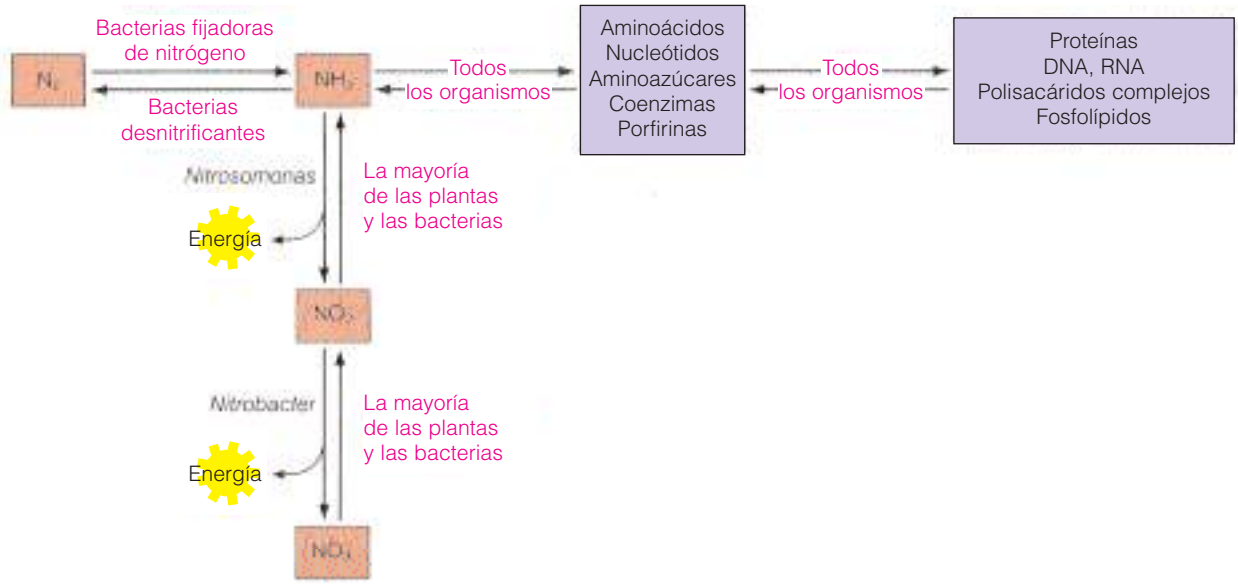


FIGURA **20.2**

Relaciones entre el metabolismo del nitrógeno inorgánico y orgánico. Los compuestos nitrogenados inorgánicos se indican de color marrón, y los compuestos nitrogenados orgánicos en morado. La interconversión de N_2, nitrato y amoníaco está limitada en la biosfera, pero se mantienen unas concentraciones de estado estacionario de estas especies moleculares. Todos los organismos pueden utilizar el amoníaco para la biosíntesis, y es un producto metabólico final importante.

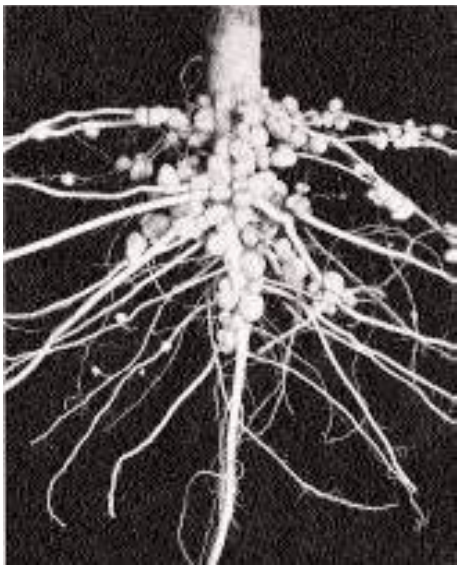


FIGURA **20.3**

Lugar de fijación del nitrógeno en los nódulos simbióticos de las raíces. Esta raíz de una planta de soja está infectada por bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium*.

Cortesía de Nitragin Company.

aquí es el empleo del nitrógeno para la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos, por lo que en el resto de este apartado trataremos sobre la síntesis del amoníaco a partir de N_2 y a partir del ion nitrato.

FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO

Aunque el gas nitrógeno constituye aproximadamente un 80% de la atmósfera de la Tierra, su reducción a amoníaco se produce en un número relativamente limitado de sistemas vivos: algunas bacterias del suelo, de vida libre, como *Klebsiella* y *Azotobacter*, las cianobacterias (algas verde-azuladas), y los nódulos simbióticos en las raíces de las plantas leguminosas, como las habas o la alfalfa, infectadas por determinadas bacterias, especialmente del género *Rhizobium* (Figura 20.3). La bacteria infectante adopta una forma modificada, denominada **bacteroide,** en el interior de las células de las plantas infectadas. Algunos árboles, como el aliso, forman también nódulos fijadores de nitrógeno y tienen, por tanto, esta capacidad.

Dado que la disponibilidad de nitrógeno es el factor que limita la fertilidad de la mayor parte de los suelos, el conocimiento de la fijación biológica del nitrógeno está directamente relacionado con el aumento del aporte de alimento en el mundo. La molécula de N_2 con un enlace triple, $N{\equiv}N$, que tiene una energía de enlace de aproximadamente 940 kJ/mol, es extraordinariamente difícil de reducir. Industrialmente, la reducción se efectúa mediante el proceso de Haber, una hidrogenación catalítica de bajo rendimiento que se realiza a temperatura y presión muy altas. Este proceso se utiliza en la fabricación de fertilizantes basados en el amoníaco. El interés por las características moleculares de la fijación biológica del nitrógeno ha procedido en gran parte de la esperanza de sustituir este proceso con un gran gasto de energía por un medio de producción de amoníaco que pueda tener lugar en condiciones más suaves.

Formalmente, la fijación del nitrógeno puede compararse con la fotosíntesis. Tanto el N_2 como el CO_2 son compuestos inorgánicos estables, cuya reducción requiere energía y electrones de potencial bajo, transportadores electrónicos de E'_0 muy bajo. Como vimos en el Capítulo 17, la fotosíntesis utiliza la luz para generar tanto energía (mediante la fotofosforilación) como electrones de potencial bajo (como ferredoxina). No está claro aún si para la fijación del nitrógeno se utilizan mecanismos comparables, puesto que las enzimas que intervienen son extremadamente sensibles al oxígeno y sólo pueden estudiarse en condiciones anaerobias. El principal motivo por el que puede fijarse nitrógeno en los nódulos de las raíces de las plantas infectadas con *Rhizobium* es que los nódulos contienen una proteína abundante, denominada **leghemoglobina,** que mantiene un medio anaerobio al fijar todo el O_2 que llega al nódulo y presentándolo a las enzimas respiratorias de una forma bastante similar al comportamiento de la mioglobina en los animales.

$$N_2 + 3H_2 \xrightarrow[450°C,\ 270\ atm]{\text{catalizador}} 2NH_3$$

El proceso de Haber

Los detalles del mecanismo de la fijación del nitrógeno parecen ser bastante parecidos en las diversas especies examinadas hasta la fecha. En los estudios realizados en *Klebsiella pneumoniae*, la estequiometría de la reacción global es la siguiente:

$$N_2 + 8e^- + 16ATP + 16H_2O \longrightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i + 8H^+$$

Aunque presentamos una ecuación equilibrada, no se ha establecido aún el número exacto de moléculas de ATP de este proceso; en cualquier caso, es necesaria una gran cantidad de ATP. El ATP se genera a través de rutas de producción de energía del organismo, principalmente el catabolismo de los hidratos de carbono. Los electrones para la reducción del N_2 proceden de transportadores de po-

tencial bajo, como la ferredoxina o la flavodoxina, una flavoproteína de potencial bajo. El hidrógeno es un producto secundario de la reducción del nitrógeno. Algunas especies que fijan nitrógeno son capaces de "reciclar" este hidrógeno, para generar electrones de potencial bajo para nuevos ciclos de reducción del N_2.

El sistema enzimático responsable de la reducción del N_2, denominado **complejo nitrogenasa,** está formado por dos proteínas distintas. Como se indica en la Figura 20.4, una proteína, denominada **componente I, nitrogenasa** o **proteína con molibdeno-hierro,** cataliza la reducción del N_2, y la otra, de-

Los sistemas de fijación del nitrógeno mejor conocidos utilizan una proteína con hierro, una proteína con hierro-molibdeno, y la hidrólisis de una cantidad grande de ATP.

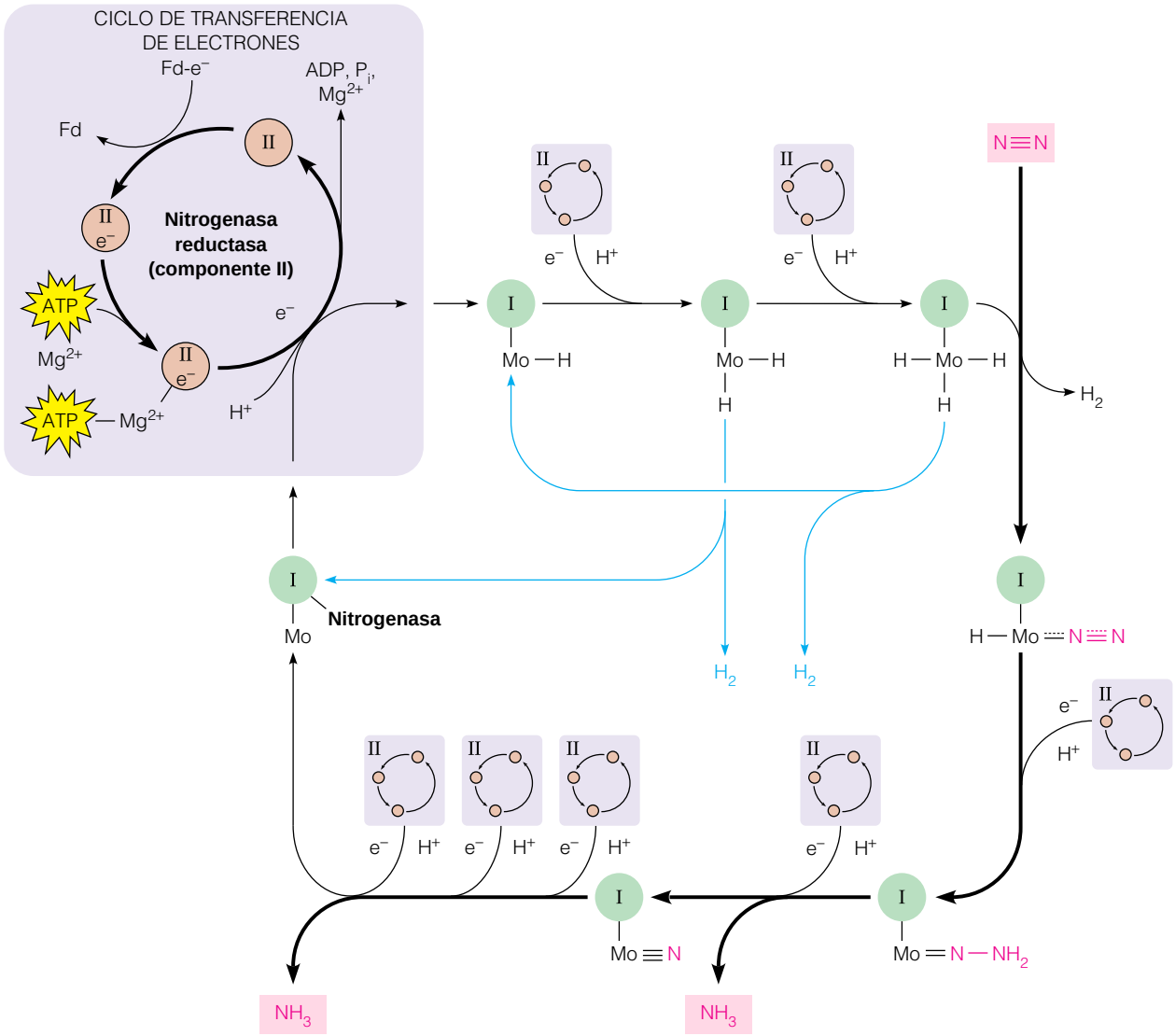
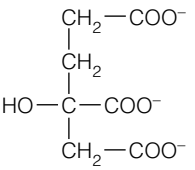


FIGURA **20.4**

Representación esquemática de la fijación de nitrógeno. El componente I (verde) es la nitrogenasa, una proteína con molibdeno-hierro. El componente II (marrón con un fondo morado claro) es la nitrogenasa reductasa, o proteína con hierro. El componente I cataliza la reducción del N_2 (que se muestra antes de la reducción en el ángulo superior derecho) y se reduce, a su vez, por el componente II. La transferencia de H^+ y de un electrón desde el componente II al componente I (que se muestra con mayor detalle en el recuadro agrandado de color morado claro) se produce ocho veces durante la reducción de una molécula de N_2. Fd-e^-, el donador electrónico que reduce el componente II, es la ferredoxina (en *Rhizobium*) o la flavodoxina (en *Klebsiella*). Se cree que la unión del ATP al componente II reducido genera una conformación alterada del componente II, con un potencial de reducción muy bajo. La transferencia del electrón del componente II reducido al componente I se acompaña de la vuelta del componente II a un estado relajado y la separación del ATP unido. Estas reacciones generan formas de mono, di y trihidruro de FeMo-co (posiblemente con el H no unido directamente al Mo) unidas al componente I. La unión del N_2 al Mo se produce simultáneamente con la liberación de dos hidrógenos unidos, en forma de H_2. El hidrógeno puede también liberarse de los di y trihidruros (flechas azules).

Conceptos utilizados por cortesía de Harold J. Evans.



Homocitrato

nominada **componente II, nitrogenasa reductasa** o **proteína con hierro,** transfiere los electrones desde la ferredoxina o la flavodoxina al componente I. Ambas proteínas (componente I y componente II) contienen grupos hierro-azufre, y el componente I contiene también molibdeno, en forma de un **cofactor de hierro-molibdeno** estrechamente unido (FeMo-co). El N_2 se une a este cofactor durante su reducción, aunque no se conoce todavía el modo preciso de unión.

En 1992, se describieron las estructuras cristalinas de ambos componentes I y II de *Azotobacter vinelandii* y, en 1997, se publicó una estructura del complejo total, con un análogo de ATP no hidrolizable unido al componente II (Figura 20.5). La unión del ATP naturalmente fuerza un cambio conformacional en el componente II, que dirige su ensamblaje al componente I. Como se muestra en la Figura 20.5, el componente II contiene un grupo Fe_4S_4 convencional, mientras que el componente I contiene dos complejos hierro-azufre nuevos: el grupo P que contiene 7 azufres y 8 hierros, y el cofactor hierro-molibdeno, el cual, como se muestra, contiene 9 azufres, 7 hierros y un ion molibdeno ligado también a una molécula de **homocitrato.** Los electrones fluyen desde la ferredoxina o la flavodoxina al complejo Fe_4S_4 del componente II y la hidrólisis del ATP

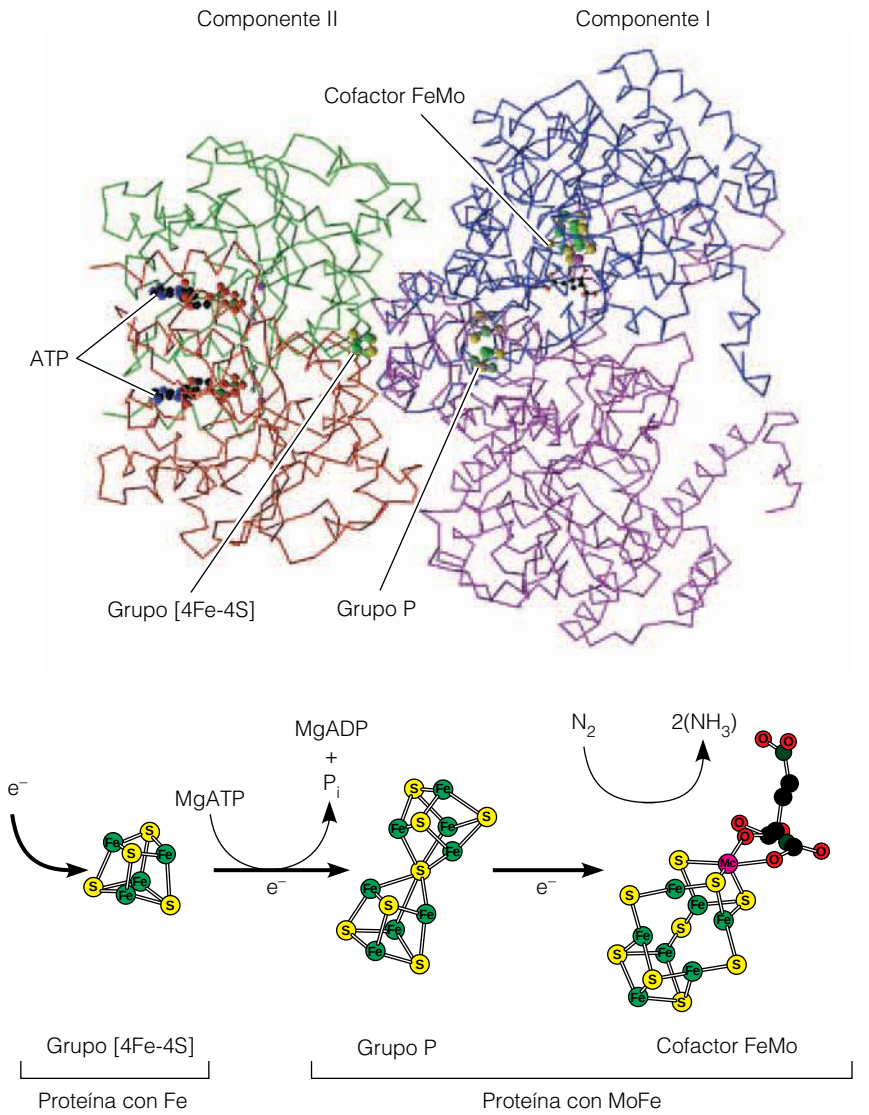


FIGURA **20.5**

Estructura del complejo nitrogenasa. Parte superior, modelo esquelético del complejo que contiene un análogo de ATP, donde se muestran en amarillo y verde las subunidades del componente II y en rojo y morado las del componente I. Parte inferior, estructuras de los grupos hierro-azufre que participan en la transferencia electrónica reductora. Se supone que la hidrólisis del ATP unido impulsa la reducción del grupo P por el componente II y desencadena un cambio conformacional en el complejo II que hace que se disocie transitoriamente del complejo I, lo que garantiza un flujo electrónico unidireccional.

Cortesía de D. C. Rees y D. R. Dean, reproducido en R. L. Rawls, *Chem. Eng. News* (1998), número del 22 de junio, pp. 29-32. Reproducido con permiso del autor.

unido dirige, de alguna manera, los electrones al grupo P del componente I y luego al FeMo-co. Como se presenta en la Figura 20.5, estos tres grupos están lo suficientemente juntos en el complejo para permitir una transferencia fácil de los electrones. Casi con certeza, la reducción del N_2 se produce en la coenzima unida, pero debe describirse el modo de unión del N_2 para que pueda comprenderse el mecanismo de reducción.

Recientemente, se ha encontrado que algunas bacterias contienen más de un complejo nitrogenasa. *Azotobacter* contiene tres sistemas de este tipo, uno de los cuales utiliza vanadio en vez de molibdeno, y otro en el que el único metal ligado es el hierro.

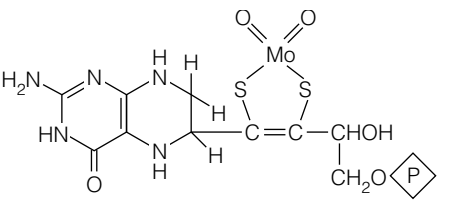
La genética de la fijación del nitrógeno está siendo estudiada intensamente por lo deseable que es poder transferir las capacidades de fijación de nitrógeno a las plantas superiores, con lo que se reduciría el empleo de fertilizantes nitrogenados. En *Klebsiella*, 13 genes que son esenciales para este proceso están ligados en una región de DNA de unos 24 000 pares de bases de longitud, el grupo génico *nif*. Siete genes interpuestos participan en la fijación del nitrógeno pero no son esenciales para la fijación del nitrógeno. Los productos de los genes esenciales incluyen las dos subunidades polipeptídicas del componente I, la subunidad del componente II, la flavodoxina y las enzimas que sintetizan el FeMo-co.

UTILIZACIÓN DEL NITRATO

La capacidad de reducir el nitrato a amoníaco es común en la práctica totalidad de las plantas, los hongos y las bacterias. El primer paso, la reducción del nitrato a nitrito (NO_2^-) es difícil químicamente y se realiza gracias a la intervención de una enzima grande y compleja, la **nitrato reductasa.** Esta enzima de múltiples subunidades, con un M_r de aproximadamente 800 kilodalton, contiene FAD unido, molibdeno y un citocromo denominado citocromo 557 (que contiene un complejo Fe_4S_4). La enzima lleva a cabo la reacción global:

$$NO_3^- + NAD(P)H + H^+ \longrightarrow NO_2^- + NAD(P)^+ + H_2O$$

Las plantas utilizan NADH como donador de electrones, mientras que los hongos y las bacterias utilizan NADPH. Los electrones se transfieren al FAD unido a la enzima, luego al citocromo 557, luego al molibdeno y finalmente al sustrato. El molibdeno está unido a un cofactor que contiene un anillo de *pteridina* (véase la página 818), que es bastante distinto de la estructura FeMo-co. De hecho, todas las enzimas conocidas que requieren molibdeno, excepto la nitrogenasa, contienen una estructura similar a la de esta **molibdopterina.**



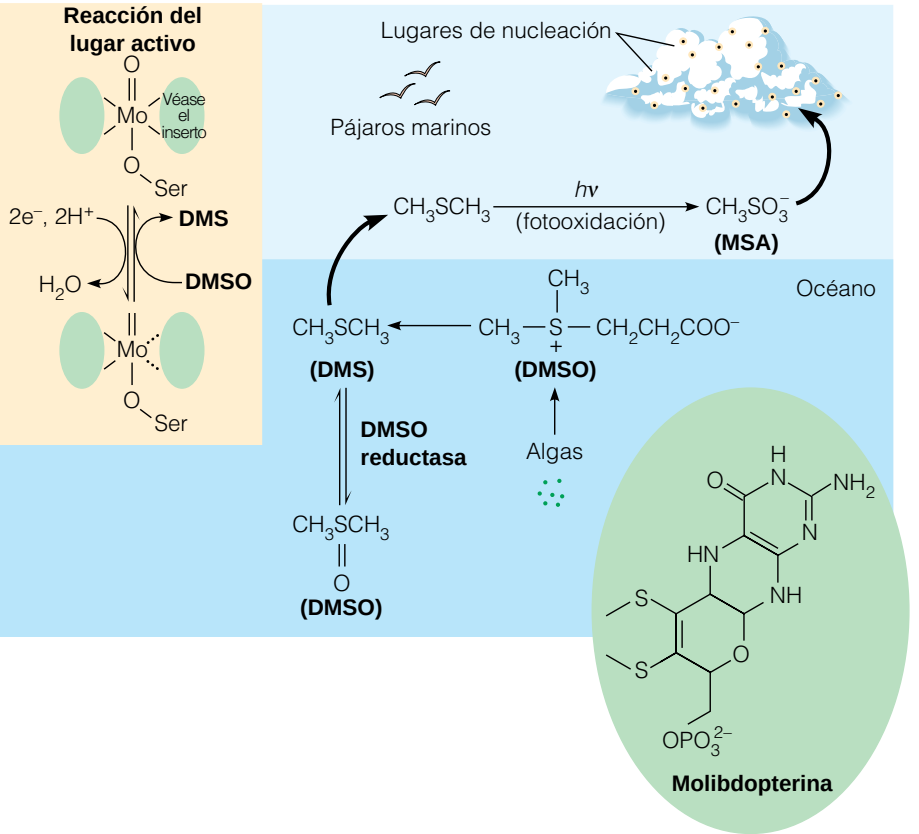
Molibdopterina

La reducción del nitrito a amoníaco se lleva a cabo en tres pasos ($NO_2^- \longrightarrow NO^- \longrightarrow NH_2OH \longrightarrow NH_3$) mediante una enzima, la **nitrito reductasa.** Esta enzima contiene un centro Fe_2S_2 y una molécula de **sirohemo,** una ferroporfirina parcialmente reducida. El donador electrónico para cada uno de los pasos es la ferredoxina.

Otra enzima con molibdeno, la **dimetilsulfóxido reductasa** tiene un interés ambiental considerable. Como se muestra en la Figura 20.6, el metabolismo de las algas marinas produce dimetil sulfoniopropionato (DMSP) como estabilizador osmótico y agente de metilación biológico. Este compuesto se hidroliza fácilmente a dimetil sulfuro (DMS), que a su vez se oxida a dimetilsulfóxido (DMSO). La reducción bacteriana del DMSO regenera el DMS, la forma volátil principal del azufre en los océanos; su liberación a la atmósfera probablemente es la responsable de la distintiva y mal llamada "fragancia del aire salino" que asociamos con el mar. Este olor atrae a las aves marinas, que lo reconocen

FIGURA **20.6**
Significado ambiental de la DMSO reductasa.

Cortesía de E. I. Steifel, *Science* (1998) 272:1599-1600, reproducido con permiso. © 1996 AAAS.



como indicador de productividad biológica en el océano próximo. Asimismo, el DMS atmosférico sufre una fotooxidación a metil sulfato (MSA), que sirve como lugares de nucleación para la formación de las nubes. De este modo, la interacción entre el DMSO y el DMS desempeña una función importante en la regulación del clima, contribuyendo a modular la temperatura de la tierra. Recientemente, la determinación estructural de la DMSO reductasa de la bacteria *Rhodobacter spheroides* ha revelado que su cofactor molibdeno contiene dos moléculas de molibdopterina unida, con el complejo ligado de forma covalente a un residuo de serina de la enzima.

Utilización del amoníaco: biogénesis del nitrógeno orgánico

Diversas enzimas de amplia distribución utilizan amoníaco como sustrato para la síntesis de glutamato, glutamina, asparagina o carbamoil fosfato.

Aunque las plantas, los animales y las bacterias obtienen su nitrógeno de orígenes diferentes, prácticamente todos los organismos comparten unas mismas rutas comunes de utilización del nitrógeno inorgánico en forma de amoníaco. El amoníaco a concentraciones elevadas es muy tóxico, pero a concentraciones más bajas constituye un metabolito central, que actúa como sustrato de cinco enzimas que lo convierten en diversos compuestos orgánicos nitrogenados. A pH fisiológico la especie iónica dominante es el ion amonio, $^{+}NH_4$. Sin embargo, en las cinco reacciones interviene el par de electrones no compartidos del NH_3, que es, por tanto, la especie reactiva.

Todos los organismos asimilan amoníaco a través de reacciones que conducen al glutamato, la glutamina, la asparagina y el **carbamoil fosfato** (Figura 20.7). Dado que el carbamoil fosfato se utiliza solamente en la biosíntesis de la

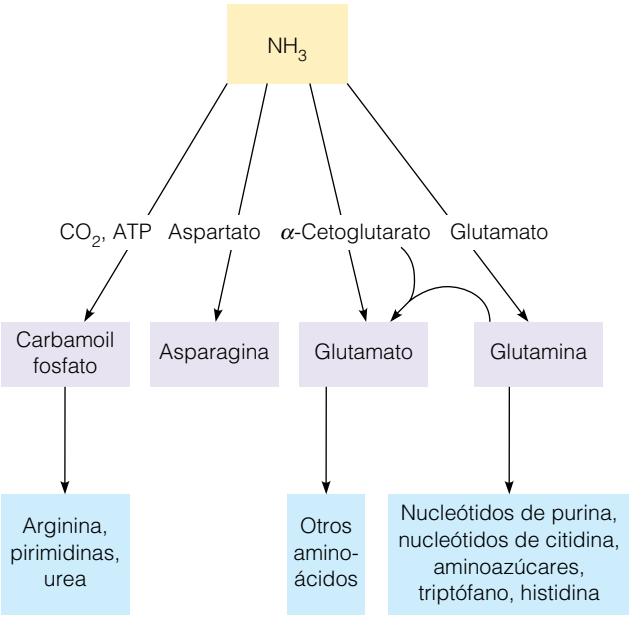
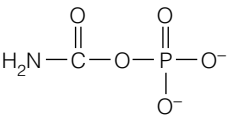


FIGURA **20.7**

Reacciones de la asimilación del amoníaco y principales destinos del nitrógeno fijado. En los animales, la glutamina es la fuente principal de nitrógeno para las pirimidinas.

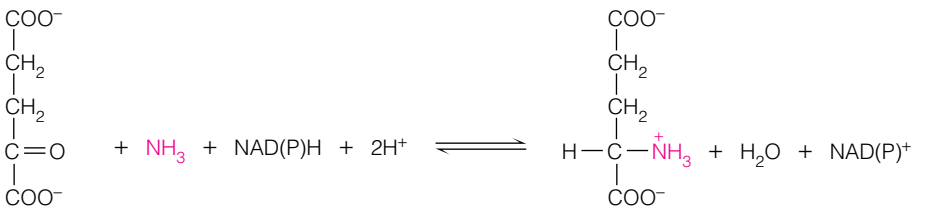
arginina, la urea y los nucleótidos de pirimidina, la mayor parte del nitrógeno procedente del amoníaco que va a parar a los aminoácidos y otros compuestos nitrogenados transcurre a través de los dos aminoácidos glutamato y glutamina. El nitrógeno amino del glutamato y el nitrógeno *amida* de la glutamina son ambos extraordinariamente activos en la biosíntesis.



Carbamoil fosfato

GLUTAMATO DESHIDROGENASA: AMINACIÓN REDUCTORA DEL α-CETOGLUTARATO

La glutamato deshidrogenasa cataliza la aminación reductora del α-cetoglutarato:



α-Cetoglutarato **Glutamato**

La reacción es reversible. La mayor parte de las bacterias y muchas plantas contienen una forma de la enzima específica para el NADPH, que actúa fundamentalmente en la dirección de la formación del glutamato. Concuerda con esta característica el hecho de que las bacterias que crecen con amoníaco como única fuente de nitrógeno utilizan esta reacción como ruta principal de asimilación del nitrógeno. En las células animales, la enzima actúa bien en la dirección de síntesis o bien en la dirección catabólica, aportando α-cetoglutarato al ciclo del ácido cítrico; es probable que predomine la función catabólica. La enzima de los animales utiliza NAD^+ como principal cofactor, pero también puede emplear $NADP^+$. En los animales, la glutamato deshidrogenasa, un hexámero de subunidades idénticas, se encuentra en las mitocondrias, lo que concuerda con un papel principal de esta enzima en la generación de energía. Además, la enzima se controla alostéricamente; la síntesis de α-cetoglutarato se inhibe por el ATP

o el GTP, y se estimula por el ADP o el GDP. Así, la enzima está activada en situaciones de baja carga energética. Las levaduras y los hongos contienen ambos tipos de glutamato deshidrogenasa, cada una de ellas con la regulación adecuada, una ajustada para la asimilación del nitrógeno y la otra funcionando principalmente en el catabolismo.

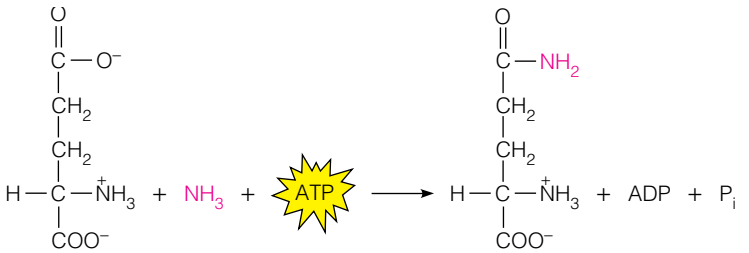
Una enzima relacionada, la **glutamato sintasa,** cataliza una reacción comparable a la catalizada por la glutamato deshidrogenasa, pero que actúa fundamentalmente en la biosíntesis del glutamato:

$$\alpha\text{-Cetoglutarato} + \text{glutamina} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow 2\ \text{glutamato} + \text{NADP}^+$$

Dado que la glutamato deshidrogenasa tiene un valor de K_M relativamente alto para el amoníaco, la glutamato sintasa desempeña un papel de mayor importancia en la síntesis del glutamato en la mayor parte de las células (junto con la glutamina sintetasa; véase el apartado siguiente). La glutamato sintasa aislada de varias bacterias contiene dos tipos de subunidades (α y β) en una holoenzima de 800 kilodalton; donde el protómero $\alpha\beta$ contiene FAD, FMN y varios centros hierro-azufre. La enzima de las plantas utiliza NADPH, NADH o ferredoxina, mientras que la glutamato sintasa de otros organismos utiliza exclusivamente NADH.

GLUTAMINA SINTETASA: GENERACIÓN DE NITRÓGENO AMIDA BIOLÓGICAMENTE ACTIVO

Tanto si se forma por la acción de la glutamato deshidrogenasa o la glutamato sintasa como si se forma por transaminación (véase el Capítulo 14), el glutamato puede aceptar un segundo grupo amoníaco para formar glutamina en la reacción catalizada por la **glutamina sintetasa.** Se requiere Mn^{2+}.

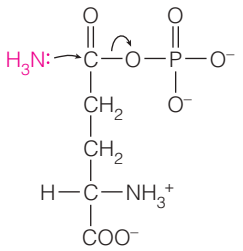


Glutamato **Glutamina**

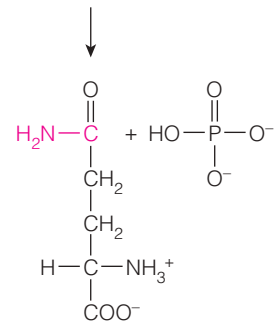
Esta enzima se denomina específicamente *sintetasa*, en lugar de *sintasa*, ya que la reacción acopla la formación del enlace con la energía liberada por la hidrólisis del ATP. Ambas enzimas se clasifican como ligasas (véase la página 439), pero una sintasa no requiere ATP.

La reacción de la glutamina sintetasa se produce a través de un intermediario acil fosfato. El ATP fosforila el carbono δ del glutamato para dar un anhídrido de ácido carboxílico-fosfórico, que sufre un ataque nucleófilo por el nitrógeno del amoníaco para dar el producto amida, glutamina.

Como se descubrió inicialmente mediante microscopia electrónica y, más recientemente, mediante cristalografía de rayos X, la glutamina sintetasa de *E. coli* es un dodecámero, cuyas 12 subunidades idénticas forman dos disposiciones hexagonales enfrentadas (Figura 20.8). La holoenzima tiene un peso molecular de alrededor de 600 000. Cada lugar catalítico está formado en una interfase entre las subunidades polipeptídicas dentro de un hexámero, y está constituido por residuos de dos subunidades adyacentes.



γ-Glutamil fosfato



Glutamina

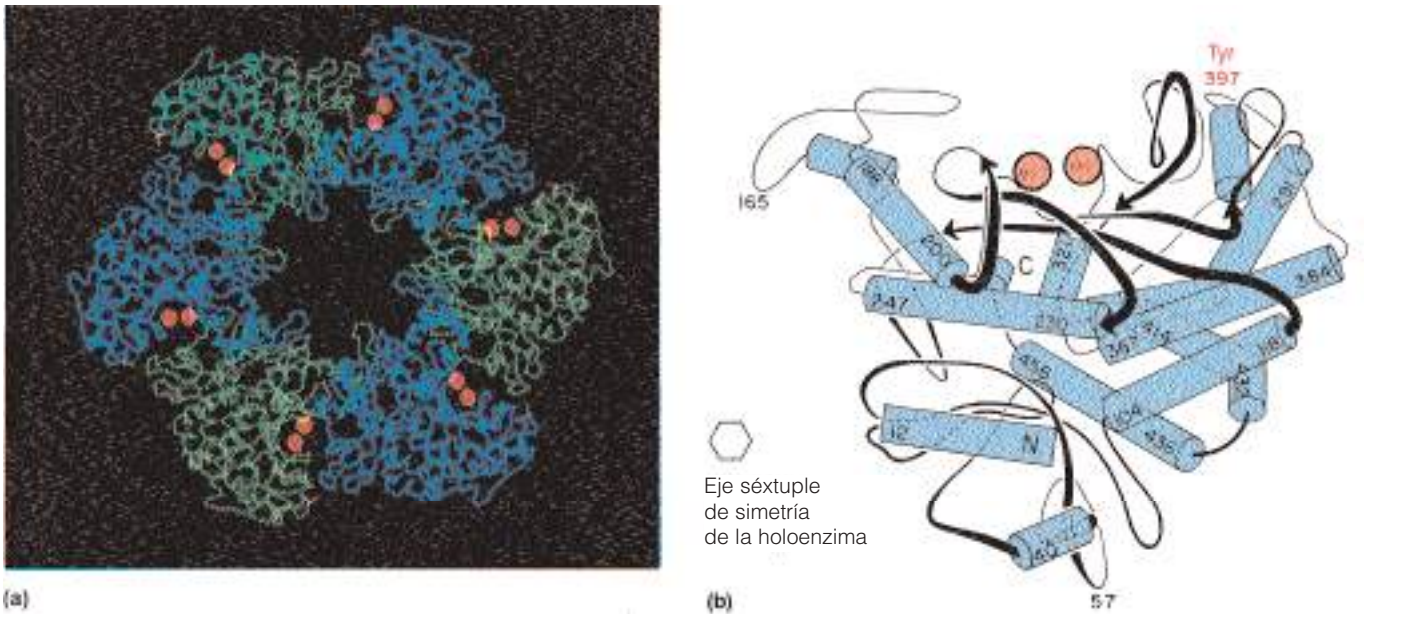


FIGURA **20.8**

Estructura de la glutamina sintetasa de *E. coli*. El lugar de adenililación (Tyr 397) se indica de color rojo, y los dos iones Mn^{2+} del lugar catalítico se muestran en color naranja. **(a)** Imagen de la holoenzima desde arriba, tal como la muestra la estructura cristalina. En esta proyección sólo pueden observarse 6 subunidades. **(b)** Representación esquemática de una de las 12 cadenas polipeptídicas.

Reproducido con permiso de D. Eisenberg et al., *Nature* (1986) 323:304-309. © 1986 Macmillan Magazines, Ltd.

Regulación de la glutamina sintetasa

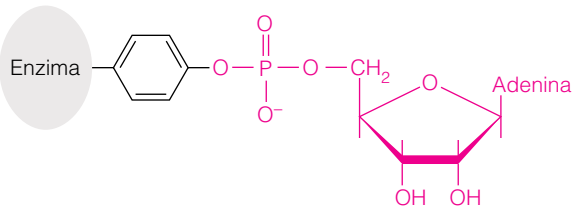
La glutamina ocupa un lugar central en el metabolismo del nitrógeno (véase la Figura 20.7). El nitrógeno amida se utiliza en la biosíntesis de varios aminoácidos (como el glutamato, el triptófano y la histidina), los nucleótidos de purina y pirimidina, y los aminoazúcares. En los animales, la glutamina sintetasa es un elemento clave en la desactivación tóxica del amoníaco que se forma por el catabolismo de los aminoácidos, en especial en el cerebro. De hecho, el glutamato y la glutamina son dos de los aminoácidos libres más abundantes en las células cerebrales; la acumulación de estos aminoácidos puede causar una reducción de α-cetoglutarato, su precursor principal, interfiriendo de esta forma con el ciclo del ácido cítrico y la generación de energía. Además, la glutamina participa en la excreción de amoníaco en el riñón y es un combustible importante para las células del sistema inmunitario. No es de extrañar, pues, que la reacción de la glutamina sintetasa esté muy regulada.

Como se ha observado fundamentalmente en *E. coli*, hay varios mecanismos notables de control de esta reacción que interaccionan entre sí de maneras complejas. La actividad de la glutamina sintetasa se controla por dos mecanismos diferentes pero acoplados: (1) una regulación alostérica mediante una **retroinhibición acumulativa** y (2) una modificación covalente de la enzima producida mediante una cascada reguladora.

La retroinhibición acumulativa comporta la acción de ocho retroinhibidores específicos. Estos ocho inhibidores son, o bien productos finales metabólicos de la glutamina (triptófano, histidina, glucosamina-6-fosfato, carbamoil fosfato, CTP y AMP; véase la Figura 20.7), o bien indicadores de algún otro tipo del estado general del metabolismo de los aminoácidos (alanina, glicina). Es de destacar que cada subunidad de 50 000 dalton de la glutamina sintetasa debe contener lugares de unión para cada uno de los ocho inhibidores, así como para los sustratos y los productos. Cada uno de los ocho compuestos produce sólo una inhibición parcial, pero, en combinación, el grado de inhibición aumenta hasta el extremo de que una mezcla de los ocho produce un bloqueo casi completo, lo cual tiene sentido desde el punto de vista metabólico, ya que garantiza que la acumulación del producto final de una ruta no desactiva el aporte de un sustrato (glutamina) necesario para otras rutas.

La glutamina sintetasa procariota se controla mediante retroinhibición acumulativa y modificación covalente.

A la retroinhibición acumulativa se superpone un modo de regulación que implica la modificación covalente de la enzima. La glutamina sintetasa se regula por **adenililación:** un residuo de tirosina específico de la enzima reacciona con el ATP para formar un éster entre el grupo hidroxilo fenólico y el fosfato del AMP resultante. Este residuo de tirosina se encuentra muy cerca del lugar catalítico. La adenililación inactiva el lugar catalítico adyacente. Una molécula enzimática con los 12 lugares adenililados es totalmente inactiva, mientras que la adenililación parcial produce una inactivación también parcial.



Residuo de tirosina adenililado

La adenililación y la desadenililación de la glutamina sintetasa comportan una compleja serie de cascadas reguladoras (Figura 20.9). Ambas reacciones es-

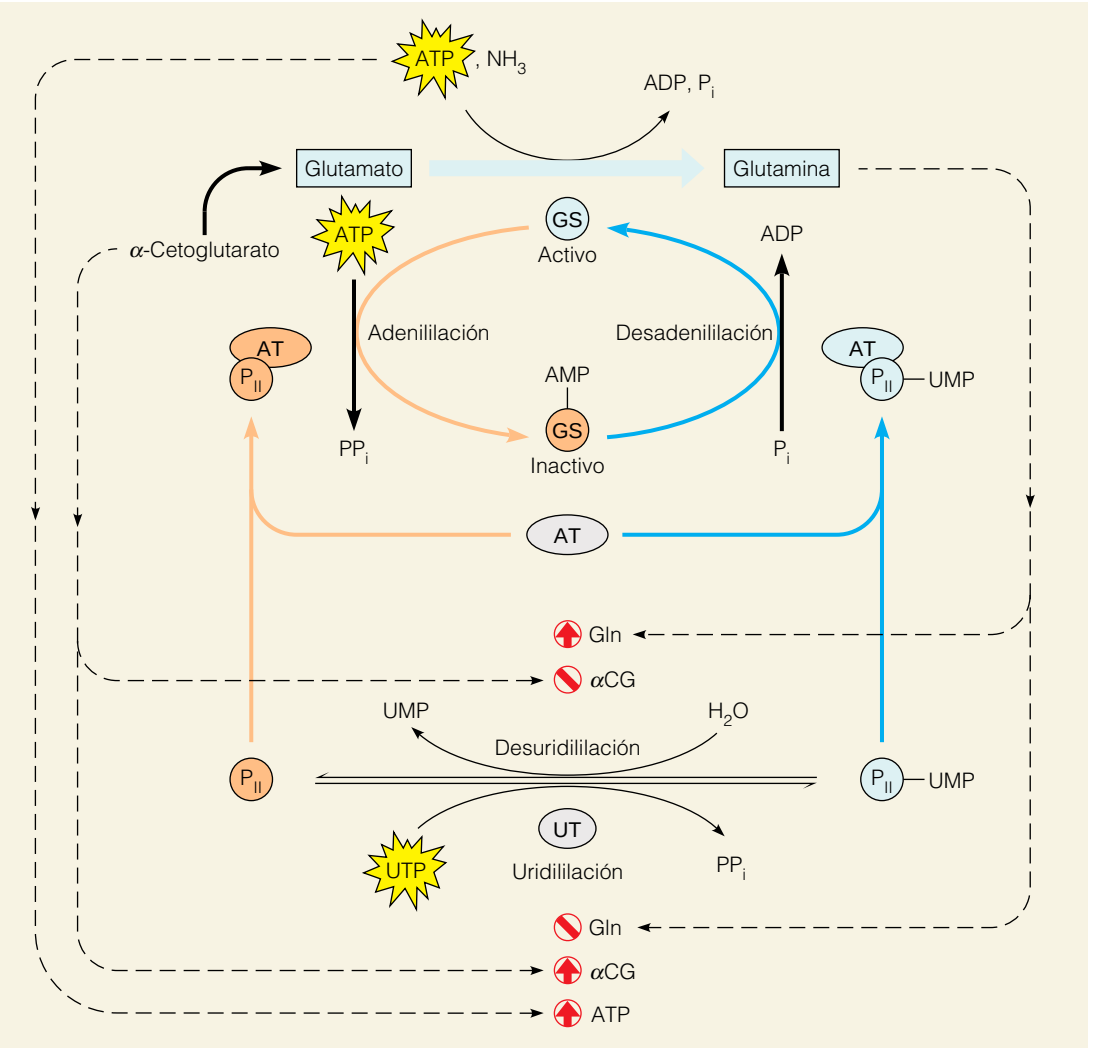


FIGURA **20.9**

Regulación de la actividad de la glutamina sintetasa de *E. coli*. El complejo de la AT (adenilil transferasa) y la P_{II} (una proteína reguladora) cataliza tanto la adenililación como la desadenililación de la glutamina sintetasa (GS), según la P_{II} esté desuridililada (izquierda) o uridililada (derecha). La uridililación de P_{II} la cataliza la uridilil transferasa (UT). Los componentes que se muestran en azul tienden a fomentar la actividad de la glutamina sintetasa, mientras que los que se indican en naranja se asocian a la inactivación de la enzima.

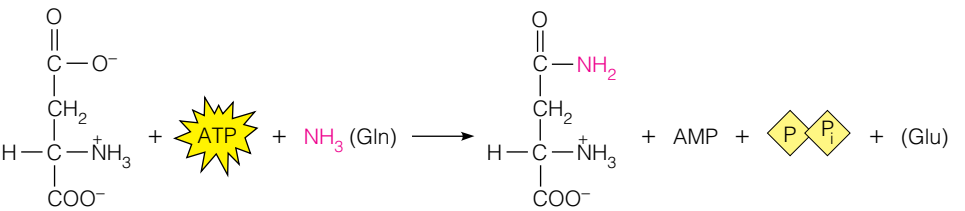
tán catalizadas por la misma enzima: un complejo de **adenilil transferasa** y una proteína reguladora, la **P_{II},** La forma molecular de la P_{II} (uridililada o desuridililada) determina que el complejo catalice la adenililación o la desadenililación. La uridililación de P_{II} la cataliza una tercera enzima, la **uridilil transferasa,** que transfiere un residuo de UMP a un lugar específico de la molécula P_{II}. El producto, **P_{II}-UMP,** reacciona con la adenilil transferasa para estimular su *des*adenililación de la glutamina sintetasa. La forma de P_{II} que no contiene UMP convierte la adenilil transferasa en una enzima adenililizante. La actividad de la uridilil transferasa se estimula, a su vez, por el ATP y el α-cetoglutarato, y se inhibe por la glutamina. La relación [α-cetoglutarato]/[glutamina] es crucial para determinar si la uridililación está favorecida o inhibida. La desuridililación de la P_{II}-UMP la cataliza una forma diferente de la misma enzima.

Estas cascadas reguladoras proporcionan un mecanismo de respuesta que garantiza que, cuando el aporte de nitrógeno activado (glutamina) es alto, su ulterior biosíntesis se corta; la forma de P_{II} que no contiene UMP se acumula y activa la actividad de adenililación de la adenilil transferasa. Esto hace que se acumule la forma de glutamina sintetasa que contiene AMP, menos activa. Y a la inversa, cuando los aportes de nitrógeno activado son bajos, se acumula α-cetoglutarato y, si el ATP es también abundante, se estimula la actividad de la glutamina sintetasa mediante el mecanismo inverso.

En la actualidad sabemos poco de la forma de regulación de la glutamina sintetasa en las células animales. Sí sabemos que estos exquisitos mecanismos de control no intervienen en ello. Algunos datos recientes sugieren que pueden estar implicadas las interconversiones entre las formas octamérica y tetramérica de la enzima.

ASPARAGINA SINTETASA: UNA REACCIÓN SEMEJANTE DE AMIDACIÓN

Una enzima comparable a la glutamina sintetasa, la **asparagina sintetasa,** tiene también una amplia distribución, aunque su contribución a la asimilación del amoníaco es mucho menor. La asparagina sintetasa utiliza amoníaco o glutamina para catalizar la conversión de aspartato en asparagina.



Aspartato **Asparagina**

Obsérvese que la asparagina sintetasa rompe el ATP para dar AMP y PP_i, mientras que la glutamina sintetasa da ADP y P_i. La asparagina sintetasa difiere también en que la glutamina es un sustrato claramente preferido al amoníaco. Probablemente la especie reactiva en la formación del enlace es el amoníaco, que se genera en el lugar activo mediante la hidrólisis de la glutamina sustrato.

CARBAMOIL FOSFATO SINTETASA: GENERACIÓN DE UN INTERMEDIARIO PARA LA SÍNTESIS DE ARGININA Y PIRIMIDINA

Recuérdese de la Figura 20.7 que la ruta final de asimilación del amoníaco forma, en primer lugar, carbamoil fosfato. La enzima responsable es la **carbamoil**

fosfato sintetasa. Tanto el amoníaco como la glutamina pueden actuar como donadores de nitrógeno.

$$NH_3 + HCO_3^- + 2ATP \longrightarrow \text{carbamoil fosfato} + 2ADP + P_i$$

$$\text{Glutamina} + HCO_3^- + 2ATP + H_2O \longrightarrow \text{carbamoil fosfato} + 2ADP + P_i + \text{glutamato}$$

La enzima bacteriana puede catalizar ambas reacciones, aunque la glutamina es el sustrato preferido. Las células eucariotas contienen dos formas de la enzima. La forma I, que se encuentra en las mitocondrias, tiene preferencia por el amoníaco como sustrato, y se utiliza en la ruta de biosíntesis de la arginina y el ciclo de la urea (véanse las páginas 814-816). La forma II, que se encuentra en el citosol, tiene una clara preferencia por la glutamina. Se inhibe por la uridina trifosfato, consistente con su participación demostrada en la biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina. Como se estudiará en el Capítulo 22, la enzima de la forma II es parte de una proteína grande con tres lugares catalíticos distintos, que cataliza las tres primeras reacciones de la síntesis de los nucleótidos de pirimidina.

Economía del nitrógeno: aspectos de la síntesis y degradación de los aminoácidos

CONSECUENCIAS METABÓLICAS DE LA AUSENCIA DE COMPUESTOS DE ALMACENAMIENTO NITROGENADOS

La mayoría de los organismos carecen de depósitos de almacenamiento de nitrógeno.

El metabolismo de las proteínas y los ácidos nucleicos difiere de manera significativa del metabolismo de los hidratos de carbono y los lípidos. Mientras que los hidratos de carbono y los lípidos pueden almacenarse para movilizarse, según las necesidades de un organismo en cuanto a la generación de energía o para la biosíntesis, la mayor parte de los organismos, pasado el estado embrionario, no disponen de compuestos de nitrógeno poliméricos cuya función sea el almacenamiento y la liberación, según la demanda. Aunque las plantas almacenan algunos compuestos nitrogenados, como la asparagina en los espárragos, y algunos insectos tienen proteínas de almacenamiento en su sangre, estos compuestos no constituyen reservas de almacenamiento de nitrógeno de uso generalizado. La falta de reservas de este tipo impone unas exigencias especiales a los organismos, particularmente dada la disponibilidad limitada de nitrógeno utilizable. Los animales deben reponer continuamente los aportes nitrogenados mediante la alimentación, con objeto de reemplazar el nitrógeno que se pierde a través del catabolismo. En gran parte del mundo, los alimentos con abundantes proteínas no pueden producirse en cantidad suficiente para satisfacer las necesidades nutricionales de los seres humanos y de los animales domésticos. Cuando las proteínas de la alimentación son insuficientes, se degradan las proteínas que se han elaborado con otros fines, principalmente las proteínas musculares, y no se reponen. Estas consecuencias se dan aun cuando la alimentación contenga una cantidad de calorías proteicas suficientes, si esas proteínas no contienen los aminoácidos necesarios (aminoácidos esenciales, véase el apartado siguiente).

De la misma manera que podemos considerar una economía del nitrógeno en la biosfera, podemos pensar en una economía de este tipo en relación con los organismos individuales. En condiciones óptimas, los animales mantienen un consumo y una excreción de nitrógeno equivalentes. Un adulto bien nutrido se encuentra en **equilibrio nitrogenado** o **balance nitrogenado normal** cuando la ingestión diaria de nitrógeno en los alimentos es igual a la que se pierde por la excreción y otros procesos, como la perspiración. Un balance nitrogenado positivo, en el que el consumo normal de nitrógeno supera a la pérdida, es el que

se observa durante el embarazo, el crecimiento de un niño o la recuperación después de un período de inanición. Cuando hay un balance nitrogenado negativo, se pierde más nitrógeno del que se ingiere, y esta situación se observa en la vejez, la inanición y determinados estados patológicos. Las plantas y los microorganismos excretan habitualmente una cantidad muy pequeña de nitrógeno. Los microorganismos crecen a menudo de una forma tan rápida que el nitrógeno liberado por el catabolismo se asimila de nuevo, y en las plantas el nitrógeno disponible está con frecuencia tan limitado que es este mismo factor el que limita la velocidad del crecimiento celular.

CAPACIDADES DE BIOSÍNTESIS DE LOS ORGANISMOS

Los organismos presentan amplias diferencias en cuanto a su capacidad de sintetizar aminoácidos. Muchas bacterias y la mayoría de las plantas pueden sintetizar todos sus metabolitos nitrogenados a partir de una única fuente de nitrógeno, como el amoníaco o el nitrato. Sin embargo, muchos microorganismos utilizarán un aminoácido ya formado cuando dispongan de él, en vez de sintetizarlo. A veces son necesarios aminoácidos preformados. Así, por ejemplo, durante el curso de la evolución, *Lactobacillus* ha perdido muchas capacidades de biosíntesis porque crece en la leche, que es un medio con abundantes nutrientes. A esta bacteria se le han de proporcionar, pues, los 20 aminoácidos para poder cultivarla en el laboratorio. Los mamíferos tienen unas características intermedias, puesto que son capaces de sintetizar aproximadamente la mitad de los aminoácidos en las cantidades necesarias para su crecimiento y para el mantenimiento de un balance nitrogenado normal.

Los aminoácidos que han de proporcionarse en el alimento para satisfacer las necesidades metabólicas de un animal se denominan **aminoácidos esenciales** (Tabla 20.1). Los aminoácidos que no es necesario proporcionar, porque pueden biosintetizarse en cantidades suficientes, se denominan **aminoácidos no esenciales.** En general, los aminoácidos esenciales son aquellos que tienen estructuras complejas, como anillos aromáticos y cadenas laterales hidrocarbonadas. Los aminoácidos no esenciales son los que se sintetizan con facilidad a partir de metabolitos abundantes, como los intermediarios de la glucólisis o del ciclo del ácido cítrico.

Los aminoácidos esenciales no pueden biosintetizarse en cantidad suficiente y deben aportarse en el alimento.

Aunque los especialistas en nutrición recomiendan un consumo de proteínas de 50 a 100 gramos al día o más, el ser humano pueden mantenerse bien con una alimentación que contenga tan sólo 20 gramos al día, si esas proteínas son de alta calidad nutricional, es decir, si contienen proporciones adecuadas de los aminoácidos esenciales. En general, cuanto más próxima sea la composición de aminoácidos de la proteína ingerida a la composición de los aminoácidos del animal que ingiere la proteína, mayor es la calidad nutricional de esa proteína. En el caso del ser humano, las proteínas de los mamíferos son las de mayor calidad nutricional, seguidas de las del pescado y las aves, y luego las de las frutas y verduras. (En este contexto, calidad nutricional se refiere únicamente al criterio del contenido de aminoácidos esenciales.) Las proteínas de las plantas presentan a menudo un déficit de lisina, metionina o triptófano. Sin embargo, una alimentación vegetariana proporciona las proteínas suficientes si contiene diversidad de fuentes proteicas, de tal manera que un déficit existente en una de ellas sea compensado por un exceso procedente de otra fuente.

TABLA 20.1 Requerimientos nutricionales de aminoácidos en los mamíferos

Esenciales
Arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina
No Esenciales
Alanina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamato, glutamina, glicina, prolina, serina, tirosina

Nota: Tanto en el ser humano como en la rata, la arginina y la histidina se clasifican como aminoácidos esenciales, aunque los estudios nutricionales indican que son necesarios en la alimentación tan sólo durante el crecimiento de los jóvenes.

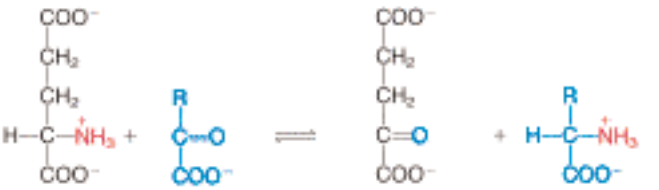
TRANSAMINACIÓN

En el Capítulo 14 presentamos la transaminación, un proceso mediante el cual los aminoácidos pueden provisionar los intermediarios del ciclo del ácido cítrico. La transaminación desempeña un papel algo más amplio en el metabo-

La transaminación es la transferencia reversible de un grupo amino desde un aminoácido a un cetoácido, con la intervención del piridoxal fosfato como coenzima.

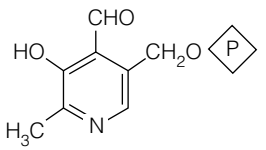
lismo de los aminoácidos, por cuanto proporciona una ruta para la redistribución del nitrógeno de los aminoácidos. Dado el papel clave del glutamato en la asimilación del amoníaco, esta sustancia tiene una participación central en la transaminación. En otras palabras, el glutamato es un producto abundante de la asimilación del amoníaco, y la transaminación utiliza el nitrógeno del glutamato para la síntesis de otros aminoácidos.

Las reacciones de transaminación están catalizadas por enzimas denominadas **transaminasas** o, más correctamente, **aminotransferasas.** Como se ha mencionado en el Capítulo 14, y se muestra a continuación, la transaminación comporta la transferencia del grupo amino, generalmente del glutamato, a un α-cetoácido, con la formación del correspondiente aminoácido más el derivado α-ceto del glutamato, que es el α-cetoglutarato.



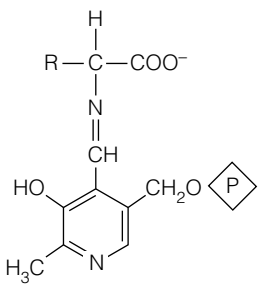
Glutamato **α-Cetoácido** **α-Cetoglutarato** **α-Aminoácido**

Existen aminotransferasas específicas en las células animales para la síntesis de todos los aminoácidos que se encuentran en las proteínas, excepto la treonina y la lisina, en tanto en cuanto se disponga de los correspondientes cetoácidos. Así pues, la incapacidad de las células animales para sintetizar la mayoría de los aminoácidos esenciales se debe a una incapacidad para sintetizar los esqueletos carbonados en forma de α-cetoácidos.



Piridoxal fosfato

Las aminotransferasas utilizan una coenzima, el **piridoxal fosfato,** que procede de la vitamina B_6. La parte funcional del cofactor es un grupo funcional aldehído, —CHO, unido a un anillo de piridina. La catálisis se inicia con la condensación de este aldehído con el grupo amino de un aminoácido, para dar un intermediario base de Schiff, o aldimina. Dado que el piridoxal fosfato participa en diversas reacciones que implican aminoácidos, consideraremos sus mecanismos catalíticos en una sección aparte, a partir de la página 814.



Base de Schiff entre un aminoácido y el piridoxal fosfato

Las reacciones de transaminación tienen unas constantes de equilibrio próximas a la unidad. En consecuencia, la dirección en que se produce una determinada transaminación está controlada en gran parte por las concentraciones intracelulares de los sustratos y los productos. Esto significa que la transaminación puede utilizarse no sólo para la síntesis de aminoácidos sino también para la degradación de los aminoácidos que se acumulan en una cantidad superior a la necesaria. En la degradación, la transaminasa actúa de manera concertada con la glutamato deshidrogenasa, como se observa en el ejemplo de la degradación de la alanina:

$$\text{Alanina} + \alpha\text{-cetoglutarato} \xrightarrow{\text{Aminotransferasa}} \text{piruvato} + \text{glutamato}$$

$$\text{Glutamato} + NAD^+ + H_2O \xrightarrow{\text{Glutamato deshidrogenasa}} \alpha\text{-cetoglutarato} + NADH + \overset{+}{N}H_4$$

$$\text{Neto: Alanina} + NAD^+ + H_2O \longrightarrow \text{piruvato} + NADH + \overset{+}{N}H_4$$

Así pues, podemos considerar la transaminación como un mecanismo de síntesis o de degradación de aminoácidos. Dado que los aminoácidos del interior de una célula rara vez se encuentran en las proporciones necesarias para la síntesis de las proteínas específicas de esa célula, la transaminación desempeña un papel importante para conseguir que la composición de aminoácidos con-

cuerde con las necesidades del organismo. También participa en el direccionamiento del exceso de aminoácidos hacia el catabolismo y la generación de energía.

La mayor parte de las aminotransferasas utilizan glutamato/α-cetoglutarato como uno de los dos pares amino/ceto implicados. Dos de estas enzimas son importantes en el diagnóstico clínico de algunas enfermedades humanas, la glutamato-oxalacetato transaminasa sérica (SGOT) y la glutamato-piruvato transaminasa sérica (SGPT):

$$\text{Glutamato} + \text{oxalacetato} \xrightarrow{\text{SGOT}} \alpha\text{-cetoglutarato} + \text{aspartato}$$

$$\text{Glutamato} + \text{piruvato} \xrightarrow{\text{SGPT}} \alpha\text{-cetoglutarato} + \text{alanina}$$

Estas enzimas, que son abundantes en el corazón y en el hígado, se liberan por las células durante la lesión celular que se produce en el infarto de miocardio, la hepatitis infecciosa, u otras lesiones de cualquier órgano. Las determinaciones de estas actividades enzimáticas en el suero sanguíneo pueden utilizarse tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de la evolución de un paciente durante el tratamiento. Obsérvese el convenio utilizado para la denominación de las transaminasas; se citan el donador del amino y el cetoácido aceptor.

Recambio proteico

Las proteínas se parecen a los intermediarios metabólicos de bajo peso molecular, en el sentido de que están sujetas a una biosíntesis y degradación continua, en un proceso denominado **recambio proteico.** Para una proteína intracelular cuya concentración total no cambie con el tiempo, la concentración del estado estacionario se mantiene mediante la síntesis de la proteína a una velocidad suficiente para reponer las pérdidas producidas por la degradación de la proteína. Muchos de los aminoácidos liberados durante el recambio proteico se reutilizan en la síntesis de proteínas nuevas.

CARACTERÍSTICAS CUANTITATIVAS DEL RECAMBIO PROTEICO

Las dimensiones macroscópicas del recambio proteico pueden apreciarse considerando un día de la vida de una persona de 70 kilogramos. Habitualmente esa persona consumirá 100 g de proteínas durante el día y, puesto que tiene un balance nitrogenado normal, excretará una cantidad equivalente de productos nitrogenados terminales. Sin embargo, los estudios de marcaje isotópico indican que se sintetizan unos 400 gramos de proteína al día, y que se degradan 400 gramos. Aproximadamente tres cuartas partes de los aminoácidos liberados se reutilizan en la síntesis proteica, y los demás se degradan y se excreta el nitrógeno. Así pues, el conjunto total de aminoácidos consiste en 500 g/día, 100 ingeridos y 400 liberados a través de la degradación proteica. De este conjunto, 400 gramos se utilizan en la síntesis proteica y 100 gramos se catabolizan y se excretan.

Las diversas proteínas presentan una enorme variabilidad en cuanto a sus tiempos de vida metabólicos, que van de pocos minutos a muchos meses. Sin embargo, es preciso tener en cuenta que todas las proteínas del cuerpo están representadas en los 400 gramos degradados en un día normal. Se han realizado numerosos experimentos de pulso y caza en animales de laboratorio (véase Herramientas de la Bioquímica 12A), que indican que la degradación proteica sigue una cinética de primer orden. Para una determinada proteína, las moléculas individuales se degradan de manera aleatoria, de tal modo que una re-

presentación semilogarítmica del isótopo que queda en la proteína respecto al tiempo es lineal. Así pues, podemos determinar la semivida metabólica de una determinada proteína. En la rata, una proteína estándar tiene una semivida de 1 ó 2 días. En la Tabla 20.2 se presenta información relativa a las semividas de proteínas específicas.

Como cabría prever, las proteínas que se segregan a un medio extracelular, como las enzimas digestivas, las hormonas polipeptídicas y los anticuerpos, tienen un recambio metabólico bastante rápido, mientras que las proteínas que desempeñan un papel predominantemente estructural, como el colágeno del tejido conjuntivo, son metabólicamente mucho más estables. Las enzimas que catalizan pasos limitantes de la velocidad de las rutas metabólicas son también de corta duración. De hecho, para muchas enzimas, la velocidad de degradación constituye un factor de regulación importante en el control de las concentraciones enzimáticas intracelulares. En cambio, las proteínas que no constituyen puntos de control metabólicos tienen un recambio relativamente lento. En la rata, el citocromo *c* tiene una semivida de casi una semana; en el ser humano, la hemoglobina tiene la misma vida que el eritrocito en el que se encuentra (unos 120 días). Pero, ¿por qué deben sufrir estas proteínas un recambio si su degradación no representa un mecanismo de control metabólico? ¿No es este recambio una pérdida inútil de energía? Consideremos ese punto.

IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL RECAMBIO PROTEICO

Como todos los demás componentes intracelulares, las proteínas están sujetas a la acción de las influencias del medio, fundamentalmente las especies reactivas de oxígeno (véase el Capítulo 15), que pueden influir en su estructura, conformación y actividad biológica. La capacidad de las proteínas para reparar el daño causado es limitada. El recambio proteico puede verse como un sistema de control de la calidad ineficaz en el que tanto proteínas normales como modificadas se degradan y sustituyen aleatoriamente. Sin embargo, algunos trabajos recientes indican que el proceso no es aleatorio; las moléculas de proteínas que se han alterado químicamente son las que se degradan de manera preferente. Un determinado cambio químico puede marcar a una molécula proteica, haciendo que pase a ser el objetivo de una enzima proteolítica que identifica específicamente el marcador y que se encargará de degradarla.

TABLA 20.2 Semividas y localizaciones intracelulares de la degradación en el recambio proteico

	Localización intracelular			
Semivida (horas)	**Núcleo**	**Citosol**	**Mitocondrias**	**Retículo endoplásmico y membrana plasmática**
<2	Productos de oncogenes	Ornitina descarboxilasa, tirosina aminotransferasa, proteína quinasa C	Ácido δ-aminolevulínico sintetasa	HMG-CoA reductasa
2–8	—	Triptófano oxigenasa, proteína quinasa dependiente de cAMP	—	γ-Glutamil transferasa
9–40	Ubiquitina	Calmodulina, glucoquinasa	Acetil-CoA carboxilasa, alanina aminotransferasa	Receptor de LDL, citocromo P450
41–200	Histona H1	Lactato deshidrogenasa, aldolasa, dihidrofolato reductasa, citocromo P670	Citocromo oxidasa, piruvato carboxilasa, citocromo *c*	Citocromo b_5, cit b_5 reductasa
>200	Histonas H2A, H2B, H3, H4	Hemoglobina, glucógeno fosforilasa	—	Receptor de acetilcolina

Fuente: Tomado de M. Rechsteiner, S. Rogers y K. Rote, *Trends Biochem. Sci.* (1987) 12:390-394. © 1987 con permiso de Elsevier Science.
Nota: Esta tabla incluye tan sólo algunos ejemplos de las muchas proteínas cuya semivida se ha determinado en diferentes organismos.

Aunque queda mucho por averiguar respecto a la degradación intracelular de las proteínas, es mucho lo que se ha descubierto durante la última década. Sabemos que en las bacterias, las proteínas mutantes se degradan con mucha mayor rapidez que las correspondientes proteínas de tipo natural. Evidentemente la evolución ha generado proteínas cuya conformación les confiere una máxima estabilidad en el medio intracelular, y la mayor parte de los cambios estructurales reducen esta estabilidad.

El recambio proteico constituye también un camino para la adaptación celular a las modificaciones de las condiciones ambientales. Así, por ejemplo, en muchas bacterias la proteólisis intensa es uno de los fenómenos metabólicos interrelacionados con la **esporulación,** o formación de esporas. Las esporas son una forma termoestable del microorganismo; tienen un metabolismo desdeñable y pueden permanecer latentes durante meses o años. Cuando las condiciones metabólicas inducen la esporulación de una célula en crecimiento, se produce un amplio recambio proteico, y los aminoácidos liberados se utilizan para sintetizar las proteínas de la espora. Este estado casi latente puede mantenerse indefinidamente y, cuando mejoran las condiciones ambientales, se produce la germinación para dar lugar a las células vegetativas.

Todas las proteínas se encuentran en un estado constante de recambio y sustitución, para reparar los daños sufridos y para la regulación biológica.

Excepto para las funciones especializadas como la esporulación, hasta comienzos de los años 1970 se creía que el recambio proteico, que significaba su degradación completa a los aminoácidos, cumplía dos funciones principales: (1) digestión proteica, que proporciona aminoácidos para la síntesis de proteínas y otros metabolitos derivados de los aminoácidos, y (2) librar a las células de proteínas defectuosas, incluyendo las dañadas por mutaciones o por el ambiente. De acuerdo con esto, se pensaba que la mayor parte de las proteasas intracelulares participaban en el recambio proteico. De hecho, se ha considerado que las reacciones de ruptura proteica por endopeptidasas específicas participan en la activación enzimática; un ejemplo es la cascada de la coagulación de la sangre que consideramos en el Capítulo 11. En las últimas dos décadas, ha quedado claro que este proceso de proteólisis limitada (ruptura de unos pocos enlaces peptídicos específicos de una proteína) tiene un conjunto de funciones adicionales, como la regulación de la expresión génica, la respuesta a la agresión ambiental y la participación en las rutas de señalización celular. De gran interés actual es la implicación de las reacciones proteolíticas selectivas en las rutas de señalización que conducen a la *apoptosis*, un proceso normal del desarrollo en el que determinadas células, que han cumplido su función en la diferenciación, sufren una muerte preprogramada. Estas funciones se presentarán con detalle en el Capítulo 28. Aquí consideramos aquellos aspectos del recambio proteico que se relacionan de manera específica con el metabolismo de los aminoácidos, para identificar las clases principales de proteasas intracelulares y para describir algunas de las características estructurales que predisponen a determinadas proteínas a la degradación.

PROTEASAS INTRACELULARES Y LUGARES DE RECAMBIO

Dado que la mayor parte de las proteínas se utilizan intracelularmente, la mayoría se recambian dentro de la célula. Las primeras proteasas intracelulares que se caracterizaron fueron las que se encuentran en los lisosomas. Sin embargo, es evidente que las proteínas se degradan en todos los compartimientos celulares principales, puesto que hay enzimas proteolíticas en todas las partes de la célula. En las células eucariotas se han encontrado al menos cuatro proteasas principales en el citosol, dos proteasas activadas por el Ca^{2+} denominadas **calpaínas,** una proteasa neutra grande (700 kilodalton) de múltiples subunidades, y otra

proteasa aún más grande dependiente de ATP denominada **proteasoma.** Estas enzimas son distintas de las proteasas lisosómicas, denominadas **catepsinas,** que están diseñadas para actuar en un medio ácido. Aunque no se han definido aún las funciones específicas de cada proteasa, parece probable que las proteínas extracelulares captadas por una célula y las proteínas celulares de larga duración se degradan en los lisosomas, mientras que en otros compartimientos se produce el recambio proteico selectivo en relación con la regulación metabólica.

Los lisosomas, que se forman por gemación a partir del complejo de Golgi, son bolsas de enzimas digestivas, que contienen proteasas, nucleasas, lipasas y enzimas de degradación de hidratos de carbono. Como se considerará posteriormente en el Capítulo 28, los lisosomas desempeñan diversas funciones celulares: secreción de enzimas digestivas, digestión de orgánulos destinados a la destrucción, digestión de partículas alimentarias o bacterias engullidas mediante fagocitosis, o liberación intracelular de enzimas seguida de **autólisis,** digestión y muerte de una célula como parte del proceso morfogenético normal del desarrollo. Así, por ejemplo, la membrana que existe entre los dedos de los pies y entre los dedos de las manos en la fase fetal inicial del ser humano se destruye mediante este tipo de muerte celular programada.

A diferencia de las enzimas lisosómicas, que generalmente están secuestradas de forma segura en sus vesículas, toda actividad proteasa libre en el citosol normal debe estar bajo un estricto control, de forma que ataque sólo a aquellas proteínas que es necesario destruir (proteínas dañadas, mutantes o prescindibles). Además, aunque la proteólisis está termodinámicamente favorecida, gran parte del recambio proteico intracelular requiere una cantidad considerable de ATP. Algunos trabajos recientes indican que el proteasoma tiene una estructura tubular (Figura 20.10) y que es necesaria energía del ATP tanto para marcar las proteínas para la degradación como para desplazarlas al interior del tubo y a través del mismo. La identificación o marcado de aquellas proteínas cuya degradación se ajusta a los intereses de la célula implica algunos esquemas de marcaje que se describen en la sección siguiente.

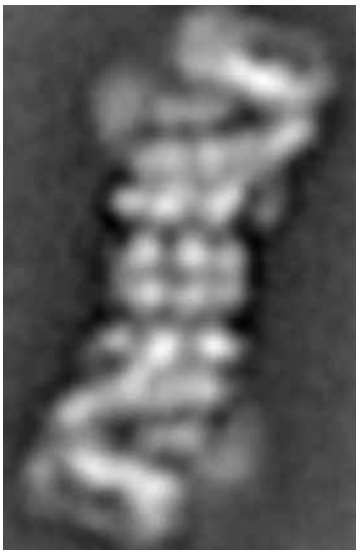


FIGURA **20.10**

Estructura del proteasoma. Esta fotografía de microscopia electrónica muestra el proteasoma de 26S del sapo *Xenopus laevis*. Esta proteína grande de los eucariotas contiene siete subunidades diferentes de tipo α (en los extremos del tubo) y siete subunidades diferentes de tipo β. Las proteínas señaladas mediante reacción con la proteína ubiquitina pasan a lo largo del tubo de un modo que depende del ATP. Una entidad menor, denominada proteasoma de 20S, contiene un centro proteolítico independiente del ATP. Las células procariotas contienen sólo el proteasoma de 20S. Se ha descrito la estructura cristalina del proteasoma de 20S de una arqueobacteria, la *Thermoplasma acidophilum*.

Cortesía de W. Baumeister de A. Lupas, J. M. Flanagan, T. Tamura y W. Baumeister, *Trends Biochem. Sci.* (1997) 22:399-404, con permiso de Elsevier Science.

SEÑALES QUÍMICAS PARA EL RECAMBIO

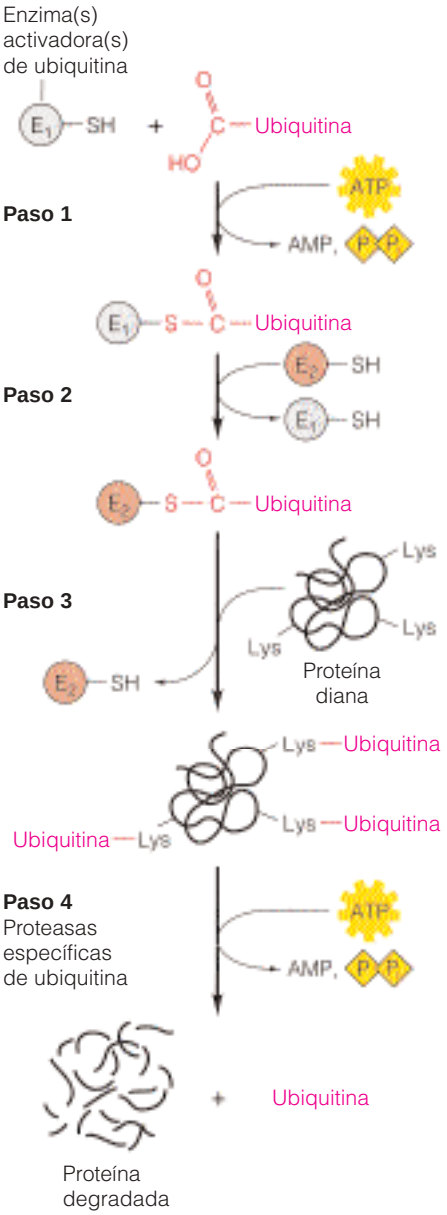
Las tasas de recambio de las distintas proteínas varían hasta 1000 veces, mientras que las diferencias de estabilidad de las proteínas, medidas según la desnaturalización in vitro, pueden ser mucho menores. En la actualidad hay cuatro características estructurales a las que se las considera factores determinantes de la tasa de recambio: (1) **ubiquitinización,** (2) oxidación de determinados residuos catalizada por metales, (3) **secuencias PEST** y (4) determinados residuos N-terminales.

Ubiquitinización

La ubiquitina es una proteína pequeña (76 residuos) y termoestable que se encuentra en todas las células eucariotas y debe su nombre a su amplia distribución. La ubiquitina experimenta una reacción dependiente de ATP con las proteínas, que condensa los residuos de glicina C-terminales de la ubiquitina con grupos amino de lisina de la proteína objetivo, como se muestra en la Figura 20.11. Estas proteínas modificadas se degradan poco después por el proteasoma, que reconoce a las proteínas con ubiquitina y utiliza la energía del ATP para llevarlas a lo largo de su estructura tubular. Todavía no está claro de qué manera se eligen las proteínas que reciben este "beso de la muerte", pero intervienen en ello aspectos de la secuencia de aminoácidos que se describen en las secciones siguientes.

FIGURA **20.11**

Destrucción programada de las proteínas citosólicas mediante el sistema de marcado de la ubiquitina. E_1 y E_2 son enzimas que intervienen en la transferencia de ubiquitina a residuos de lisina sobre las proteínas diana. **Paso 1:** formación, dependiente de ATP, de un enlace tioéster entre el C-terminal de la ubiquitina y un tiol de cisteína en E_1. **Paso 2:** transferencia de la ubiquitina de E_1 a E_2. **Paso 3:** transferencia de la ubiquitina a residuos de lisina en las proteínas diana. **Paso 4:** proteólisis, dependiente de ATP, de las proteínas marcadas por la ubiquitina.



Oxidación de residuos de aminoácidos

Earl Stadtman y sus colaboradores han demostrado que muchas proteínas experimentan una oxidación de función mixta en determinados residuos, promovida por condiciones que generan radicales de oxígeno. El Fe^{2+} y el radical hidroxilo, $OH^{\cdot}$, son reactantes esenciales en este proceso, y los residuos de lisina, arginina y prolina los más susceptibles a la oxidación. Evidentemente estas modificaciones marcan a estas proteínas para su posterior degradación por las proteasas citosólicas. En consonancia con esta idea está el aislamiento reciente de una proteasa, tanto de *E. coli* como de hígado de la rata, que rompe in vitro la glutamina sintetasa oxidada, pero que no ataca a la enzima nativa; presumiblemente, otras proteínas oxidadas son también objetivos de esta enzima. Obsérvese que la oxidación es diferente de la reacción con ubiquitina, ya que la última es una señal específica diseñada para marcar proteínas para la degradación. Las pruebas recientes sugieren que la acumulación de proteínas con daños oxidativos más allá de la capacidad de la célula para degradarlas y sustituirlas contribuye de manera importante al envejecimiento celular.

Secuencias PEST

El estudio de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de vida corta ($t_{1/2}$ < 2 horas) indica que prácticamente todas estas proteínas contienen una o más regiones con abundante prolina, glutamato, serina y treonina. Con el empleo de las designaciones de una letra de estos aminoácidos (P, E, S y T, respectivamente), a estas regiones, de entre 12 y 60 residuos de longitud, se las ha denominado secuencias PEST. Son muy pocas las proteínas de vida larga que contienen estas regiones. Aunque estas pruebas son en gran parte circunstanciales y no nos dicen nada sobre la función bioquímica de las secuencias PEST, el patrón es el resultado de la inspección de varias docenas de secuencias de aminoácidos. Además, la creación de secuencias PEST en las proteínas de vida larga mediante mutagénesis de lugar dirigida aumenta su labilidad metabólica. Parece probable, pues, que la región PEST forme parte de un esquema de reconocimiento para los sistemas enzimáticos que degradan las proteínas de vida corta, que posiblemente incluya el sistema de marcado de la ubiquitina.

Residuo aminoácido N-terminal

Los experimentos con bacterias han revelado que la semivida intracelular de una determinada proteína varía considerablemente en función de la identidad de su residuo aminoácido N-terminal. Un residuo N-terminal de Phe, Leu, Tyr, Trp, Lys o Arg está correlacionado con una vida metabólica corta, mientras que las proteínas con otros amino terminales tienen una vida más prolongada. Estas observaciones, que se realizaron inicialmente en proteínas naturales, se han visto confirmadas por experimentos en los que se alteró el amino terminal de una proteína mediante mutagénesis dirigida, lo cual produjo cambios correspondientes de las semividas metabólicas de las proteínas mutantes. En las células animales y vegetales parece aplicarse la misma "regla del extremo N".

Los tiempos de vida metabólicos de las proteínas vienen determinados por la ubiquitinización, que está determinada por las secuencias PEST, por residuos N-terminales concretos y por la oxidación de ciertos residuos.

Éstas y otras observaciones indican que determinadas características estructurales específicas de las proteínas incluyen información acerca de la estabilidad metabólica de las mismas. No se han determinado aún la naturaleza molecular de ese procesado de la información y las identidades de las enzimas que intervienen y, como se señalará posteriormente en el Capítulo 28, la proteólisis se considera comparable a la fosforilación en su importancia como un mecanismo regulador del metabolismo.

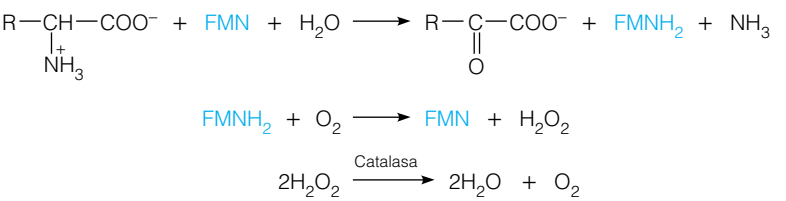
Degradación de los aminoácidos y metabolismo de los productos finales nitrogenados

CARACTERÍSTICAS COMUNES DE LAS RUTAS DE DEGRADACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

En los animales cuyo consumo de proteínas en la alimentación supera a las necesidades existentes para la síntesis de proteínas y otras biosíntesis, el exceso de nitrógeno se degrada en su mayor parte, y los esqueletos carbonados se metabolizan en el ciclo del ácido cítrico. Así pues, las proteínas pueden contribuir de manera importante a satisfacer las necesidades energéticas de un animal. En cambio, las plantas y las bacterias pueden sintetizar generalmente la mayor parte de sus propios aminoácidos y regular las rutas anabólicas, de tal manera que rara vez se producen excesos. Habitualmente los microorganismos utilizan los aminoácidos preformados con preferencia a su síntesis, aunque muchas bacterias pueden satisfacer todas sus necesidades de nitrógeno y carbono a partir de un único aminoácido. Las rutas de degradación que actúan en estos casos son en general similares a las descritas en los animales.

La degradación de los aminoácidos suele iniciarse con la conversión en el correspondiente α-cetoácido mediante transaminación o desaminación oxidativa.

Con pocas excepciones, el primer paso de la degradación de los aminoácidos consiste en la eliminación del grupo α-amino para dar el α-cetoácido correspondiente. Esta modificación suele realizarse mediante una transaminación, con la síntesis simultánea de glutamato a partir de α-cetoglutarato, lo cual va seguido de la reacción de la glutamato deshidrogenasa, como se mostró en la página 806. De esta forma, el proceso neto es la desaminación del aminoácido al cetoácido correspondiente más amoníaco. La misma conversión neta puede también catalizarse por la **L-aminoácido oxidasa,** una enzima flavoproteica que se encuentra en el hígado y el riñón.



El peróxido formado se descompone por la catalasa. El riñón y el hígado poseen también una cantidad abundante de **D-aminoácido oxidasa** que contiene FAD. No se conoce la función de esta enzima en los animales, ya que los isómeros D de los aminoácidos son bastante raros. Sin embargo, las paredes celulares de las bacterias contienen D-aminoácidos (véase el Capítulo 16) y diversas células bacterianas contienen D-aminoácido oxidasas.

Una vez eliminado el nitrógeno, el esqueleto carbonado puede procesarse hacia la oxidación en el ciclo del ácido cítrico o puede utilizarse para la biosíntesis de hidratos de carbono, dependiendo del estado fisiológico del organismo. En la Figura 20.12 se muestran los puntos de entrada en el ciclo del ácido cítrico de

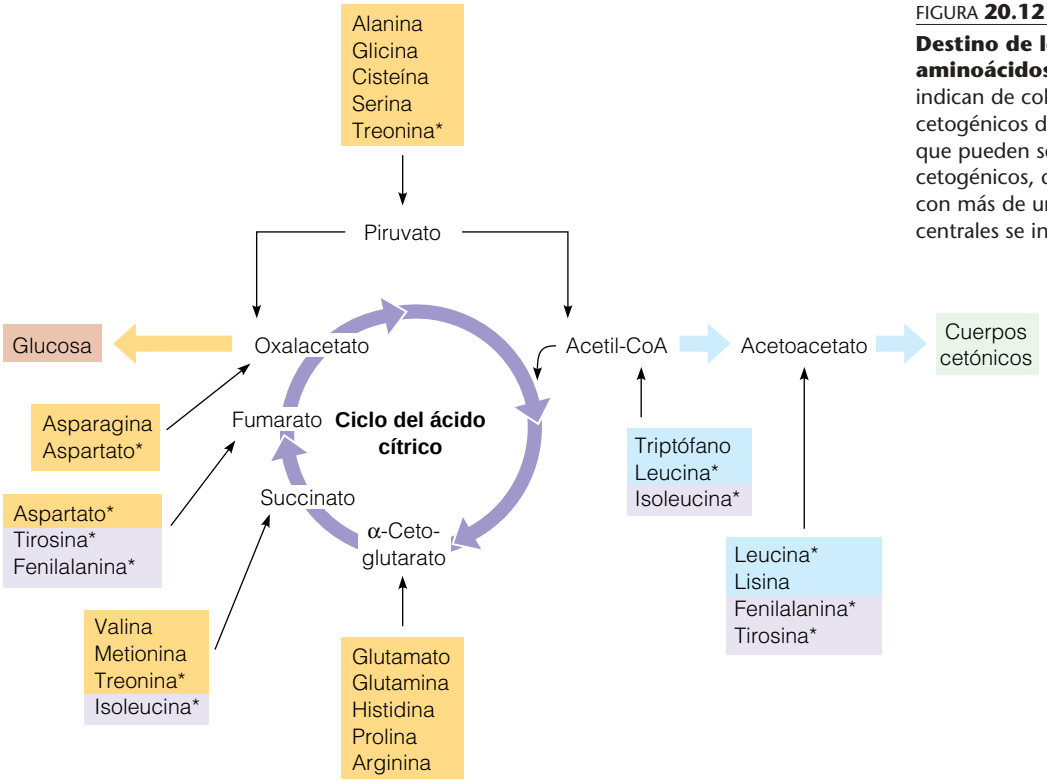


FIGURA **20.12**

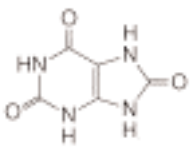
Destino de los esqueletos carbonados de los aminoácidos. Los aminoácidos glucogénicos se indican de color naranja, los aminoácidos cetogénicos de color azul, y los pocos aminoácidos que pueden ser tanto glucogénicos como cetogénicos, de color morado. Los aminoácidos con más de una vía de entrada en las rutas centrales se indican con un asterisco.

los productos de degradación de cada uno de los aminoácidos. Las rutas individuales se presentarán en el Capítulo 21.

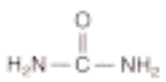
Los aminoácidos cuyos esqueletos generan piruvato u oxalacetato (son ejemplos la alanina o el aspartato) se convierten de manera eficaz en hidratos de carbono mediante la gluconeogénesis. Los aminoácidos que conducen a la acetil-CoA o la acetoacetil-CoA, como la leucina, tienen una contribución intensa a la cetogénesis. Los términos **glucogénico** y **cetogénico** se han utilizado para clasificar a los aminoácidos como generadores básicamente de hidratos de carbono o de cuerpos cetónicos, respectivamente.

DESACTIVACIÓN TÓXICA Y EXCRECIÓN DE AMONÍACO

Aunque el amoníaco es un participante universal en la síntesis y degradación de los aminoácidos, su acumulación en concentraciones anormales tiene consecuencias tóxicas. Por lo tanto, las células con un catabolismo activo de los aminoácidos deben ser capaces de biotransformar y/o excretar el amoníaco con la misma rapidez con que éste se genera. Para la mayor parte de los animales acuáticos, que pueden captar y expulsar cantidades ilimitadas de agua, el amoníaco se disuelve simplemente en el agua y se difunde al exterior. Dado que los animales terrestres necesitan conservar el agua, convierten el amoníaco en una forma que pueda excretarse sin que ello comporte pérdidas de agua importantes. Los pájaros, los reptiles terrestres y los insectos convierten la mayor parte de su amoníaco excedente en **ácido úrico,** una purina oxidada. Dado que el ácido úrico es bastante insoluble, precipita y puede excretarse sin una pérdida de agua importante y sin que se eleve la presión osmótica. Esto reviste una especial importancia durante la parte de la vida de cada animal que transcurre en el huevo. La biosíntesis de ácido úrico se produce mediante la ruta utilizada para la síntesis de los nucleótidos de purina, una ruta que se presentará en el Capítulo 22.



Ácido úrico

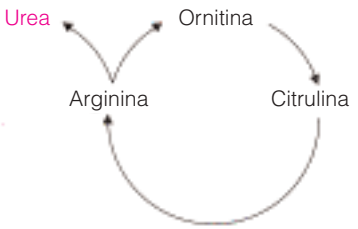


Urea

Los animales han creado rutas, adaptadas a sus estilos de vida, para la excreción de amoníaco, ácido úrico o urea, como principales productos finales nitrogenados.

La mayor parte de los mamíferos excretan el grueso de su nitrógeno en forma de **urea** (una excepción interesante es el perro dálmata que excreta la mayor parte del nitrógeno como ácido úrico). La urea es muy soluble y, al ser eléctricamente neutra, no afecta al pH cuando se acumula, como ocurre con el amoníaco.

CICLO DE LA UREA DE KREBS-HENSELEIT



La urea se sintetiza casi exclusivamente en el hígado, y se transporta posteriormente a los riñones para su excreción. La ruta de síntesis, que es cíclica, fue descubierta por Hans Krebs y Kurt Henseleit en 1932, cinco años antes que el otro ciclo que hizo famoso a Krebs. Estos dos autores estaban investigando la ruta mediante la adición de precursores posibles a cortes de hígado, y midiendo luego la cantidad de urea producida. Al añadir arginina, la producción de urea mostraba un exceso molar de 30 veces respecto a la cantidad de arginina administrada. Se observaban resultados semejantes cuando se sustituía la arginina por dos aminoácidos relacionados estructuralmente, la **ornitina** y la **citrulina.** Dado que estos tres aminoácidos parecían actuar de manera catalítica para fomentar la síntesis de urea, Krebs y Henseleit propusieron la existencia de una ruta cíclica (véase el margen).

La propuesta era correcta, y fue confirmada posteriormente por el aislamiento de las enzimas que intervienen en el proceso y la identificación de la ruta de biosíntesis de la ornitina, que inicia el proceso. Estos detalles se presentan en la Figura 20.13. La ornitina actúa como "transportador", sobre el cual se ensamblan los átomos de carbono y nitrógeno que finalmente constituirán la urea. La propia ornitina se sintetiza a partir del glutamato, mediante una ruta que se mostrará en el Capítulo 21 (véase la Figura 21.2). El origen del carbono y de un átomo de nitrógeno de la urea es el carbamoil fosfato, que reacciona con la ornitina a través de la enzima **ornitina carbamoiltransferasa,** para dar citrulina. El segundo nitrógeno procede del aspartato, que reacciona con la citrulina para formar **argininosuccinato,** mediante la acción de la **argininosuccinato sintetasa.** A continuación, la **argininosuccinasa** rompe el argininosuccinato mediante una reacción no hidrolítica y no oxidativa para dar arginina y fumarato. La arginina se rompe de forma hidrolítica por la **arginasa,** para regenerar la ornitina y producir una molécula de urea.

La enzima arginasa es la responsable de la naturaleza cíclica de la ruta de biosíntesis de urea. Prácticamente todos los organismos sintetizan arginina a partir de ornitina mediante las reacciones que se muestran en la Figura 20.13. Sin embargo, tan sólo los organismos **ureotélicos** (los que excretan la mayor parte de su nitrógeno en forma de urea) contienen arginasa y, por tanto, tan sólo estos organismos realizan la ruta cíclica. Es interesante señalar que la capacidad de sintetizar arginasa aparece en las ranas al mismo tiempo que experimentan la metamorfosis de la fase de renacuajo a la de animal adulto. Dado que el renacuajo vive en el agua, puede excretar el amoníaco. La rana adulta, al adaptarse a un estilo de vida terrestre, presenta la capacidad de sintetizar urea.

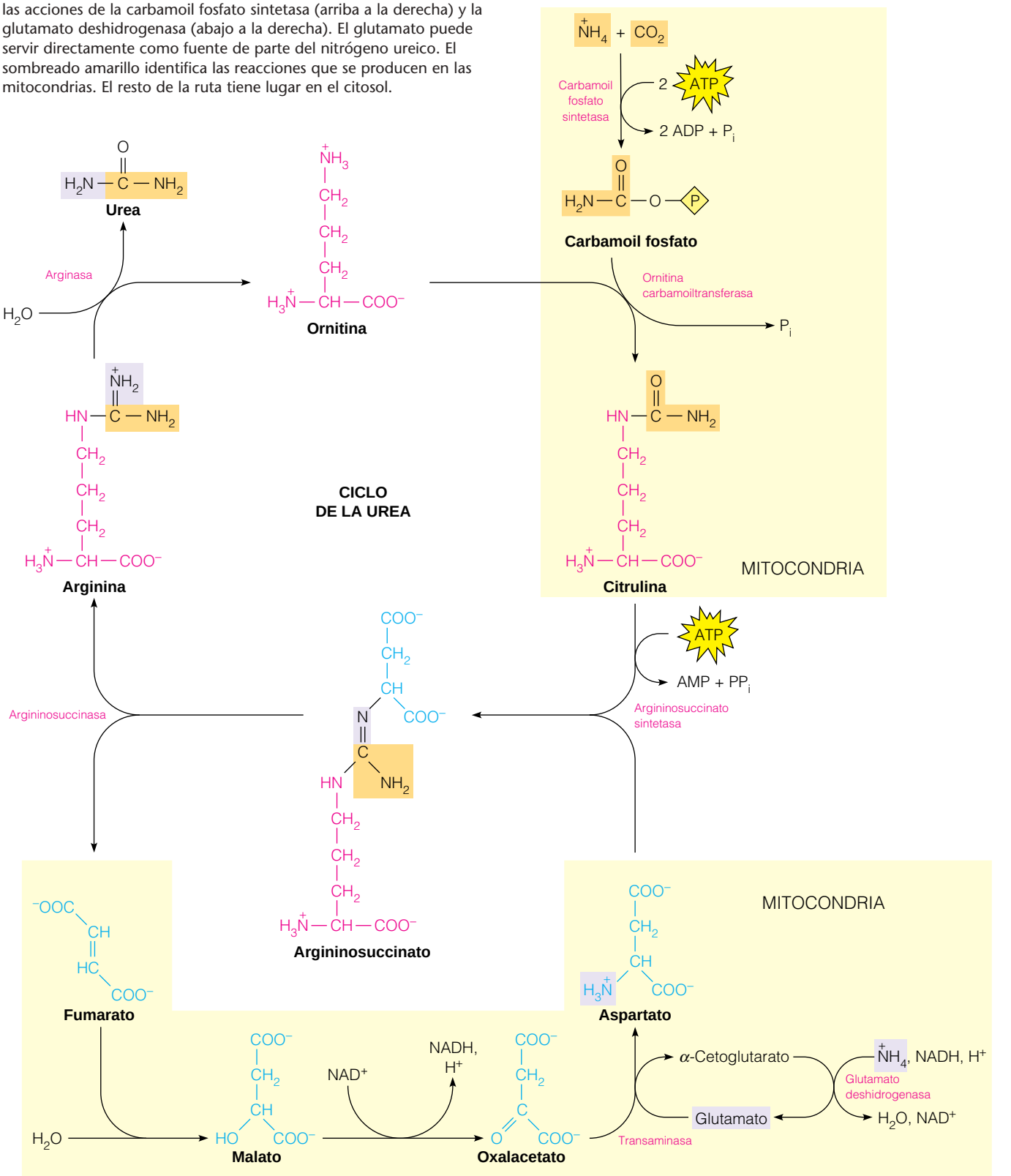
Como ya se ha indicado, un átomo de nitrógeno de la urea procede del aspartato. Este átomo tiene su origen en el amoníaco, que se transfiere al glutamato a través de la reacción de la glutamato deshidrogenasa, y luego al aspartato mediante transaminación. Obsérvese en la parte inferior de la Figura 20.13 que el balance de carbono se mantiene en este proceso mediante la conversión del fumarato producido en la rotura del argininosuccinato a oxalacetato en el ciclo del ácido cítrico y luego a aspartato mediante transaminación.

La reacción neta para una vuelta del ciclo de la urea es la siguiente:

$$CO_2 + \overset{+}{N}H_4 + 3ATP + \text{aspartato} + 2H_2O \longrightarrow \text{urea} + 2ADP + 2P_i + AMP + PP_i + \text{fumarato}$$

FIGURA **20.13**

Ciclo de la urea de Krebs-Henseleit. La urea (arriba a la izquierda) contiene un carbono y un nitrógeno (naranja) derivados del carbamoil fosfato, y un nitrógeno (morado) derivado del aspartato. El CO_2 y el $^+NH_4$, que son los orígenes últimos de estos átomos, se incorporan por las acciones de la carbamoil fosfato sintetasa (arriba a la derecha) y la glutamato deshidrogenasa (abajo a la derecha). El glutamato puede servir directamente como fuente de parte del nitrógeno ureico. El sombreado amarillo identifica las reacciones que se producen en las mitocondrias. El resto de la ruta tiene lugar en el citosol.



La urea se sintetiza mediante una ruta cíclica que requiere energía y que se inicia y termina en la ornitina.

Son necesarias dos moléculas de ATP para reconvertir el AMP en ATP, con lo que se consumen realmente cuatro (no tres) fosfatos de energía elevada en cada vuelta del ciclo. Así pues, la síntesis de este producto de excreción es energéticamente costosa. Las alimentaciones con un contenido extremadamente abundante de proteínas no son, pues, necesariamente beneficiosas. Dado que se consume mucha energía en la fijación del nitrógeno y en la excreción del mismo, el consumo de proteínas en el alimento en una cantidad superior a la necesaria para la biosíntesis de los metabolitos nitrogenados constituye un desperdicio desde el punto de vista energético.

Las reacciones del ciclo de la urea se producen tanto en las mitocondrias como en el citosol de las células hepáticas. La glutamato deshidrogenasa, las enzimas del ciclo del ácido cítrico, la carbamoil fosfato sintetasa I y la ornitina carbamoiltransferasa se encuentran en la mitocondria y el resto del ciclo se produce en el citosol. Esto significa que la ornitina debe transportarse a las mitocondrias, y la citrulina exportarse al citosol, para que el ciclo pueda funcionar.

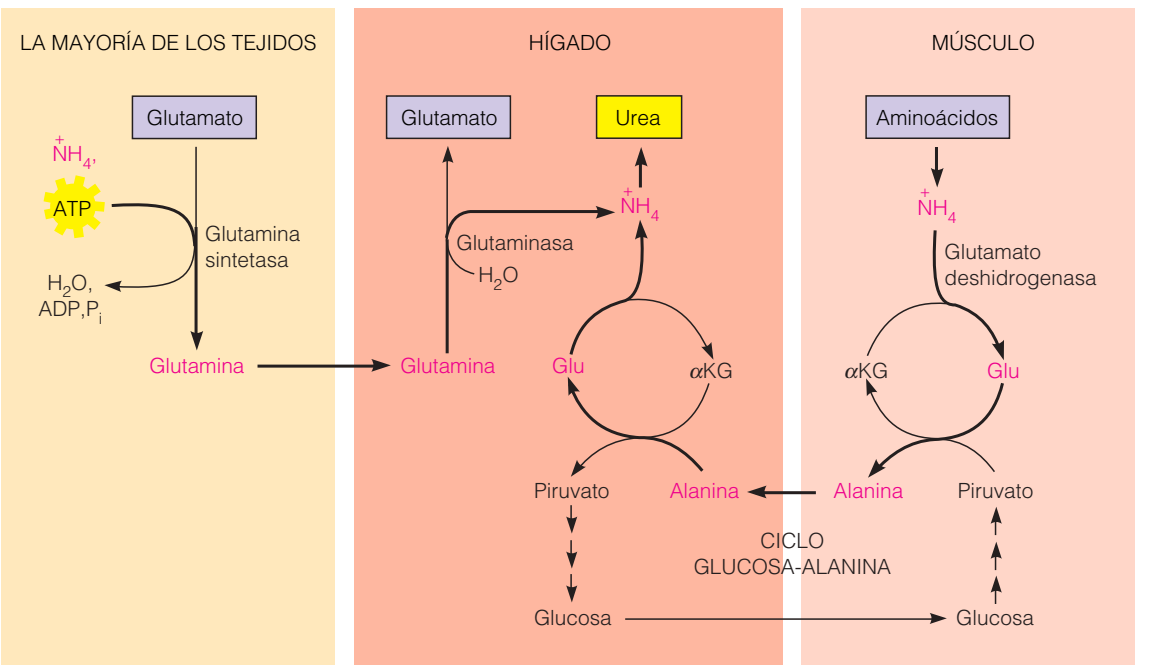
Tras su síntesis, la urea se transporta por el torrente sanguíneo a los riñones, que la filtran para su excreción. Las determinaciones de la concentración de urea en sangre proporcionan un indicador clínico sensible de la función renal, ya que la filtración y eliminación de la urea se deterioran cuando la función renal es incorrecta. De forma análoga, las determinaciones de amoníaco en sangre constituyen una prueba sensible de función hepática. Una lesión hepática, ya sea aguda (hepatitis, intoxicación) o crónica (cirrosis alcohólica), reduce la actividad del ciclo de la urea. La acumulación del amoníaco es tóxica para el cerebro y, por tanto, está relacionada con el estado comatoso que se aprecia en casos avanzados de alcoholismo crónico.

TRANSPORTE DEL AMONÍACO AL HÍGADO

Todos los órganos de los animales degradan los aminoácidos y producen amoníaco. En el transporte de este amoníaco desde otros tejidos al hígado para su conversión final en urea intervienen dos mecanismos (Figura 20.14). La mayoría de los tejidos utilizan la glutamina sintetasa para convertir el amoníaco en el

FIGURA **20.14**

Transporte del amoníaco al hígado para la síntesis de urea. El transportador en la mayoría de los tejidos es la glutamina, pero en el músculo es la alanina.



producto atóxico y eléctricamente neutro glutamina. La glutamina se transporta por la sangre al hígado en donde, como ya se señaló en el Capítulo 16, se degrada hidrolíticamente por la **glutaminasa.**

$$\text{Glutamina} + H_2O \longrightarrow \text{glutamato} + \text{amoníaco}$$

El ciclo glucosa-alanina elimina el amoníaco tóxico del músculo. La glutamina sintetasa y la glutaminasa hacen lo mismo en la mayor parte de los demás tejidos.

El músculo, que obtiene la mayor parte de su energía de la glucólisis, utiliza una ruta diferente, el **ciclo glucosa-alanina.** La glucólisis genera piruvato, que experimenta una transaminación con glutamato para dar alanina y α-cetoglutarato. El glutamato a su vez ha obtenido su nitrógeno del amoníaco, a través de la glutamato deshidrogenasa. La alanina resultante se transporta al hígado, donde pierde su nitrógeno mediante la inversión de los procesos anteriores. Esta inversión produce amoníaco para la síntesis de urea, así como piruvato. Este último sufre un proceso de gluconeogénesis para dar glucosa, que se libera a la sangre para transportarse de nuevo al músculo o para nutrir al cerebro. Este proceso cíclico permite al músculo eliminar el amoníaco y retornar el carbono del piruvato al hígado para la gluconeogénesis.

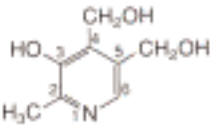
Aunque la urea se ha considerado habitualmente como un producto final, algunos estudios en los animales que hibernan han demostrado que la urea puede reutilizarse para la síntesis de aminoácidos en estos animales. Durante los 6 a 7 meses de hibernación del oso negro, este animal no orina. La urea que se acumula en la vejiga urinaria se reabsorbe de alguna forma y se devuelve a los tejidos para la síntesis de aminoácidos. Las rutas de utilización no se conocen, pero es probable que comporten una ruptura hidrolítica de la urea a amoníaco. Las investigaciones actuales se plantean si los osos son capaces de sintetizar todos los aminoácidos necesarios en condiciones de hibernación.

Coenzimas que intervienen fundamentalmente en el metabolismo del nitrógeno

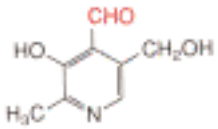
Antes de presentar detalladamente el metabolismo de los aminoácidos y los nucleótidos, como haremos en los dos capítulos siguientes, debemos considerar tres familias de coenzimas que actúan fundamentalmente en el metabolismo de los aminoácidos y/o los nucleótidos. Aunque todas ellas se han mencionado anteriormente, consideraremos aquí sus acciones con detalle. Estos cofactores son: (1) el piridoxal fosfato, el cofactor de la transaminación y otras muchas reacciones del metabolismo de los aminoácidos; (2) las coenzimas de ácido fólico, que transfieren grupos funcionales de un carbono en la síntesis de nucleótidos y de determinados aminoácidos; y (3) las coenzimas B_{12} o cobalaminas que participan en la síntesis de la metionina y, como se ha indicado en el Capítulo 18, en el catabolismo de la metilmalonil-CoA.

PIRIDOXAL FOSFATO

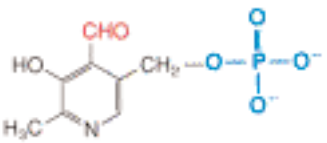
La vitamina B_6 se descubrió en los años 1930 como resultado de los estudios nutricionales realizados en ratas a las que se alimentaba con dietas carentes de vitaminas. La vitamina se aisló inicialmente en forma de **piridoxina,** a la que se dio este nombre por su semejanza estructural con la piridina. La piridoxina contiene un grupo hidroximetilo en la posición 4 del anillo de piridina. Sin embargo, en la coenzima este grupo se ha oxidado a aldehído. Además, el grupo hidroximetilo de la posición 5 está fosforilado. El piridoxal fosfato (que abreviaremos PLP) es la forma predominante de la coenzima, y la piridoxamina fosfato (PMP) es un intermediario en las reacciones de transaminación.



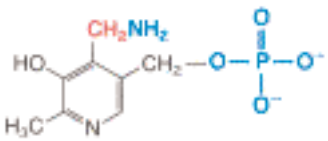
Piridoxina



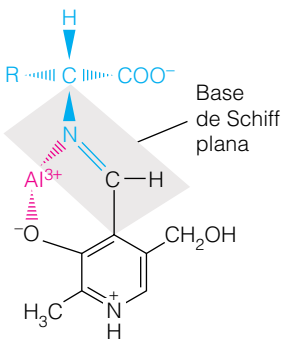
Piridoxal



Piridoxal fosfato (PLP)



Piridoxamina fosfato (PMP)



En todas las reacciones con piridoxal fosfato se produce la formación inicial de una base de Schiff, seguida de la labilización del enlace causada por la extracción de electrones hacia el anillo de piridina de la coenzima.

Las necesidades nutricionales de vitamina B_6 son tan bajas que rara vez se observan estados carenciales en el ser humano. Sin embargo, muchos fármacos y productos tóxicos *inducen* estados carenciales, generalmente al reaccionar con el grupo aldehído y secuestrar, por tanto, la coenzima. Una situación bien conocida es la de la carencia inducida de B_6 que se produce durante el tratamiento de la infección micobacteriana denominada tuberculosis. El fármaco antimicobacteriano **isoniazida** (hidrazida del ácido isonicotínico) reacciona covalentemente con el piridoxal haciendo que éste no pueda fosforilarse por la piridoxal quinasa. Dado que la micobacteria contiene concentraciones bajas de la quinasa, su crecimiento se bloquea eficazmente por el agente. Un tratamiento prolongado con este fármaco puede generar una carencia de B_6 en el paciente mediante el mismo mecanismo, a no ser que se aporten suplementos de la vitamina con la alimentación.

El piridoxal fosfato es una coenzima notablemente versátil. Además de su intervención en las reacciones de transaminación, participa en las descarboxilaciones de los aminoácidos, las racemizaciones, y numerosas modificaciones de las cadenas laterales de los aminoácidos. Una pista clave para identificar el mecanismo de actuación de esta coenzima fue la observación realizada en los años 1940 en el laboratorio de Esmond Snell de que todas las reacciones enzimáticas conocidas que requerían PLP podían catalizarse, en ausencia de cualquier enzima, por el propio piridoxal. También son necesarios algunos iones metálicos, como Al^{3+} o Cu^{2+}. Aunque las velocidades de reacción eran mucho más lentas que en las catalizadas por enzimas, los estudios con modelos permitieron un análisis detallado que condujo a la formulación de un mecanismo de acción unificado para las enzimas que necesitan PLP. Se propuso que el ion metálico estabilizaba una base de Schiff o aldimina, formada entre el piridoxal y el sustrato aminoácido, que se muestra en el margen. Normalmente este papel lo desempeñaría un aminoácido situado en el lugar activo de la enzima.

Actualmente sabemos que todas las enzimas que necesitan piridoxal fosfato actúan a través de la formación de una base de Schiff entre el aminoácido y la coenzima (Figura 20.15). Un catión, tanto si es metálico (como en el sistema del modelo no enzimático), como si se trata de un protón (como en el caso de la reacción enzimática), es esencial para establecer un puente entre el ion fenolato de la coenzima y el nitrógeno imino del aminoácido. Este puente mantiene la estructura plana, que es esencial para la catálisis. La característica catalítica más importante de la coenzima es el nitrógeno electrófilo del anillo de piridina, que actúa como un *sumidero de electrones*, extrayendo los electrones del aminoácido y estabilizando un carbanión intermediario. Las interacciones con la enzima determinan el enlace que se rompe en el sustrato y, por tanto, las reacciones específicas que se catalizan. *Todas las reacciones conocidas de las enzimas PLP pueden describirse, desde el punto de vista del mecanismo, de la misma forma*: formación de una base de Schiff plana o intermediario aldimina, seguido por la formación de un carbanión estabilizado por resonancia con una estructura quinonoide, como se muestra en la Figura 20.15. Según cuál sea el enlace labilizado, la formación de la aldimina puede conducir a una transaminación (como se muestra), a una descarboxilación, a una racemización o a numerosas modificaciones de la cadena lateral, como la β-eliminación.

Aunque el piridoxal fosfato es la coenzima para todas estas reacciones, actualmente sabemos que la especie reactiva no es el grupo aldehído sino una aldimina, que se forma entre la coenzima y un grupo ε-amino de un residuo de lisina en el lugar activo. Este enlace puede reducirse por el borohidruro sódico, para dar un enlace irreversible entre la coenzima y el residuo activo de lisina. Este hallazgo permitió identificar el lugar catalítico de la enzima y el residuo de lisina específico que participa en la unión de la coenzima.

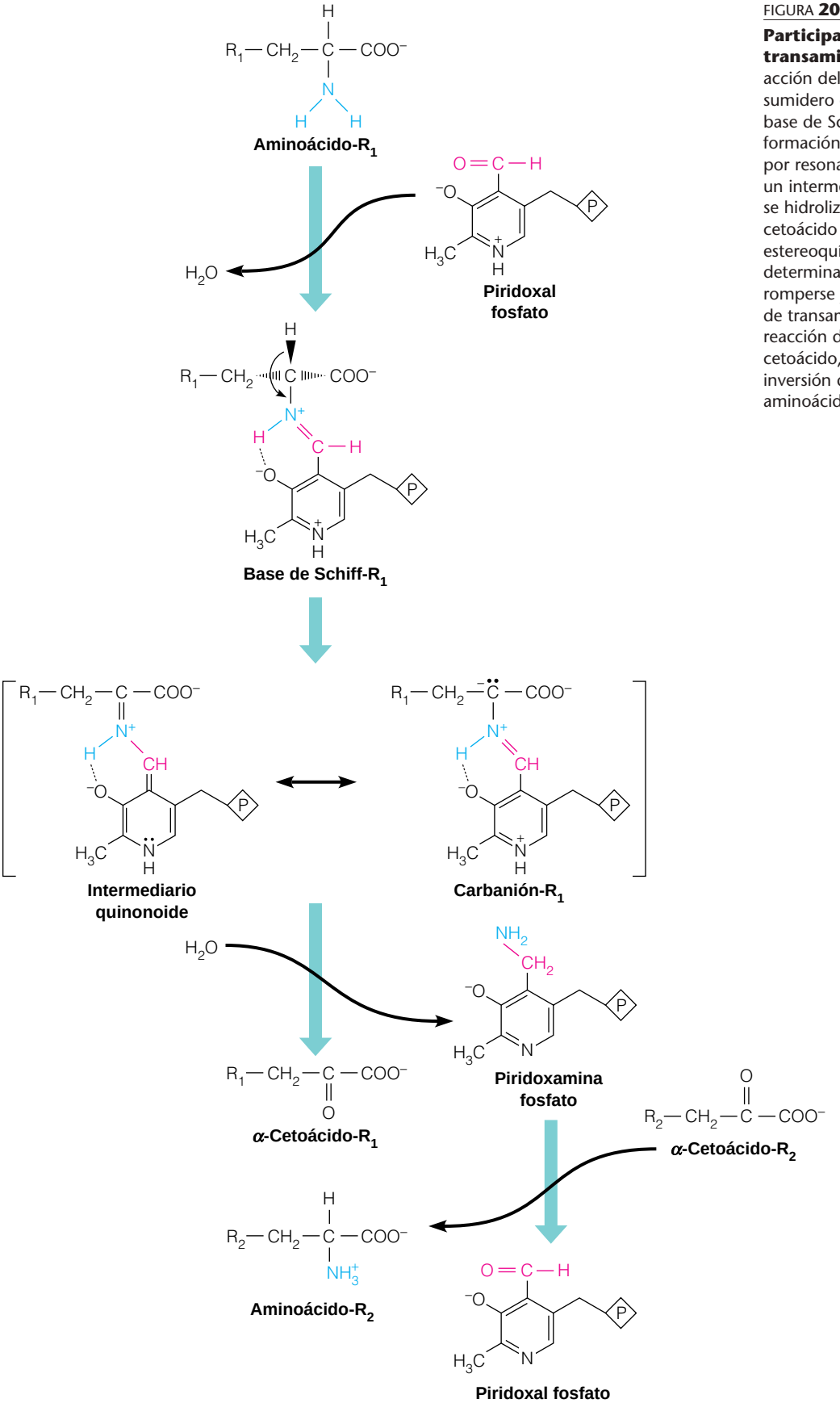
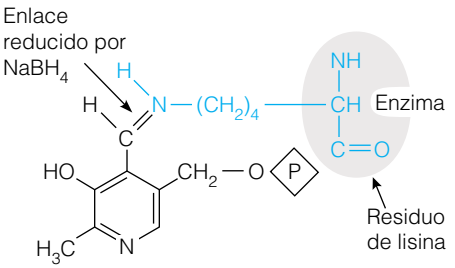
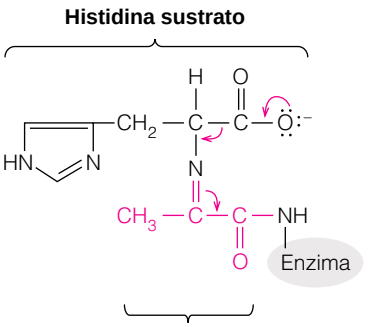


FIGURA **20.15**

Participación del piridoxal fosfato en la transaminación. La figura muestra la acción del ion piridinio de carga positiva como sumidero de electrones. La formación de una base de Schiff intermediaria da lugar a la formación de un carbanión, que se estabiliza por resonancia mediante la interconversión con un intermediario quinonoide. El intermediario se hidroliza para dar lugar a un producto cetoácido y piridoxamina fosfato. La estereoquímica de la base de Schiff inicial determina el enlace que está posicionado para romperse y formar un carbanión. La reacción de transaminación se completa mediante una reacción de la piridoxamina fosfato con un cetoácido, y la conversión, mediante la inversión de esta ruta, en piridoxal fosfato y un aminoácido.



Piridoxal fosfato unido a la enzima



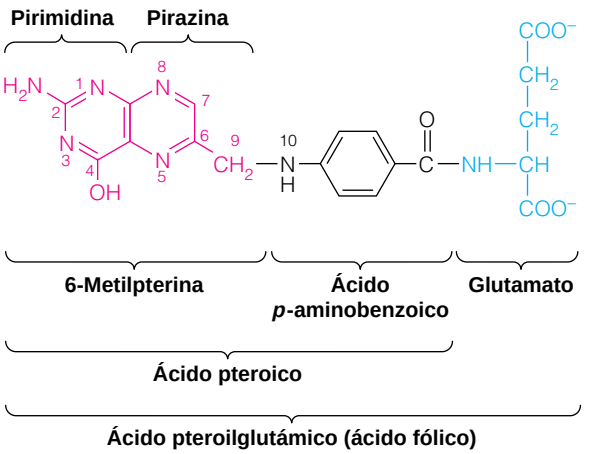
Durante muchos años se pensó que el PLP era el cofactor de todas las descarboxilasas de aminoácidos. Sin embargo, en la actualidad conocemos una clase de enzimas que utilizan como cofactor el *ácido pirúvico*. Aunque difiere estructuralmente del PLP, el piruvato actúa evidentemente de manera similar desde el punto de vista del mecanismo; se une de forma covalente a un grupo amino de la enzima (aunque a través de una amida con su grupo carboxilo). Evidentemente, durante la catálisis el oxígeno ceto del piruvato desempeña un papel comparable al del nitrógeno del anillo del PLP, como se muestra para la enzima **histidina descarboxilasa** de *Lactobacillus*.

COENZIMAS DE TETRAHIDROFOLATO Y METABOLISMO DE UN CARBONO

Descubrimiento y química del ácido fólico

Las coenzimas derivadas de la vitamina **ácido fólico** participan en la generación y la utilización de los grupos funcionales de un solo carbono, metilo, metileno y formilo. La vitamina en sí fue descubierta en los años 1930, cuando se observó que las personas con un determinado tipo de **anemia megaloblástica** podían curarse mediante el tratamiento con extractos de levadura o de hígado. El trastorno se caracteriza, como todas las anemias, por una reducción de la cantidad de eritrocitos. Las células que permanecen de forma característica son grandes e inmaduras, lo cual sugiere la intervención de la vitamina en la proliferación y/o maduración celular. El componente activo de los extractos era también esencial para el crecimiento de los pollos y lo requerían los medios de cultivo para determinadas bacterias, especialmente *Lactobacillus casei* y *Streptococcus faecium*. Esta última observación permitió poner a punto un análisis biológico rápido basado en el crecimiento de estas bacterias, y poco después se logró el aislamiento y la identificación estructural de la sustancia. Se observó que la vitamina era abundante en los vegetales de hojas verdes, como las espinacas, por lo que se la denominó ácido fólico, con la misma raíz que *follaje*.

Desde el punto de vista químico, el ácido fólico se forma a partir de tres grupos distintos: (1) un anillo de **pteridina** heterocíclico, bicíclico, la 6-metilpterina; (2) el **ácido *p*-aminobenzoico (PABA)**, que es necesario también para el crecimiento de muchas bacterias; y (3) el ácido glutámico. Estas tres partes se muestran en la siguiente estructura general:

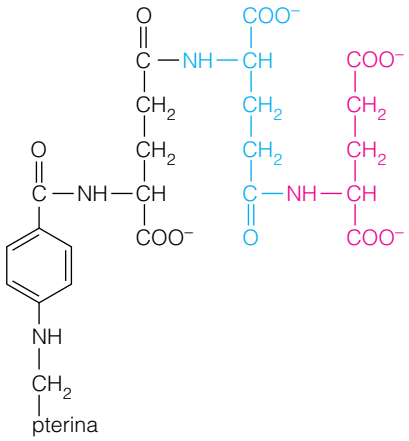


Se conocía ya el anillo de pteridina en la naturaleza, tras el descubrimiento del mismo en un amplio grupo de pigmentos biológicos. Las alas y los ojos de los

insectos contienen pigmentos de pteridina, al igual que la piel de los anfibios y los peces. Las alas de la mariposa contienen pteridinas en cantidad especialmente abundante, y fueron el primer lugar en el que se identificaron estructuralmente los compuestos de este tipo. Estos compuestos reciben su nombre por el término griego *pteron* ("ala").

En la estructura del ácido fólico, la 6-metilpterina está ligada a través del grupo amino del PABA, formando el **ácido pteroico,** que está unido a su vez a través de una amida al glutamato, para formar **pteroilmonoglutamato.** Los folatos que se encuentran en la naturaleza pueden diferir de este compuesto en el número de residuos de glutamato por molécula de vitamina, que va de tres a ocho, o más. Estos residuos están ligados entre sí, no por el enlace peptídico habitual, sino por un enlace peptídico modificado en el que interviene el grupo α-amino y el grupo γ-carboxilo. En el margen se muestra un ejemplo representativo de estos folato poliglutamatos.

La mayoría de las enzimas que utilizan coenzimas de folato se unen más estrechamente a las formas poliglutamatos que a las monoglutamatos. La principal necesidad de residuos de glutamato adicionales corresponde probablemente a la retención intracelular de folatos. Las células animales captan folatos mediante transporte activo, pero sólo pueden captar la forma monoglutamato. Sin embargo, esta forma puede transportarse también al exterior de las células, por lo que la conjugación con otros residuos de glutamato adicionales convierte al folato en una forma que no puede salir de la célula.

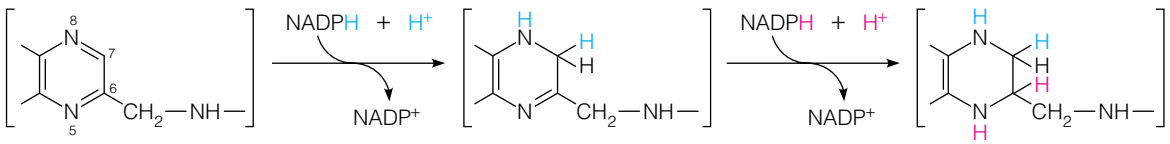


Pteroil-γ-triglutamato

Las coenzimas de folato contienen múltiples residuos de glutamato, que evidentemente facilitan el que sean retenidas dentro de las células.

Conversión del folato en tetrahidrofolato

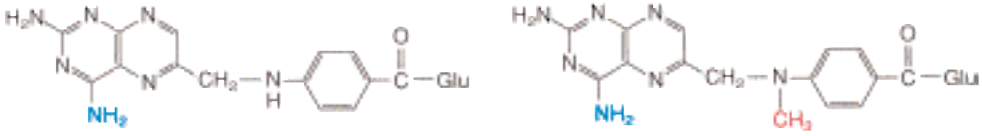
Una vez dentro de la célula, el folato se convierte en formas activas mediante dos reducciones sucesivas de la parte de pirazina del anillo de pteridina. Ambas reacciones están catalizadas por la enzima **dihidrofolato reductasa** específica de NADPH. La primera reducción da lugar a **7,8-dihidrofolato,** y la segunda reducción produce **5,6,7,8-tetrahidrofolato.**



Folato (estructura parcial) **Dihidrofolato** **Tetrahidrofolato**

Por motivos que aclararemos más adelante, el dihidrofolato es el sustrato preferido, y de ahí que se utilice este nombre para la enzima.

La dihidrofolato reductasa se ha estudiado con profusión debido a que es el objetivo de la acción de numerosos **antimetabolitos** que son clínicamente útiles. Un antimetabolito es un compuesto sintético, generalmente un análogo estructural de un metabolito normal, que interfiere con la utilización del metabolito con el que está relacionado estructuralmente. Ya en 1948 se habían sintetizado dos análogos del folato, la **aminopterina** y la **ametopterina** (también denominada **metotrexato**) y se había observado que inducen remisiones en las leucemias agudas.



Aminopterina (4-aminofolato) **Ametopterina (4-amino-10-metilfolato)**

La dihidrofolato reductasa es el objetivo de diversos fármacos anticancerosos, antibacterianos y antiparasitarios útiles.

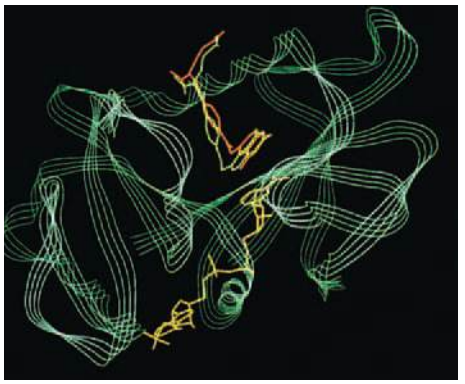
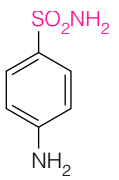


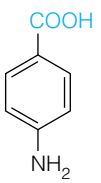
FIGURA **20.16**

Dihidrofolato reductasa humana formando complejos con ligandos. Esta figura se basa en la cristalografía de la proteína humana y una creación de modelo, utilizando estructuras de complejos enzima-ligando de otros orígenes. El NADPH se indica de color naranja, el metotrexato en rojo y el dihidrofolato en amarillo. El grupo amino adicional del metotrexato permite la formación de un enlace de hidrógeno adicional con la enzima, que aumenta su afinidad de unión y altera en cierta medida la conformación del anillo de pteridina unido.

Cortesía de B. I. Schweitzer, A. P. Dicker y J. R. Bertino, *FASEB J.* (1990) 4:2441-2452.



Sulfanilamida

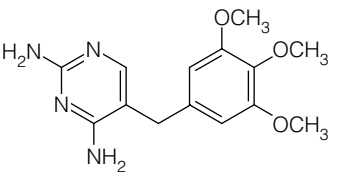


Ácido *p*-aminobenzoico (PABA)

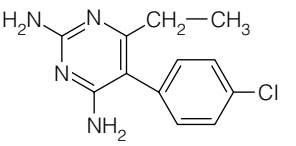
Las coenzimas de tetrahidrofolato transfieren e interconvierten unidades de un carbono en los niveles de oxidación de metilo, metileno y formilo.

Una década después se encontró que estos compuestos inhiben la dihidrofolato reductasa, uniéndose a la enzima con una fuerza al menos 1000 veces superior a la de los sustratos normales. Así pues, estos análogos bloquean la utilización del folato y del dihidrofolato. Actualmente sabemos que su eficacia deriva de la intervención de la dihidrofolato reductasa en la biosíntesis de los nucleótidos de timina y, por tanto, del DNA. La inhibición de la síntesis del DNA bloquea la proliferación de las células cancerosas, como se considerará con mayor detalle en el Capítulo 22. Tuvieron que transcurrir casi dos décadas más antes de que se obtuviera un conocimiento detallado del mecanismo de inhibición de la dihidrofolato reductasa, gracias a la cristalización de los complejos enzima-inhibidor y a la determinación de su estructura tridimensional (Figura 20.16).

Los análogos del folato como el metotrexato se han utilizado en el tratamiento de muchos cánceres diferentes, además de la leucemia. Otros inhibidores de la dihidrofolato reductasa que tienen utilidad clínica presentan una selectividad entre diversas formas de la enzima específicas para distintas especies. Así, la **trimetoprima** inhibe específicamente las dihidrofolato reductasas bacterianas, y se utiliza mucho en el tratamiento de las infecciones bacterianas, mientras que la **pirimetamina** presenta una especificidad similar frente a la enzima de origen protozoario.



Trimetoprima



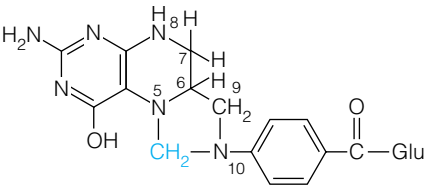
Pirimetamina

El concepto completo de antimetabolitos como fármacos surgió a partir de los trabajos iniciales sobre el metabolismo del folato. Antes de la Segunda Guerra Mundial, uno de los pocos fármacos antibacterianos eficaces de que se disponía era la **sulfanilamida,** que pertenece a la clase de las sulfamidas. Un bioquímico británico, D. D. Woods, observó una semejanza estructural entre la sulfanilamida y el *p*-aminobenzoato, que se sabía era esencial para el crecimiento bacteriano. Antes de que se supiera nada de la relación entre el PABA y el ácido fólico, Woods propuso que la sulfanilamida actúa bloqueando la utilización normal del PABA y acuñó el término *antimetabolito*. El PABA no es necesario para el crecimiento de las células animales, por lo que el fármaco no es tóxico para las células humanas. Años después, una vez establecida la ruta de biosíntesis del folato, se supo que Woods tenía razón; la enzima que incorpora el PABA se inhibe por las sulfamidas. Dado que las células animales no llevan a cabo la ruta de síntesis sino que captan el folato completamente formado del alimento, el fármaco no les causa efectos nocivos. El concepto descubierto por Woods, de buscar una diferencia metabólica entre las células normales y las células patológicas, parásitos infecciosos, células infectadas por un virus o células cancerosas, y aprovechar esa diferencia químicamente, ha tenido un enorme impacto en el campo de la farmacología.

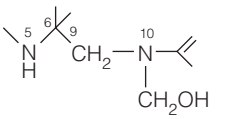
El tetrahidrofolato en el metabolismo de las unidades de un carbono

La función coenzimática del tetrahidrofolato consiste en la movilización y utilización de grupos funcionales de un carbono. Estas reacciones están implicadas en el metabolismo de la serina, la glicina, la metionina y la histidina, entre los aminoácidos, y en la biosíntesis de los nucleótidos de purina y del grupo metilo de la timina.

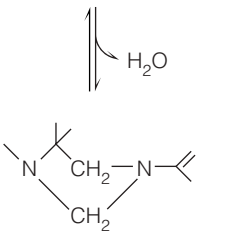
El tetrahidrofolato une unidades de un carbono, con los niveles de oxidación metilo, metileno y formilo, que equivalen al nivel de oxidación metanol, formaldehído y ácido fórmico, respectivamente (Figura 20.17). Los grupos de un carbono sobre al tetrahidrofolato pueden transportarse en N-5 o N-10, o formar un puente entre N-5 y N-10. La formación de un puente aducto cíclico comporta la deshidratación de un intermediario hidroximetilado, por lo que un grupo metileno (—CH_2—) es formalmente equivalente a un grupo hidroximetilo (—CH_2OH) en un compuesto sin formación de puente, y un grupo formilo (—CHO) se cicla para pasar a un grupo **metenilo** (—CH═). Además, hay un aducto monocarbonado de tetrahidrofolato en el que la unidad de un carbono contiene también un átomo de nitrógeno. En este grupo **formimino** (—C═NH), el átomo de carbono está al mismo nivel de oxidación que un grupo formilo. La estructura de un aducto de este tipo, el **5,10-metilentetrahidrofolato,** es la siguiente:



5,10-Metilentetrahidrofolato

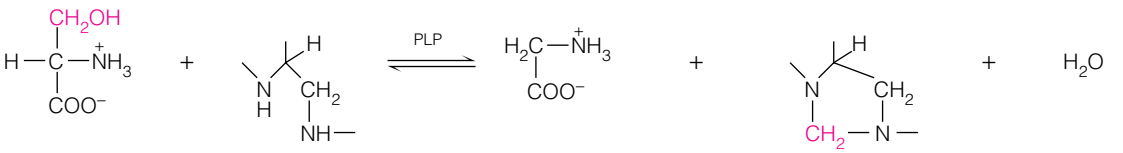


10-hidroximetil-THF



5,10-metilen-THF

El tetrahidrofolato puede captar unidades de un carbono de diversas fuentes. Así, por ejemplo, muchas células realizan una activación del formato dependiente de ATP para dar lugar a 10-formiltetrahidrofolato. La degradación de la histidina, tanto en las células bacterianas como en las animales, produce 5-formiminotetrahidrofolato, al igual que ocurre en la fermentación bacteriana de las purinas. Sin embargo, la mayoría de los organismos obtienen la mayor parte de sus unidades de un carbono activadas a partir del carbono β de la serina y la posterior oxidación de la glicina (reacciones 10 y 11 en la Figura 20.17). La primera de estas reacciones la cataliza la **serina transhidroximetilasa**:



Serina **Tetrahidrofolato** **Glicina** **5,10-Metilentetrahidrofolato**

Esta reacción es reversible y, en la dirección mostrada, produce glicina y 5,10-metilentetrahidrofolato, pero puede utilizarse también, si es necesario, para la biosíntesis de la serina. La enzima requiere también piridoxal fosfato, por lo que el sustrato real es la base de Schiff formada a partir de la serina y el PLP.

La glicina puede dar lugar a una molécula adicional de 5,10-metilentetrahidrofolato mediante la acción del **sistema de fragmentación de la glicina,** un complejo multienzimático situado en las mitocondrias:

Glicina + tetrahidrofolato + NAD^+ ⟶ 5,10-metilentetrahidrofolato + CO_2 + NH_3 + NADH + H^+

Esta reacción constituye la principal ruta catabólica de la glicina en la mayor parte de los organismos. La reacción global es la que se ha mostrado, pero la ruta es desde el punto de vista del mecanismo similar a la catalizada por el complejo piruvato deshidrogenasa (véase el Capítulo 14). Intervienen cuatro proteínas,

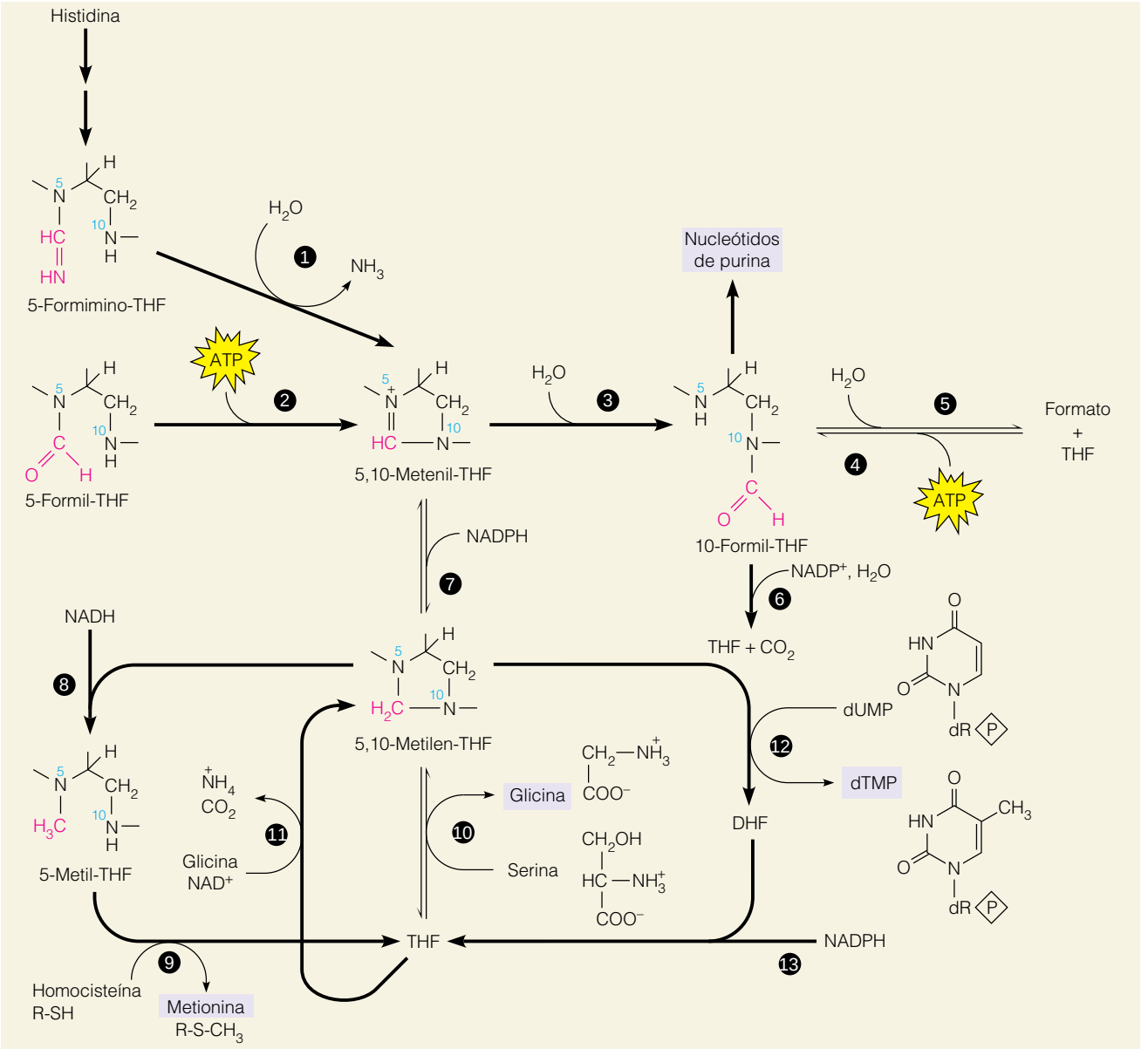


FIGURA **20.17**

Reacciones metabólicas que implican la síntesis, interconversión y utilización de aductos de un carbono del tetrahidrofolato. Se resaltan (en morado) los productos terminales principales del metabolismo de un carbono. Las enzimas que intervienen son las siguientes: (1) ciclodesaminasa, (2) meteniltetrahidrofolato sintetasa, (3) meteniltetrahidrofolato ciclohidrolasa, (4) formiltetrahidrofolato sintetasa, (5) formiltetrahidrofolato hidrolasa, (6) formiltetrahidrofolato deshidrogenasa, (7) metilentetrahidrofolato deshidrogenasa, (8) metilentetrahidrofolato reductasa, (9) homocisteína metiltransferasa (también denominada metionina sintasa), (10) serina transhidroximetilasa, (11) sistema de ruptura de glicina, (12) timidilato sintasa y (13) dihidrofolato reductasa. THF = tetrahidrofolato, DHF = dihidrofolato.

junto con el piridoxal fosfato, el FAD y el ácido lipoico. Las reacciones de la serina transhidroximetilasa y de fragmentación de glicina comprenden esa parte de la ruta de fotorrespiración que tiene lugar en las mitocondrias de los vegetales (Capítulo 17, página 693).

Una vez activada una unidad de un carbono mediante su unión al tetrahidrofolato, puede sufrir interconversiones como el cambio de estado de oxidación, o puede utilizarse directamente en una reacción de biosíntesis. En la Figura 20.17 se muestran la mayor parte de las reacciones conocidas en las que intervienen coenzimas de tetrahidrofolato. Obsérvense las reacciones que comportan un cambio del nivel de oxidación de la unidad de un carbono unida: la oxidación reversible del 5,10-metilentetrahidrofolato para producir 5,10-meteniltetrahidrofolato, catalizada por la **5,10-metilentetrahidrofolato deshidrogenasa** (reacción 7) y la reducción irreversible del 5,10-metilentetrahidrofolato al derivado 5-metilo, que la lleva a cabo la **5,10-metilentetrahidrofolato reductasa** (reacción 8). Muchos organismos contienen enzimas multifuncionales o

complejos que facilitan la canalización de estos intermediarios escasos y/o inestables. Así, por ejemplo, la mayor parte de los eucariotas combinan las actividades 3, 4 y 7 en una sola proteína trifuncional.

Como se indica en la Figura 20.17, las unidades de un carbono procedentes de las coenzimas de tetrahidrofolato se utilizan en la síntesis de nucleótidos de purina, nucleótidos de timina (dTMP) y metionina, además de las reacciones que hemos considerado. Además, en los procariotas, el 10-formiltetrahidrofolato participa en la síntesis de ***N*-formilmetionil-tRNA,** implicado en la iniciación de la síntesis de proteínas (que se considerará en el Capítulo 27). En la síntesis de los nucleótidos de timina, catalizada por la **timidilato sintasa** (reacción 12), la coenzima de tetrahidrofolato actúa como donador de un carbono y como fuente de poder reductor. Dado que esta enzima genera el grupo metilo de la timina a partir del 5,10-metilentetrahidrofolato, cataliza una transferencia de un carbono y una reducción. Los electrones proceden del anillo de pteridina reducido para dar dihidrofolato como producto. Aunque la dihidrofolato reductasa (reacción 13) puede actuar sobre el folato o sobre el dihidrofolato, la reducción del dihidrofolato es más significativa in vivo que la del folato debido a la necesidad de una regeneración constante del tetrahidrofolato a partir del dihidrofolato producido en la reacción de la timidilato sintasa.

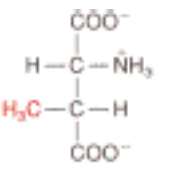
COENZIMAS DE B_{12}

La vitamina B_{12} se descubrió mediante los estudios de una enfermedad que anteriormente era incurable, la anemia perniciosa. Este trastorno se inicia con una anemia megaloblástica, que es prácticamente idéntica a la que se observa en el déficit de folato, pero que conduce a una degeneración irreversible del sistema nervioso si no se trata. En 1926, dos médicos de Harvard, George Minot y William Murphy, observaron que los síntomas de la enfermedad podían aliviarse si se daba a los pacientes una cantidad elevada de hígado crudo. La sustancia activa del hígado, a la que se denominó vitamina B_{12}, estaba presente en cantidades muy pequeñas, por lo que tuvieron que pasar muchos años hasta que se hubo aislado la cantidad suficiente para poder caracterizarla. En 1964, en Inglaterra, Dorothy Hodgkin y sus colaboradores utilizaron la cristalografía de rayos X para completar la determinación de la estructura de esta sustancia activa. Hodgkin recibió el Premio Nobel por este trabajo.

En la Figura 20.18 se muestra la estructura de la vitamina B_{12}. El cobalto metálico está combinado con un sistema de anillo tetrapirrólico, denominado anillo de **corrina,** que es semejante al anillo de porfirina de los compuestos hemo. El cobalto está también ligado a una base heterocíclica, el 5,6-dimetilbenzimidazol (DMB). En la vitamina aislada, la sexta posición de coordinación del cobalto está ocupada por un ion cianuro, pero este ion se introduce durante el aislamiento. La vitamina, tal como se encuentra en los tejidos, contiene en esta posición agua o un grupo hidroxilo. Dada la presencia de cobalto y de muchos nitrógenos amida, los compuestos B_{12} se denominan **cobamidas,** o más comúnmente aunque de manera menos exacta, **cobalaminas.** Los derivados de la B_{12} se denominan también en función del grupo que ocupa la sexta posición de coordinación. Así, la vitamina tal como se aísla es la **cianocobalamina,** y las formas intracelulares son la **acuocobalamina** y la **hidroxicobalamina.**

Formas coenzimáticas de la B_{12}

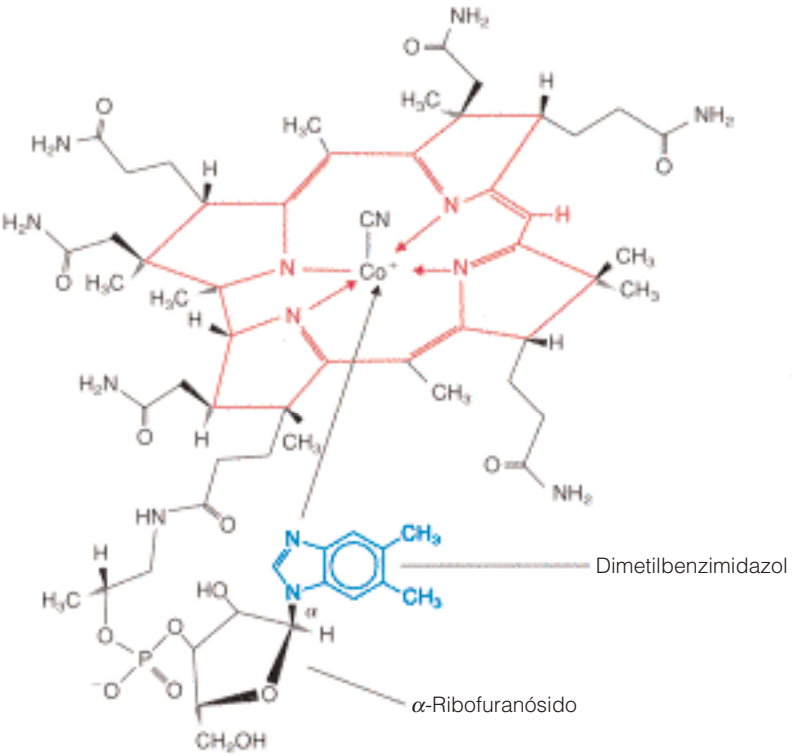
Se conoce la existencia de dos formas de B_{12} con actividad coenzimática (Figura 20.19). La primera de ellas, la **5′-adenosilcobalamina,** fue descubierta en 1964 por H. A. Barker. La bacteria *Clostridium cylindrosporum* fermenta el glutamato en primer lugar mediante una isomerización del mismo a β-metilaspartato.



β-Metilaspartato

FIGURA **20.18**

Estructura de la vitamina B_{12}. La molécula que se muestra aquí es la forma que contiene cianuro que se aisló inicialmente (cianocobalamina). En las células, una molécula de agua o un grupo hidroxilo ocupa el lugar del CN, formando el precursor de las formas de coenzima de B_{12}. El anillo de corrina se muestra en rojo. El 5,6-dimetilbenzimidazol (DMB), que está ligado al cobalto, se indica en azul.



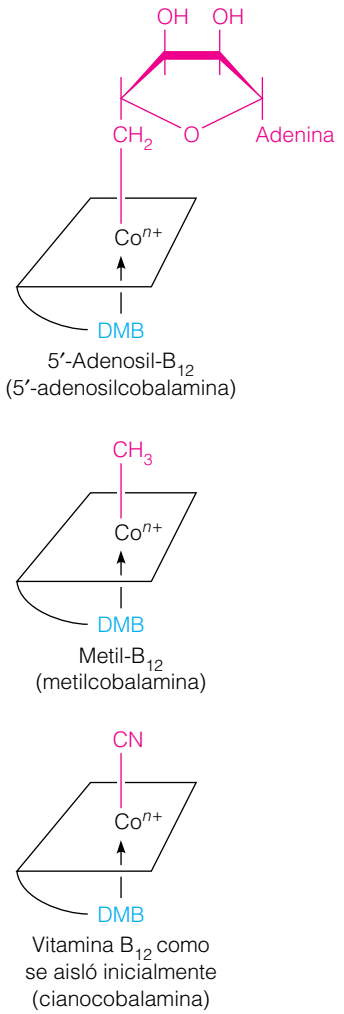
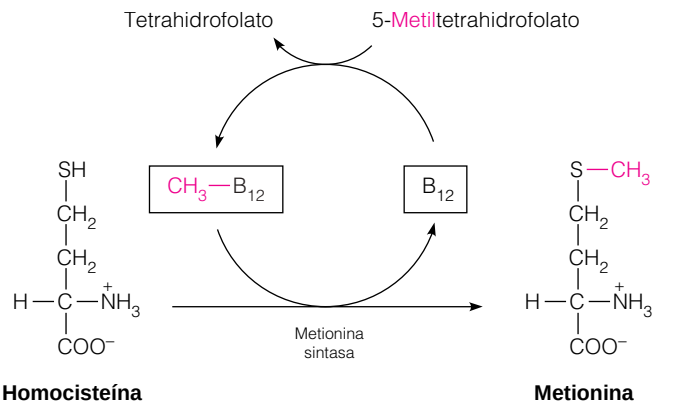


FIGURA **20.19**

Coenzimas derivadas de la vitamina B_{12}. El anillo de corrina, idéntico en todas las formas conocidas de B_{12}, se indica aquí de manera esquemática. El Co lleva una carga positiva (n = 1, 2 ó 3), mientras que cada molécula global carece de carga.

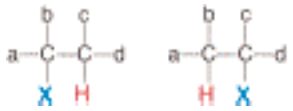
Barker y sus colaboradores indicaron que la adenosilcobalamina es esencial para que se produzca esta reacción. Poco después, los estudios de la síntesis enzimática de metionina a partir de **homocisteína** revelaron la existencia de una segunda forma coenzimática activa, la **metilcobalamina,** o metil-B_{12}. Tanto la adenosilcobalamina como la metilcobalamina contienen un enlace covalente carbono-cobalto, que hace que sean verdaderos productos organometálicos. En la síntesis de metionina, la coenzima transfiere su grupo metilo con un cambio del estado de oxidación del cobalto desde +3 a +1.



Obsérvese que el grupo metilo procede en última instancia del 5-metiltetrahidrofolato (reacción 9, Figura 20.17).

Actualmente se conocen unas 15 reacciones diferentes que requieren B_{12}, la mayoría de las cuales se producen en unas pocas especies bacterianas que llevan a cabo fermentaciones especializadas. Tan sólo dos reacciones se producen en un grado significativo en el metabolismo de los mamíferos: la síntesis de metionina a partir de la homocisteína, que hemos mostrado antes, y la isomerización de

la metilmalonil-CoA para dar lugar a succinil-CoA, que hemos presentado en el Capítulo 18 como un paso clave en la oxidación de los ácidos grasos de cadena impar. Es de interés también la implicación de la metil-B_{12} en la síntesis de metano por las bacterias metanogénicas. Con una excepción, las reacciones conocidas que requieren B_{12} comportan, o bien (1) la transferencia de un grupo metilo, como en la reacción de la metionina sintasa, utilizando como cofactor metilcobalamina, o bien (2) isomerizaciones dependientes de la adenosilcobalamina que comportan el intercambio de un hidrógeno unido al carbono por otro grupo funcional unido al carbono, como se muestra aquí; la metilmalonil-CoA mutasa cataliza una reacción de este tipo.



La única excepción es una reacción de transferencia intermolecular catalizada por una ribonucleótido reductasa de *Lactobacillus* y otros pocos procariotas (véase el Capítulo 22). Esta enzima puede ser un vestigio de una fase evolutiva anterior, puesto que todas las demás ribonucleótido reductasas conocidas actúan mediante un mecanismo que es independiente de la B_{12}, aunque globalmente similar.

Las coenzimas B_{12} poseen o bien un grupo metilo o bien un grupo 5′-adenosilo ligado al Co^{+}, que las convierte en las primeras sustancias organometálicas conocidas del metabolismo.

Acción de la adenosilcobalamina

Los enlaces carbono-carbono son generalmente difíciles de romper y de formar. Las coenzimas de B_{12} catalizan con facilidad reacciones de este tipo, y esta actividad, junto con el nuevo enlace cobalto-carbono, ha centrado la atención sobre los mecanismos de acción de la adenosilcobalamina. A partir de los estudios realizados sobre la metilmalonil-CoA mutasa y una o dos enzimas más, se han establecido los siguientes hechos: (1) La transferencia de hidrógeno es estereoespecífica; algunas de las reacciones comportan una inversión de la configuración y otras no. (2) El hidrógeno que se transfiere no se intercambia con los protones del agua; el hidrógeno isotópico presente en un sustrato se conserva en el producto. (3) El hidrógeno transferido se transporta transitoriamente sobre el carbono 5′ del grupo adenosilo; el marcaje de esta posición con tritio conduce a la incorporación de ese marcaje al producto. (4) Los estudios espectrales indican que el cobalto cambia su estado de oxidación durante la catálisis. (5) Los estudios de resonancia de espín electrónico indican que se generan intermediarios radicales libres durante la catálisis.

Todas estas observaciones implican que el enlace covalente carbono-cobalto sobre la coenzima experimenta una rotura **homolítica** transitoria durante la catálisis. Esto es, tanto el cobalto como el carbono adquieren un electrón del par que formaba el enlace, creando un radical libre en la adenosina C-5′. La interacción con el sustrato crea entonces un radical sustrato, como se muestra para la metilmalonil-CoA mutasa en la Figura 20.20, y ello da lugar a una reordenación del sustrato.

Una característica del mecanismo que se muestra en la Figura 20.20 puede requerir pronto una modificación. A finales de 1994, se describió la estructura cristalina de la metilcobalamina ligada a la metionina sintasa, y se demostró que la coenzima sufre un cambio de conformación importante al unirse a la enzima. Como se indica en la Figura 20.21, la "cola" que contiene DMB ya no está más complejada con el cobalto. En su lugar, la "cola" se ha desplazado hacia un bolsillo profundo, que ayuda a unir estrechamente la coenzima. La sustitución del DMB en coordinación con el cobalto por un residuo de histidina de la enzima, sugiere un papel de la enzima en la estabilización de los intermediarios de la

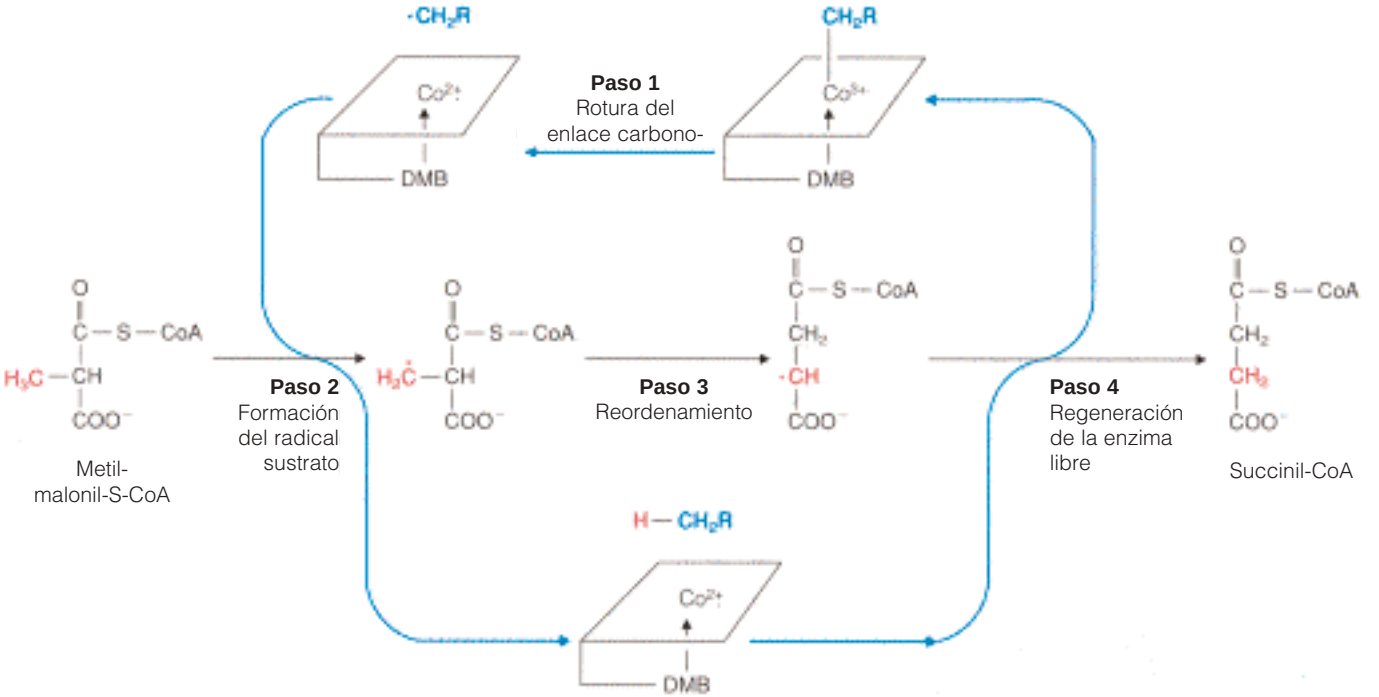
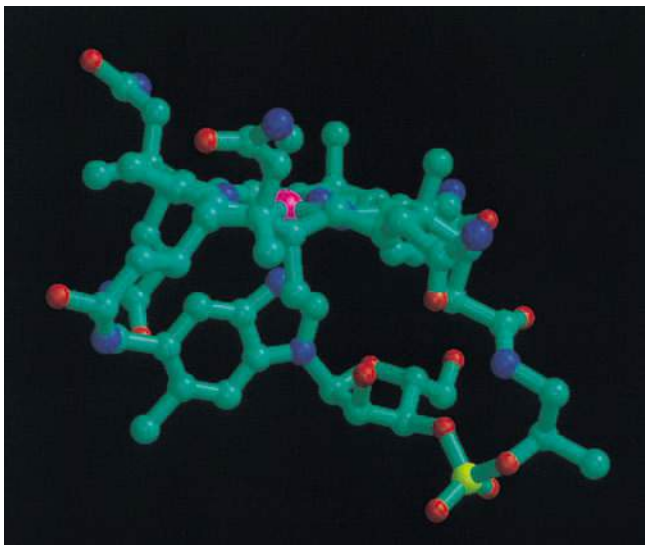
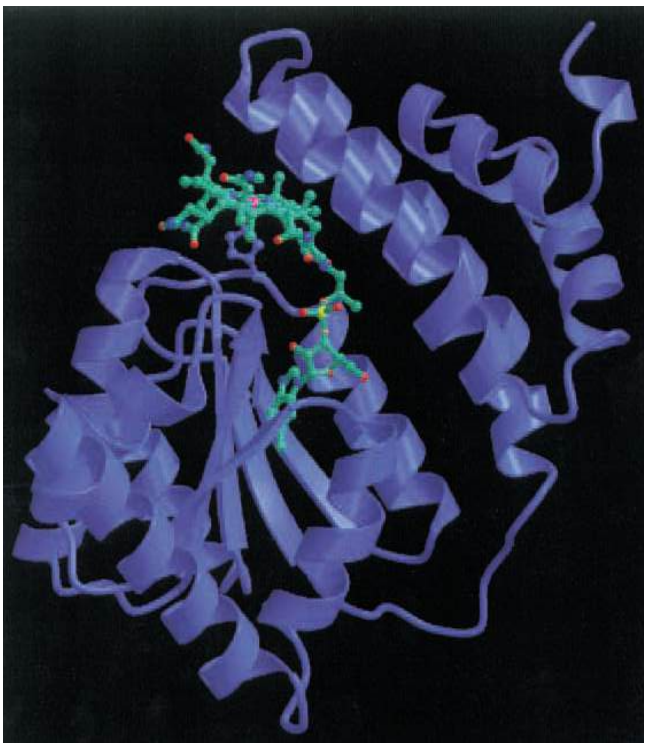


FIGURA **20.20**

Reordenamiento intramolecular catalizado por la metilmalonil-CoA mutasa. Este mecanismo concuerda con las observaciones experimentales y puede explicar otros reordenamientos dependientes de la B_{12}. CH_2R es la porción adenosilo. No se conoce el mecanismo exacto mediante el cual se reordena la forma de radical libre del sustrato.



(a)



(b)

FIGURA **20.21**

Cambio conformacional que acompaña a la unión enzimática de B_{12}. **(a)** Estructura cristalina de la metilcobalamina, con formación de complejos de DMB con el cobalto. **(b)** Dominio de unión de la B_{12} de la metionina sintasa y metilcobalamina unida, que muestra el DMB enterrado en una grieta profunda. Un residuo de histidina de la enzima contacta con la cara inferior del anillo de corrina, en lugar del DMB.

Reproducido con permiso de C. L. Drennan et al., *Science* (1994) 266:1669-1674. © 1994 AAAS.

reacción. No se ha establecido aún la relación de esta estructura con el mecanismo propuesto para otras reacciones enzimáticas dependientes de la cobalamina.

Coenzimas de B_{12} y anemia perniciosa

Volvamos ahora a la función de las coenzimas de B_{12} en el metabolismo de los mamíferos. Recuérdese que la vitamina B_{12} se aisló como un factor que podía curar la anemia perniciosa, lo que sugería que la enfermedad se produce como consecuencia de la carencia de B_{12}. De hecho, la anemia perniciosa es una enfermedad del estómago. El tejido gástrico segrega una glucoproteína, denominada **factor intrínseco,** que forma complejos con la B_{12} ingerida en el tubo digestivo y promueve su absorción a través del intestino delgado al torrente sanguíneo. La anemia perniciosa se produce como consecuencia de una secreción insuficiente de factor intrínseco. De hecho, los pacientes a los que se practica una extirpación quirúrgica del estómago para el tratamiento de las úlceras u otros problemas pueden presentar también los síntomas de la anemia perniciosa. La vitamina sin formar complejos puede absorberse, pero esta absorción es tan poco eficaz que es necesario administrar dosis masivas para curar o evitar la enfermedad.

La anemia perniciosa está causada por la carencia de una glucoproteína necesaria para la absorción intestinal de la vitamina B_{12}, conduciendo a carencias intracelulares de las coenzimas de B_{12}.

Pero, ¿cuál es la relación entre la falta de absorción de la B_{12} y el déficit de formación de eritrocitos que define las anemias? Teniendo en cuenta la semejanza hematológica entre las anemias por carencia de folato y la anemia perniciosa, se ha sospechado durante mucho tiempo la existencia de una relación entre el metabolismo del folato y el de la B_{12}. De hecho, la anemia megaloblástica que se observa en las fases iniciales de la anemia perniciosa desaparece si se administra ácido fólico. Sin embargo, este tratamiento tan sólo retarda la aparición de los síntomas neurológicos que son mucho más graves. Dado que estos problemas neurológicos no se observan nunca en la carencia simple de folato, ¿cuál es la relación metabólica entre estas dos vitaminas?

En la Figura 20.22 se presenta la explicación probable: (1) Cuando las concentraciones de B_{12} son bajas, el flujo a través de la reacción de la metionina sintasa (reacción 9, Figura 20.17) se reduce, pero puesto que generalmente se dispone de la metionina suficiente a través del alimento, no se produce una alteración inmediata del metabolismo de las proteínas. (2) La reducción del 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato (reacción 8, Figura 20.17) continúa, ya que esta reacción es prácticamente irreversible. (3) Dado que la metionina sintasa es la única enzima conocida de los mamíferos que actúa sobre el 5-metiltetrahidrofolato, la disminución de la actividad intracelular de esta enzima hace que se acumule el 5-metiltetrahidrofolato a costa de un agotamiento de las reservas de las demás coenzimas de tetrahidrofolato. Así pues, a pesar

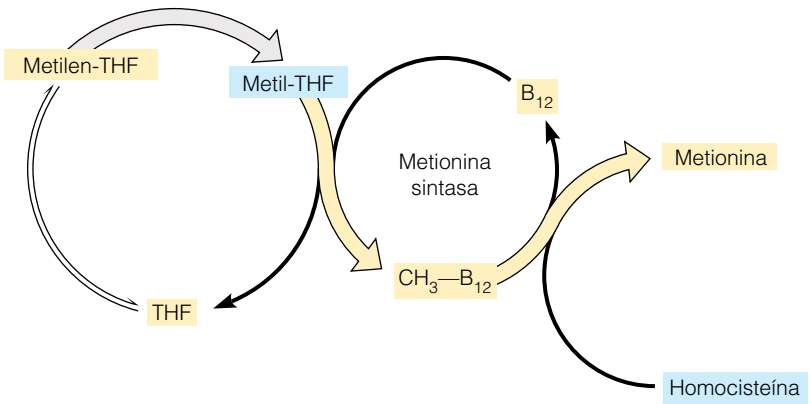


FIGURA **20.22**

Relación entre el metabolismo del folato y de la B_{12}. Este esquema se basa en la carencia aparente de folato que se observa en las fases iniciales del déficit de B_{12}. El diagrama identifica los intermediarios que se acumulan (en azul) o que sufren un agotamiento (en amarillo) como consecuencia de la disminución del flujo a través de la reacción de la metionina sintasa.

La carencia de B_{12} produce probablemente una acumulación de 5-metiltetrahidrofotalo, con el descenso simultáneo de otras coenzimas de folato.

de que las concentraciones totales de folato puedan parecer altas, existe una carencia *funcional* de folato, con una concentración insuficiente de los derivados formilo y metileno que son necesarios para la síntesis de los precursores de los ácidos nucleicos. De esta consideración queda claro que la metionina sintasa desempeña una función principal en el mantenimiento de los aportes de tetrahidrofolato liberando THF de su forma "atrapada", el metil-THF.

Esto no explica por qué la anemia perniciosa no tratada progresa hacia una enfermedad neurológica, ya que las anemias por carencia simple de folato no presentan estas complicaciones. Las observaciones iniciales sugirieron que el metabolismo anormal de los ácidos grasos causado por la inhibición de la metilmalonil-CoA mutasa era el responsable. El problema resulta extraordinariamente difícil, ya que las necesidades de B_{12} en la alimentación son tan bajas que es casi imposible generar modelos animales de carencia de B_{12}. Recientemente, se ha obtenido una mejor perspectiva respecto a este tema mediante la observación de que el anestésico comúnmente utilizado óxido nitroso (N_2O), o gas hilarante, induce un estado similar a la anemia perniciosa al oxidar el cobalto de la B_{12} que pasa del estado +1 a +2, con lo que se inactiva la coenzima y se inhiben las enzimas que utilizan las coenzimas de B_{12}. Los datos obtenidos en los animales tratados con N_2O sugieren que la inhibición de la síntesis de metionina es la responsable de la degeneración del sistema nervioso que se produce en la anemia perniciosa, aunque no se han aclarado aún los mecanismos implicados.

Ácido fólico, vitamina B_{12} y corazón

A mediados de los años 1990, diversas comunicaciones clínicas describieron la existencia de correlaciones entre el déficit de folato y el riesgo incrementado de infarto de miocardio. Los mismos estudios revelaron que las personas con riesgo de ataque cardíaco también tenían concentraciones anormalmente elevadas de homocisteína en suero. La interpretación más simple es que en las personas con carencia de folato, las concentraciones disminuidas de cofactores de tetrahidrofolato limitan el flujo metabólico a lo largo de la reacción de la metionina sintasa (reacción 9, Figura 20.17), con la consiguiente acumulación de homocisteína, el sustrato de esta enzima. Se supone que la homocisteína es la responsable metabólica del daño del corazón, aunque se desconocen los mecanismos tóxicos y, de hecho, algunos estudios han fracasado al no encontrar una correlación entre el estatus de folato y las enfermedades cardíacas. Sin embargo, la carencia de folato tiene otras consecuencias biológicas detectadas recientemente, entre las que se encuentran las cantidades anormalmente elevadas de uracilo en el DNA. Como trataremos en el Capítulo 22, este fenómeno, que puede producir roturas cromosómicas, es consecuencia de la limitación de la biosíntesis de los nucleótidos de timina. Por medio de un mecanismo probablemente semejante, las carencias de folato durante la embriogénesis producen una proporción significativa de defectos del tubo neural, en los cuales el sistema nervioso no puede desarrollarse adecuadamente. Como consecuencia de esto, se insta a las mujeres a que tomen suplementos de ácido fólico durante su embarazo, pero especialmente en las primeras fases, cuando se desarrolla con mayor rapidez el sistema nervioso del feto.

RESUMEN

Aunque el nitrógeno inorgánico es abundante, el metabolismo de la mayor parte de los organismos se ve limitado por la biodisponibilidad del nitrógeno. La reducción del N_2 mediante la fijación biológica del nitrógeno y la reducción del nitrato en el metabolismo de las plantas y las bacterias generan amoníaco,

que pueden utilizar todos los organismos. La capacidad de síntesis de los aminoácidos varía enormemente en los distintos organismos, de tal manera que los mamíferos necesitan aproximadamente la mitad de los 20 aminoácidos habituales en la alimentación. Las proteínas se encuentran en un estado continuo de recambio y sustitución, en parte para sustituir las proteínas dañadas y en parte como consecuencia de los mecanismos reguladores celulares. La mayor parte de los aminoácidos liberados por el recambio proteico se reutilizan para la síntesis proteica. Cuando los aminoácidos se degradan, ya sea por el catabolismo de un exceso de aporte, ya sea por ser necesarios para la generación de energía, el primer paso suele ser la eliminación del grupo amino, mediante una transaminación o mediante una desaminación oxidativa. El amoníaco resultante se excreta directamente (en los peces), se convierte en ácido úrico (en la mayoría de los reptiles, insectos y pájaros) o se convierte en urea (en los mamíferos). La síntesis de urea es una ruta cíclica en la que intervienen como intermediarios la ornitina y la arginina. La transaminación y numerosas reacciones adicionales que experimentan los aminoácidos utilizan como coenzima piridoxal fosfato. Tras la condensación del grupo amino del aminoácido con el aldehído de la coenzima para dar una base de Schiff, el anillo de piridina de la coenzima retira electrones transitoriamente y desestabiliza los enlaces que se rompen en la reacción. El tetrahidrofolato une unidades de un carbono en tres estados de oxidación diferentes, las interconvierte, y las transfiere en la síntesis de los nucleótidos de purina, los nucleótidos de timidina y varios aminoácidos. Las coenzimas B_{12} incluyen la metilcobalamina, que participa en la biosíntesis de la metionina, y la adenosilcobalamina, la coenzima de la metilmalonil-CoA mutasa. El metabolismo del folato presenta varios posibles objetivos de la quimioterapia, y las carencias de folato y de B_{12} tienen consecuencias clínicas importantes.

BIBLIOGRAFÍA

Metabolismo del nitrógeno inorgánico

Fischer, H-M. (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* 58:352-386. Una visión actual de la complejidad del control de la fijación del nitrógeno, con una cierta perspectiva respecto al uso práctico de esta información.

Howard, J. B. y D. C. Rees (1994) Nitrogenase: A nucleotide-dependent molecular switch. *Annu. Rev. Biochem.* 63:235-264. Una perspectiva estructural sobre el mecanismo de la fijación del nitrógeno.

Kisker, C., H. Schindelin y D. C. Rees (1997) Molybdenum-cofactor containing enzymes: Structure and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 66:233-267. Revisa todas las reacciones conocidas que requieren molibdeno, con un énfasis en las estructuras de las proteínas involucradas.

Rawls, R. L. (1998) Breaking up is hard to do. *Chem. Eng. News*, número del 22 de junio, pp. 29-34. Un artículo legible, con un formato de tipo noticia, que revisa de forma sencilla las aportaciones recientes de la química y la enzimología de la fijación biológica del nitrógeno.

Aspectos generales del metabolismo del nitrógeno

Brusilow, S. W. y A. L. Horwich (1995) Urea cycle enzymes. En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7.ª ed., editado por C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle, pp. 1187-1232. McGraw-Hill, Nueva York. Se revisan en este capítulo de la obra definitiva sobre las enfermedades metabólicas hereditarias, las enfermedades genéticas de las enzimas del ciclo de la urea.

Morris, S. M., Jr. (1992) Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis. *Annu. Rev. Nutrition* 12:81-101. Los estudios recientes, que se resumen aquí, proporcionan conocimientos respecto a la regulación alimenticia y hormonal de estas enzimas en los mamíferos.

Walsh, C. T. (1979) *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Freeman, San Francisco. Un libro excelente, particularmente valioso en el ámbito del metabolismo de los aminoácidos, el metabolismo de un carbono, las coenzimas de cobalamina y las oxigenasas.

Woehl, E. U. y M. F. Dunn (1995) The roles of Na^+ and K^+ in pyridoxal phosphate enzyme catalysis. *Coordination Chem. Rev.* 144:147-197. Una revisión reciente de un aspecto de la función del PLP.

Recambio proteico

Goldberg, A. L. (1995) Functions of the proteasome: The lysis at the end of the tunnel. *Science* 268:522-523. Un artículo breve que aporta una perspectiva respecto a la estructura cristalina de un proteasoma arqueobacteriano, que se describe con cierto detalle en el mismo número de *Science*.

Hopkin, K. (1997) Regulating cellular processes: The power of protein degradation. *J. NIH Res.* 9:36-42. Un artículo de tipo noticias

que presenta una revisión exhaustiva de los procesos proteolíticos intracelulares y su significado metabólico.

Lupas, A., J. M. Flanagan, T. Tamura y W. Baumeister (1997) Selfcompartmentalizing proteases. *Trends Biochem. Sci.* 21:399-404. Este artículo, que revisa las estructuras del proteasoma y otros complejos proteolíticos, es un artículo de un número especial de esta revista dedicado a la biología y a la bioquímica de la proteólisis controlada.

Rechsteiner, M., L. Hoffman y W. Dubiel (1993) The multicatalytic and 26 S proteases. *J. Biol. Chem.* 268:6065-6068. Una mini-revisión en la que se describen algunas enzimas del recambio proteico caracterizadas recientemente.

Rechsteiner, M. y S. W. Rogers (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21:267-271. Esta revisión breve resume las pruebas experimentales de que estas secuencias realmente influyen en las vidas metabólicas de las proteínas.

Stadtman, E. R. (1992) Protein oxidation and aging. *Science* 257:1220-1224. Una de las diversas revisiones de Stadtman sobre la oxidación y el recambio proteico.

Coenzimas de folato y B_{12}

Appling, D. R. (1991) Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes. *FASEB J.* 5:2645-2651. Varias de estas reacciones están catalizadas por proteínas multifuncionales o complejos multienzimáticos, y esto tiene consecuencias para el uso terapéutico óptimo de los antimetabolitos de folato.

Benkovic, S. J. y R. L. Blakley (1984) *Folates and Pterins*, Vol. 1. Academic Press, Nueva York. Una revisión con la extensión de un libro, que cubre el metabolismo de un carbono y los mecanismos de acción de las coenzimas de folato.

Fenton, W. A. y L. E. Rosenberg (1995) Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7.ª ed., editado por C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle, pp. 1423-1450. McGraw-Hill, Nueva York. Se revisan en este capítulo de la obra definitiva sobre las enfermedades metabólicas hereditarias, las enfermedades genéticas del metabolismo de la B_{12}.

Halpern, J. (1985) Mechanisms of coenzyme B_{12}-dependent rearrangements. *Science* 227:869-875. Consideración de las pruebas experimentales del mecanismo descrito en este capítulo.

Ludwig, M. L. y R. G. Matthews (1997) Structure-based perspectives on B_{12}-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 66:269-313. Una revisión reciente excelente de los mecanismos de la B_{12}, centrada en las estructuras de las enzimas involucradas.

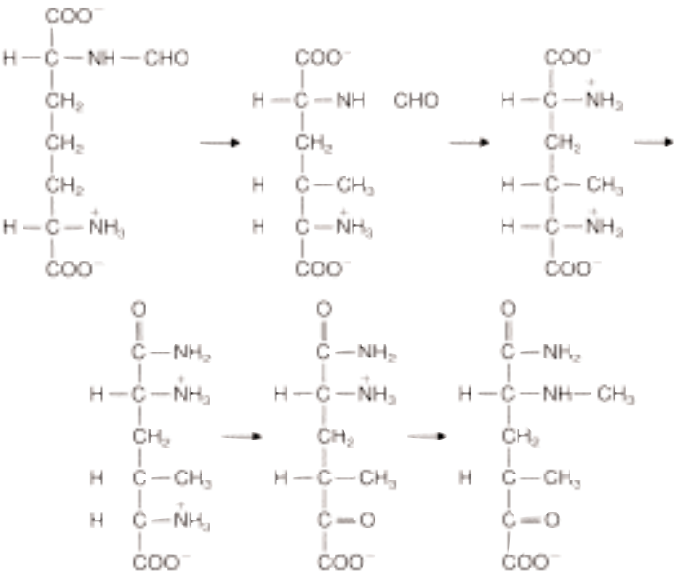
Metz, J. (1992) Cobalamin deficiency and the pathogenesis of nervous system disease. *Annu. Rev. Nutrition* 12:59-79. Un tratamiento sobre la relación todavía desconocida entre la vitamina B_{12} y la neurobiología.

Schweitzer, B. I., A. P. Dicker y J. R. Bertino (1990) Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. *FASEB J.* 4:2441-2452. Analiza diversos inhibidores útiles desde el punto de vista estructural de su interacción con la enzima diana.

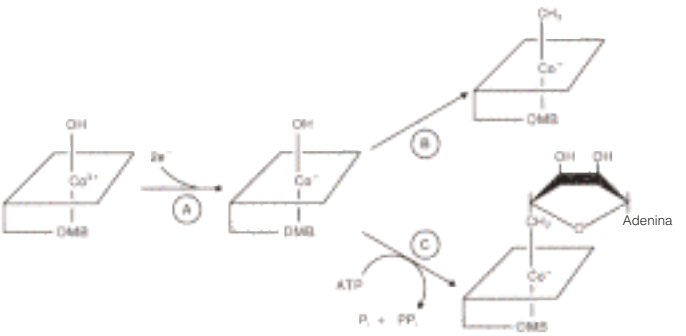
Smaglik, P. (1997) Folic acid deficiency's role expands beyond birth defects. *The Scientist*, número del 13 de octubre, pp. 10-11. Un artículo que se lee muy bien, con un formato de noticias, que revisa muy bien diversos estudios nutricionales y clínicos sobre el ácido fólico.

PROBLEMAS

1. Identifique los sustratos adicionales, los productos y las coenzimas más probables para cada reacción de la siguiente ruta imaginaria.



2. El siguiente esquema muestra la biosíntesis de las coenzimas de B_{12}, empezando con la vitamina. DMB indica dimetilbenzimidazol.

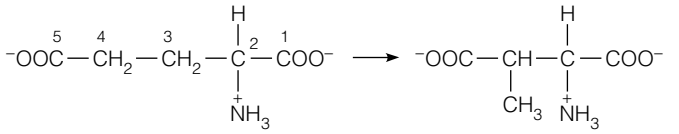


   (a) ¿Qué sustrato adicional o cofactor necesita la enzima B?
   (b) Un déficit genético de la enzima C en los animales daría lugar a una excreción urinaria excesiva. ¿De qué compuesto?
   (c) Algunas formas del trastorno que se describe en (b) pueden tratarse satisfactoriamente mediante la inyección de dosis masivas de vitamina B_{12}. ¿Qué tipo de alteración genética de la enzima concordaría con este resultado?
   (d) Un déficit genético de la enzima B en los animales dará lugar a una excreción urinaria excesiva. ¿De qué aminoácido?

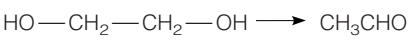
*3. Utilizando los principios descritos en el texto en cuanto a los mecanismos del piridoxal fosfato, proponga un mecanismo para la reacción catalizada por la serina transhidroximetilasa.

*4. Un médico que trata a un paciente con anemia megaloblástica podría verse tentado de tratar al paciente con ácido fólico, para comprobar si hay una carencia simple de folato. Si el paciente presenta una anemia perniciosa, este tratamiento acelera la aparición de los síntomas neurológicos mucho más graves. ¿Por qué?

5. Utilice los números 1 a 5 para identificar cada átomo de carbono del producto de esta reacción. ¿Cuál es la coenzima?



*6. Basándose en el mecanismo de la metilmalonil-CoA mutasa que se muestra en la Figura 20.20, proponga un mecanismo para la reacción de la diol deshidrasa:



7. El mecanismo exacto de la toxicidad del amoníaco en el cerebro no se conoce. Plantee hipótesis sobre un posible mecanismo, basándose en los posibles efectos del amoníaco sobre las concentraciones de los intermediarios clave de la generación de energía.

*8. Los mutantes de *Neurospora crassa* que carecen de carbamoil fosfato sintetasa I (CPS I) necesitan la presencia de arginina en el medio para crecer, mientras que los mutantes que carecen de la carbamoil fosfato sintetasa II (CPS II) necesitan una pirimidina, como el uracilo. *A priori*, sería de prever que la CPS II activa en los mutantes de arginina aportara el carbamoil fosfato suficiente para la síntesis de arginina, y que la CPS I activa de los mutantes de pirimidina "alimentara" la ruta de las pirimidinas. Explique estas observaciones.

9. En algunas formas de leucemia, los leucocitos que proliferan contienen unas concentraciones muy bajas de asparagina sintetasa. Hace algunos años hubo un cierto interés por el tratamiento de estas leucemias mediante la purificación de la enzima asparaginasa de *E. coli* y la inyección de la misma en el torrente sanguíneo de los pacientes leucémicos. La asparaginasa cataliza la hidrólisis de la asparagina a aspartato y amoníaco. ¿Cuál es el razonamiento de este tipo de tratamiento, y por qué cabría prever que no diera resultado?

10. Indique, para cada una de las afirmaciones siguientes, si es verdadera o falsa, y explique brevemente su respuesta.
    (a) En general, la oxidación metabólica de las proteínas en los mamíferos es menos eficaz, en cuanto a conservación de energía, que la oxidación metabólica de los hidratos de carbono o de las grasas.
    (b) Teniendo en cuenta que el nitrógeno del glutamato puede redistribuirse por transaminación, el glutamato debiera ser un buen suplemento de las proteínas nutricionalmente pobres.
    (c) La arginina es un aminoácido no esencial para los mamíferos, debido a que las enzimas de la síntesis de arginina son abundantes en el hígado.
    (d) La alanina es un aminoácido esencial puesto que forma parte de todas las proteínas.

11. Escriba una serie de ecuaciones equilibradas y una ecuación de resumen para las reacciones del ciclo glucosa-alanina.

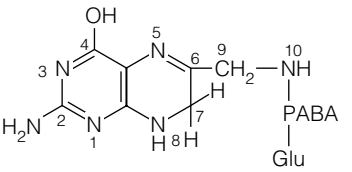
12. Considere las siguientes cuestiones relativas a la glutamato deshidrogenasa.
    (a) La reacción tal como se muestra en la página 799 utiliza el NH_3 como reactante, en vez del $^+NH_4$, que es mucho más abundante a pH fisiológico. ¿Por qué se prefiere el NH_3?
    (b) El equilibrio de la reacción favorece enormemente la reducción del α-cetoglutarato, pero en las mitocondrias la enzima actúa fundamentalmente oxidando el glutamato a α-cetoglutarato. Explíquelo.
    (c) Proponga un mecanismo razonable para esta reacción.

13. Explique el fundamento de la siguiente afirmación: como coenzima, el piridoxal fosfato se une de forma covalente a las enzimas con las que actúa, pero durante la catálisis la coenzima no está unida de forma covalente.

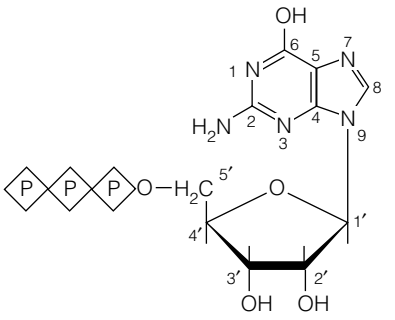
14. Considere la regulación de la glutamina sintetasa de *E. coli*, y explique el fundamento metabólico de cada uno de los siguientes efectos:
    (a) Inhibición de la glutamina sintetasa por el carbamoil fosfato
    (b) Inhibición de la desuridililación de P_{II}-UMP por el α-cetoglutarato
    (c) Activación de la uridililación de P_{II} por el ATP

15. Suponga que desea determinar la semivida metabólica de la glutamina sintetasa en células HeLa (una línea de células tumorales humanas) en crecimiento en cultivo. Describa cómo podría hacerse experimentalmente.

*16. El ácido fólico se sintetiza en las bacterias en forma de dihidrofolato, en una ruta que se inicia en la guanosina trifosfato. En esta ruta, se pierde C-8 como formato. A partir de las semejanzas estructurales existentes entre la guanina y la pterina, prediga qué átomos de carbono y de nitrógeno del GTP son los precursores de N-1, C-2, C-4, N-5, C-7, N-8 y C-9 del dihidrofolato.



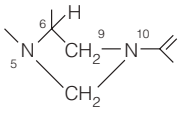
Dihidrofolato



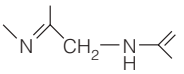
GTP

17. ¿Qué coenzima de folato
    (a) es el sustrato de la enzima que se inhibe por el metotrexato y la trimetoprima?
    (b) tiene el sustituyente monocarbonado más oxidado?
    (c) se utiliza en la conversión de la serina en glicina?
    (d) transfiere su sustituyente monocarbonado a la coenzima B_{12}? ¿Qué aminoácido se sintetiza como resultado final de esta reacción?

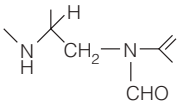
(e) es la coenzima de la reacción de la timidilato sintasa?
(f) no se conoce su existencia en la naturaleza?
(g) se usa en la síntesis de los nucleótidos de purina?



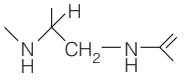
A



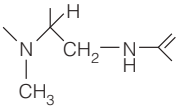
B



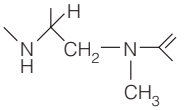
C



D



E



F

18. La glutamina afecta el sistema regulador de la glutamina sintetasa de *E. coli* de forma que promueve la adenililación de la glutamina sintetasa e inhibe la desadenililación. ¿Por qué tienen estos efectos un sentido metabólico correcto?
19. Comente brevemente cómo una célula de levadura puede contener dos glutamato deshidrogenasas, una especializada en la asimilación del nitrógeno y la otra en el catabolismo de los aminoácidos, y no se disipa energía en el ciclo inútil glutamato $\rightleftharpoons$ α-cetoglutarato.

CAPÍTULO 21

Metabolismo de los compuestos nitrogenados: aminoácidos, porfirinas y neurotransmisores

En el Capítulo 20 hemos presentado los principios básicos del metabolismo de los aminoácidos, es decir, las características generales de las rutas de síntesis y degradación, las vías comunes para la utilización y la excreción del amoníaco y las coenzimas que se emplean en el metabolismo del nitrógeno. Consideraremos aquí el metabolismo de los 20 aminoácidos individuales. Nuestro planteamiento es organizar estos aminoácidos en familias o grupos estructural o metabólicamente relacionados. Dentro de cada familia, consideraremos la biosíntesis y la degradación de cada aminoácido y los principales cometidos de cada uno como intermediario en ruta hacia otros metabolitos distintos de las proteínas. Prestaremos especial atención a los procesos y rutas que están más difundidos en la biología y a aquellos que se interrelacionan con otros procesos metabólicos, ilustran principios biológicos importantes o tienen interés desde el punto de vista del mecanismo. Algunas de las funciones biológicas de los aminoácidos, como neurotransmisores y precursores de los neurotransmisores y como precursores de las porfirinas, son tan importantes que se presentan en apartados diferenciados en este capítulo.

Aminoácidos relacionados con intermediarios del ciclo del ácido cítrico

Aproximadamente la mitad de los 20 aminoácidos se biosintetiza de manera más o menos directa a partir de intermediarios del ciclo del ácido cítrico o a partir del piruvato, como se presenta en la Figura 21.1. Incluimos en esta familia al glutamato, al aspartato y a la alanina, que pueden formarse por transaminación a partir de α-cetoglutarato, oxalacetato y piruvato, respectivamente. La familia también incluye la glutamina y la asparagina, que se forman directamente a partir del glutamato y del aspartato, respectivamente, y la prolina y la arginina, que se forman en rutas cortas a partir del glutamato. Hay otros aminoácidos, como la treonina, la metionina y la isoleucina, que proceden del aspartato, pero los hemos asignado a otras familias y consideraremos su metabolismo en apartados posteriores de este capítulo.

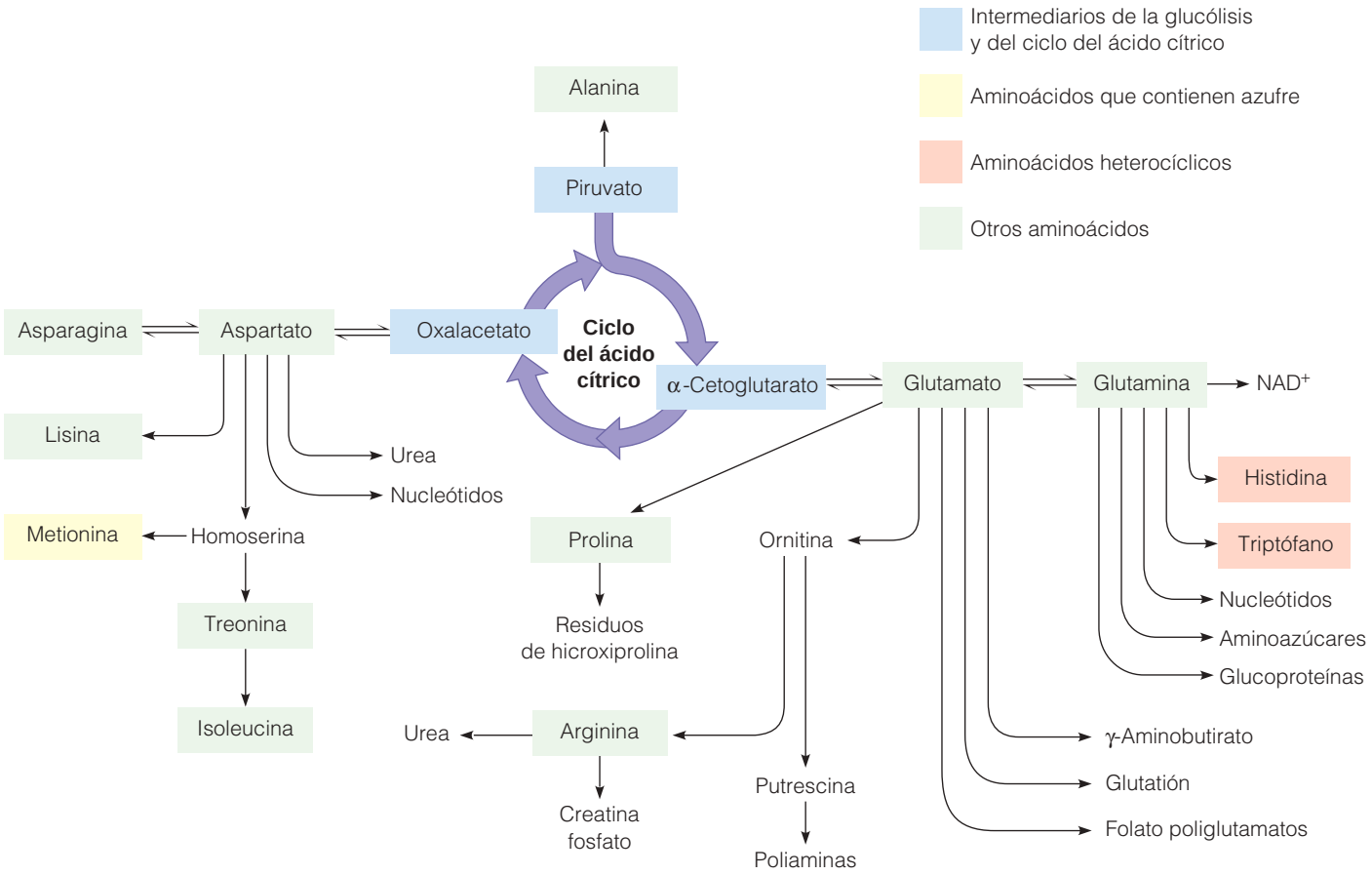
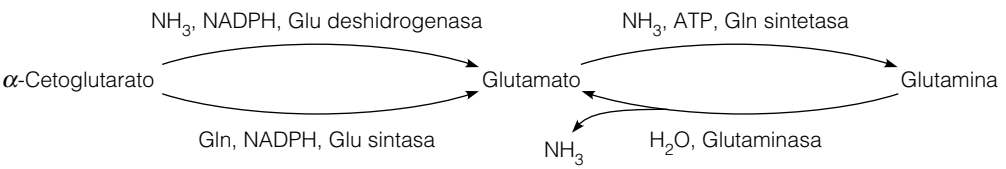


FIGURA **21.1**

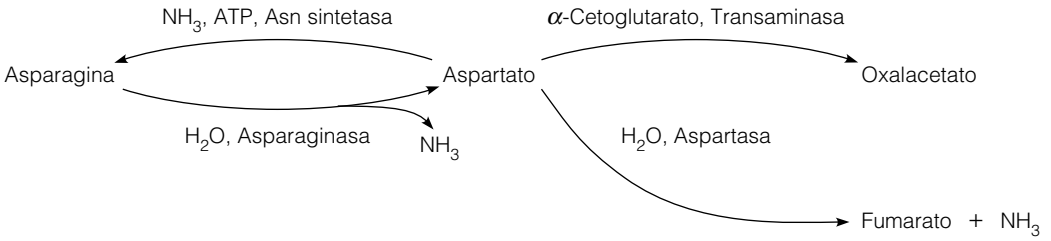
Relaciones metabólicas entre los aminoácidos derivados de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico.

SÍNTESIS Y CATABOLISMO DE GLUTAMATO, ASPARTATO, ALANINA GLUTAMINA Y ASPARAGINA

La transaminación proporciona vías importantes para la síntesis y la degradación del glutamato, el aspartato y la alanina. Las reacciones catalizadas por la glutamato deshidrogenasa y la glutamato sintasa, que se han presentado en el Capítulo 20, tienen vías adicionales para la síntesis del glutamato a partir del α-cetoglutarato.



La glutamina se sintetiza a partir del glutamato por la glutamina sintetasa, y su ruta catabólica principal es la hidrólisis a glutamato por la *glutaminasa*, que en los animales interviene en el transporte de amoníaco al hígado (véase la Figura 20.14). De forma análoga, la asparagina se sintetiza a partir del aspartato por la asparagina sintetasa, y la principal ruta de degradación es la rotura hidrolítica a aspartato, catalizada por la **asparaginasa.** El aspartato se cataboliza mediante transaminación o a través de una desaminación por la **aspartasa,** para dar fumarato y amoníaco.



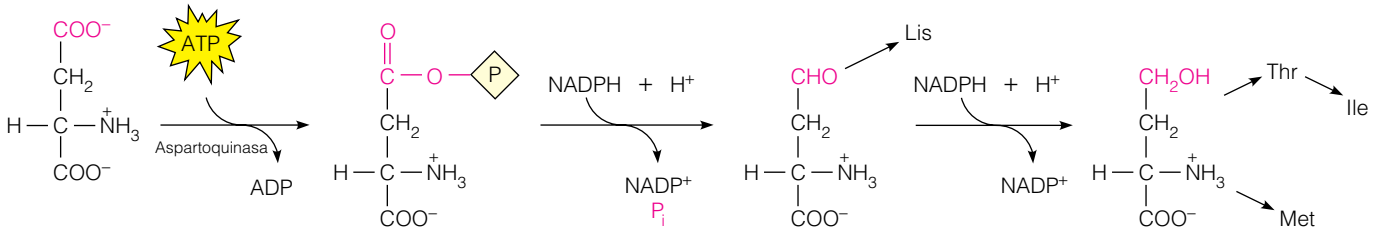
La asparagina tiene pocas funciones metabólicas aparte de actuar como componente de las proteínas.

En los animales, una función importante de la alanina es su papel en el ciclo glucosa-alanina como transportador de carbono desde el músculo al hígado para la gluconeogénesis (véase la Figura 20.14). Otros miembros de esta familia de aminoácidos, la glutamina, el aspartato y el glutamato, poseen todos numerosas funciones metabólicas. La glutamina aporta su nitrógeno amida en reacciones que conducen a otros aminoácidos, a nucleótidos y a aminoazúcares y glucoproteínas. Estas reacciones están catalizadas por un grupo de ligasas similares, dependientes de ATP, las **amidotransferasas.** En el Capítulo 16 se ha presentado una reacción de este tipo (véase la página 649): la biosíntesis de la glucosamina-6-fosfato a partir de la fructosa-6-fosfato, que interviene en la biosíntesis de los aminoazúcares. En este capítulo y en el Capítulo 22 se presentan otras reacciones de amidotransferasa.

El nitrógeno amida de la glutamina se utiliza en varias reacciones que conducen a los nucleótidos de purina y de pirimidina, a los aminoazúcares y a los nucleótidos de nicotinamida.

El nitrógeno del aspartato se utiliza en la biosíntesis de la arginina y de la urea, como se ha indicado en el Capítulo 20. Otras reacciones similares intervienen en la síntesis de los nucleótidos de purina, y toda la molécula de aspartato se utiliza en la biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina; ambos procesos se considerarán en el Capítulo 22. Por último, en las plantas y las bacterias, el aspartato es un precursor de otros tres aminoácidos a través de su conversión en **homoserina,** como se muestra aquí. Rutas separadas conducen posteriormente desde la homoserina a la metionina, la treonina y la isoleucina. También, en las bacterias y las plantas, el α-semialdehído aspártico es un precursor de la lisina.

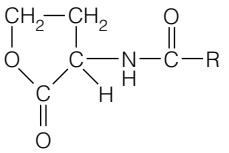
El aspartato conduce, a través de la homoserina, a la treonina, la isoleucina y la metionina.



Aspartato **β-Aspartil fosfato** **β-Semialdehído aspártico** **Homoserina**

La primera enzima de esta ruta, la **aspartoquinasa,** es un lugar principal de regulación para cada una de las rutas de biosíntesis. Las bacterias contienen tres formas diferentes de aspartoquinasa, cada una con su propio modo de regulación alostérica. En *E. coli*, una forma se inhibe específicamente por la treonina y otra por la lisina. La tercera enzima no se inhibe mediante retroacción por la metionina, pero la síntesis de la enzima se reprime específicamente por la metionina. Estos hallazgos sugieren que cada enzima está especializada en una sola de las tres rutas.

La homoserina tiene una función interesante en el metabolismo microbiano que no está relacionada con su función en la síntesis de aminoácidos. Los



N-Acilhomoserina lactosa

cultivos bacterianos llevan a cabo determinados procesos sólo una vez que han alcanzado una densidad celular determinada. Este fenómeno se denomina "detección del quórum". Las bacterias, de alguna forma, detectan cuándo se ha cruzado un determinado umbral de densidad de población, lo cual desencadena respuestas fisiológicas tan diversas como la luminiscencia, la síntesis de antibióticos y la transferencia de genes por conjugación. En muchas bacterias, la molécula de señalización es uno de los diversos derivados *N*-acilados de cadena larga de la homoserina (véase el margen). La *N*-acilhomoserina lactona se sintetiza y segrega a una tasa baja constante y difunde de nuevo al interior de las células. A una densidad celular suficientemente elevada, las concentraciones extracelulares y, de aquí, las intracelulares de la lactona se han elevado lo suficiente para unirse a proteínas reguladoras genéticas, que a su vez estimulan la transcripción de genes que se requieren para activar el proceso específico.

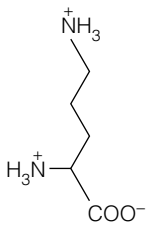
METABOLISMO INTERMEDIARIO DEL GLUTAMATO

El glutamato, uno de los aminoácidos más activos, es un precursor de la glutamina, la arginina, la creatina fosfato, la prolina, la hidroxiprolina, las poliaminas, el glutatión y el ácido γ-aminobutírico.

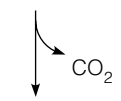
Biosíntesis de ornitina, arginina y creatina fosfato

Como sugiere la Figura 21.1, el glutamato es tal vez el más activo de todos los aminoácidos en cuanto al número de sus funciones metabólicas. Una reacción importante del glutamato es la reducción, con gasto de energía, del grupo γ-carboxilo, para dar **γ-semialdehído glutámico** (Figura 21.2). Esta reacción, que conduce a la ornitina y a la prolina, es comparable a la reducción del aspartato a semialdehído aspártico, que se acaba de presentar. En las plantas y las bacterias, el glutamato se acetila a ***N*-acetilglutamato** antes de la reducción, y el grupo acetilo se elimina un par de pasos después. La acetilación impide la ciclación de la molécula tras la reducción, por condensación entre el aldehído resultante y el grupo α-amino.

Consideraremos el papel del γ-semialdehído glutámico en la síntesis de prolina en breve. La ornitina se forma directamente a partir del γ-semialdehído glutámico mediante transaminación del grupo aldehído. Recuérdese del Capítulo 20 que la ornitina participa en el ciclo de la urea, dando arginina y urea. En el músculo, la arginina es el precursor del compuesto de almacenamiento de energía creatina fosfato (Figura 21.3). El grupo guanidino se transfiere a la glicina, con regeneración de la ornitina. El otro producto, el **ácido guanidinoacético,** se metila por la *S*-adenosilmetionina para dar lugar a creatina, tras lo cual se produce la fosforilación de esta última a creatina fosfato, catalizada por la creatina quinasa.



Ornitina





Putrescina

La ornitina sufre una descarboxilación para dar 1,4-diaminobutano, al que se da el prosaico nombre de **putrescina** (véase el margen), ya que se aisló por primera vez de la carne en descomposición. La putrescina es el precursor de una clase de compuestos importantes y ubicuos, las **poliaminas.** La síntesis de las poliaminas utiliza *S*-adenosilmetionina en una reacción que presentamos en el apartado dedicado al metabolismo de la metionina (véase la Figura 21.10).

La arginina como precursor del óxido nítrico, un nuevo segundo mensajero

A partir de finales de los años 1980, se describió un papel inesperado de la arginina como precursor de un nuevo segundo mensajero y neurotransmisor. Este nuevo regulador se ha identificado como un gas, el **óxido nítrico** (NO·), que se produce a partir de la arginina mediante una reacción poco habitual que da lugar también a citrulina (Figura 21.3). La enzima, NO· sintasa, contiene unido FMN, FAD, hierro no hemo y *tetrahidrobiopterina*, una sustancia relacionada con el tetrahidrofolato que se identificó originalmente como cofactor de la síntesis de tirosina a partir de fenilalanina (véase la página 859).

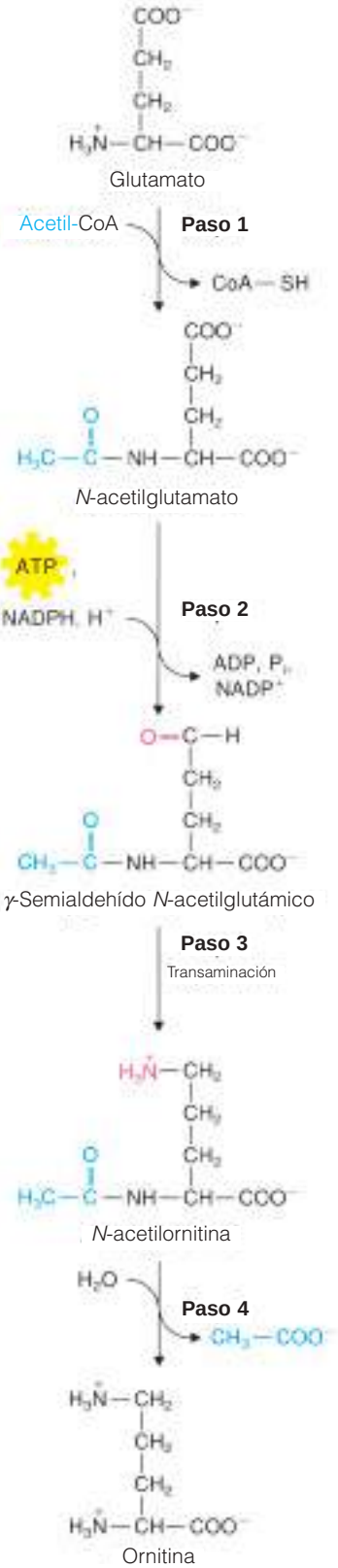


FIGURA **21.2**

Biosíntesis de la ornitina a partir del glutamato. La reducción del *N*-acetilglutamato (paso 2) se inicia probablemente con la fosforilación del grupo carboxilo por el ATP, seguido de la reducción dependiente de NADPH del grupo carboxilo activado.

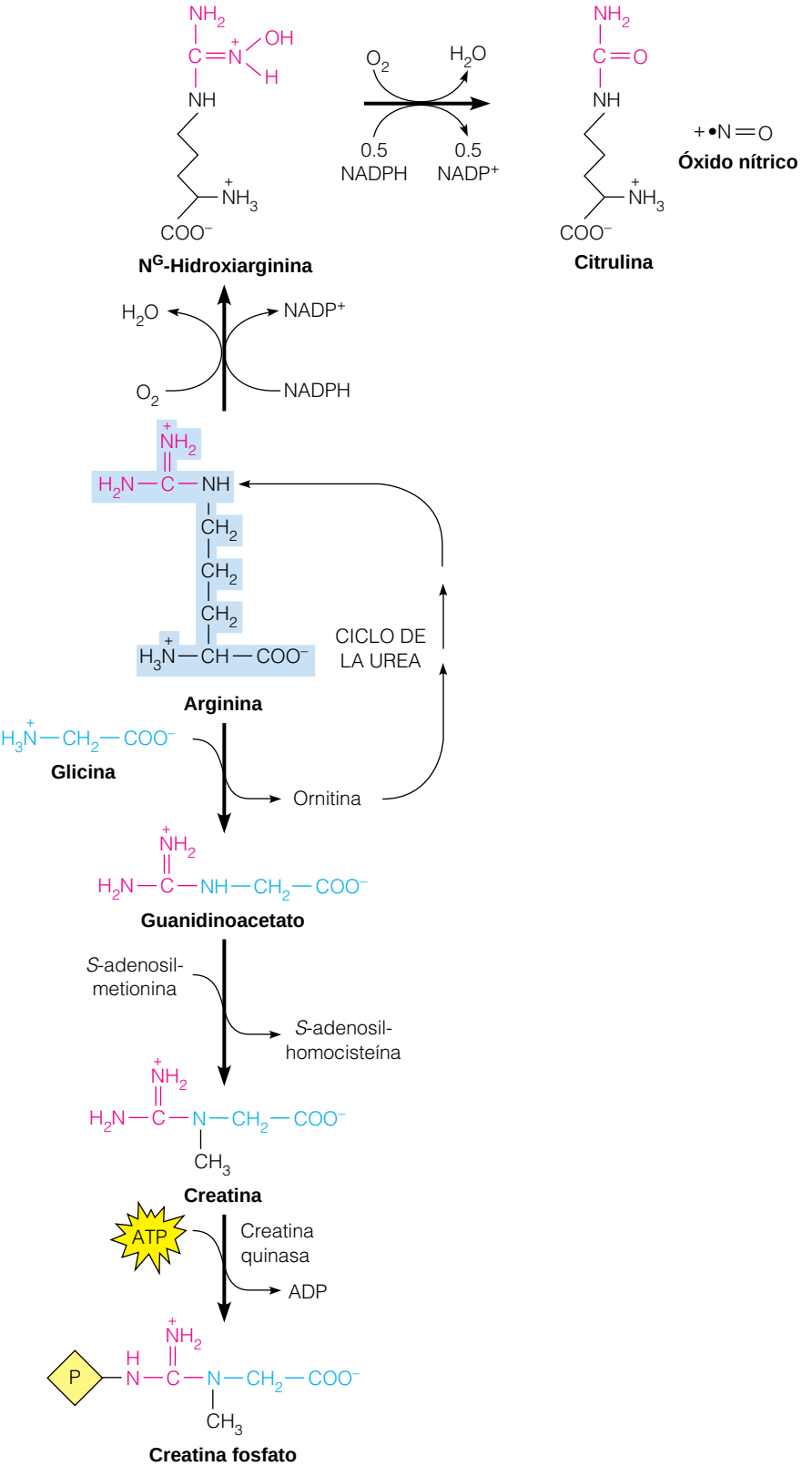


FIGURA **21.3**

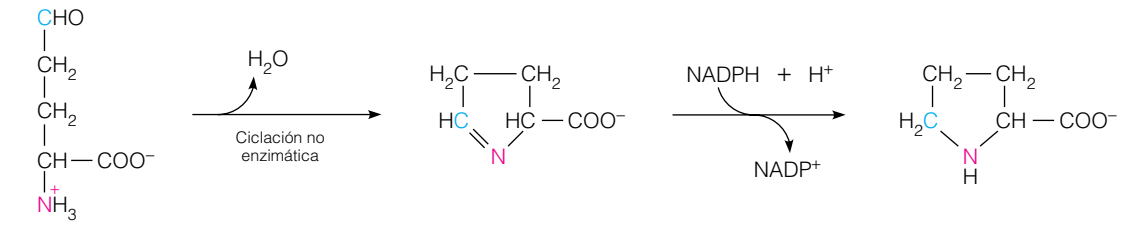
Biosíntesis de la creatina fosfato y del óxido nítrico a partir de la arginina. En la N^G-hidroxiarginina, la G señala el lugar del grupo hidroxilo en el grupo guanidino.

El NO· se identificó originalmente como un agente de transducción de señal en la vasodilatación de las células vasculares endoteliales y del músculo liso subyacente. Diversas señales que reducen la presión sanguínea e inhiben la agregación plaquetaria utilizan el NO· como intermediario. En las respuestas inflamatoria e inmunitaria, una forma inducible de la óxido nítrico sintasa produce NO· a concentraciones suficientes para ser tóxicas para los organismos patógenos.

La NO· sintasa de las células vasculares endoteliales es muy sensible a la concentración de ion calcio; la activación de la enzima por Ca^{2+} produce la acumulación de NO·. Dado que el NO· es un gas, puede difundir rápidamente hacia las células próximas y controlar su metabolismo, fundamentalmente mediante la estimulación de la síntesis de GMP cíclico (véase el Capítulo 23). Como es inestable, con una semivida química de 1 a 5 segundos, sus acciones son de corta duración. Los estudios sobre la localización intracelular de la NO· sintasa y sobre sus inhibidores han identificado otras funciones del NO· tan diversas como la neurotransmisión en el sistema nervioso central y la estimulación de la erección del pene. El fármaco Viagra, presentado en 1998 para contrarrestar la disfunción eréctil, actúa inhibiendo la degradación del GMP cíclico, prolongando de esta manera los efectos del NO·.

Biosíntesis de prolina, hidroxiprolina y colágeno

Como se observa en la figura siguiente, el γ-semialdehído glutámico no sólo conduce a la ornitina sino también a la prolina (véase también la Figura 21.1). En primer lugar, la formación intramolecular espontánea de la base de Schiff produce el **ácido Δ1-pirrolin carboxílico.** Se produce a continuación una reducción dependiente de NADPH para dar prolina.



γ-Semialdehído glutámico | **Ácido Δ1-Pirrolin carboxílico** | **Prolina**

En las plantas, el γ-semialdehído glutámico se sintetiza a partir del γ-semialdehído *N*-acetilglutámico, mediante la transferencia del grupo acetilo de este último al glutamato.

γ-semialdehido *N*-Acetilglutámico + glutamato ⟹ *N*-acetilglutamato + γ-semialdehido glutámico

Una función metabólica importante de la prolina es su incorporación a precursores polipeptídicos del colágeno y otras proteínas del tejido conjuntivo, en las que actúa como precursor de la **hidroxiprolina.** Como se ha indicado en el Capítulo 5 (véase la página 150), los residuos de hidroxiprolina se generan mediante una modificación posterior a la traducción, tras haberse completado la cadena polipeptídica. El precursor del colágeno no hidroxilado se denomina **procolágeno** (véase el Capítulo 6). En este polipéptido, un residuo de prolina a dos posiciones del extremo carboxilo de un residuo de glicina es el sustrato preferido para la acción de la **procolágeno prolina hidroxilasa** (Figura 21.4). Esta enzima poco habitual requiere hierro ferroso, ácido ascórbico, oxígeno molecular y α-cetoglutarato. El α-cetoglutarato se oxida durante la reacción a suc-

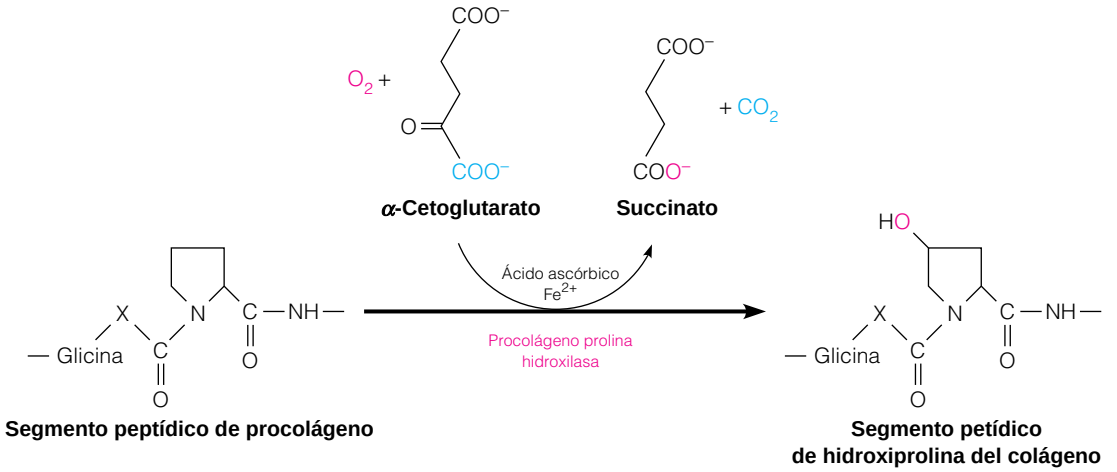


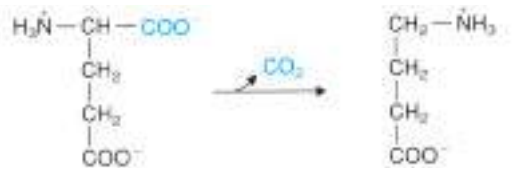
FIGURA **21.4**

Hidroxilación enzimática de los residuos de prolina del procolágeno en la síntesis del colágeno. Se indica en rojo el destino de los dos átomos de O_2. X es cualquier residuo de aminoácido.

cinato y CO_2. El ácido ascórbico reduce al O_2 con la incorporación de un átomo al succinato y el otro termina en el grupo hidroxilo de la hidroxiprolina. Esta reacción tiene un interés especial ya que representa una de las pocas funciones bien definidas del ácido ascórbico, o vitamina C. La carencia de vitamina C, o escorbuto, comporta defectos de la función del tejido conjuntivo, y parece probable que estos problemas se deban a una síntesis o maduración defectuosa del colágeno en el tejido conjuntivo.

Ácido γ-aminobutírico

El glutamato es uno de los diversos aminoácidos que actúan como precursores de compuestos que intervienen en la transmisión de los impulsos nerviosos. La descarboxilación del glutamato da lugar a **ácido γ-aminobutírico** o **GABA.** Además, el glutamato en sí es un neurotransmisor. Las funciones del glutamato y del GABA en la neurotransmisión se considerarán más adelante en este capítulo.



Glutamato **Ácido γ-aminobutírico**

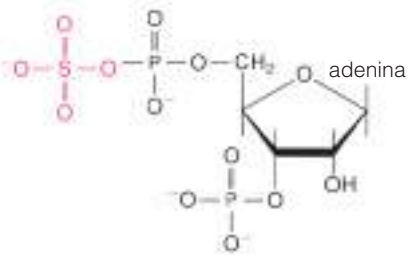
Otras funciones del glutamato

El glutamato tiene al menos otros dos destinos metabólicos importantes y ubicuos, en cada uno de los cuales intervienen sistemas enzimáticos específicos: (1) la síntesis del glutatión (véase el Capítulo 14), junto con la cisteína y la glicina, y (2) la síntesis, a través de un sistema de conjugación dependiente de ATP, de formas de poliglutamato del ácido fólico y sus coenzimas (véase el Capítulo 20).

Metabolismo de los aminoácidos que contienen azufre

REDUCCIÓN DEL AZUFRE INORGÁNICO

Como el carbono y el nitrógeno, el azufre está disponible para los organismos en gran parte en forma de compuestos inorgánicos, principalmente sulfato, aunque algunas bacterias pueden sintetizar compuestos orgánicos a partir de azufre elemental o de sulfito. De la misma forma que el CO_2 y el N_2 deben fi-



3′-Fosfoadenosina-5′-fosfosulfato

La fosfoadenosina fosfosulfato es una forma activada de sulfato que se utiliza para las reacciones de sulfatación y también como sustrato para la reducción del sulfato.

jarse para ser utilizados, el empleo del sulfato requiere la activación metabólica a una forma que pueda sufrir con facilidad una reducción. En el caso del sulfato, este proceso está limitado en gran parte a las plantas y las bacterias. El producto final de la reducción es el H_2S. El compuesto de sulfato activado es la **3′-fosfoadenosina-5′-fosfosulfato (PAPS).** Este nucleótido se forma en dos pasos a partir de ATP y de ion sulfato.

$$SO_4^{2-} + ATP \xrightarrow{PP_i} \text{adenosina-5′-fosfosulfato} \xrightarrow{ATP} PAPS + ADP$$

En todos los organismos, la PAPS actúa como un agente activo para la esterificación del sulfato, como en la síntesis de polisacáridos sulfatados como el condroitín sulfato.

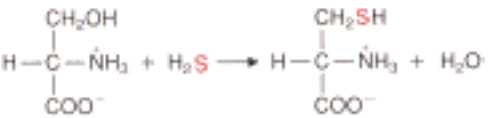
En las bacterias, la PAPS actúa también como sustrato para la reducción del sulfato. En la reducción del sulfato de la PAPS a sulfito (SO_3^{2-}) interviene la **tiorredoxina,** una proteína pequeña ($M_r \cong 12\,000$) que contiene dos grupos tioles oxidables de manera reversible. La tiorredoxina participa en otras reacciones redox intracelulares, como las descritas en los Capítulos 17 y 22. El sulfito se reduce a continuación por la **sulfito reductasa,** una enzima grande y compleja que cataliza una transferencia de seis electrones. Los electrones se transfieren a lo largo de una ruta en la que intervienen NADPH, FAD, FMN, un centro hierro-azufre y la porfirina sirohemo (véase la página 797). No se acumulan intermediarios, sino tan sólo el producto H_2S. En las plantas, el sustrato para la reducción es la adenosina 5′-fosfosulfato en vez de la PAPS.

SÍNTESIS DE CISTEÍNA Y METIONINA EN LAS PLANTAS Y LAS BACTERIAS

Nuestra exposición sobre los aminoácidos que contienen azufre se refiere únicamente a la cisteína y la metionina. Las bacterias y las plantas pueden sintetizar ambos aminoácidos mediante la incorporación de H_2S (Figura 21.5), mientras que los animales obtienen la cisteína o bien de la alimentación o bien de la metionina del alimento. Aunque la cistina se encuentra en los hidrolizados proteicos, recuérdese del Capítulo 5 que los disulfuros de cistina se sintetizan a nivel del polipéptido, mediante la oxidación posterior a la traducción de los residuos de cisteína. Normalmente, la cistina no se encuentra en las células en forma de aminoácido libre ya que, cuando se acumula, se reduce de manera no enzimática por el glutatión.

Biosíntesis de cisteína

Las plantas y los microorganismos utilizan el H_2S para la síntesis de cisteína, mientras que la serina proporciona el esqueleto carbonado. Algunas bacterias pueden condensar estos dos sustratos de manera directa mediante una enzima dependiente del piridoxal fosfato.



Serina **Cisteína**

Sin embargo, las plantas y la mayoría de los microorganismos utilizan la *β*-*O*-acetilserina como sustrato que reacciona con el H_2S.

$$\text{Serina} + \text{acetil-CoA} \longrightarrow \textit{O}\text{-acetilserina} + \text{CoA-SH}$$
$$\textit{O}\text{-Acetilserina} + H_2S \longrightarrow \text{cisteína} + \text{acetato} + H_2O$$

Biosíntesis de metionina

En las plantas y las bacterias, la cisteína aporta el azufre para la síntesis de metionina, y el carbono procede de la homoserina (Figura 21.6). La homoserina reacciona primero con la succinil-CoA para formar ***O*-succinilhomoserina.** Esta reacción constituye evidentemente un punto de control, ya que la enzima que cataliza esta reacción se inhibe mediante retroacción por la metionina. La *O*-succinilhomoserina reacciona con la cisteína para dar **cistationina,** un com-

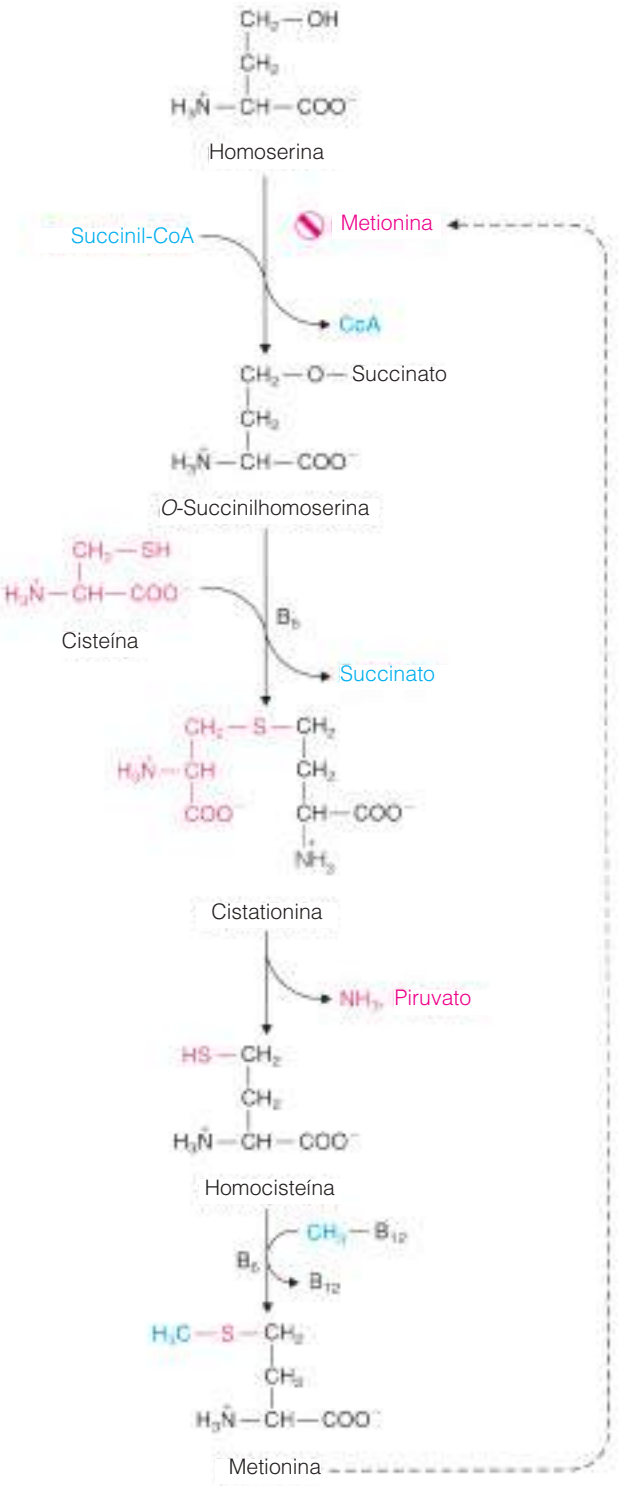


FIGURA **21.5**

Esquema de las rutas de la síntesis de cisteína y de metionina en las plantas y las bacterias.

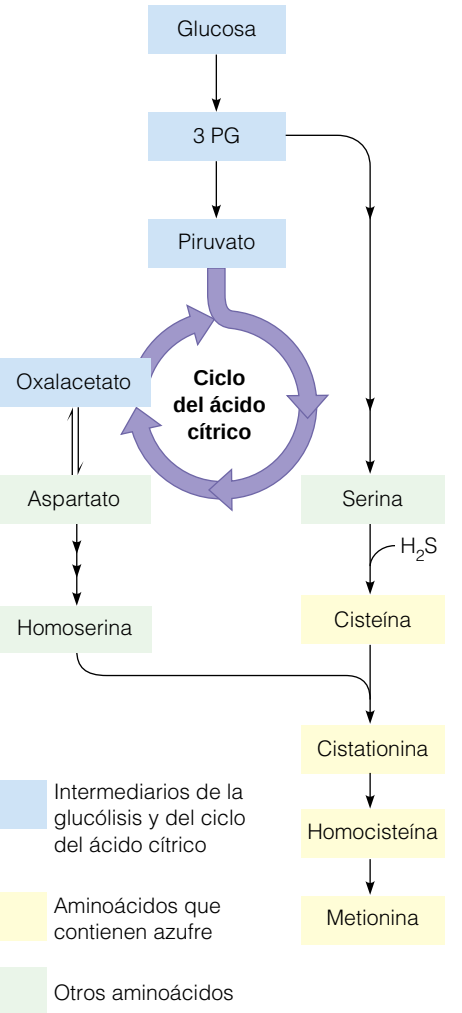


FIGURA **21.6**

Biosíntesis de metionina a partir de homoserina, tal como se produce en las plantas y las bacterias.

puesto tioéter. Se produce entonces la fragmentación de la cistationina, de manera que el azufre queda unido a la cadena lateral de cuatro carbonos que comenzó como homoserina. El aminoácido resultante, la homocisteína, es el sustrato de la metionina sintasa, que, como se señaló en el Capítulo 20, utiliza la B_{12} para transferir un grupo metilo desde el 5-metiltetrahidrofolato, dando lugar a metionina (véase la página 826).

LA METIONINA COMO ORIGEN DEL AZUFRE DE LA CISTEÍNA EN LOS ANIMALES

La metionina se clasifica como aminoácido esencial para los mamíferos, y la cisteína se considera no esencial. De hecho, la ruta de biosíntesis va en los animales desde la metionina a la cisteína, como se muestra en la Figura 21.7, por lo que la cisteína es no esencial en tanto en cuanto la alimentación contenga una cantidad adecuada de metionina.

La síntesis de cisteína en los animales, que se presenta con mayor detalle en la Figura 21.8, se parece al mecanismo inverso de la ruta de biosíntesis de metionina que acabamos de considerar. La homocisteína se condensa con serina en una reacción dependiente de piridoxal fosfato, catalizada por la **cistationina sintasa,** para dar cistationina. Este compuesto se rompe luego, también en una reacción dependiente de PLP, para dar cisteína. La cadena lateral de cuatro carbonos se desamina, formando amoníaco y α-cetobutirato. Las plantas y los organismos procariotas utilizan la misma ruta, con el empleo de α-cetobutirato también para la biosíntesis de isoleucina.

Obsérvese que la cistationina desempeña un papel central tanto en la biosíntesis de metionina en las plantas y las bacterias como en la biosíntesis de cisteína en los animales. En la síntesis de metionina a partir de cisteína, la ruptura de la cistationina acompaña a la transferencia de azufre desde una cadena lateral de tres carbonos a una de cuatro. Ocurre lo contrario durante la síntesis de cisteína a partir de metionina.

En el ser humano, un déficit genético de cistationina sintasa conduce a un trastorno denominado **homocistinuria,** en el que se acumula en exceso la homocisteína, lo cual se pone de manifiesto por una excreción urinaria excesiva de homocistina (el derivado disulfuro de la homocisteína). El trastorno da lugar a un retraso mental grave, al daño de los vasos sanguíneos y a la luxación del cristalino ocular. Tras la descripción del déficit de cistationina sintasa, se encontró que se producían síntomas semejantes en los déficit de otras dos enzimas relacionadas, la metionina sintasa y la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa. En la Figura 21.9 puede apreciarse cómo un déficit de una de estas tres enzimas causa la acumulación de homocisteína.

METABOLISMO DEL GLUTATIÓN

Como se describió en el Capítulo 14, la cisteína desempeña un papel metabólico importante como componente del **glutatión** o γ-glutamilcisteinilglicina. Este tripéptido, que es abundante en todas las células, protege frente a dos tipos de agresiones metabólicas. En primer lugar, puede reducir de manera no enzimática diversas sustancias, como los peróxidos o los radicales libres, que se acumulan en las células en condiciones oxidativas. El glutatión mantiene un medio intracelular reductor, que impide que los tioles proteicos intracelulares se oxiden a disulfuro. En segundo lugar, mediante la acción de unas enzimas muy extendidas, las **glutatión *S*-transferasas,** el glutatión participa en la desactivación tóxica de muchas sustancias, como los **xenobióticos** (compuestos orgánicos extraños que no se producen en el metabolismo) o los electrófilos, que se producen por la acción de las oxidasas ligadas al citocromo P450. Entre estos com-

Las plantas y las bacterias sintetizan cisteína a partir de azufre inorgánico, y sintetizan metionina a partir de la cisteína. Los animales sintetizan la cisteína a partir de la metionina de la alimentación.

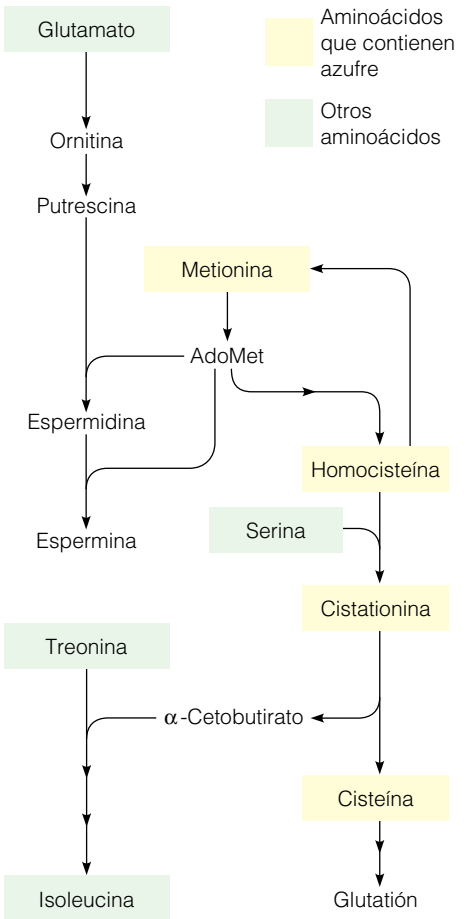


FIGURA **21.7**

Esquema del metabolismo de la metionina. Excepto por la síntesis de la isoleucina a partir de treonina (véase la página 867), que está limitada a las plantas y las bacterias, estas rutas se dan en prácticamente todos los organismos.

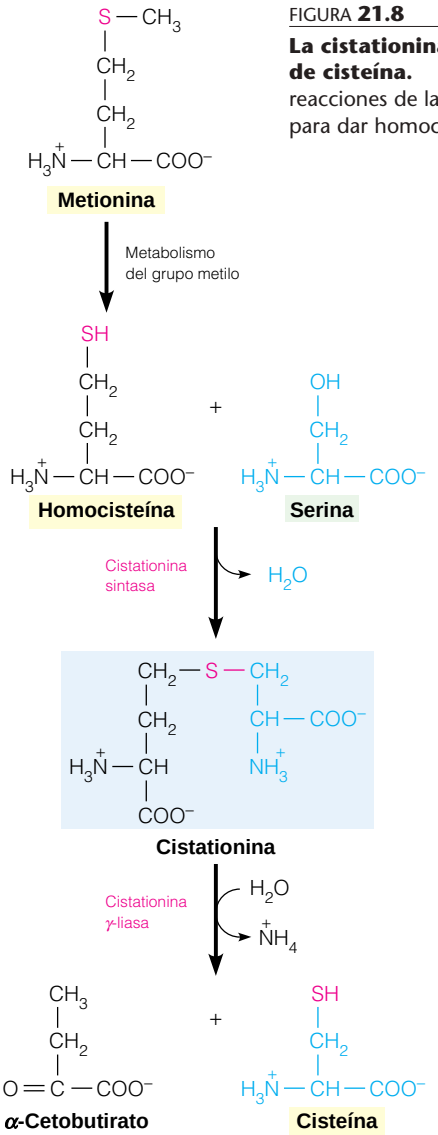


FIGURA **21.8**

La cistationina como intermediario en la biosíntesis de cisteína. La 5-adenosilhomocisteína producida en las reacciones de la metiltransferasa se fracciona hidrolíticamente para dar homocisteína y adenosina (véase la página 847).

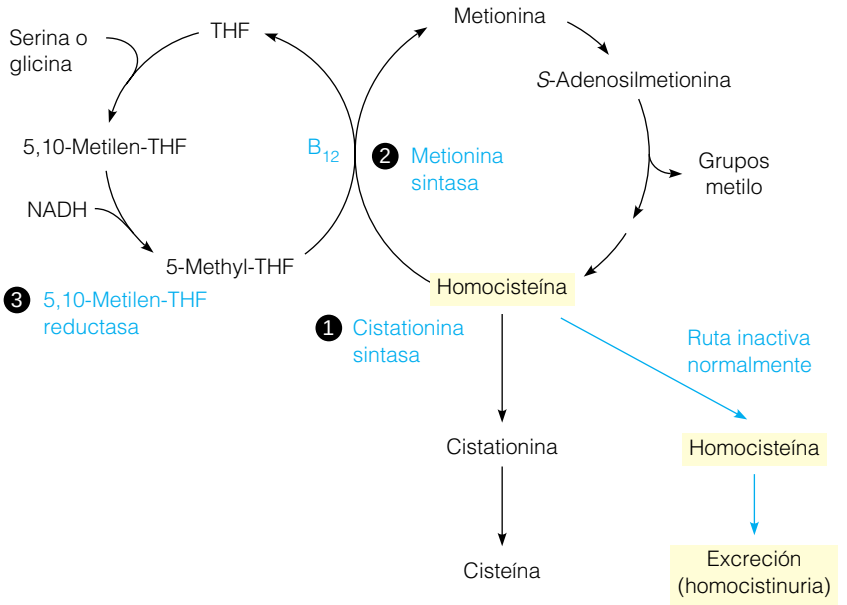
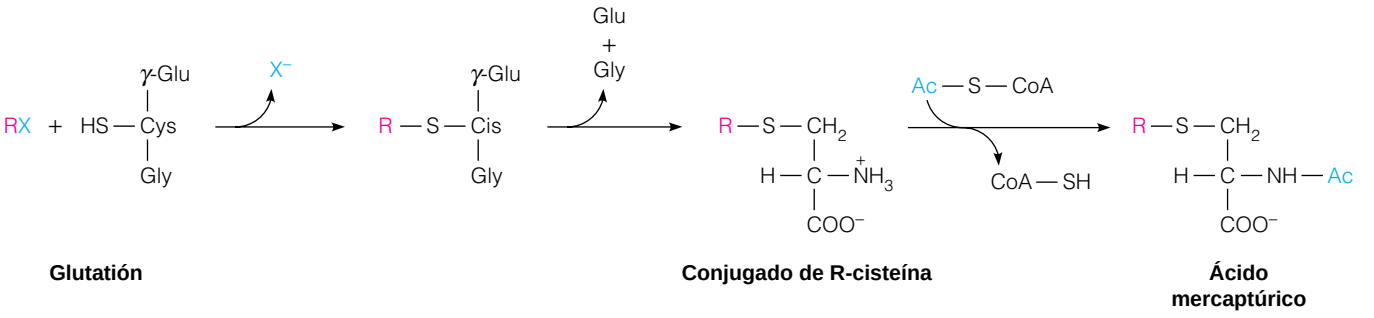
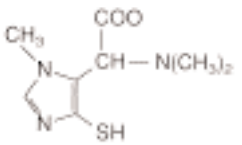


FIGURA **21.9**

Déficit enzimáticos que producen homocistinuria. Las enzimas que pueden ser deficitarias se indican en azul. Un defecto de la cistationina sintasa (1) causa una acumulación de homocisteína debido a que está deteriorada la conversión en cistationina. Un déficit de metionina sintasa (2) o de metilentetrahidrofolato reductasa (3) bloquea la conversión de homocisteína en metionina. En cualquiera de estos casos, la homocisteína que se acumula se oxida a homocistina, la forma que se excreta.

puestos se encuentran haluros orgánicos, peróxidos de ácidos grasos derivados de la oxidación lipídica y productos procedentes del DNA dañado por la radiación. El glutatión reacciona con estos compuestos (que se indican con RX) como se muestra aquí, tras lo cual se produce una ruptura de los residuos γ-glutamilo y glicilo, y luego la acetilación por la acetil-CoA para dar un **ácido mercaptúrico.** Este derivado del compuesto original más soluble y menos tóxico puede excretarse a continuación por la orina.





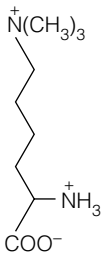
Ovotiol

Otra posibilidad es que la desactivación tóxica se realice mediante el catabolismo del conjugado de cisteína a un compuesto metiltio o un glucurónido.

Un aminoácido azufrado, descrito recientemente, el **ovotiol,** se encuentra en los huevos fertilizados, en los que desempeña un papel comparable al del glutatión. El ovotiol, que está presente a una concentración de 5 mM en los óvulos del erizo de mar, protege al óvulo frente a la lesión oxidativa de los peróxidos que se producen en la superficie del óvulo al inicio de la fertilización. El ovotiol se reduce a su vez por el glutatión.

S-ADENOSILMETIONINA Y METILACIÓN BIOLÓGICA

En el Capítulo 19 hemos presentado la *S*-adenosilmetionina (AdoMet) como una forma de metionina metabólicamente activada, al describir la biosíntesis de la fosfatidilcolina a partir de la fosfatidiletanolamina. Recuérdese que la síntesis de AdoMet a partir de metionina y ATP genera un compuesto de sulfonio con un alto potencial de transferencia de grupo. La mayor parte, aunque no todas las reacciones de transferencia de grupo en las que interviene la AdoMet son **transmetilaciones,** en las que el grupo metilo se transfiere a un aceptor, siendo el otro producto la *S*-adenosilhomocisteína (AdoHcy). La síntesis de creatina (véase la Figura 21.3) y de fosfatidilcolina (véase la página 754) son buenos ejemplos de transmetilaciones.



***ε*-*N*-Trimetillisina**

En la Tabla 21.1 se citan diversas transmetilaciones dependientes de AdoMet que tienen importancia biológica. Obsérvese que los sustratos pueden ser proteínas poliméricas o ácidos nucleicos. Consideraremos las funciones de la metilación del DNA y el RNA en capítulos posteriores. Sin embargo, conviene hacer aquí una breve consideración de la metilación de las proteínas. Los residuos metilables son, en distintas proteínas, la lisina, la arginina y los residuos que contienen grupos carboxilo libres. Aunque es poco lo que conocemos acerca de las funciones específicas, sí sabemos que las histonas se metilan, de tal manera que se modifican en momentos determinados del ciclo celular residuos específicos de arginina y lisina. También sabemos que la *ε*-*N*-trimetillisina, derivada específicamente de la hidrólisis de la proteína metilada, actúa como precursor de la carnitina, cuyo papel en la transferencia de grupos acilo a través de las membranas se ha presentado en el Capítulo 18. Sabemos también que, en las bacterias, la metilación de las proteínas desempeña un papel importante en el **quimiotactismo,** que es el proceso mediante el cual las bacterias perciben un gradiente de concentración de una sustancia química del medio y se desplazan hacia ella o se alejan de ella. El quimiotactismo está siendo estudiado como un modelo rudimentario para la transducción sensitiva; en este proceso se produce una metilación y desmetilación cíclica de un grupo de proteínas denominadas **MCP** o proteínas quimiotácticas metilables. Por último, hay algunos indicios de que la metilación proteica protege de algún modo a las proteínas, al menos de dos formas: (1) bloqueando los lu-

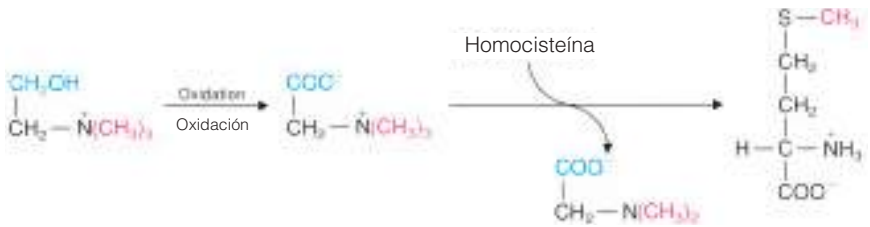
TABLA 21.1 Algunas transmetilaciones dependientes de la AdoMet

Aceptor del grupo metilo	Producto Metilado
Noradrenalina	Adrenalina
Ácido guanidinoacético	Creatina
Fosfatidiletanolamina	Fosfatidilcolina
Adenina o citosina de DNA	*N*-metiladenina o 5-metilcitosina de DNA
Bases de tRNA	Bases de tRNA metiladas
Nicotinamida	N^1-Metilnicotinamida
Residuos de aminoácidos de proteínas	Residuos de aminoácidos metilados

gares de ubiquitinización (véase el Capítulo 20), con lo que la metilación ayuda evidentemente a proteger del recambio a las proteínas; (2) la lesión ambiental de las moléculas proteicas modifica sus residuos de aspartato, produciendo un daño que puede repararse mediante una reacción de metilación.

El papel metabólico central de la AdoMet puede apreciarse si se tiene en cuenta que, excepto en unas pocas reacciones del metabolismo bacteriano, *la única transferencia de grupo metilo conocida en la que no interviene la AdoMet es la síntesis de la propia metionina.* Como se ha indicado en el Capítulo 20, se genera de novo un grupo metilo mediante la reducción del 5,10-metilentetrahidrofolato para dar lugar a 5-metiltetrahidrofolato. El grupo metilo se transfiere entonces para producir metionina a través de la metil-B_{12} y la acción de la metionina sintasa. Sin embargo, existe una vía adicional para la síntesis de metionina que se produce a través de un tipo de transmetilación diferente. La *S*-adenosilhomocisteína, formada a partir de transmetilaciones dependientes de la AdoMet, se fragmenta hidrolíticamente y da lugar a adenosina y homocisteína. La homocisteína se remetila a metionina, ya sea por la metionina sintasa, ya sea mediante una transmetilación a partir de la **glicina betaína.** Esta última se forma a partir de la oxidación de la colina.

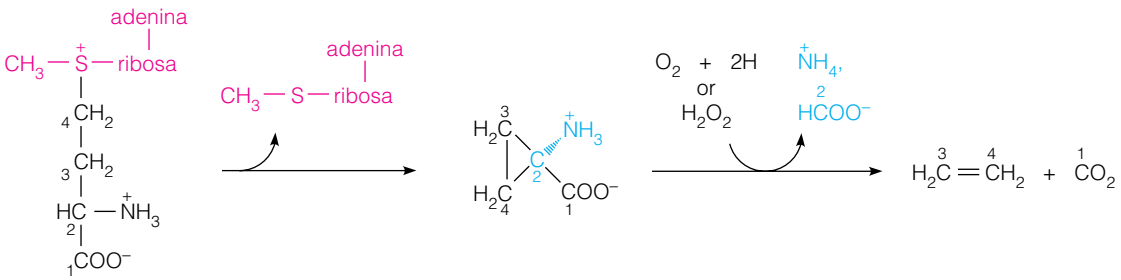
El 5-metiltetrahidrofolato transfiere un grupo metilo en la síntesis de metionina, pero en todas las demás transferencias biológicas de metilo interviene la *S*-adenosilmetionina.



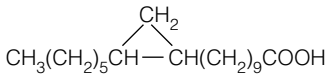
Colina **Glicina betaína** **Metionina**

La betaína, que es un derivado amino cuaternario de un aminoácido, tiene una carga positiva y un elevado potencial de transferencia de grupo, como la propia AdoMet. Dado que los grupos metilo de la glicina betaína procedían originalmente de la AdoMet, la existencia de este proceso de transmetilación concuerda con la afirmación de que todos los grupos metilo proceden de la metionina excepto los que se utilizan en la síntesis de metionina.

La *S*-adenosilmetionina desempeña otro papel adicional en el metabolismo de las plantas, como precursor de la hormona **etileno.** El etileno fomenta el crecimiento y desarrollo de las plantas e induce la maduración de las frutas. Aunque no se conocen bien los detalles del mecanismo, sabemos que el esqueleto carbonado principal de la metionina, y no el grupo metilo, se fragmenta en este proceso, para dar lugar a **ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico.** Esta sustancia se fragmenta como se indica, para producir etileno como uno de los productos.



AdoMet **1-Aminociclopropano-1-carboxilato** **Etileno**



Ácido lactobacílico

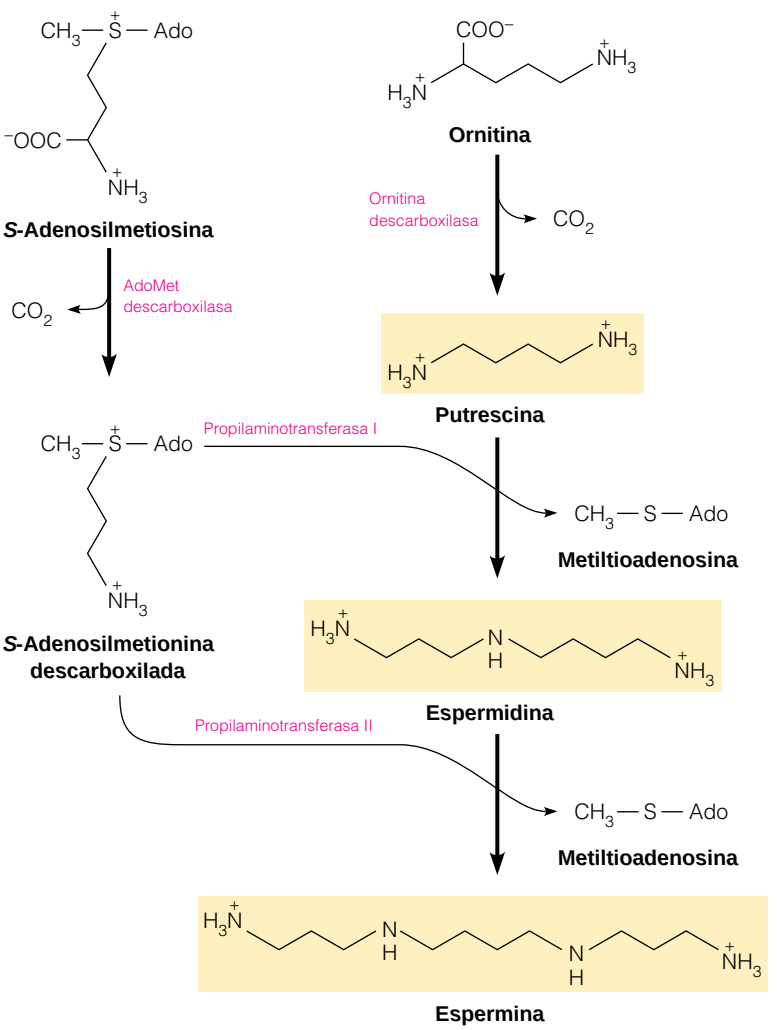
Los estudios de marcaje isotópico realizados con la metionina suministrada a las plantas han revelado el origen de cada átomo de carbono.

Es probable que intervenga un mecanismo similar en la síntesis de los ácidos grasos raros que contienen un anillo de ciclopropano en sus cadenas hidrocarbonadas, como el ácido lactobacílico, el ejemplo que se presenta.

POLIAMINAS

En la síntesis del etileno se produce una transferencia, no del grupo metilo, sino de la porción de cuatro carbonos de la metionina unida a la AdoMet. Tiene lugar un proceso comparable durante la síntesis de las poliaminas muy extendidas **espermina** y **espermidina** (Figura 21.10). Los nombres de estas sustancias sugieren el origen de su detección original, el semen humano. Estas poliaminas y la diamina putrescina son componentes celulares catiónicos muy extendidos, y son especialmente abundantes en las células que proliferan rápidamente. Aunque la putrescina y su homólogo, la **cadaverina,** se clasifican en el grupo de las poliaminas, de hecho son diaminas, que se sintetizan mediante la descarboxilación de la ornitina y la lisina, respectivamente. La **ornitina descarboxilasa,** que sintetiza la putrescina, es una enzima muy regulada cuya actividad responde a múltiples estímulos hormonales. Tiene una semivida metabólica extremadamente breve (aproximadamente 10 minutos), lo cual sugiere que su

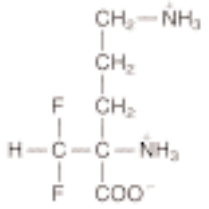
FIGURA **21.10**
Biosíntesis de putrescina, espermidina y espermina.



actividad intracelular se controla en gran parte a nivel de la degradación proteica.

Como los policationes, las poliaminas desempeñan múltiples funciones en la estabilización de las conformaciones intracelulares de los ácidos nucleicos cargados negativamente. Una molécula de poliamina puede unirse a los fosfatos de las dos cadenas de un dúplex, estabilizando de esta forma el DNA de doble cadena o una región dúplex de RNA. Así, por ejemplo, en el bacteriófago T4, alrededor del 40% de la carga negativa del DNA vírico se neutraliza por las poliaminas. El RNA de transferencia de algunas fuentes contiene dos moléculas de espermina o espermidina estrechamente unidas por cada molécula de RNA de transferencia. Algunas proteínas contienen poliaminas unidas covalentemente, con los nitrógenos unidos a grupos γ-carboxilo de glutamato. En las células bacterianas, las poliaminas también participan en la regulación de la fuerza osmótica interna y ayudan a estabilizar las membranas. En las células animales, las poliaminas controlan las propiedades eléctricas de las membranas excitables. Asimismo, la biosíntesis de poliaminas está relacionada estrechamente con el estado de proliferación de la célula; cuando está activada la síntesis de ácidos nucleicos, lo está también la de poliaminas. Como consecuencia, los investigadores se preguntan si la activación de la síntesis de poliaminas al comienzo de la génesis de los tumores podría ser un marcador para el diagnóstico precoz del cáncer o una diana para el tratamiento del cáncer. Consistente con esto último, el fármaco antiparasitario **difluorometilornitina** detiene la progresión del ciclo de división celular (véase el Capítulo 28) mediante la inhibición de la ornitina descarboxilasa, lo cual sugiere un papel de las poliaminas en la regulación del ciclo celular.

Las poliaminas son necesarias para la proliferación celular, debido a su intervención en la estabilización de las estructuras de DNA de doble cadena.



Difluorometilornitina

La putrescina actúa como precursor de la espermidina, y luego de la espermina, a través de una transferencia de grupos propilamino activos con participación de la AdoMet (véase la Figura 21.10). En primer lugar, la AdoMet se descarboxila por la **AdoMet descarboxilasa.** Esta enzima es un ejemplo de una descarboxilasa que contiene como cofactor no el piridoxal fosfato sino piruvato unido covalentemente (véase la página 86). El grupo propilamino resultante se transfiere a la putrescina para dar espermidina, y un segundo grupo se transfiere a la espermidina, mediante una enzima diferente, para dar espermina. El otro producto de estas reacciones es la metiltioadenosina, que sufre una rotura fosforolítica a adenina y **5′-metiltiorribosa-1-fosfato.** Este último compuesto se utiliza para sintetizar de nuevo metionina por otra ruta que no se muestra aquí.

CATABOLISMO DE LA CISTEÍNA Y LA METIONINA

Las principales rutas catabólicas de la cisteína y la metionina se indican en la Figura 21.11. El β-mercaptopiruvato, que es el producto de transaminación de la cisteína, puede sufrir una desulfuración por varios caminos, para dar piruvato y H_2S, sulfito (SO_3^{2-}), tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) o tiocianato (SCN^-). Una enzima mitocondrial denominada **rodanesa** cataliza varias reacciones, entre ellas la de la formación de tiocianato a partir de tiosulfato e ion cianuro. Esta reacción interviene en la desactivación del cianuro.

El catabolismo de la metionina se produce en gran parte a través de la homocisteína, que se cataboliza por la ruta de la cistationina para dar α-cetobutirato. El α-cetobutirato reacciona con la CoA y el ATP para producir propionil-CoA, que se convierte luego en succinil-CoA por una ruta que requiere B_{12} y que hemos comentado antes. El α-cetobutirato tiene también una función de biosíntesis, en la formación de isoleucina.

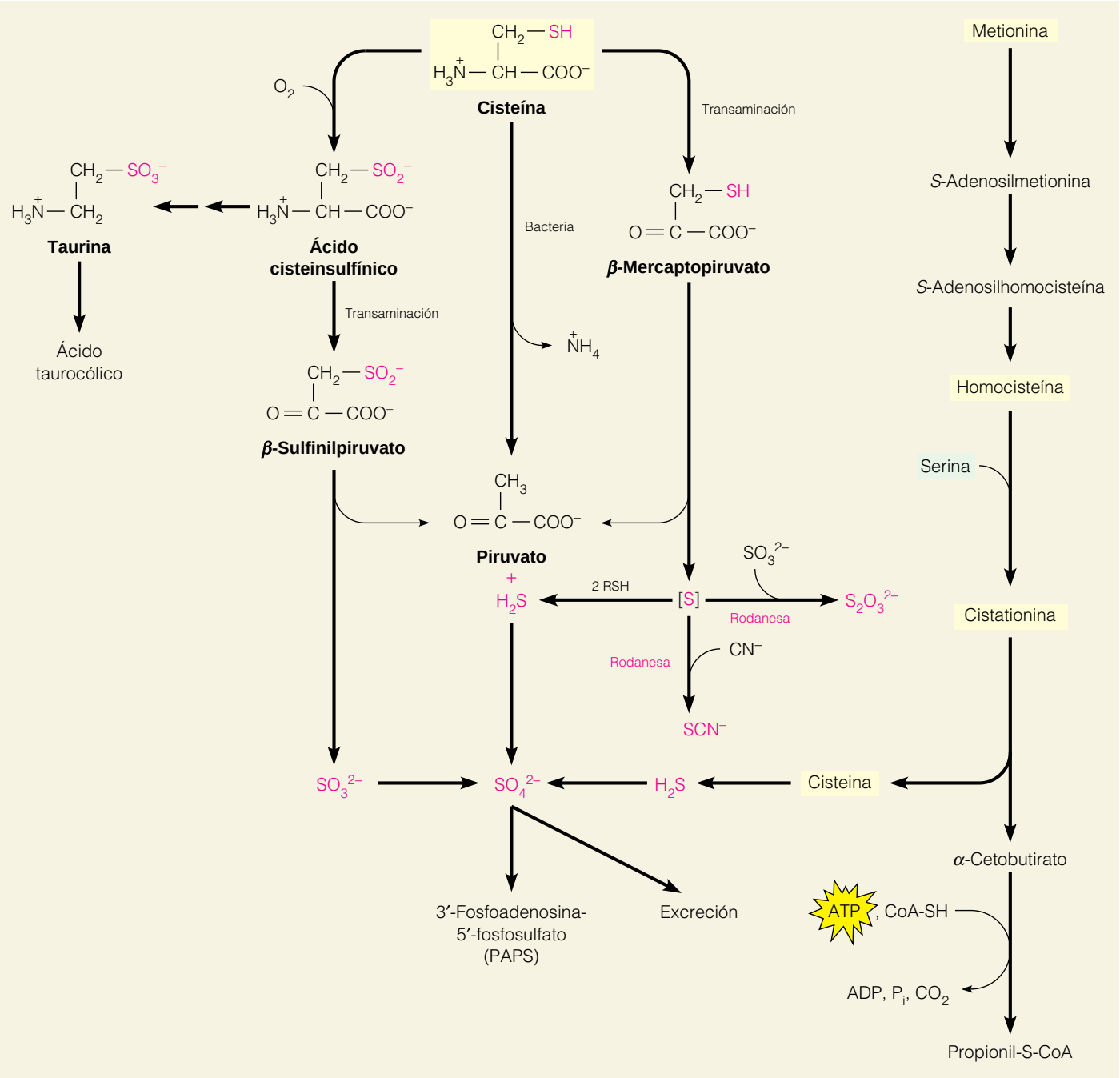


FIGURA **21.11**

Rutas catabólicas de los aminoácidos que contienen azufre. El *β*-mercaptopiruvato procedente de la degradación de la cisteína produce piruvato. Se indican los diversos destinos del azufre, aunque no se presentan de manera detallada las reacciones específicas en las que interviene el azufre.

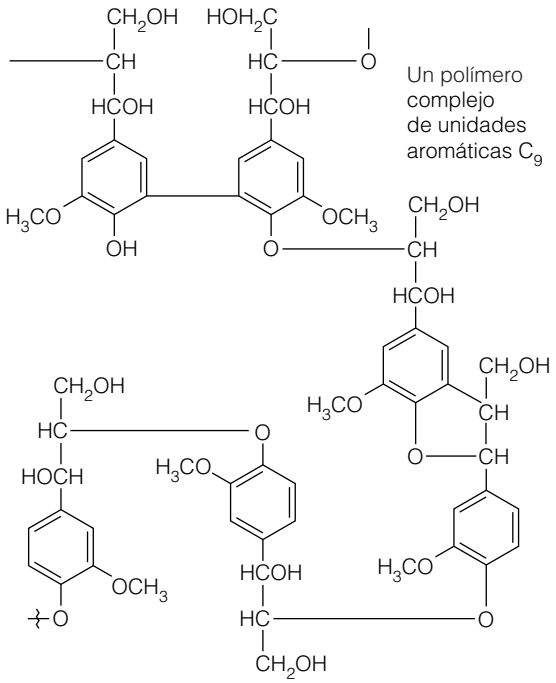
Aminoácidos aromáticos

En este apartado consideraremos el metabolismo de la fenilalanina, la tirosina, el triptófano y la histidina. La histidina no suele clasificarse con los aminoácidos aromáticos, pero puesto que existen varias semejanzas entre su metabolismo y el de los demás, la consideraremos en nuestro tratamiento como un "aromático honorario". La síntesis de estos anillos heterocíclicos y/o aromáticos a partir de precursores no cíclicos implica una química compleja. Al igual que ocurre con otras rutas largas de biosíntesis, como la síntesis de las vitaminas, la mayoría de las capacidades de biosíntesis aromáticas se han perdido a lo largo

de la evolución de los animales. Las rutas de síntesis que consideraremos están limitadas a las plantas y las bacterias, con una excepción, que es la hidroxilación de la fenilalanina a tirosina, una reacción importante en el metabolismo animal.

BIOSÍNTESIS DE LOS ANILLOS AROMÁTICOS: LA RUTA DEL ÁCIDO SIKÍMICO

Una única ruta ramificada en los microorganismos y las plantas conduce a la síntesis de fenilalanina, tirosina, triptófano y prácticamente todos los demás compuestos aromáticos (Figura 21.12). Dado que estas últimas sustancias incluyen la **lignina,** un componente importante del tejido leñoso, parece claro que a través de esta ruta pasa una enorme cantidad del carbono de la biosfera.



Lignina

Las reacciones individuales de la ruta se establecieron en las bacterias. Fue posible aislar un gran número de mutantes auxótrofos que se caracterizaron genéticamente (cartografiado), fisiológicamente (identificación de los compuestos que podían satisfacer los requerimientos de crecimiento) y bioquímicamente (identificación de los intermediarios que se acumulan cuando está bloqueado un paso determinado). Por lo que se sabe hasta la fecha, los procesos son bastante similares en las plantas.

Las observaciones clave fueron, en primer lugar, que todo el carbono de la fenilalanina y la tirosina procede de la eritrosa-4-fosfato y del fosfoenolpiruvato y, en segundo lugar, que en una clase de mutantes que requieren fenilalanina, tirosina, triptófano, ácido *p*-aminobenzoico y ácido *p*-hidroxibenzoico para su crecimiento, las necesidades de estos cinco compuestos pueden satisfacerse con una sola sustancia, el **ácido sikímico.** Actualmente sabemos que en estos mutantes existe un bloqueo de la formación de sikimato (la cuarta reacción en la parte de la ruta que se muestra en la Figura 21.13) y que, cuando se proporciona esta sustancia, pueden producirse todos los pasos posteriores de la ruta. Obsérvese que una ruta no ramificada da lugar al **ácido corísmico** a través del

La ruta del ácido sikímico conduce a la síntesis de casi todos los compuestos aromáticos, entre ellos la lignina, y es pues una de las rutas más productivas de la biología.

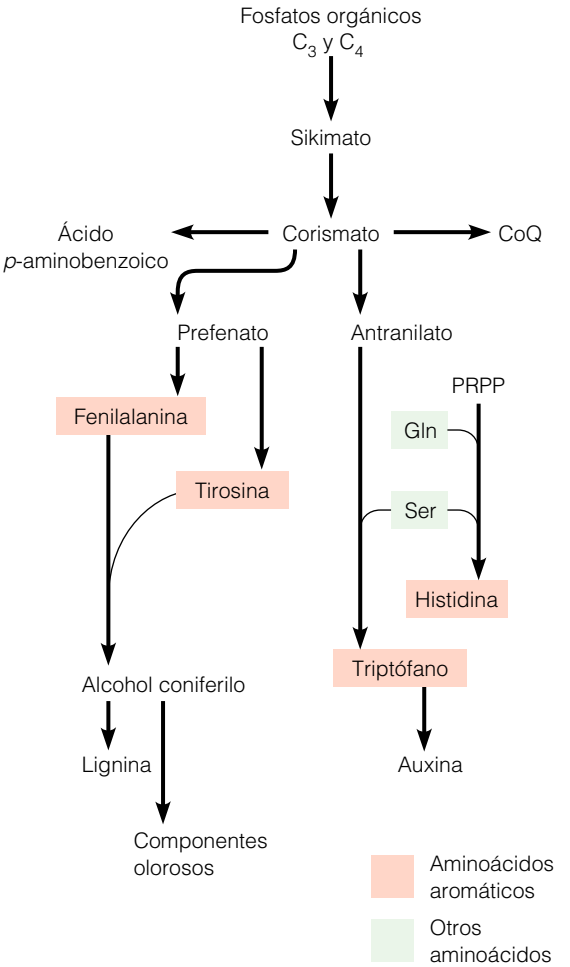
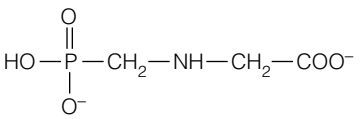


FIGURA **21.12**

Visión general de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos y de la histidina. Las rutas centrales que conducen a los cuatro aminoácidos son básicamente las mismas en las plantas y las bacterias. Se presentan detalles de la ruta del ácido sikímico en las Figuras 21.13 y 21.14, y la síntesis de la histidina en la Figura 21.17. PRP es 5-fosforribosil-1-pirofosfato (Figura 21.14).

ácido sikímico. A partir del ácido corísmico, hay una ruta que conduce al **ácido prefénico,** con posteriores ramificaciones que conducen a la fenilalanina y a la tirosina. Hay otra ruta que conduce al triptófano a través del **ácido antranílico,** y otra que da lugar al ácido *p*-aminobenzoico y una última ruta conduce a la coenzima Q a través del ácido *p*-hidroxibenzoico. Así pues, la ruta del ácido sikímico es la responsable de la biosíntesis de prácticamente todos los compuestos aromáticos, puesto que los productos que acabamos de mencionar actúan, a su vez, como precursores de otros compuestos aromáticos.



Glifosato

En los últimos años se ha dedicado una gran atención a la sexta reacción de la ruta del ácido sikímico, catalizada por la **5-enoilpiruvilsikimato-3-fosfato sintasa (EPSP sintasa),** en las plantas superiores. Esta enzima se inhibe específicamente por un compuesto denominado **glifosato** o glicina fosfonato (un *fosfonato* es un compuesto con un enlace covalente que une el carbono al fósforo). El crecimiento de la mayor parte de las plantas de cultivo se inhibe por el glifosato, que constituye un herbicida eficaz, de amplio espectro. Un logro reciente de la biotecnología ha sido la transferencia de genes que confieren resistencia al glifosato a las plantas de cultivo. Por ejemplo, la semilla de algodón "Roundup Ready" llegó a los granjeros a mediados de los años 1990 y otras plantas de cultivo, modificadas de forma similar, están en el mercado ya. Esta modificación permite un control simplificado y eficaz de los cultivos. La nebulización de un campo de cultivo eliminará todas las plantas excepto las especies producidas mediante ingeniería genética.

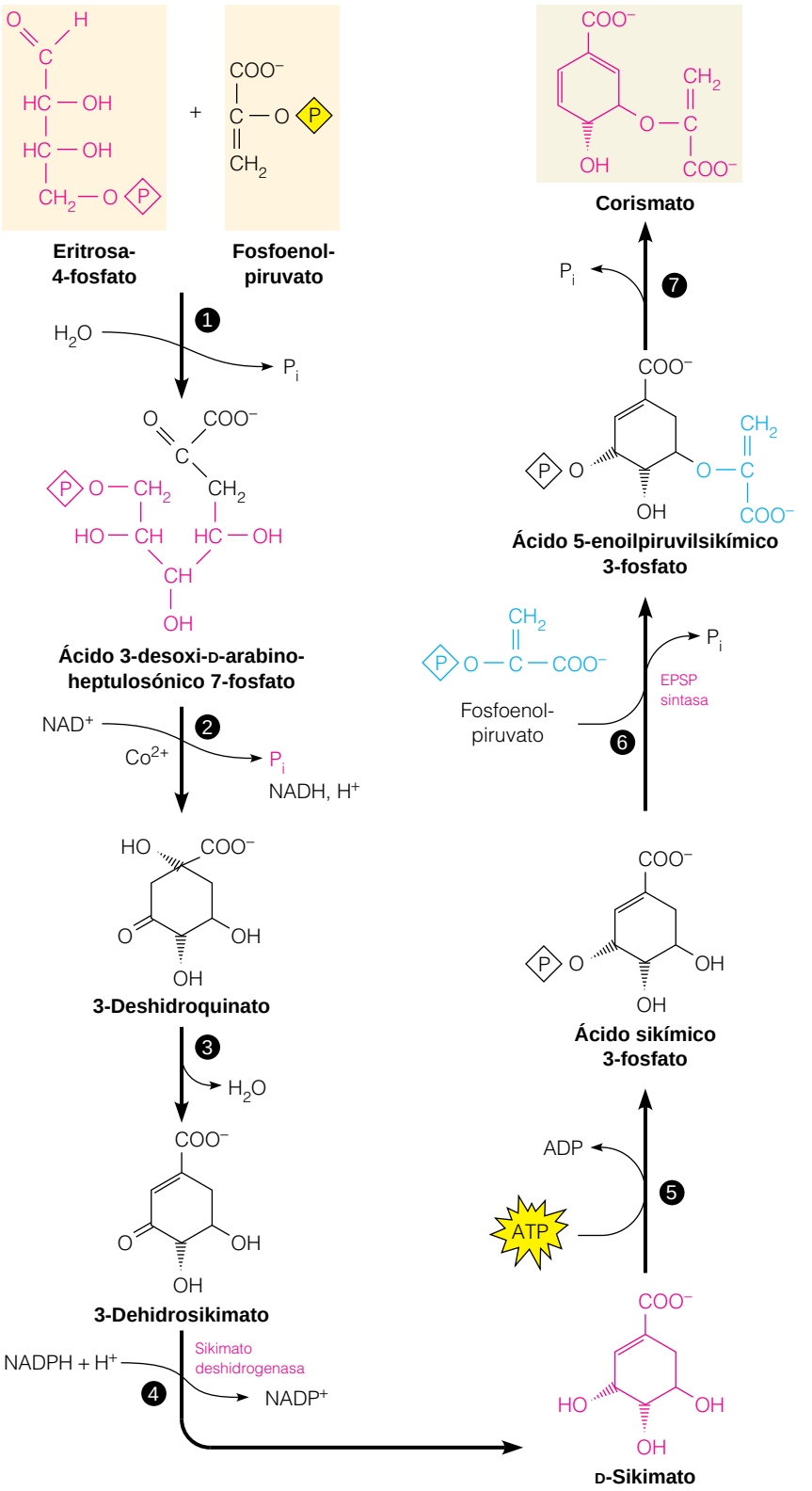


FIGURA **21.13**

Detalles de la ruta del ácido sikímico, I. En la figura se presenta la ruta inicial no ramificada que va de la eritrosa-4-fosfato y el fosfoenolpiruvato al ácido corísmico. La primera reacción se impulsa por la pérdida de fosfato del fosfoenolpiruvato. En la segunda reacción, una enzima poco habitual que requiere cobalto realiza el cierre del anillo mediante una deshidrogenación y la pérdida del segundo fosfato. La deshidratación del tercer paso da lugar a deshidrosikimato, que se reduce luego por el NADPH a sikimato. A continuación, se añade una cadena lateral de tres carbonos a través de una fosforilación del sikimato y la reacción con una segunda molécula de fosfoenolpiruvato. La desfosforilación de este intermediario da corismato, que es el punto de ramificación de la ruta.

En la regulación de estas rutas intervienen unos mecanismos de control interesantes. Los estudios realizados sobre el control genético de la biosíntesis del triptófano, que se describirán en el Capítulo 26, nos han proporcionado algunas de las perspectivas más importantes para comprender la regulación de la

transcripción. Los estudios más recientes sobre las reacciones que conducen al ácido corísmico han revelado la existencia de varias enzimas multifuncionales, que son cadenas polipeptídicas únicas que contienen dos o más lugares activos para la catálisis de reacciones secuenciales, que constituyen evidentemente una forma eficaz de controlar conjuntamente varias reacciones.

En la primera reacción de la ruta que va del ácido antranílico al triptófano (Figura 21.14) interviene un derivado de azúcar activado, el **5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP),** que desempeña funciones muy generalizadas en la síntesis de los nucleótidos (véase el Capítulo 22). En las bacterias, los genes que codifican estas enzimas están ligados en una disposición lineal, el **operón triptófano.** Como se expondrá en el Capítulo 26, un *operón* es un conjunto ligado de genes cuya expresión se regula de manera conjunta a nivel de la transcripción. En las bacterias entéricas, la enzima final de la ruta es la **triptófano sintasa,** un dímero $\alpha_2\beta_2$. Las subunidades α y β aisladas catalizan las siguientes reacciones parciales, y la holoenzima cataliza una reacción concertada en la que el indol no se disocia de la superficie enzimática sino que reacciona inmediatamente con la serina para dar triptófano.

$$\text{Indol-3-glicerol fosfato} \xrightarrow{\text{subunidad } \alpha} \text{indol} + \text{3-fosfogliceraldehído}$$

$$\text{Indol} + \text{serina} \xrightarrow{\text{subunidad } \beta} \text{triptófano} + H_2O$$

Es de destacar que la cristalografía de rayos X indica que el intermediario, el indol, se transporta desde el lugar activo de la subunidad α al lugar activo β, una distancia de 2.5 nm, a través de un túnel situado en el interior de la molécula proteica (Figura 21.15). Los análisis cinéticos, que complementan los análisis estructurales más detallados, sugieren que cada lugar activo está cubierto de forma intermitente por una "tapa" (Figura 21.16), que mantiene al indol dentro del canal.

BIOSÍNTESIS DE HISTIDINA

La biosíntesis de histidina presenta varios paralelismos con la ruta del ácido sikímico, en lo que respecta a los métodos utilizados para su determinación, la complejidad de las reacciones que comporta, la elegancia de la regulación genética de la ruta y las aplicaciones prácticas de su conocimiento. Sin embargo, la ruta de la histidina se diferencia por no ser ramificada. En la Figura 21.17 se presenta esta ruta tal como se estableció en gran parte en los laboratorios de Bruce Ames y Philip Hartman. Incluye diez reacciones distintas, que empiezan con una reacción poco habitual que une ATP y PRPP; ambos compuestos aportan carbono al producto.

Los 10 genes estructurales de las enzimas de la síntesis de histidina en las bacterias entéricas están ligados entre sí en el mismo orden en el que se producen las reacciones de la ruta. Este conjunto de genes, el **operón histidina,** se regula de manera coordinada a nivel de la transcripción, y los 10 genes se transcriben para dar un gran RNA mensajero, que se traduce para dar lugar a las 10 enzimas. Esta disposición de genes muy organizada puede facilitar la regulación de la ruta.

Las mutaciones auxótrofas de histidina han sido útiles para definir la ruta de biosíntesis y para analizar la mutagénesis ambiental.

Una vez identificados los genes y los productos génicos, Bruce Ames utilizó las bacterias mutantes que se habían generado para estas investigaciones de una forma novedosa, para buscar productos mutágenos en el medio. Con el empleo de la **prueba de Ames,** los investigadores pueden contar las mutaciones midiendo simplemente la velocidad a la que los mutantes que no sintetizan histidina (**auxótrofos** de histidina) mutan a una forma que puede sintetizar el

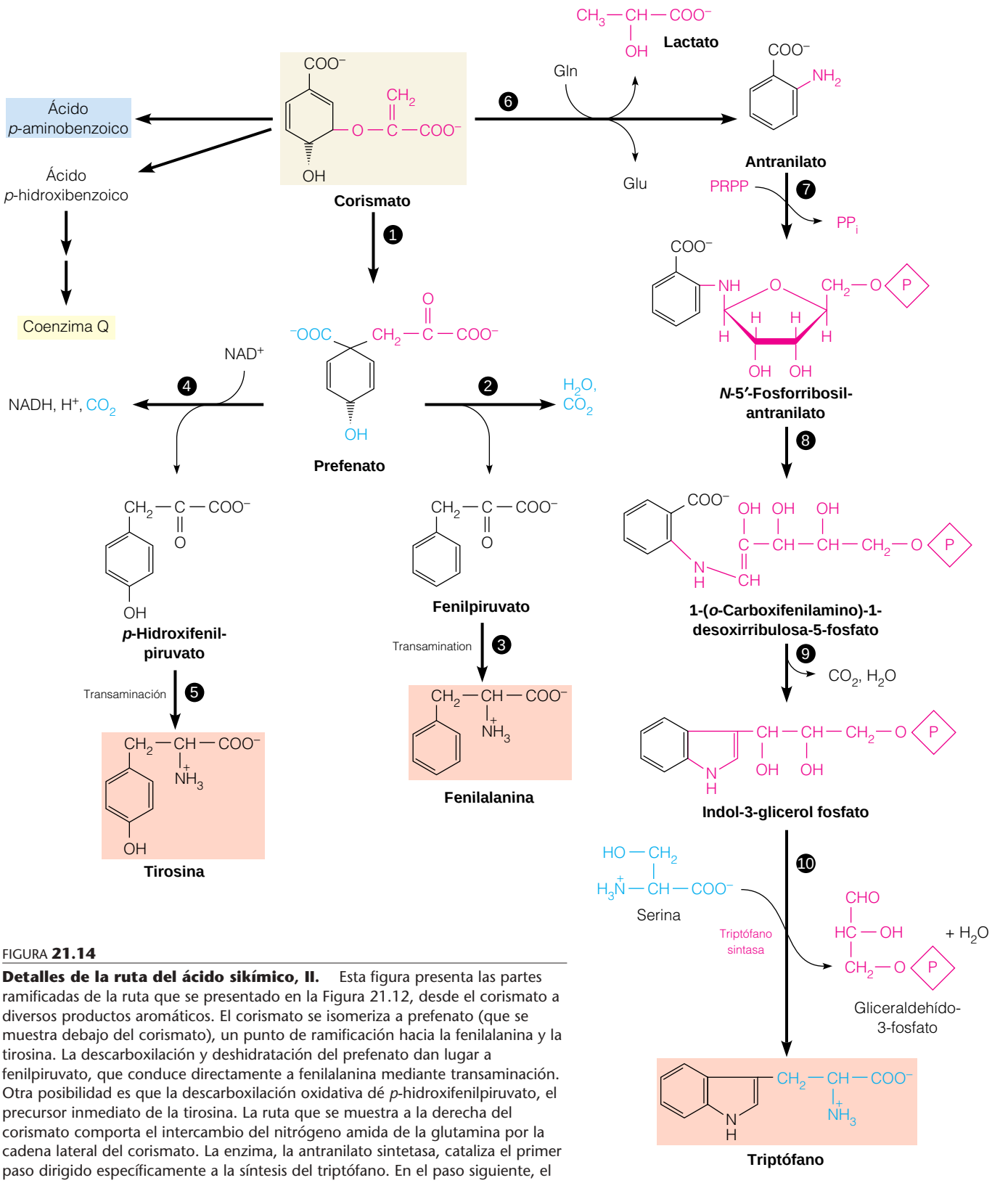


FIGURA **21.14**

Detalles de la ruta del ácido sikímico, II. Esta figura presenta las partes ramificadas de la ruta que se presentado en la Figura 21.12, desde el corismato a diversos productos aromáticos. El corismato se isomeriza a prefenato (que se muestra debajo del corismato), un punto de ramificación hacia la fenilalanina y la tirosina. La descarboxilación y deshidratación del prefenato dan lugar a fenilpiruvato, que conduce directamente a fenilalanina mediante transaminación. Otra posibilidad es que la descarboxilación oxidativa dé *p*-hidroxifenilpiruvato, el precursor inmediato de la tirosina. La ruta que se muestra a la derecha del corismato comporta el intercambio del nitrógeno amida de la glutamina por la cadena lateral del corismato. La enzima, la antranilato sintetasa, cataliza el primer paso dirigido específicamente a la síntesis del triptófano. En el paso siguiente, el carbono 1 del 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) se liga al nitrógeno del antranilato, mediante la pérdida de pirofosfato del carbono 1. La apertura del anillo del azúcar va seguida de una descarboxilación y del cierre del anillo para dar indol-3-glicerol fosfato. En el último paso, la cadena lateral de tres carbonos del compuesto indol se intercambia por la de la serina, dando triptófano.

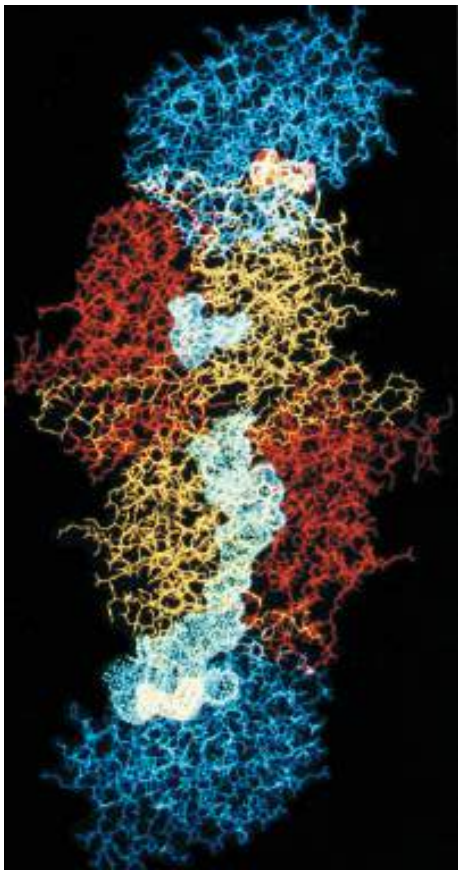


FIGURA **21.15**

Estructura de la triptófano sintasa. Este modelo muestra la estructura del complejo triptófano sintasa $\alpha_2\beta_2$ de *Salmonella typhimurium*. Las subunidades α se muestran de color azul, el dominio N-terminal de las subunidades β en amarillo y los dominios C-terminales de las subunidades β en rojo. El azul claro muestra un túnel interior que conecta los lugares activos de la parte inferior de las subunidades α y β. Los lugares activos de la parte superior de las subunidades α y β se indican en rojo y azul claro, respectivamente, y el túnel que conecta estas subunidades no está resaltado.

Cortesía de C. C. Hyde et al., *J. Biol. Chem.* (1988) 263:17857-17871. Reproducido con permiso de The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

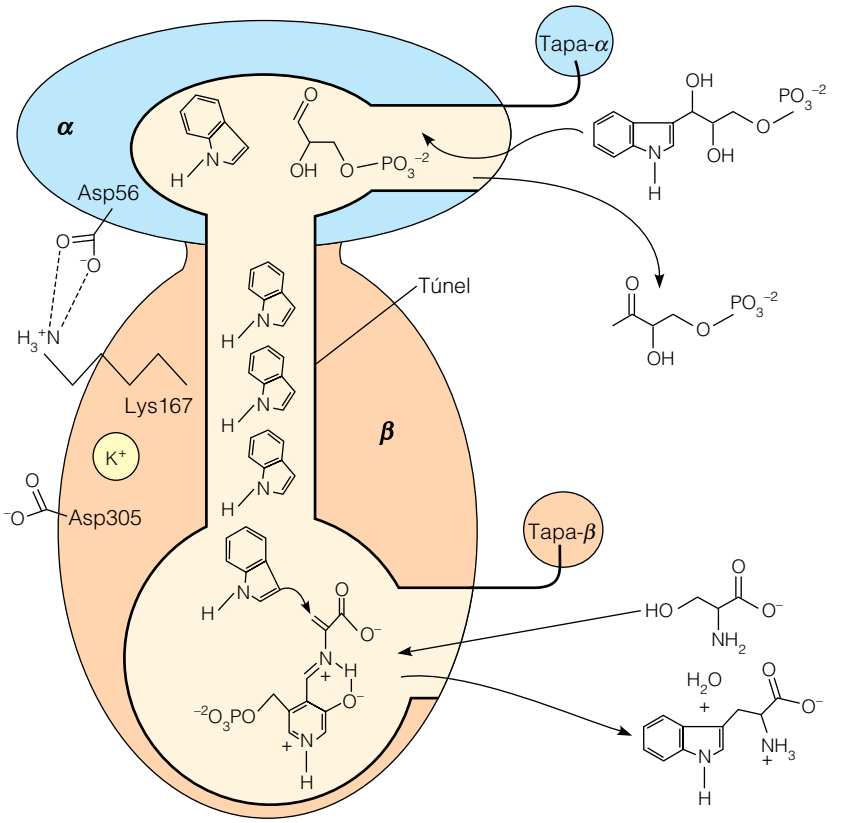


FIGURA **21.16**

Representación esquemática de la acción de la triptófano sintasa en un ensamblaje α–β. Se muestran los lugares activos de las subunidades α (rojo) y β (naranja), el túnel de 2.5 nm de interconexión lleno de moléculas de indol, y las rutas de entrada de sustrato y de liberación de producto de ambas subunidades, con las "tapas", cuya apertura y cierre alternativos restringe al indol dentro del túnel. Se muestran también un lugar de unión del K^+ catalítico esencial y un puente salino que proporciona un ligamiento alostérico entre las dos subunidades.

Cortesía de P. Pan, E. Woehl y M. F. Dunn, *Trends Biochem. Sci.* (1997) 22:22-27. © 1997 con permiso de Elsevier Science.

aminoácido (**protótrofos**). El investigador trata un cultivo de auxótrofos con un supuesto mutágeno, siembra las bacterias en un medio que no contenga histidina y cuenta las colonias que aparecen como resultado de las mutaciones de reversión. Con el empleo de este sistema, Ames y sus colaboradores describieron una correlación muy elevada entre los compuestos que son cancerígenos conocidos en los animales y los que resultan ser mutágenos en esta prueba. Así pues, la prueba de Ames proporciona una forma rápida y barata de buscar posibles cancerígenos ambientales. Además, estos resultados respaldaron la idea de que el cáncer aparece como resultado de una serie de mutaciones de células somáticas, una idea que consideraremos posteriormente en el Capítulo 23.

UTILIZACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS EN LAS PLANTAS

La fenilalanina y la tirosina actúan como precursores de un enorme número de sustancias de las plantas, que van desde la lignina polimérica hasta los taninos, los pigmentos y muchos de los componentes que dan sabor a las especias. De hecho, la función de estos aminoácidos como precursores de sustancias como el aceite de canela, el aceite de gauteria, las almendras amargas, la nuez moscada, la pimienta cayena, la vainilla, el clavo y el jengibre, está relacionada con su de-

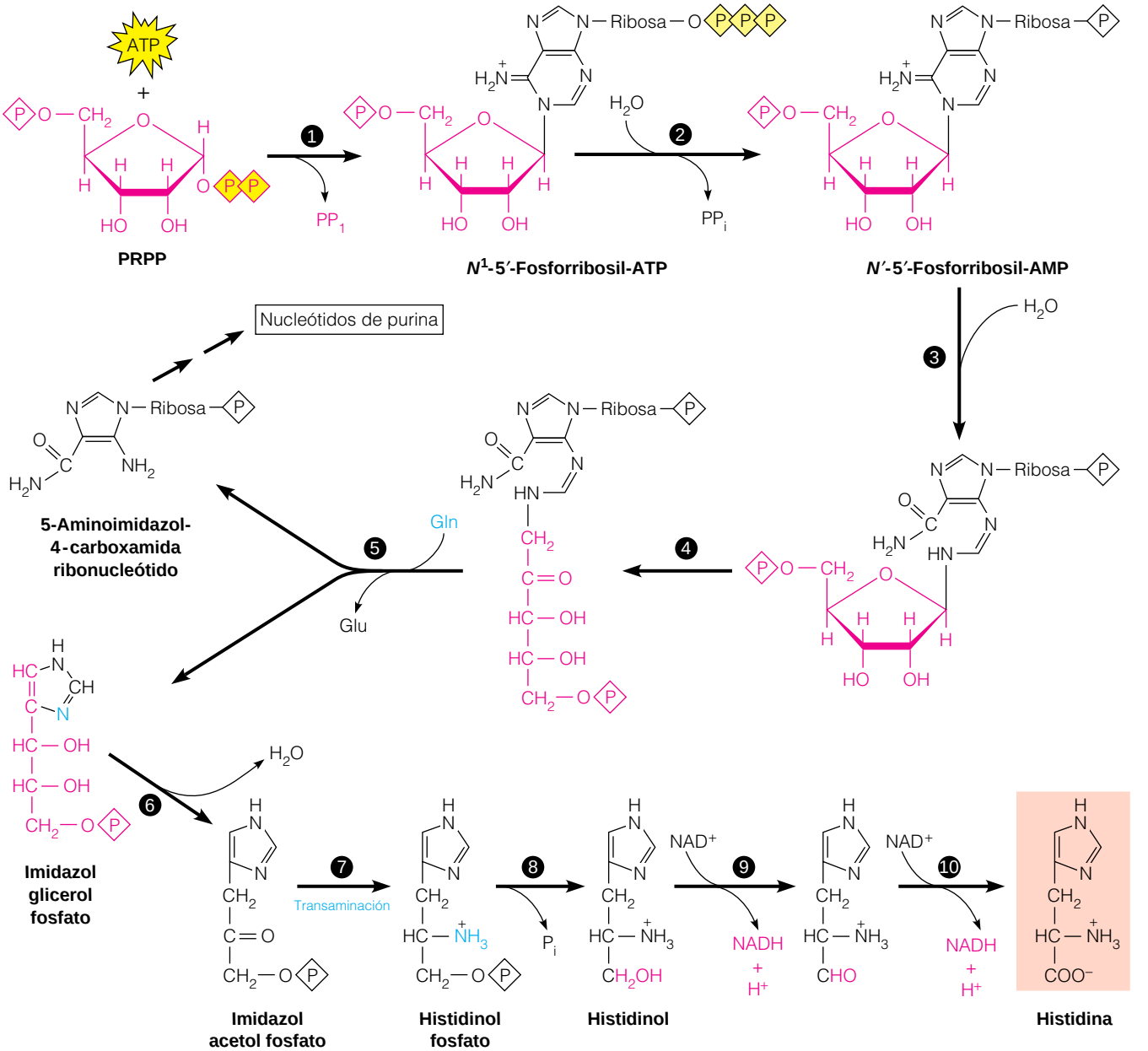
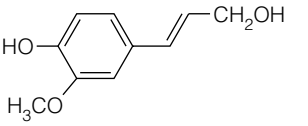


FIGURA **21.17**

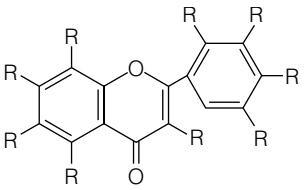
Ruta de la biosíntesis de histidina. Tras la activación de un anillo de purina mediante la reacción con 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP, paso 1), el anillo se abre para dar el tercer intermediario (pasos 2 y 3). A continuación, se abre el anillo de ribosa procedente del PRPP (paso 4). La transferencia del nitrógeno amida de la glutamina (paso 5) se realiza mediante la ruptura y cierre del anillo, dando el primer compuesto imidazólico, el imidazol glicerol fosfato. El otro producto es un intermediario de la síntesis de los nucleótidos de purina. El imidazol glicerol fosfato se transforma en histidina mediante una secuencia simple que conlleva deshidratación (paso 6), transaminación (paso 7) desfosforilación (paso 8) y deshidrogenación (pasos 9 y 10).

nominación de aminoácidos *aromáticos*. Derivan del alcohol coniferílico, que también es el intermediario central en la síntesis de lignina.

La fenilalanina también actúa como precursor de un gran número de pigmentos vegetales y compuestos polifenólicos relacionados denominados **flavo-**

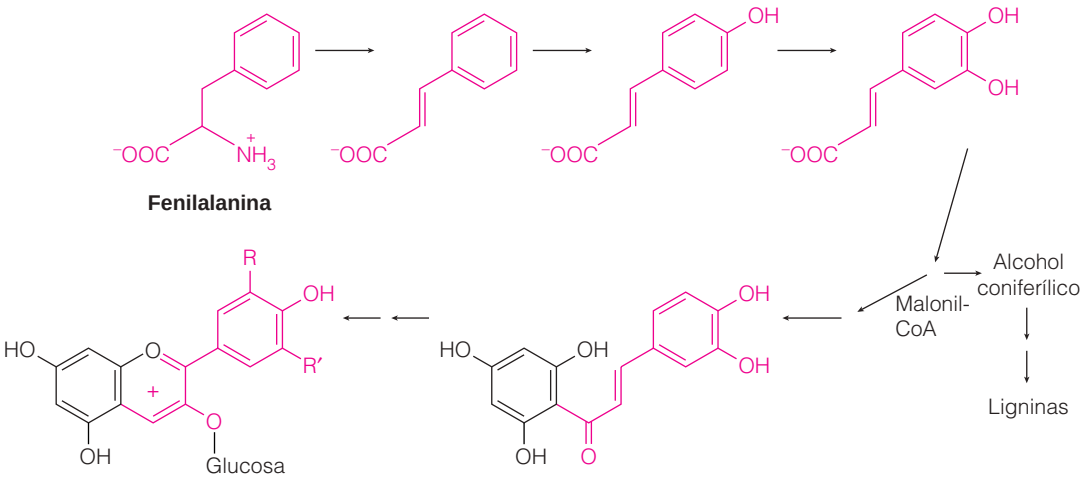


Alcohol coniferílico



noides, entre los que se encuentran muchos colorantes de las flores, que actúan en parte como protectores ultravioleta, y también el inhibidor respiratorio rotenona (véase la página 596). En la estructura genérica que se presenta en el margen (esta página), el anillo aromático de la derecha procede de la fenilalanina a través del esquema de abajo, y el anillo de la izquierda procede de la malonil-CoA en un proceso análogo a la síntesis de ácidos grasos y de poliquétidos (Capítulo 18). Los grupos sustituyentes (R) son combinaciones de —H, —OH y $—OCH_3$.

El esquema de biosíntesis delineado al final del párrafo conduce a una clase de flavonoides denominados **antocianinas,** que son pigmentos comunes de las flores. Como se muestra, los sustituyentes en los anillos determinan el color específico. Una ramificación de esta ruta conduce a la síntesis de cocaína.

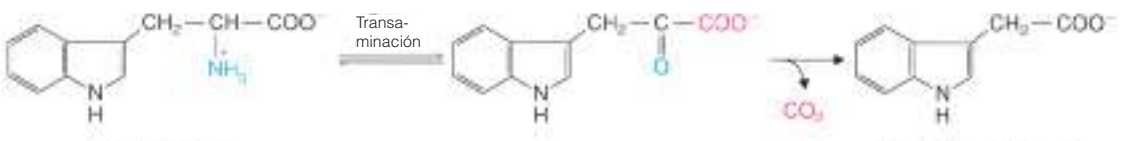


Antocianinas

Si R y R′ son ambos H, el color es rojo-anaranjado
Si R es H y R′ es OH, el color es morado-carmesí
Si R y R′ son ambos OH, el color es azul

Como se señala en la página 851, el alcohol coniferílico es el precursor de las complejas y casi inertes ligninas. Gran parte del esfuerzo en la creación de papel y de tejidos a partir de la madera corresponde a la degradación de la lignina para acceder a las fibras de celulosa de los tejidos de la madera. Una utilización ingeniosa de la biotecnología es la sustitución de los organismos en los procesos de obtención de la pulpa que se utilizan para degradar la lignina, que liberan grandes cantidades de sulfitos al medio ambiente. En estas aplicaciones de obtención de "pulpa biotecnológica", se están creando hongos que producen enzimas de degradación de ligninas para la producción de celulosa sin la acumulación de polución química.

El triptófano se utiliza para la síntesis de una hormona de crecimiento de las plantas. Como se muestra aquí, el producto de transaminación del triptófano produce **ácido indol-3-acético,** o **auxina.**



Triptófano **Ácido indol-3-acético**

METABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS EN LOS ANIMALES

Aunque las células de los animales no sintetizan los anillos aromáticos de novo, el metabolismo intermediario de los aminoácidos aromáticos en los animales es muy amplio, y afecta a muchos procesos biológicos importantes. Entre ellos se encuentran la biosíntesis de la tirosina a partir de fenilalanina, la utilización de la tirosina en la síntesis de los pigmentos y las hormonas, y la utilización de la tirosina, el triptófano y la histidina en la síntesis de las **aminas biógenas,** compuestos que actúan como hormonas y como neurotransmisores. El metabolismo de los aminoácidos aromáticos proporciona también el fundamento de gran parte de nuestro conocimiento básico sobre la genética bioquímica del ser humano.

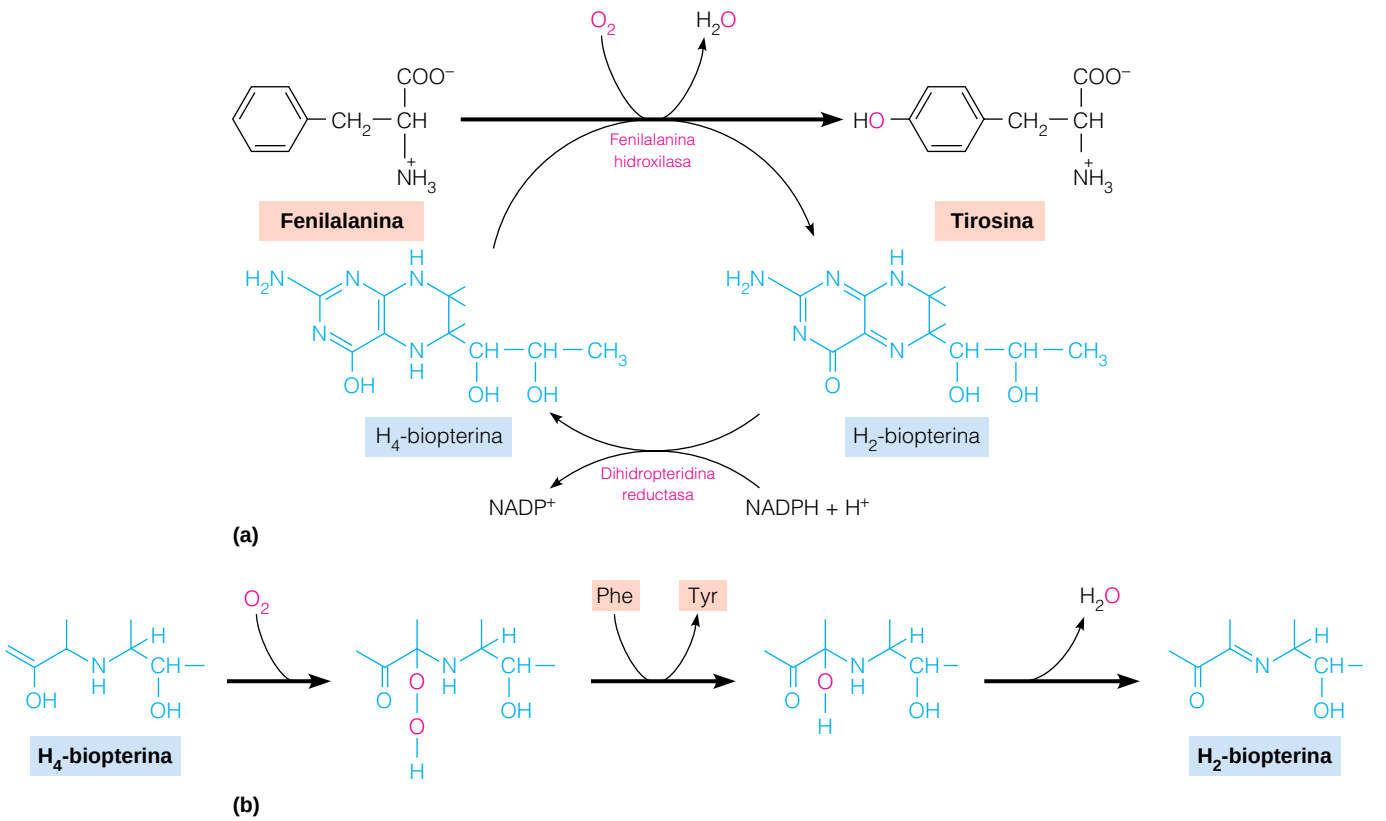
Biosíntesis de tirosina

La única reacción conocida de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en los animales es la conversión de la fenilalanina en tirosina, catalizada por la **fenilalanina hidroxilasa.** Esta interesante enzima es una oxigenasa de función mixta, que utiliza un cofactor de pteridina, la **tetrahidrobiopterina** (que se ha presentado en la página 836). La reacción oxida la tetrahidrobiopterina para dar lugar al isómero quinonoide de la dihidrobiopterina, como se muestra en la Figura 21.18. La coenzima se regenera mediante la acción de la **dihidropteridina reductasa** que requiere NADPH (de manera análoga, aunque no idéntica a la dihidrofolato reductasa). Este sistema enzimático se encuentra casi enteramente en el hígado.

Un déficit hereditario de la fenilalanina hidroxilasa es la causa de la **fenilcetonuria** (**PKU**), un trastorno que afecta a aproximadamente 1 de cada 10 000 re-

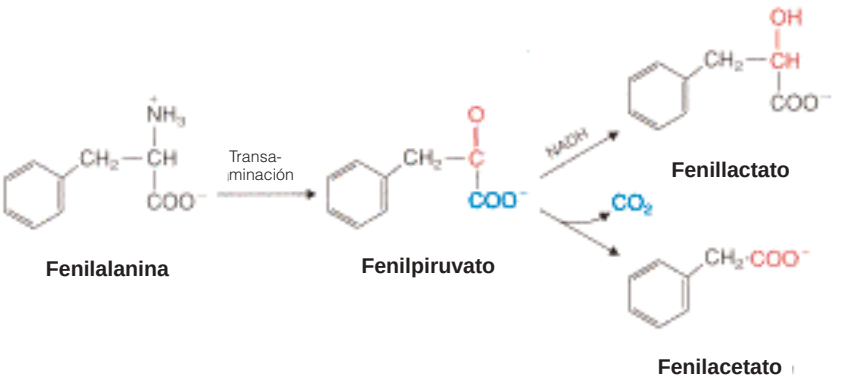
FIGURA **21.18**

Reacciones de la fenilalanina hidroxilasa y la dihidropteridina reductasa. **(a)** La conversión de la fenilalanina en tirosina está catalizada por la fenilalanina hidroxilasa, acompañada por la oxidación del cofactor, la tetrahidrobiopterina, a dihidrobiopterina. La tetrahidrobiopterina se regenera por la enzima dihidrobiopterina reductasa. **(b)** Esquema de la activación del O_2 por la tetrahidrobiopterina.



La fenilcetonuria, un déficit mental grave, se debe a una insuficiencia genética de la fenilalanina hidroxilasa o, en casos raros, de la dihidropteridina reductasa.

cién nacidos en Europa Occidental y los Estados Unidos. La fenilcetonuria es un rasgo autosómico recesivo, es decir, los dos progenitores heterocigotos para el rasgo tienen una posibilidad entre cuatro de tener un niño con fenilcetonuria. A partir de la incidencia de la enfermedad, podemos calcular que alrededor del 2% de la población son portadores. En la fenilcetonuria, la fenilalanina se acumula hasta concentraciones muy elevadas a causa del bloqueo de la conversión en tirosina, y gran parte de esta fenilalanina se metaboliza a través de rutas que normalmente son poco utilizadas, en especial la transaminación a fenilpiruvato y también la posterior conversión del fenilpiruvato en fenillactato y fenilacetato. Estos compuestos se excretan en la orina en cantidades enormes (1 a 2 gramos al día).



Si no se detecta y se trata, la fenilcetonuria da lugar a un retraso mental profundo cuya causa bioquímica exacta no se ha identificado aún. Por fortuna, la fenilcetonuria puede detectarse con facilidad al nacer, y muchos hospitales realizan exámenes de detección sistemáticos de los recién nacidos. Si el trastorno se detecta de forma precoz, puede evitarse la aparición del retraso mediante la alimentación del niño durante varios años con una dieta sintética con un bajo contenido de fenilalanina y abundante tirosina, con objeto de permitir el desarrollo normal del sistema nervioso. Dado que el empleo de esta dieta sintética es muy caro, ha habido un gran interés por el diagnóstico prenatal de la fenilcetonuria y la identificación de los portadores heterocigotos. Se ha clonado el gen humano de la fenilalanina hidroxilasa, y ello ha sido la base para una prueba en la que se utiliza la hibridación de ácidos nucleicos, que puede aplicarse a cualquier célula.

En los últimos años se ha descrito una forma diferente de fenilcetonuria debida a un déficit hereditario de la dihidropteridina reductasa. Este trastorno es mucho más raro que la fenilcetonuria clásica y, puesto que la tetrahidrobiopterina participa en otras hidroxilaciones, produce unos síntomas mucho más graves.

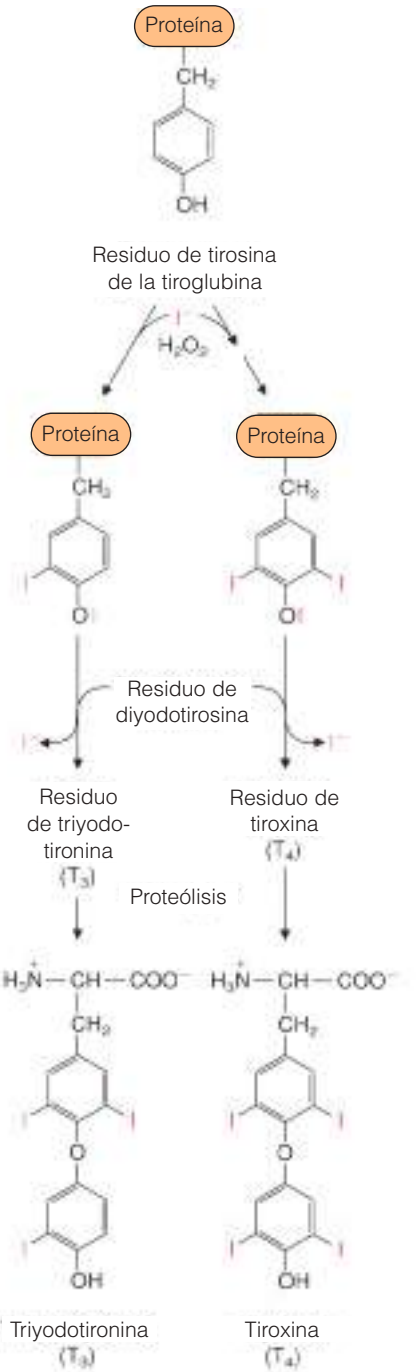
Utilización y catabolismo de la tirosina

En los animales, la fenilalanina no tiene ninguna otra función importante aparte de la de ser un componente de las proteínas y un precursor de la tirosina. Sin embargo, la tirosina desempeña varias funciones importantes en el metabolismo de los animales, como precursora de las hormonas tiroideas, de los pigmentos biológicos denominados **melaninas** y de las *catecolaminas*, que actúan como hormonas y como neurotransmisores (que se consideran más adelante en este capítulo).

Las hormonas tiroideas estimulan diversos procesos metabólicos, mediante la activación de la transcripción de genes específicos (véase el Capítulo 23). La

FIGURA **21.19**

Biosíntesis de las hormonas tiroideas como residuos de la proteína tiroglobulina. Las formas yodadas de la tirosina, triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4), se liberan a partir de estas proteínas mediante degradación proteolítica.



síntesis de las hormonas tiroideas, principalmente la **tiroxina** (T_4) y la **triyodotironina** (T_3), se produce a través de una ruta peculiar, a nivel de los residuos de tirosina de una proteína específica, la **tiroglobulina.** Como se muestra en la Figura 21.19, dos residuos de tisorina yodados en la misma cadena polipeptídica reaccionan para dar un residuo de T_3 o T_4, que se libera por proteólisis. Esta proteína sufre una degradación para producir las hormonas libres, que se transportan a sus lugares de acción a través del torrente sanguíneo. La síntesis de las hormonas tiroideas comporta la yodación del anillo de tirosina. Este proceso tiene lugar en la glándula tiroidea que concentra el ion yoduro del suero sanguíneo con este fin. Una de las consecuencias del déficit de yodo es el **bocio,** un trastorno en el que la glándula tiroides crece hasta alcanzar un tamaño anormalmente grande en su intento de captar todo el yodo disponible. Antes de que se utilizara de manera general la sal yodada, el bocio era un trastorno endémico en las regiones en las que había un déficit de yodo en el suelo.

La síntesis de las melaninas (Figura 21.20) tiene lugar en las células productoras de pigmentos, los **melanocitos.** Durante bastante tiempo se pensó que toda la ruta utiliza una sola enzima. Sin embargo, en los tejidos de los mamíferos, es probable que el paso inicial, la hidroxilación de la tirosina a **3,4-dihidroxifenilalanina** (normalmente denominada por el acrónimo **dopa**), implica una reacción de peroxidación. La dopa, que actúa también como cofactor de esta reacción, es el sustrato de una oxidación posterior a **dopaquinona,** catalizada por una oxigenasa que contiene cobre denominada tirosinasa. Las reacciones posteriores, que conducen a las melaninas, se producen in vitro de manera espontánea. No obstante, se ha demostrado que la tirosinasa cataliza otra reacción, en la rama de la ruta que conduce a la **melanina negra,** que es la oxidación del 5,6-dihidroxiindol a indol-5,6-quinona. Esta reacción requiere también dopa como cofactor y se inhibe por la tirosina, proporcionando al parecer un medio de regulación de la formación del pigmento.

En otra rama de la ruta, la dopaquinona reacciona con la cisteína en su camino hacia la síntesis de otra serie de polímeros relacionados, las **melaninas rojas.** La pigmentación de una persona viene dada por las cantidades relativas de melaninas roja y negra de la piel. Éstas están en función, a su vez, de la distribución y densidad de los melanocitos en las capas basales de la piel, así como de las actividades de las rutas que conducen a las diferentes melaninas. Un déficit genético de tirosinasa hace que una persona carezca de pigmentación y este trastorno se denomina **albinismo.**

La ruta catabólica principal para la tirosina implica primero su transaminación mediante la **tirosina aminotransferasa,** una enzima del hígado cuya concentración se regula hormonalmente (Figura 21.21). El producto, el *p*-hidroxifenilpiruvato, sufre la acción de la ***p*-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa,** una enzima poco habitual que contiene hierro, que cataliza una hidroxilación del anillo, una descarboxilación y una migración de la cadena lateral, utilizando como cofactor el ascorbato, de una forma similar a su uso con la procolágeno prolina hidroxilasa (véase la página 840). Esta reacción tiene lugar a través de un mecanismo denominado **desplazamiento NIH,** en honor de los científicos de los National Institutes of Health de Estados Unidos, que describieron una hi-

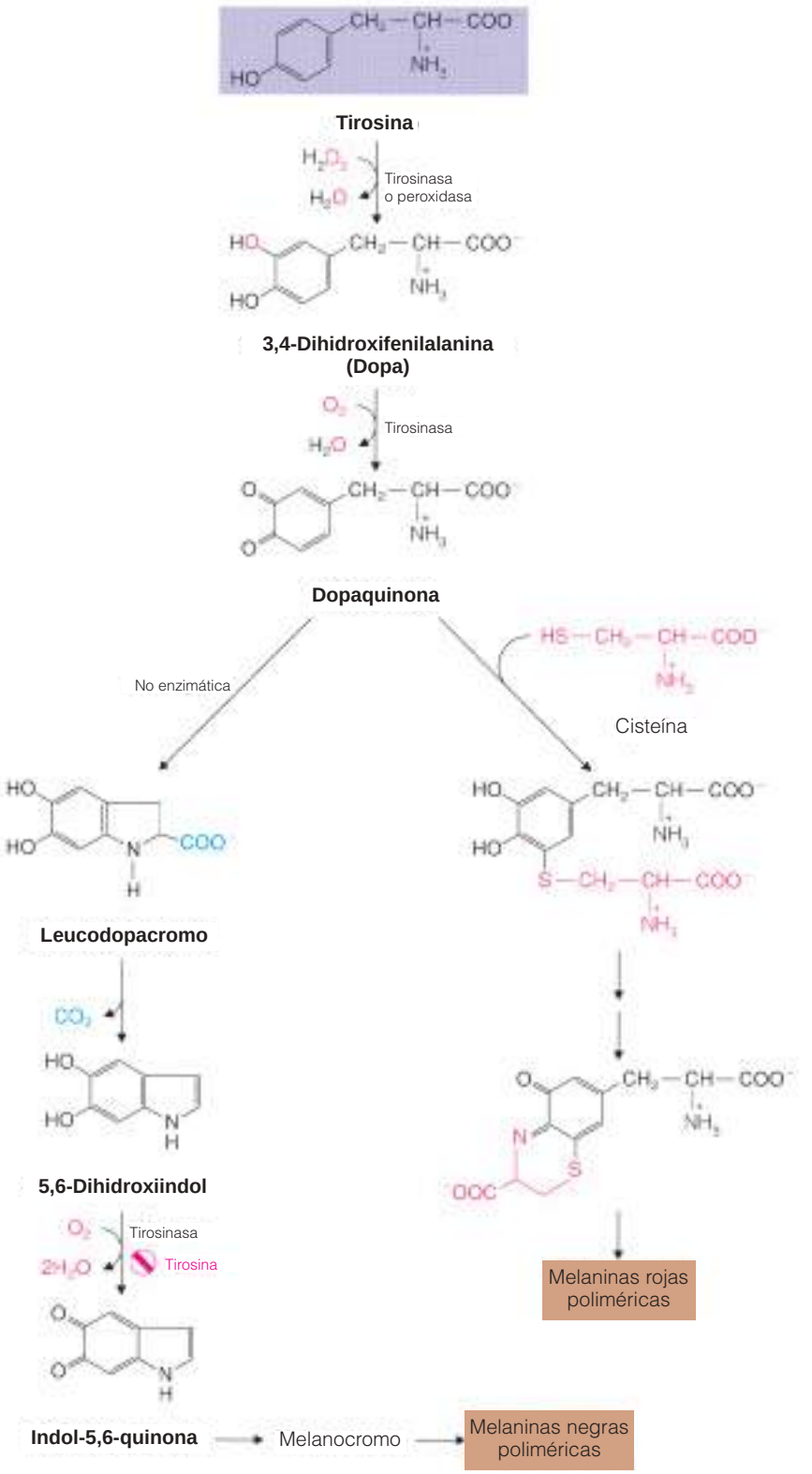


FIGURA **21.20**

Rutas de biosíntesis desde la tirosina a las melaninas.

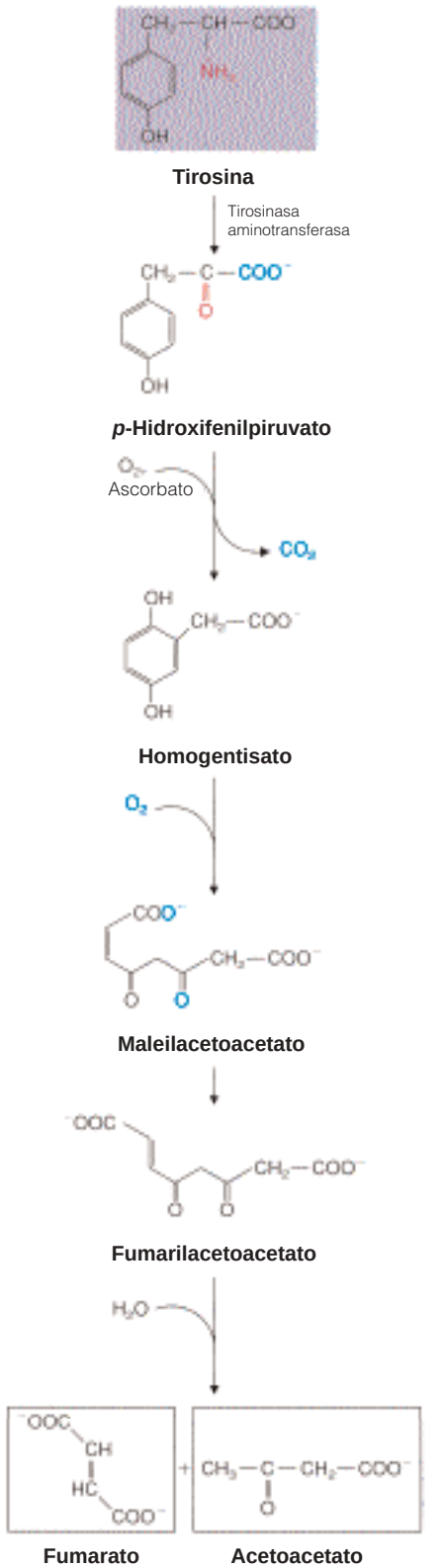
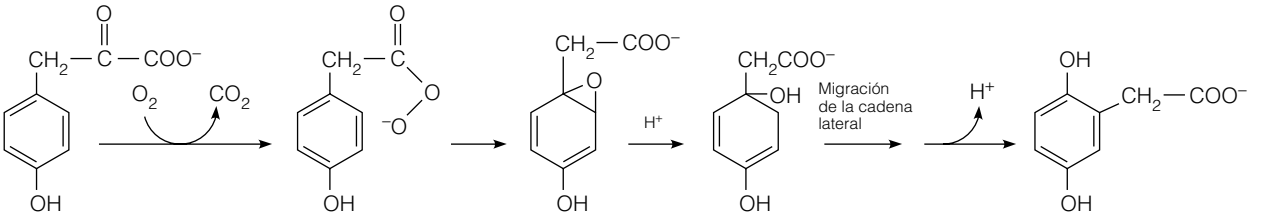


FIGURA **21.21**

Catabolismo de la tirosina a fumarato y acetoacetato.

droxilación del anillo que tiene lugar a través de la formación de un intermediario epóxido.



***p*-Hidroxifenilpiruvato** **Homogentisato**

La reacción de la fenilalanina hidroxilasa comporta también un desplazamiento NIH, con migración del hidrógeno del C-4 de la fenilalanina al C-3 de la tirosina, sin mezclarse con el disolvente.

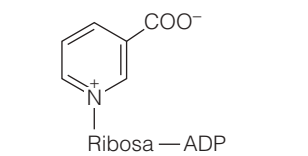
El producto de la oxidación del *p*-hidroxifenilpiruvato, el **ácido homogentísico,** se oxida por una enzima que contiene hierro, la **ácido homogentísico dioxigenasa,** que rompe el anillo para dar un compuesto de ocho carbonos de cadena lineal que se isomeriza a **fumarilacetoacetato.** Este último se rompe finalmente para producir fumarato y acetoacetato, sustancias ambas que se catabolizan mediante las rutas habituales de producción de energía. En las plantas, el homogentisato es el precursor del anillo aromático de la vitamina E (véase la página 780).

Un déficit hereditario de la enzima ácido homogentísico dioxigenasa en el ser humano produce un trastorno conocido durante siglos como la "enfermedad de la orina oscura", pero a la que actualmente se denomina **alcaptonuria.** Se acumula ácido homogentísico que se excreta en la orina en grandes cantidades y cuya oxidación al dejarla en reposo hace que la orina adquiera un color oscuro. Aunque los síntomas clínicos de la enfermedad no son graves, tiene un considerable interés histórico. A comienzos de este siglo, Archibald Garrod analizó los árboles genealógicos de las familias de las personas afectadas, y en 1908 propuso acertadamente que el déficit se debía a un gen que controla una reacción normal de la degradación de los compuestos aromáticos. En otras palabras, este autor propuso que un gen codifica una enzima, mucho antes de que se conociera la naturaleza química de los genes o de las enzimas.

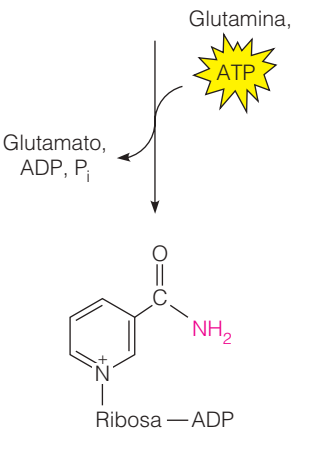
Triptófano

El triptófano se transforma mediante muchas rutas, de las cuales tan sólo dos nos ocuparán aquí: la ruta catabólica principal, que transcurre a través de la **quinurenina** hasta la glutaril-CoA (Figura 21.22), y la síntesis de nucleótidos de nicotinamida mediante una ramificación de esta ruta catabólica principal. La primera reacción de la degradación del triptófano la cataliza la **triptófano oxigenasa,** una proteína con hierro hemo cuya concentración se controla mediante dos mecanismos: (1) la inducción por determinadas hormonas y (2) la estabilización in vivo por su sustrato, el triptófano, que aumenta las concentraciones de la enzima al proteger a la proteína frente a la degradación intracelular.

El NAD^+ puede sintetizarse bien a partir del triptófano o bien a partir de la vitamina ácido nicotínico (véase la Tabla 11.5). En ambas rutas, la última reacción está catalizada por una amidotransferasa que requiere glutamina (véase el margen). Ambas rutas contribuyen probablemente de manera significativa a la biosíntesis del NAD^+, como puede inferirse de los estudios realizados sobre la enfermedad producida por la carencia de nicotinamida, la **pelagra.** Este tras-



Desamido-NAD^+



NAD^+

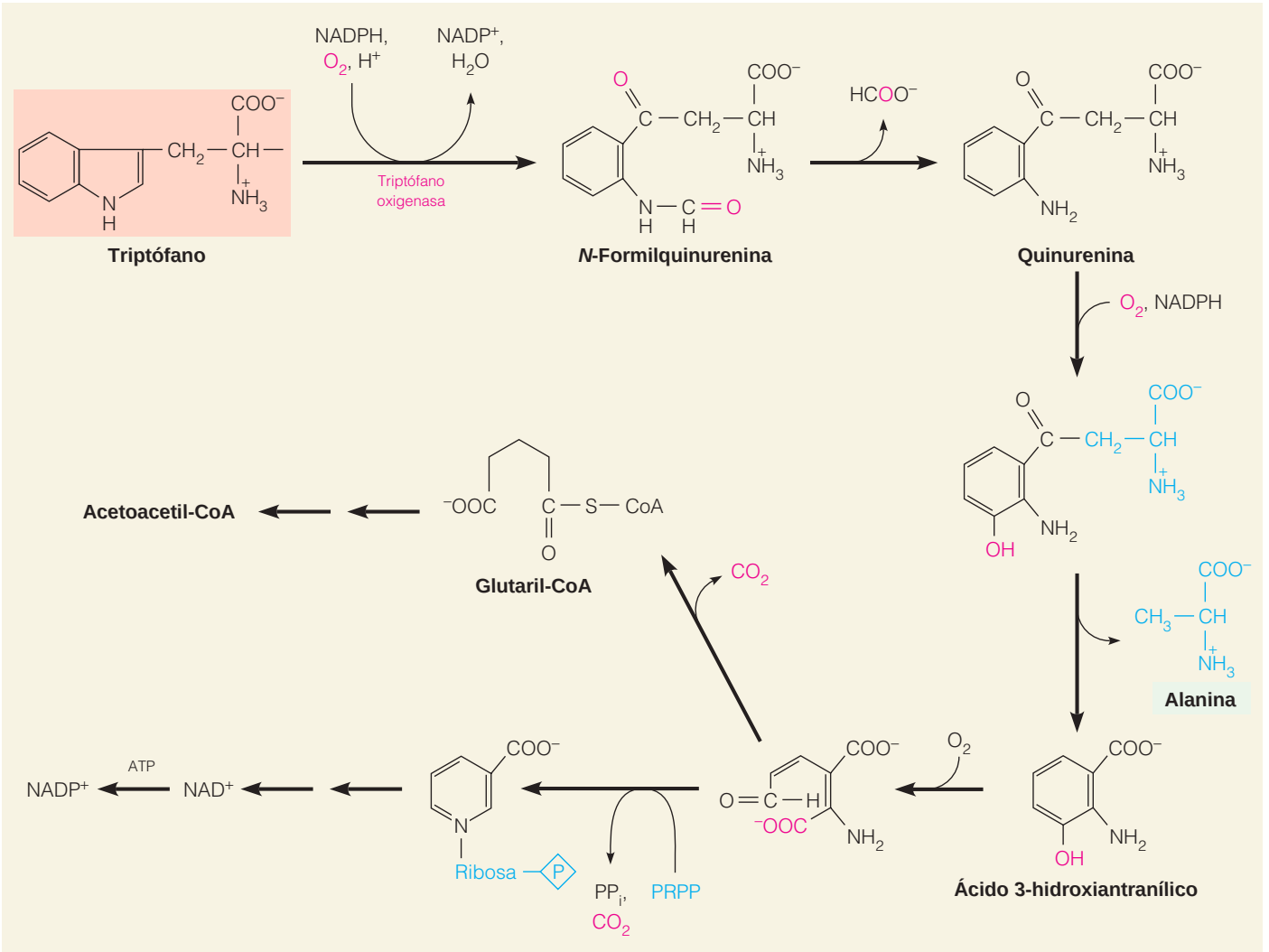
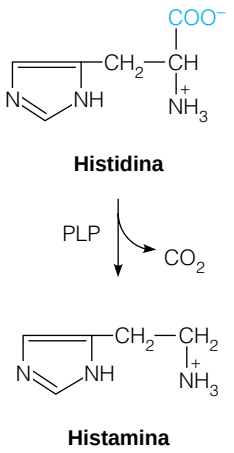


FIGURA **21.22**

Destinos metabólicos del triptófano. En la figura se muestran las dos rutas principales: la ruta de síntesis de los nucleótidos de nicotinamida y la ruta catabólica principal que degrada la mayor parte de la molécula de triptófano a acetoacetil-CoA y CO_2.



torno era antes endémico en regiones, como el sur de EE.UU., en las que la base de la alimentación era el maíz. Dado que las proteínas del maíz contienen poco triptófano, eran frecuentes las carencias de este aminoácido. Los síntomas de la carencia de triptófano son idénticos a los de la carencia de nicotinamida, como cabe esperar teniendo en cuenta que una función principal del triptófano es ser sustituto de la nicotinamida.

Histidina

La histidina se descarboxila para generar **histamina,** una sustancia con múltiples acciones biológicas. Cuando se segrega en el estómago, la histamina fomenta la secreción de ácido clorhídrico y pepsina, sustancias ambas que facilitan la digestión. Es un vasodilatador potente, que se libera locamente en los lugares de traumatismos, inflamación o reacciones alérgicas. La dilatación local de los capilares sanguíneos es el fundamento del enrojecimiento cutáneo que se produce en los tejidos inflamados. La liberación de histamina en los traumatismos contribuye a producir la peligrosa reducción de la presión sanguínea que puede conducir al shock. Se utilizan un gran número de **antihistamínicos** en el tratamiento de las alergias y otras inflamaciones. De forma característica, estos fármacos impiden la unión de la histamina a sus receptores.

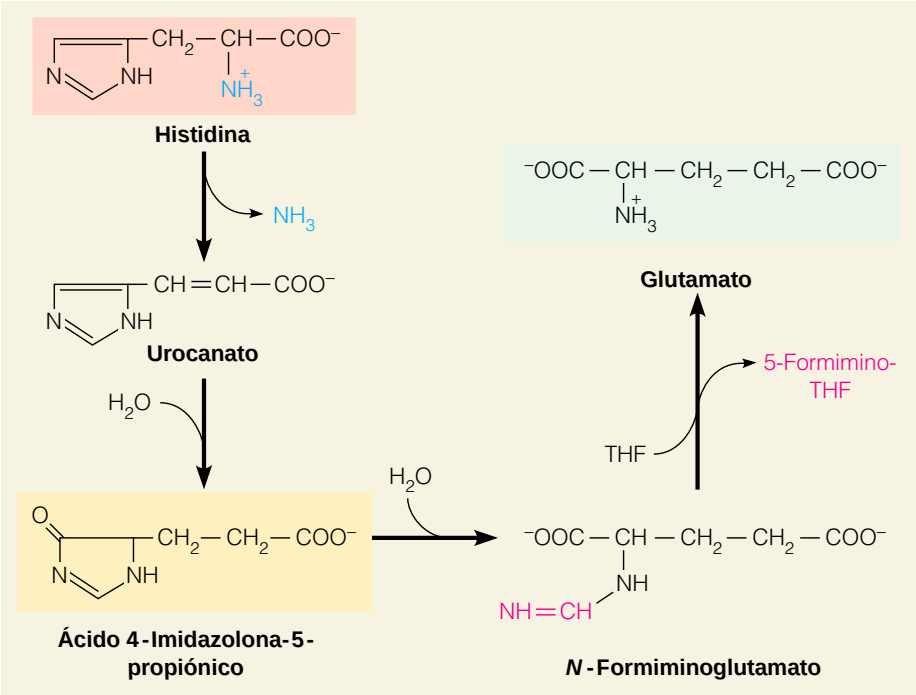


FIGURA **21.23**

Catabolismo de la histidina. El carbono meteno del anillo imidazol se convierte en un aducto de tetrahidrofolato de un carbono.

En la Figura 21.23 se presenta la ruta catabólica principal de la histidina. Este aminoácido, como el triptófano, no se transamina al inicio de su degradación. En vez de ello, una liasa específica fragmenta al amoníaco para dar **ácido urocánico.** Dos pasos posteriores dan lugar a una reducción y a la apertura del anillo para producir **ácido formiminoglutámico,** sustancia de interés ya que actúa como donador de fragmentos de un carbono activo. El grupo formimino se transfiere al tetrahidrofolato dando 5-formiminotetrahidrofolato y glutamato.

Serina, glicina y treonina

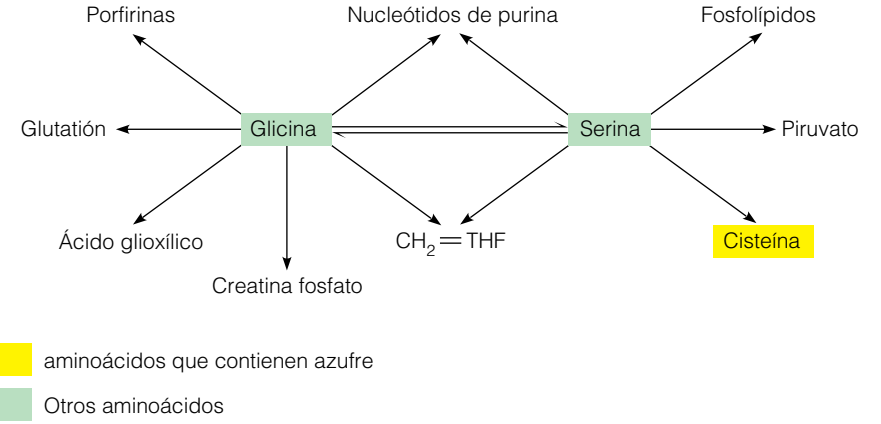
Aunque la serina, la glicina y la treonina no forman un grupo natural, las consideramos juntas debido en parte al grupo hidroxilo compartido por la serina y la treonina y en parte por la estrecha interrelación entre la serina y la glicina a través de la reacción de la serina transhidroximetilasa (véase la página 823). La serina es muy activa metabólicamente y hemos analizado ya su participación en la biosíntesis de los fosfolípidos y la cisteína, así como su contribución de unidades de un carbono activadas al conjunto de coenzimas de tetrahidrofolato. La glicina desempeña también muchas funciones, como las contribuciones al conjunto de unidades de un carbono y como un precursor del glutatión, de los nucleótidos de purina (véase el Capítulo 22) y de las porfirinas. En la Figura 21.24 se resumen los destinos metabólicos de la glicina y la serina. En cambio, la treonina sólo tiene una función importante, además de la de componente de las proteínas: es un precursor de la isoleucina en las plantas y los microorganismos.

La serina interviene en la síntesis de la glicina, los fosfolípidos y la cisteína. La glicina es activa en la biosíntesis de los nucleótidos de purina y de las porfirinas.

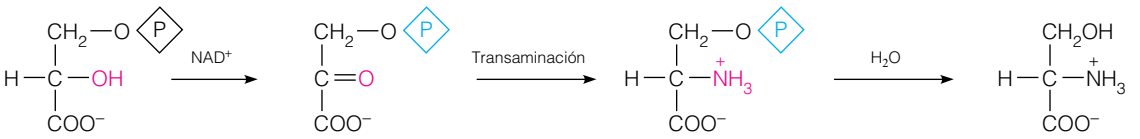
Estos tres aminoácidos se sintetizan y degradan mediante rutas bastante sencillas. La serina puede sintetizarse a partir de la glicina, mediante la reacción de la serina transhidroximetilasa. Sin embargo, es probable que esta reacción se produzca con mayor frecuencia en la dirección contraria, como principal ruta de biosíntesis de la glicina y de los compuestos de un carbono activados. La ma-

La serina y la glicina contribuyen de manera importante a crear la reserva de grupos de un carbono activados, como el 5,10-metilentetrahidrofolato.

FIGURA **21.24**
Interconversiones metabólicas y destinos de la serina y la glicina.

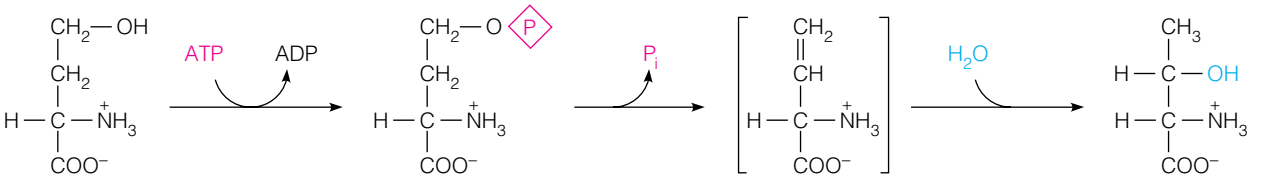


yor parte de la biosíntesis de la serina se produce en una secuencia de tres pasos a partir del intermediario glucolítico 3-fosfoglicerato.



3-Fosfoglicerato **3-Fosfopiruvato** **3-Fosfoserina** **Serina**

La treonina es un aminoácido esencial y su síntesis está limitada a las plantas y a los procariotas. La síntesis de la treonina se inicia con la homoserina, que procede del aspartato (véase la página 837). La homoserina se fosforila, a lo que sigue una reacción dependiente de piridoxal fosfato que elimina el fosfato y rehidrata el doble enlace resultante con la migración del grupo hidroxilo al carbono β.



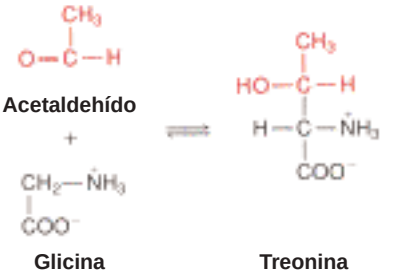
Homoserina ***O*-Fosfohomoserina** **Treonina**

La principal ruta de degradación de la glicina es la del sistema de fragmentación mitocondrial de glicina (véase el Capítulo 20), que produce NH_3, CO_2 y 5,10-metilentetrahidrofolato. Esta reacción es especialmente importante en la fotorrespiración de las plantas (véase el Capítulo 17). El glicolato producido en la fotorrespiración se oxida a glioxilato, que se transamina a glicina. Una molécula de glicina sufre la reacción de rotura de glicina, y el 5,10-metilentetrahidrofolato resultante reacciona con una segunda molécula de glicina, para dar serina. La serina se convierte, a su vez, en 3-fosfoglicerato, que experimenta el ciclo normal de reducción fotosintética del carbono.

La serina se cataboliza mediante su conversión en glicina y mediante la acción de la **serina-treonina deshidratasa.** Esta enzima dependiente de piridoxal fosfato convierte la serina en piruvato y la treonina en α-cetobutirato (Figura 21.25). El α-cetobutirato se convierte en propionil-CoA y CO_2; la propionil-CoA se metaboliza a succinil-CoA por la misma ruta que se utiliza en la oxida-

ción de los ácidos grasos de cadena impar (Capítulo 18) y en el catabolismo de la metionina. En las plantas y los organismos procariotas, el α-cetobutirato tiene también una función de biosíntesis, como primer intermediario en la ruta de biosíntesis de la isoleucina.

Una ruta alternativa del catabolismo de la treonina es la ruptura irreversible a glicina y acetaldehído, catalizada por la **treonina aldolasa.** Aunque esta reacción podría conducir en principio a la biosíntesis de treonina en los animales, el acetaldehído es muy tóxico y no puede acumularse hasta el punto en que pudiera constituir un intermediario biosintético.



Valina, leucina, isoleucina y lisina

La valina, la leucina, la isoleucina y la lisina tienen en común el hecho de que son aminoácidos esenciales para los mamíferos y de que se sintetizan fundamentalmente en las plantas y en las células bacterianas. Además, ninguno de estos aminoácidos desempeña un papel metabólico significativo aparte del de ser un componente de las proteínas y un sustrato de su propia degradación. Las rutas implicadas son complejas y se presentan aquí tan sólo de manera esquemática.

VALINA, LEUCINA E ISOLEUCINA

La valina, la leucina y la isoleucina están relacionadas estructuralmente, y comparten determinadas reacciones y enzimas en sus rutas de biosíntesis (Figura 21.26). Las cuatro últimas reacciones de la biosíntesis de la valina y de la bio-

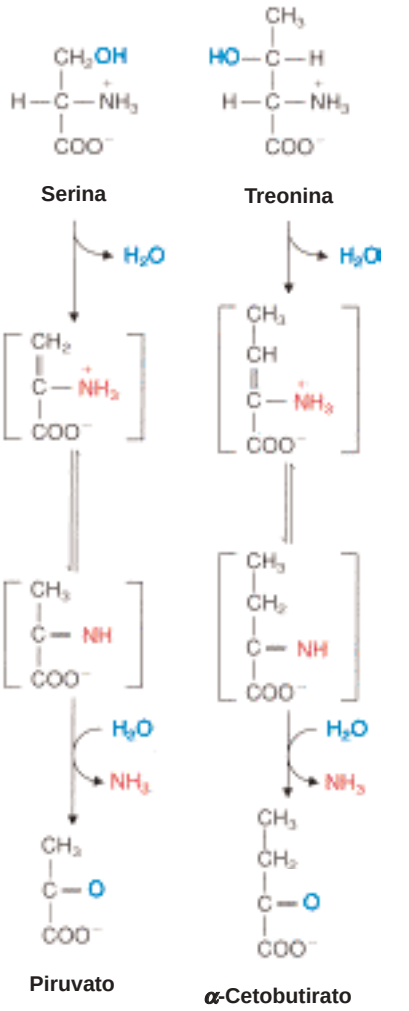


FIGURA **21.25**

Reacciones catalizadas por la serina-treonina deshidratasa.

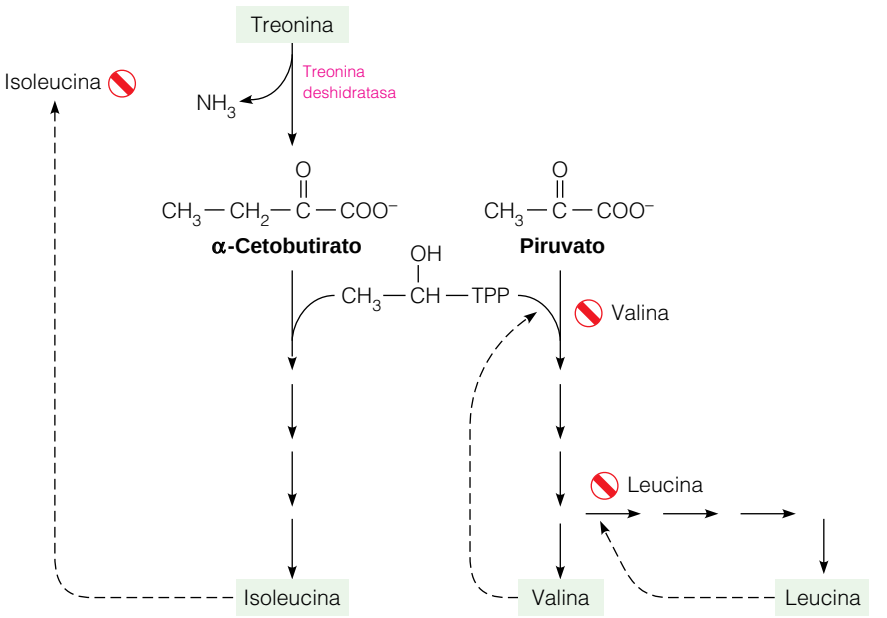
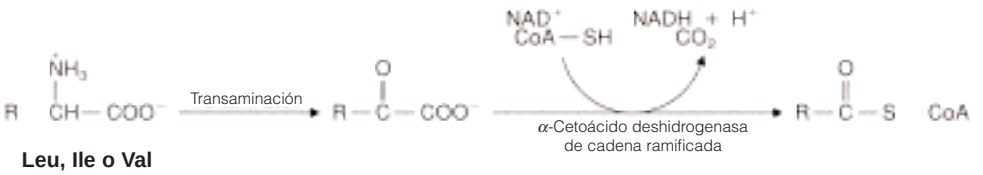


FIGURA **21.26**

Biosíntesis de valina e isoleucina. Tras la reacción de la treonina deshidratasa, un conjunto de enzimas cataliza las reacciones comparables de la síntesis de valina y de isoleucina. En las bacterias, cada producto final regula su propia síntesis mediante la inhibición de una enzima específica.

síntesis de la isoleucina las catalizan las mismas cuatro enzimas. La biosíntesis de valina se inicia con la transferencia de un fragmento de dos carbonos desde el pirofosfato de hidroxietil tiamina al piruvato. Se produce una transferencia similar de una unidad de dos carbonos al α-cetobutirato como paso inicial de la ruta hacia la isoleucina. El cetoácido análogo de la valina es la entrada de una ruta de cuatro pasos que conduce a la leucina. En las bacterias, cada uno de estos tres aminoácidos controla su propia síntesis, mediante retroinhibición de una enzima diferente. De hecho, el concepto de control alostérico se elaboró en gran parte en los estudios sobre la inhibición de la treonina deshidratasa por la isoleucina.

La degradación de la leucina, la isoleucina y la valina en los animales se inicia con una transaminación, seguida de una descarboxilación oxidativa de los cetoácidos respectivos.

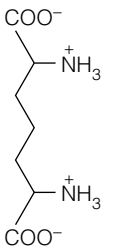


Leu, Ile o Val

Un déficit del complejo α-cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, que metaboliza la valina, la leucina y la isoleucina en el ser humano, crea un déficit mental grave denominado enfermedad de la orina de jarabe de arce.

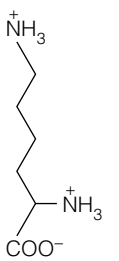
Esta última reacción la lleva a cabo un complejo multienzimático, denominado **complejo α-cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada,** que tiene una estructura y un mecanismo similares a los de los complejos piruvato deshidrogenasa y α-cetoglutarato deshidrogenasa. En un trastorno poco frecuente del ser humano, denominado **enfermedad de la orina de jarabe de arce,** existe un déficit de este complejo. Los tres cetoácidos se acumulan en la orina, y su olor característico da nombre al trastorno. La enfermedad cursa con un retraso mental grave.

El resto de las rutas de degradación son comparables a la oxidación de los ácidos grasos, excepto que los intermediarios deben sufrir una desramificación que no se observa en la β-oxidación.



Diaminopimelato





Lisina

LISINA

El metabolismo de la lisina se diferencia en parte por la complejidad de sus rutas de síntesis y de degradación, y en parte por el hecho de que tenga dos rutas de biosíntesis distintas. La **ruta del ácido diaminopimélico** actúa en las bacterias, algunos hongos inferiores, las algas y las plantas superiores. Esta ruta se inicia con la condensación del piruvato con el β-semialdehído aspártico y finaliza con la descarboxilación del diaminopimelato. El principal intermediario, el diaminopimelato, tiene también una función importante como componente de las paredes celulares bacterianas. La **ruta del ácido α-aminoadípico** está menos extendida, y se da en otros hongos inferiores, en los hongos superiores y en el protista *Euglena.*

Metabolismo de la porfirina y el hemo

BIOSÍNTESIS DE LOS TETRAPIRROLES: RUTA DEL SUCCINATO-GLICINA

Uno de los principales destinos metabólicos de la glicina es su utilización para la biosíntesis de tetrapirrol. *Tetrapirrol* es un término genérico que se aplica a los compuestos que contienen cuatro anillos pirrólicos ligados. Hay cuatro clases de compuestos de este tipo muy extendidos en el terreno biológico: la *ferroporfirina* de amplia distribución, que constituye el hemo; las *clorofilas* de las plantas y las bacterias fotosintéticas; las **ficobilinas** que son pigmentos fotosintéticos de las

algas (Capítulo 17), y las *cobalaminas*, en especial la vitamina B_{12} y sus derivados. Las estructuras de la mayor parte de estos compuestos se han mostrado ya con anterioridad. Todos los tetrapirroles se sintetizan a partir de un precursor común, el **ácido *δ*-aminolevulínico (ALA).** En la Figura 21.27 se muestran las relaciones entre las diversas rutas de síntesis.



Pirrol

Nos centraremos aquí en la bien conocida ruta de síntesis de porfirina, que conduce al hemo. Esta ruta está muy extendida en los tejidos animales y, por lo que sabemos hasta el momento, es similar en todos los organismos que contienen hemoproteínas, como los citocromos. Intervienen en ella siete reacciones, y se produce en dos compartimientos celulares diferentes. La primera reacción tiene lugar en las mitocondrias, seguida de tres reacciones en el citosol y, finalmente, otras tres reacciones mitocondriales más. Como veremos, esta compartimentación hace posible un mecanismo de control original de la ruta.

Los estudios iniciales de marcaje en animales indicaron que *todo el nitrógeno del hemo procede de la glicina y todo el carbono procede del succinato y la glicina.* Así pues, esta síntesis se denomina a menudo **ruta del succinato-glicina.** La primera reacción está catalizada por una enzima dependiente de piridoxal fosfato, la **ácido *δ*-aminolevulínico sintetasa,** o ALA sintetasa. Como se muestra en la Figura 21.28, la unión de la glicina al piridoxal fosfato probablemente activa el carbono α de la glicina para un ataque sobre el carbono tioéster de la succinil-CoA. Se produce una descarboxilación, que da lugar al producto ALA.

La ácido *δ*-aminolevulínico sintetasa reúne la succinil-CoA y la glicina, que aportan todo el carbono y el nitrógeno de las porfirinas, las cobalaminas, las ficobilinas y las clorofilas.

En las plantas, el ALA se forma mediante una ruta completamente diferente, una secuencia de tres pasos que se inicia con el glutamato (Figura 21.29). La primera reacción de esta ruta nueva une el glutamato, a través de su grupo carboxilo, a un RNA de transferencia específico, igual que ocurre en la síntesis de proteínas. El grupo carboxilo activado de esta forma se reduce entonces por el NADPH, dando 1-semialdehído glutámico, que finalmente sufre una transaminación interna para dar ALA. Dado que el principal producto final de la ruta en las plantas es la clorofila, la síntesis de ALA se regula por la luz. La identidad de los pasos específicos regulados por la luz está siendo objeto actualmente de una intensa investigación.

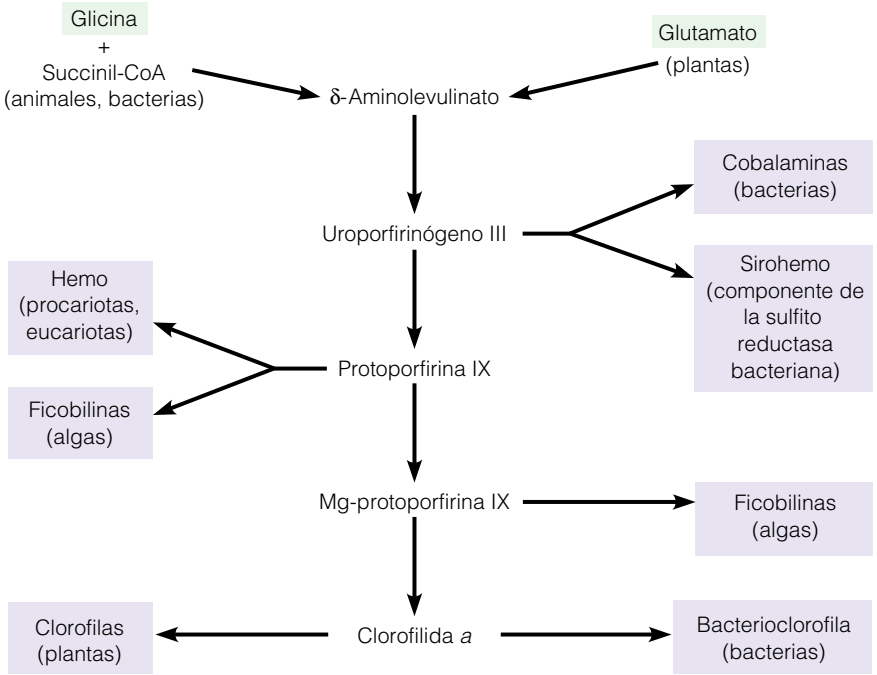


FIGURA **21.27**

Rutas de biosíntesis a los tetrapirroles. Los tetrapirroles comprenden el hemo, las clorofilas, las ficobilinas y las cobalaminas. Todos se sintetizan a partir del ácido *δ*-aminolevulínico, que se forma de manera diferente en las plantas, en comparación con la manera en que se forma en las células bacterianas y los animales.

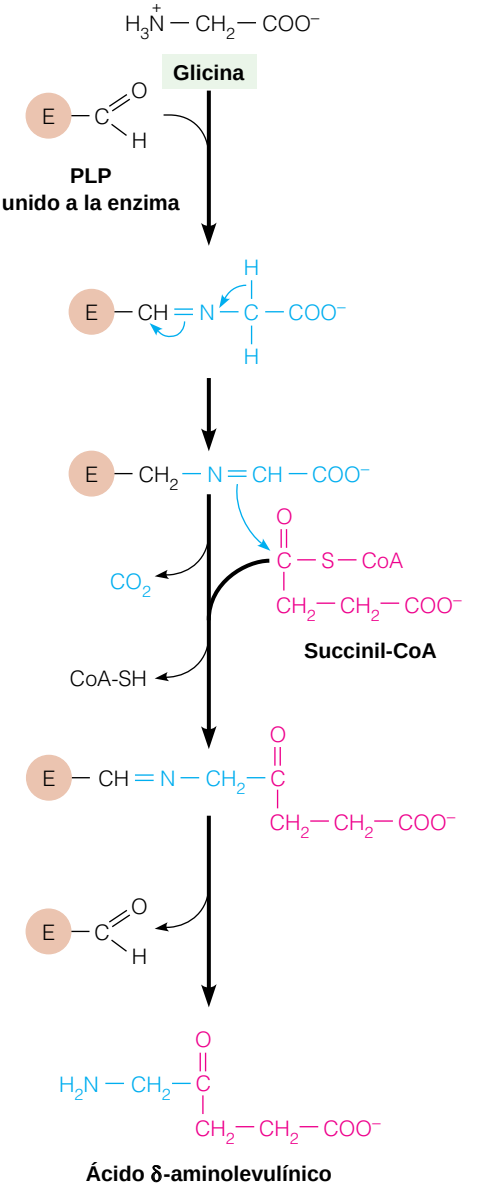


FIGURA **21.28**

Reacción de la ácido δ-aminolevulínico sintetasa. E-CHO es el complejo enzima-piridoxal fosfato.

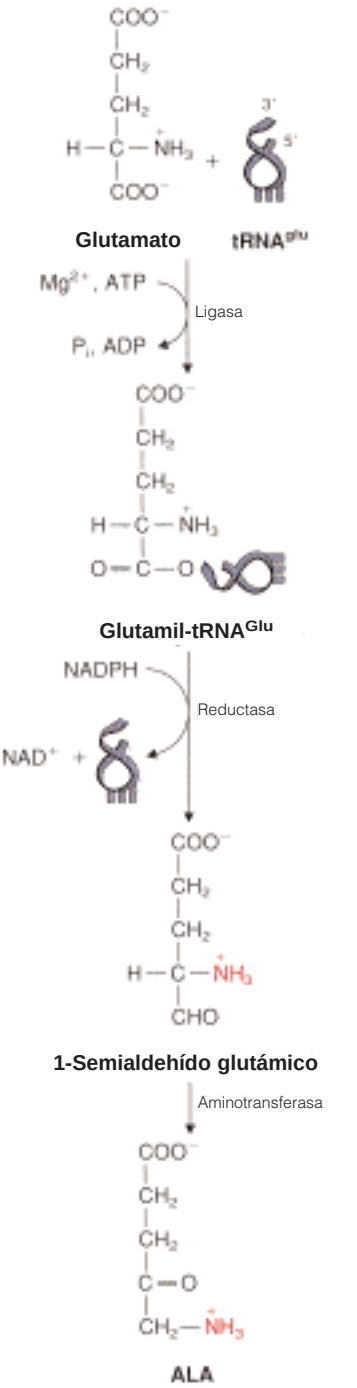


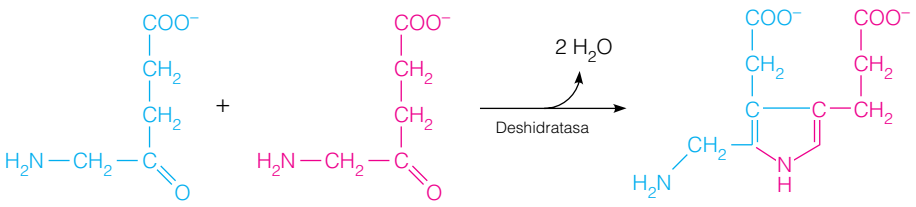
FIGURA **21.29**

Síntesis del ácido δ-aminolevulínico en las plantas.

La biosíntesis de las porfirinas implica: (1) la formación de un anillo pirrólico, (2) la condensación de cuatro grupos pirrólicos para dar un tetrapirrol cíclico, y (3) las modificaciones de la cadena lateral y las oxidaciones del anillo.

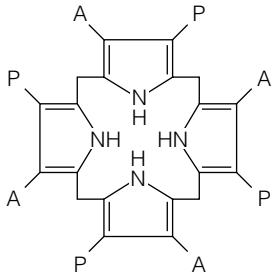
Tanto en las plantas como en los animales y los microorganismos el resto de la ruta de síntesis de la porfirina incluye tres procesos diferenciados: (1) síntesis de un compuesto pirrólico sustituido, el **porfobilinógeno,** a partir del ALA; (2) condensación de cuatro moléculas de porfobilinógeno para producir un precursor parcialmente reducido denominado **porfirinógeno;** y (3) modificación de las cadenas laterales, deshidrogenación del sistema de anillo e introducción de hierro, para dar la porfirina producto, el hemo. En la primera etapa, se con-

densan en el citosol dos moléculas de ALA para formar una molécula de porfobilinógeno. La reacción está catalizada por la **ALA deshidratasa:**



***δ*-ALA** ***δ*-ALA** **Porfobilinógeno**

A continuación, se combinan cuatro moléculas de porfobilinógeno en una reacción de desaminación que requiere PLP, para dar el primer compuesto tetrapirrólico, el **uroporfirinógeno III** (Figura 21.30; obsérvense las abreviaturas de las cadenas laterales utilizadas en esta figura). Intervienen en esta reacción dos proteínas diferentes: la **uroporfirinógeno I sintasa** y la **uroporfirinógeno III cosintasa.** La primera de estas proteínas es enzimáticamente activa por sí misma, pero cuando actúa sola, el producto es el compuesto simétrico, no deseado, **uroporfirinógeno I.** La interacción entre la sintasa y la cosintasa permite que uno de los anillos gire durante la reacción de combinación, de manera que el producto es el uroporfirinógeno III asimétrico. El compuesto simétrico y algunos metabolitos derivados del mismo se sintetizan como productos secundarios no funcionales, en cantidades bajas.



Uroporfirinógeno I

El uroporfirinógeno III experimenta una descarboxilación de sus cadenas laterales de ácido acético. A continuación, el producto vuelve a entrar en la mitocondria donde sufre nuevas modificaciones: en primer lugar, modificaciones de la cadena lateral, luego la oxidación del anillo para producir un sistema totalmente conjugado, y finalmente la inserción del hierro. La última reacción puede producirse de manera espontánea, pero está catalizada por la **ferroquelatasa,** una enzima de la membrana mitocondrial interna que requiere también un agente reductor. En esta fase, el hemo completado se combina con polipéptidos para dar las hemoproteínas completas, como la mioglobina y la hemoglobina en los vertebrados, y los citocromos y otras hemoproteínas en todos los organismos aerobios.

En un trastorno hereditario denominado **porfiria eritropoyética congénita,** es defectuosa la uroporfirinógeno III cosintasa y se acumulan las porfirinas de tipo I simétricas (y metabólicamente inútiles) en una cantidad superior a la capacidad de excreción del organismo. Su acumulación hace que la orina adquiera un color rojo, la piel pase a ser muy fotosensible y los dientes se hagan fluorescentes, todo ello como consecuencia del depósito de las porfirinas que absorben intensamente la luz. Además, los eritrocitos se destruyen de forma prematura y se sintetiza una cantidad insuficiente de hemo, lo que hace que las personas afectadas presenten una anemia considerable. Se ha especulado que las personas consideradas vampiros en las leyendas medievales sufrieran este trastorno, lo que explicaría su preferencia por la oscuridad, su aspecto extraño y su tendencia a beber sangre. De hecho, las personas con una porfiria eritropoyética congénita pueden tratarse con inyecciones de hemo.

Las porfirias se caracterizan por una acumulación anormal de precursores del hemo, ya sea por sobreproducción de las porfirinas de tipo I no naturales, ya sea por un flujo anormalmente elevado a través de la *δ*-ALA sintetasa.

Muy distinta de la enfermedad anterior es la **porfiria intermitente aguda,** que se debe a un déficit de uroporfirinógeno I sintasa. Este déficit hace que se acumulen en el hígado el ALA y el porfobilinógeno. El trastorno se acompaña de episodios de dolor abdominal agudo y alteraciones neurológicas. Existen pruebas de que el rey Jorge III de Inglaterra padecía esta enfermedad. Estas pruebas se pusieron en conocimiento del público en la obra de teatro de éxito y la película *La*

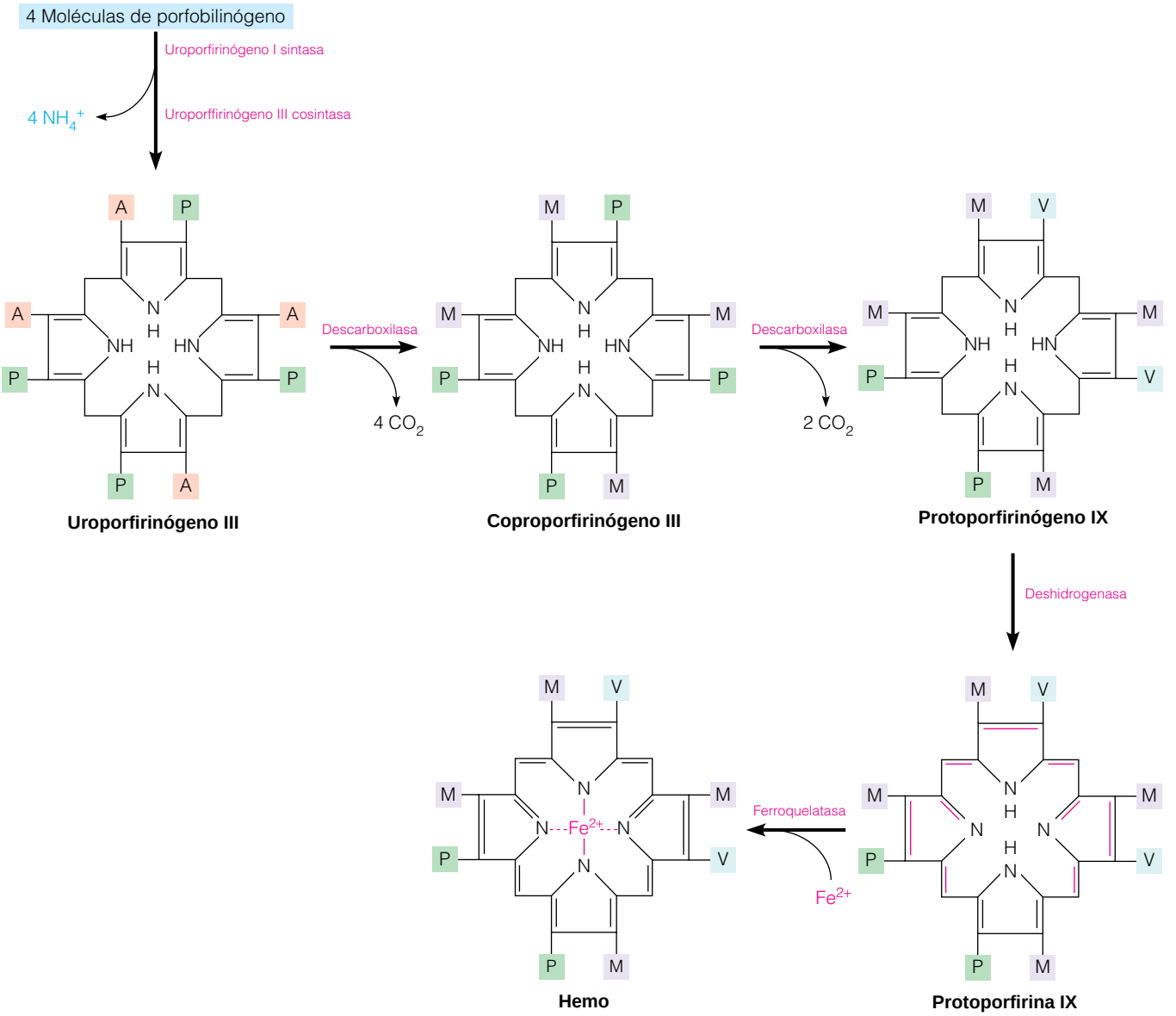


FIGURA **21.30**

Biosíntesis del hemo a partir del porfobilinógeno. Las abreviaturas de letras indican las cadenas laterales: P (ácido propiónico), $—CH_2—CH_2—COO^-$; A (ácido acético), $—CH_2—COO^-$; V (vinilo), $—CH=CH_2$; M (metilo), $—CH_3$.

locura del rey Jorge. Los síntomas de las porfirias pueden también adquirirse, la forma más notable, por envenenamiento con plomo. La estructura cristalina de la ALA deshidratasa muestra que el plomo puede desplazar al zinc, el cofactor metálico natural, e inhibir la enzima, dando lugar a una gran acumulación de ALA.

Al ser el primer paso dirigido específicamente a la síntesis del hemo, la reacción de la ALA sintetasa (Figura 21.28) constituye el principal punto de control. El hemo y los compuestos relacionados inhiben la enzima mediante retroacción. El hemo tiene también otros dos efectos importantes. A concentraciones bajas el hemo inhibe la *síntesis* de la ALA sintetasa a nivel de la traducción. A concentraciones más elevadas, el hemo bloquea de algún modo la *translocación* de la ALA sintetasa desde el citosol, en donde se sintetiza en los ribosomas, a las mitocondrias, en donde actúa. El hemo inhibe también la reacción de la ferroquelatasa (Figura 21.30). Diversos fármacos y productos tóxicos producen una síntesis excesiva de hemo. En algunos casos, este efecto se debe a la estimulación de la síntesis del citocromo P450, que aumenta la demanda de hemo y activa, por tanto, la ALA sintetasa.

La biosíntesis de tetrapirrol está siendo aprovechada como objetivo para la acción de los herbicidas. La idea consiste en nebulizar las hierbas en la oscuridad con ALA. La ruta hacia la clorofila se inicia y, cuando llega la luz, la ruta se ha completado, y se produce clorofila en cantidades tan masivas que la planta se debilita y muere.

DEGRADACIÓN DEL HEMO EN LOS ANIMALES

El compuesto porfirínico más abundante en los vertebrados es, con mucho el hemo de la hemoglobina. En consecuencia, la degradación de la porfirina es en gran parte la degradación de la hemoglobina y del hemo. Al carecer de núcleo, los eritrocitos de los mamíferos no son capaces de renovarse y se autodestruyen tras intervalos característicos. En el ser humano, la semivida del eritrocito es de 120 días. Los eritrocitos envejecidos se destruyen a su paso por el bazo o el hígado (Figura 21.31).

Los aminoácidos liberados de la porción globina de la molécula de hemoglobina se catabolizan o reutilizan para la síntesis proteica. La porción hemo sufre una degradación, que se inicia con una reacción de oxidasa de función mixta que abre el anillo y convierte uno de los carbonos del puente de meteno en monóxido de carbono. Se libera hierro del tetrapirrol lineal resultante, denominado **biliverdina,** y se transporta a las reservas de almacenamiento en la médula ósea para utilizarse de nuevo en la producción de eritrocitos. A continuación, el tetrapirrol se reduce a **bilirrubina,** que se excreta. La bilirrubina es bastante insoluble, y en su eliminación intervienen varios sistemas orgánicos. En primer lugar forma complejos con la albúmina sérica para transportarse al hígado. Allí, la bilirrubina se solubiliza mediante la conjugación con dos moléculas de **ácido glucurónico.** La reacción es comparable a otras reacciones de glucosiltransferasa que hemos encontrado (véase el Capítulo 16) y su sustrato es el **UDP-glucuronato.** Este compuesto solubilizado, el **diglucurónido de bilirrubina,** se segrega a la bilis y se excreta finalmente a través del intestino.

La degradación de las hemoproteínas en los animales libera aminoácidos y hierro, que se reutilizan, y bilirrubina, que debe solubilizarse para su excreción.

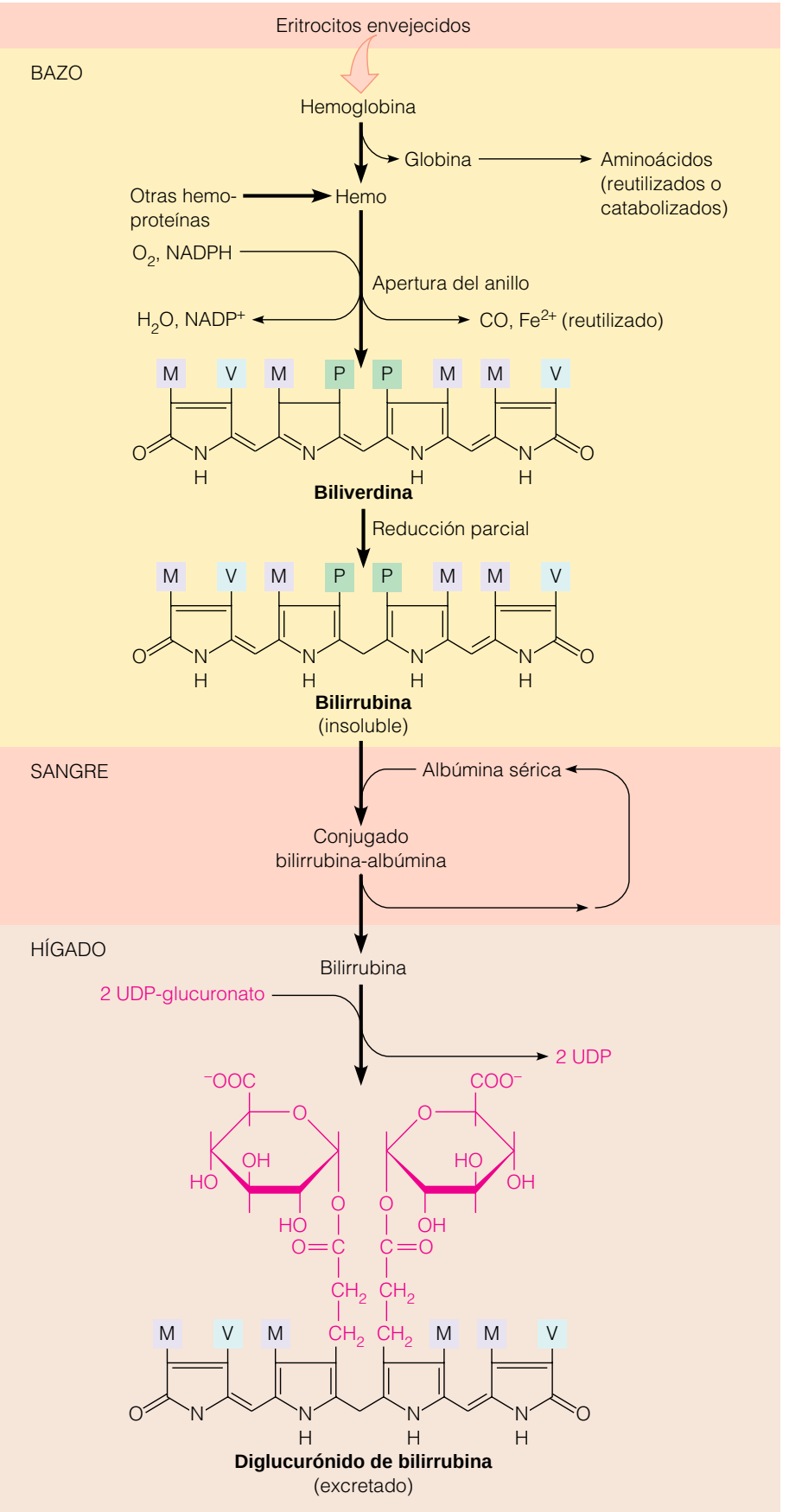
Dado que en la degradación del hemo participan varios sistemas orgánicos, existen muy diversas posibilidades de que falle alguna parte del proceso. Cuando el catabolismo del hemo es defectuoso, se acumula la bilirrubina en la sangre. Este defecto se detecta en primer lugar por la aparición del color amarillento característico que confiere la bilirrubina a la piel y a las conjuntivas de los ojos. Este hecho, denominado **ictericia,** se observa por ejemplo en las enfermedades hepáticas agudas o crónicas, en las que está alterado el sistema de conjugación con glucuronato y la síntesis de albúmina puede ser deficiente; en la obstrucción de la vía biliar (por ejemplo, por cálculos biliares), cuando el diglucurónido de bilirrubina no puede segregarse al intestino; en las reacciones de incompatibilidad de Rh de los recién nacidos, en las que los eritrocitos se destruyen por el sistema inmunitario con una rapidez superior a la rapidez con que puede catabolizarse el hemo; o en los recién nacidos prematuros, cuando el sistema de conjugación de la bilirrubina no está totalmente desarrollado. A los recién nacidos ictéricos se les coloca con frecuencia bajo una luz fluorescente intensa, que hace que se reordene la estructura de la bilirrubina circulante a productos más solubles.

Los aminoácidos y sus metabolitos como neurotransmisores y reguladores biológicos

Muchos aminoácidos y sus metabolitos participan en los procesos de transducción de señal, en el control hormonal y en la transmisión sináptica de los impulsos nerviosos. Como se presentó en el Capítulo 12 y se considerará poste-

FIGURA **21.31**

Catabolismo del hemo. La mayor parte del hemo procede de la degradación de los eritrocitos envejecidos, pero una parte procede de los citocromos y otras hemoproteínas. Las designaciones de las cadenas laterales son como las de la Figura 21.30.



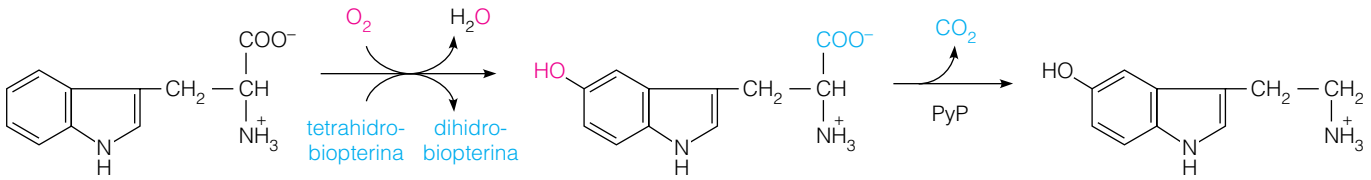
riormente en el Capítulo 23, estas dos funciones son comparables en el sentido de que una sustancia de bajo peso molecular liberada por una célula se desplaza hasta una célula diana, en donde interacciona con receptores específicos de la membrana de la célula diana. La diferencia radica en que la neurotransmisión comporta el movimiento a través de una sinapsis, entre dos células adyacentes, mientras que la transmisión hormonal se produce a distancia, de tal manera que el mensajero hormonal se transporta por el torrente sanguíneo hasta la célula efectora. La semejanza de estos dos procesos de transducción de señal se pone de relieve por la participación de compuestos como la adrenalina y la histamina en ambos procesos.

Entre los aminoácidos que actúan directamente como neurotransmisores están la glicina y el glutamato. Como se ha indicado antes, el GABA, que es el producto de descarboxilación del glutamato, es también un neurotransmisor. Varios metabolitos de los aminoácidos aromáticos actúan también en la neurotransmisión. Se trata de la histamina, que deriva de la histidina; la **serotonina** (5-hidroxitriptamina), que deriva del triptófano, y las **catecolaminas,** adrenalina, **dopamina** y **noradrenalina,** que derivan de la tirosina. Describiremos ahora las rutas de biosíntesis de estos compuestos y consideraremos luego su intervención en la neurotransmisión.

El glutamato, la tirosina, la glicina y el triptófano actúan como neurotransmisores o como precursores de neurotransmisores.

BIOSÍNTESIS DE LA SEROTONINA Y LAS CATECOLAMINAS

La ruta hacia la serotonina se inicia con la hidroxilación del triptófano por una enzima dependiente de la tetrahidrobiopterina, similar a la fenilalanina hidroxilasa. Esta reacción va seguida de una descarboxilación para producir serotonina.



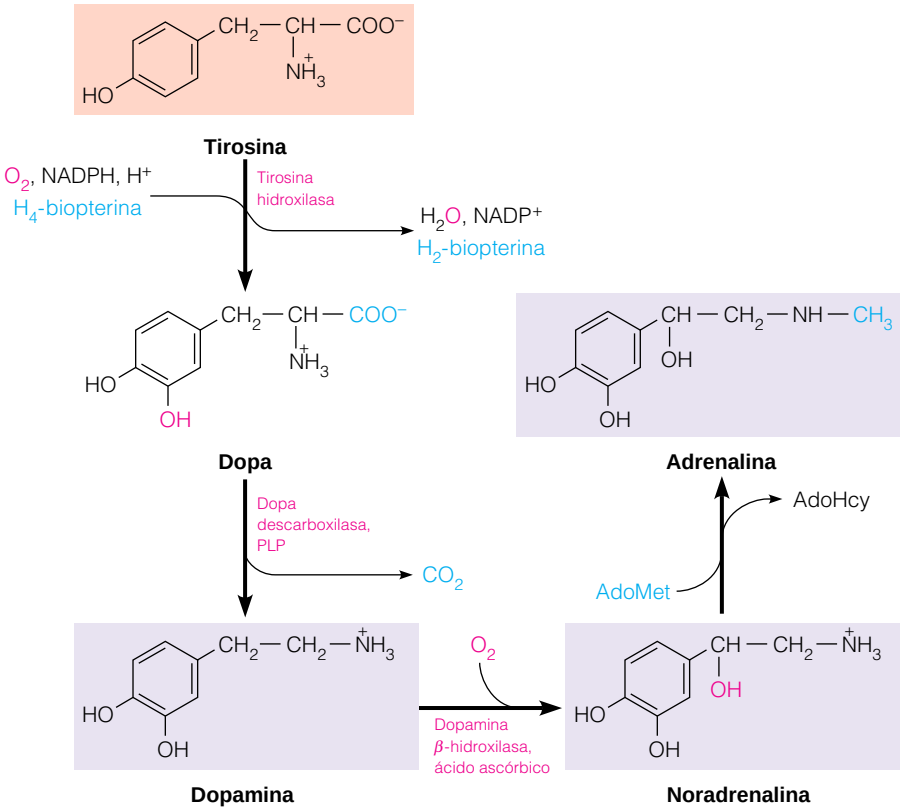
Triptófano **Serotonina**

La serotonina desempeña múltiples funciones reguladoras en el sistema nervioso, entre las que se encuentra la neurotransmisión. Se produce en la glándula pineal, en donde actúa como precursor de la **melatonina** (*O*-metil-*N*-acetilserotonina). Se sabe que la pineal regula los ciclos de luz-oscuridad en los animales, y las concentraciones de serotonina y melatonina experimentan variaciones cíclicas en fase con estos ciclos. Así pues, aunque las acciones relacionadas con el ciclo de estos compuestos no se conocen aún, parece que la serotonina y la melatonina pueden actuar como reguladores del sueño y la vigilia. Muchos pasajeros de vuelos de larga distancia ingieren píldoras de melatonina para evitar el "jet lag" volviendo a colocar en hora sus relojes biológicos. La serotonina se segrega también por las células del intestino delgado, en donde regula el peristaltismo intestinal. Por último, la serotonina es un potente vasoconstrictor, que ayuda a regular la presión sanguínea. Varios tratamientos para la obesidad actúan aumentando las concentraciones de serotonina, creando de esta manera una sensación de saciedad, o de bienestar con respecto a la comida.

Como se indica en la Figura 21.32, la ruta hacia las catecolaminas es similar, y se inicia con una hidroxilación (de la tirosina) dependiente de la tetrahidrobiopterina, seguida por una descarboxilación. El producto de hidroxilación es la dopa, que se forma mediante un mecanismo muy diferente en la síntesis de me-

La tirosina se hidroxila a dopa por dos mecanismos distintos en la síntesis de las catecolaminas y las melaninas.

FIGURA **21.32**
Biosíntesis de las catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina) a partir de tirosina.



Las reacciones de descarboxilación del triptófano, la dopa y la histidina conducen a una serie de reguladores biológicos potentes.

lanina (véase la página 860). Sin embargo, esta última ruta está localizada en los melanocitos, mientras que la mayor parte de la síntesis de las catecolaminas se produce en la médula suprarrenal y en el sistema nervioso central.

Una vez formada, la dopa se descarboxila para dar dopamina. La dopamina actúa a su vez como sustrato de una monooxigenasa que contiene cobre, la **dopamina β-hidroxilasa,** dando noradrenalina, que se metila a su vez por la *S*-adenosilmetionina para dar adrenalina. Aunque la dopamina y la noradrenalina son intermediarios en la síntesis de adrenalina, cada una de ellas es de por sí un neurotransmisor, como se considera en el apartado siguiente.

BIOQUÍMICA DE LA NEUROTRANSMISIÓN

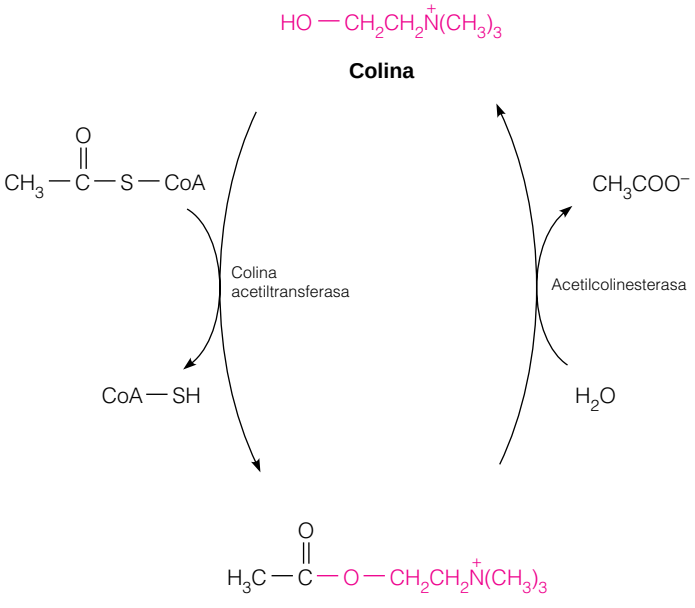
En el Capítulo 10 señalamos que la transmisión de los impulsos nerviosos tiene dos componentes diferentes: (1) la transmisión de un potencial de acción dentro de una neurona, mediante la polarización y despolarización continua de la membrana, y (2) la transmisión del impulso, a través de una unión sináptica, de una neurona a otra neurona o a una célula muscular o glandular. La transmisión dentro de una neurona se describió en el Capítulo 10. Aquí presentamos la transmisión de una célula a otra.

La sinapsis colinérgica

La neurotransmisión comporta generalmente la liberación de un mensajero químico, el **neurotransmisor,** desde la célula presináptica, y su unión a receptores de la célula postsináptica (nervio, músculo o glándula). Las sinapsis que utilizan como neurotransmisor la **acetilcolina** (**sinapsis colinérgicas**) son las que se conocen mejor. Recuérdese del Capítulo 19 que la colina se sintetiza principalmente como parte de la fosfatidilcolina, y que los carbonos de la colina proceden en última instancia de la serina.

En la Figura 21.33 se muestra una sinapsis colinérgica. El **bulbo terminal** (también denominado **nudo sináptico**) del **axón presináptico** está separado de la **dendrita postsináptica** por una **hendidura sináptica** de unos 20 nm de amplitud. El impulso nervioso (potencial de acción) desciende por el axón presináptico hasta el bulbo terminal; el cambio del potencial de membrana en el bulbo produce la apertura de los canales de calcio con apertura de voltaje, que permite el paso de iones Ca^{2+} desde la hendidura sináptica al bulbo axónico (Figura 21.33a). En el interior del bulbo se encuentran las **vesículas sinápticas,** cada una de las cuales contiene aproximadamente 10^3 a 10^4 moléculas de acetilcolina. El aumento de la concentración de Ca^{2+} hace que estas vesículas se fusionen con la membrana axónica y se abran, vertiendo su contenido a la hendidura sináptica (Figura 21.33b). La membrana postsináptica de la dendrita receptora tiene receptores de acetilcolina específicos, hacia los que difunde el neurotransmisor (Figura 21.33c). La unión de la acetilcolina desencadena la apertura de los canales iónicos de la membrana postsináptica (Figura 21.33d), iniciando un potencial de acción que puede pasar al axón siguiente (Figura 21.33e). Este último proceso comporta una onda de cambios de permeabilidad que causa la entrada de sodio y la salida de potasio. Los receptores que se muestran se denominan **receptores de acetilcolina nicotínicos,** ya que pueden unir el alcaloide **nicotina;** comentaremos en breve su relación con los canales iónicos. El otro tipo importante de receptor de acetilcolina se denomina *receptor de acetilcolina muscarínico*, que interviene en diferentes sinapsis (véase la página 882).

La neurotransmisión implica la liberación de calcio en la terminación nerviosa presináptica, la fusión de la membrana de las vesículas, la liberación del neurotransmisor, y la unión de éste a los receptores en la membrana celular postsináptica.

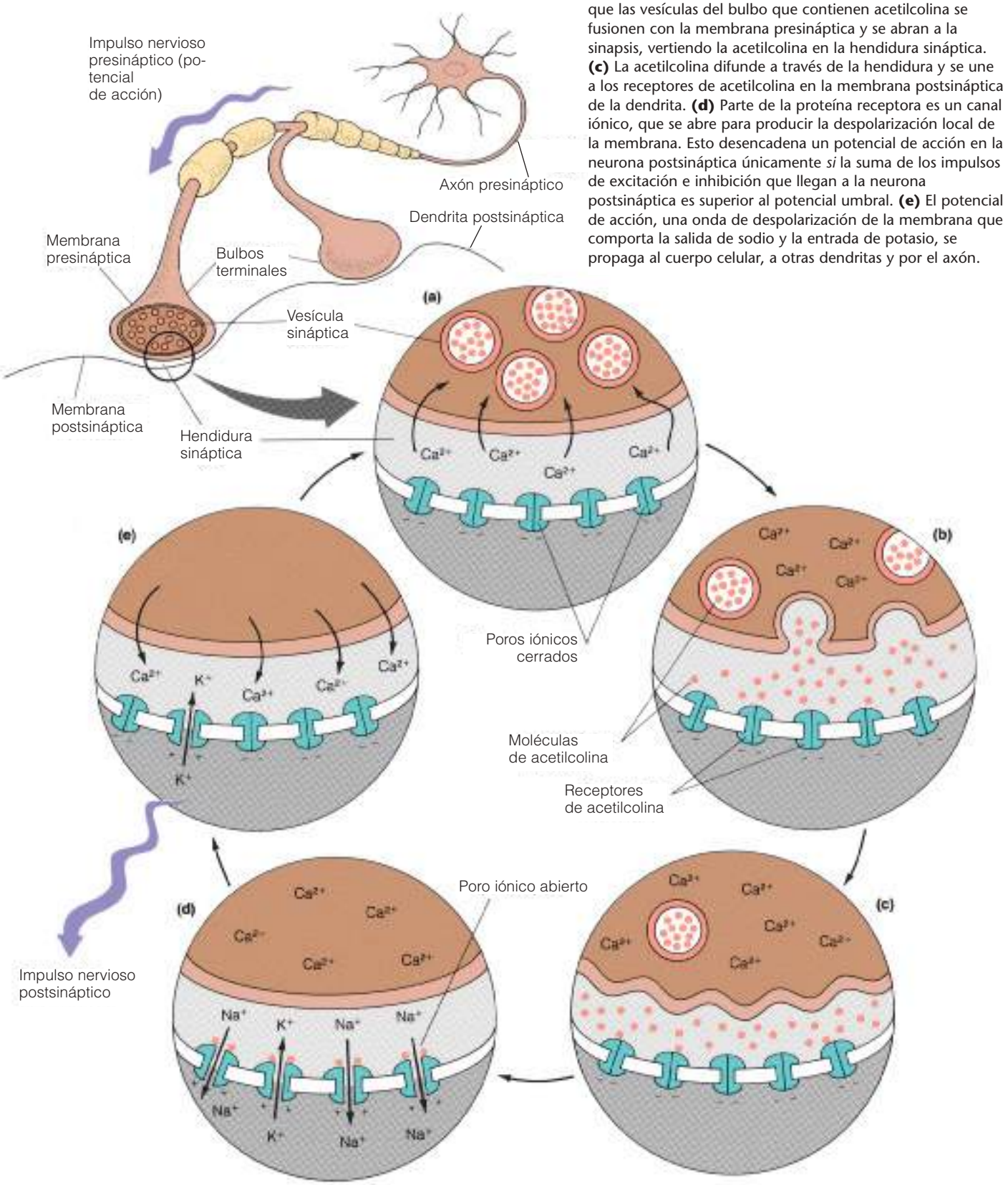


La acetilcolina se sintetiza a partir de colina y acetil-CoA, por la acción de la **colina acetiltransferasa,** en los bulbos terminales axónicos. Una vez liberado de las vesículas y unido a los receptores, el neurotransmisor se hidroliza rápidamente por una enzima que se encuentra en la hendidura sináptica, la **acetilcolinesterasa,** para producir colina, que se une mal a los receptores de acetilcolina. La degradación de la acetilcolina restablece el potencial de reposo en la membrana postsináptica.

Para preparar a la sinapsis para otro impulso (que debe producirse aproximadamente 1000 veces por segundo), las vesículas sinápticas vacías, que se devuelven al bulbo terminal axónico mediante endocitosis, deben rellenarse de

FIGURA **21.33**

Transmisión de un impulso nervioso a través de una sinapsis colinérgica. **(a)** El movimiento del potencial de acción entrante dentro del bulbo del axón presináptico abre los canales de Ca^{2+} de la membrana, lo que permite la entrada de Ca^{2+} en el bulbo. **(b)** El aumento de Ca^{2+} hace que las vesículas del bulbo que contienen acetilcolina se fusionen con la membrana presináptica y se abran a la sinapsis, vertiendo la acetilcolina en la hendidura sináptica. **(c)** La acetilcolina difunde a través de la hendidura y se une a los receptores de acetilcolina en la membrana postsináptica de la dendrita. **(d)** Parte de la proteína receptora es un canal iónico, que se abre para producir la despolarización local de la membrana. Esto desencadena un potencial de acción en la neurona postsináptica únicamente *si* la suma de los impulsos de excitación e inhibición que llegan a la neurona postsináptica es superior al potencial umbral. **(e)** El potencial de acción, una onda de despolarización de la membrana que comporta la salida de sodio y la entrada de potasio, se propaga al cuerpo celular, a otras dendritas y por el axón.



acetilcolina. Esta tarea se realiza mediante una proteína **transportadora de acetilcolina,** que se encarga de llevar acetilcolina recién sintetizada a las vesículas, intercambiándola por protones. Los protones se bombean al interior de las vesículas por una **ATPasa vacuolar.** A medida que los protones vuelven al citosol desde las vesículas, la acetilcolina se transporta en sentido contrario. En la sinapsis neurona-neurona se producen los mismos acontecimientos.

El Receptor de acetilcolina nicotínico

Vistos directamente desde la superficie, los receptores de acetilcolina nicotínicos aparecen al microscopio electrónico como unas estructuras en forma de rosquilla que se extienden por toda la membrana y que contienen un poro central (Figura 21.34). El aislamiento de los receptores mediante cromatografía de afinidad demostró que eran pentámeros formados por cuatro clases de subunidades glucoproteicas (masas moleculares de 54, 56, 58 y 60 kilodalton, en una proporción molar de 2:1:1:1). La reconstitución de los receptores en vesículas lipídicas proporciona un sistema que puede conducir iones cuando se estimula por la acetilcolina. Parece, pues, que el receptor y el canal iónico sean una sola unidad. Es probable que el poro central actúe como una puerta del canal iónico. Se han clonado ya los genes de muchos de los componentes del sistema sináptico, entre los que están la colina acetiltransferasa, la acetilcolinesterasa y los componentes de los receptores nicotínicos.

Aunque es característico que las membranas postsinápticas contengan receptores agrupados densamente (del orden de 20 000 por micrómetro cuadrado), estas regiones constituyen tan sólo una pequeña parte de la superficie celular en un tejido nervioso característico. En consecuencia, los bioquímicos

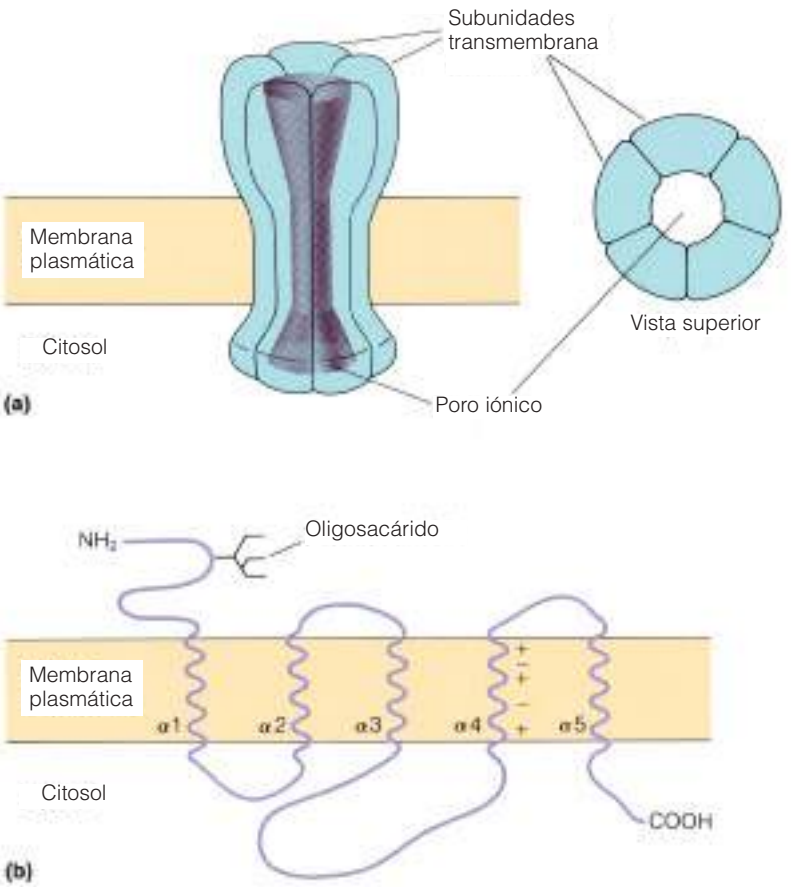
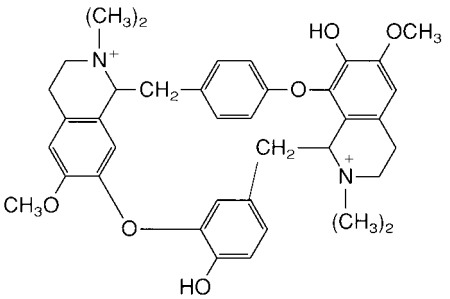


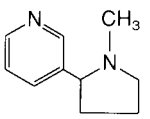
FIGURA **21.34**

Receptor de acetilcolina nicotínico. **(a)** Modelo esquemático del receptor. Cinco subunidades se combinan para formar una estructura transmembrana con un poro iónico en el centro. **(b)** Estructura de una subunidad individual. Existen cuatro tipos diferentes de subunidades, pero sus secuencias son similares, y cada una de las subunidades tiene el tipo de estructura que se representa aquí. Cinco hélices α (α1 a α5) de cada subunidad atraviesan la membrana. Los residuos cargados de la hélice α4, que tienden a estar sobre una superficie, recubren probablemente la pared del poro.

recurren a menudo a tejidos más especializados para el estudio de los procesos sinápticos y su bioquímica. Son objetos experimentales favoritos para estos estudios los órganos eléctricos de la raya (*Torpedo*) y de la anguila eléctrica (*Electrophorus*). Estos órganos contienen pilas de células denominadas **electroplacas,** que poseen una densidad elevada ($10^5/\mu m^2$) de receptores de acetilcolina nicotínicos que se extienden sobre la totalidad de una cara de la célula. La despolarización de la membrana en esta cara, mientras la otra se mantiene en el potencial de reposo, proporciona una $\Delta\psi$ de 130 mV a través de la célula. Con la presencia de miles de células apiladas en serie, se generan potenciales de varios centenares de voltios.



Tubocurarina, un antagonista



Nicotina, un agonista

Inhibición de la transmisión sináptica colinérgica

La acetilcolinesterasa es una serina esterasa y, por consiguiente, puede inhibirse de manera irreversible por los reactivos que reaccionan con la serina del lugar activo, como el diisopropil fluorofosfato, la sarina, la fisostigmina y el paratión (véase la Tabla 11.4). Como cabría prever, los inhibidores de la acetilcolinesterasa son sustancias extremadamente tóxicas, que causan parálisis. Otra clase de toxinas actúan sobre el propio receptor de acetilcolina, bloqueándolo (*d*-tubocurarina, procedente del curare, y las pequeñas proteínas tóxicas de algunos venenos de serpiente, como la toxina de la cobra) o bloqueando los canales iónicos en una posición abierta (nicotina). Los del primer tipo se denominan **antagonistas** y los del segundo **agonistas.** Estos compuestos son útiles, tanto como herramientas de investigación y, con el debido cuidado, como fármacos (relajantes musculares).

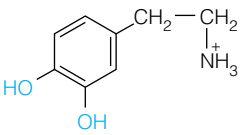
Catecolaminas y neuronas adrenérgicas

Nos hemos centrado en la sinapsis colinérgica porque es la que en la actualidad se conoce mejor. Pero hay otras muchas sustancias que se sabe o se sospecha que son neurotransmisores, y que ejercen su acción en distintos tipos de sinapsis. Entre ellas se encuentran las catecolaminas, dopamina, noradrenalina y adrenalina. Dado que la adrenalina es también una hormona suprarrenal, las sinapsis que utilizan catecolaminas se denominan **adrenérgicas.**

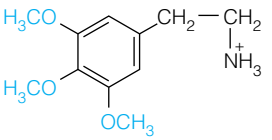
La importancia de la dopamina en la transmisión nerviosa se pone de manifiesto por el número de enfermedades neurológicas importantes que se asocian con una regulación inadecuada de dopamina. El primer indicio de este tipo de defecto fue el hallazgo de que las concentraciones de dopamina son anormalmente bajas en una determinada región del cerebro de los pacientes con **parkinsonismo,** un trastorno neurológico grave. Los intentos de tratar a estos pacientes con dopamina fueron inútiles, ya que esta sustancia, tras inyectarse, no atraviesa la **barrera hematoencefálica,** un bloqueo de permeabilidad selectiva que impide la captación de determinadas sustancias por el cerebro. Sin embargo, el precursor de la dopamina, la dopa, sí atraviesa la barrera hematoencefálica. En muchas personas con parkinsonismo, la administración diaria de dopa ha producido una mejoría clínica extraordinaria.

Existen pruebas circunstanciales que ligan el metabolismo de la dopamina con la esquizofrenia, que puede resultar en parte de un exceso de descarga de las **neuronas dopaminérgicas** (neuronas que segregan dopamina). Parte de las pruebas circunstanciales se refieren a la estrecha relación estructural que existe entre la dopamina (véase la Figura 21.32) y la **mescalina,** un producto del cactus peyote que induce un estado casi esquizofrénico. La **anfetamina** es otro análogo de las catecolaminas con propiedades psicofarmacológicas potentes. Otra prueba circunstancial es que los fármacos más útiles para el tratamiento de la esquizofrenia, en especial la **clorpromazina,** son antagonistas de la dopami-

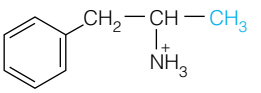
na, que bloquean la unión de dopamina a sus receptores. En los últimos años, se han clonado los genes de cuatro receptores de dopamina diferentes, y ha habido un gran interés por determinar si alguno de estos cuatro receptores tiene un funcionamiento anormal en la esquizofrenia.



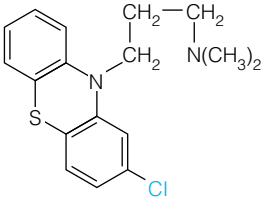
Dopamina



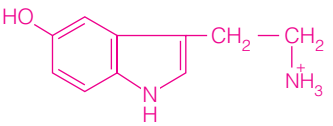
Mescalina



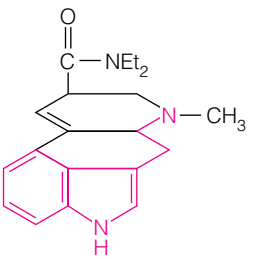
Anfetamina



Clorpromazina

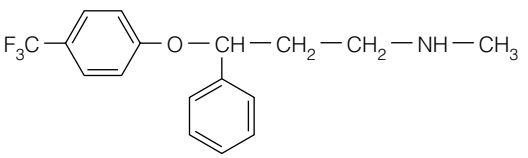


Serotonina



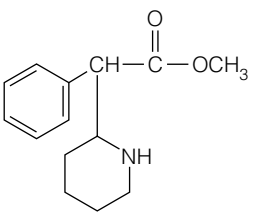
Dietilamida del ácido lisérgico

Otro fármaco psicótropo cuya acción sugirió una función para la serotonina en la neurotransmisión, es la **dietilamida del ácido lisérgico** (**LSD**), un derivado indólico. La acción del LSD se explica en parte como un mimetismo de los efectos de la serotonina en los receptores del sistema nervioso central. Más recientemente, se ha demostrado que el fármaco **fluoxetina** (comercializado con el nombre de **Prozac**) bloquea la captación de serotonina en las terminales nerviosas presinápticas, con un aumento de la cantidad disponible para la unión a los receptores postsinápticos. El Prozac, que se comercializó inicialmente como fármaco antidepresivo, se sabe ahora que es activo en diversos trastornos psiquiátricos.



Prozac
(fluoxetina)

Otro fármaco muy recetado, la **Ritalina,** que se emplea para tratar a los niños con la enfermedad de hiperactividad-déficit de atención, también está relacionado con el metabolismo de la serotonina. Debido a que la Ritalina es un estimulante que actúa aumentando las concentraciones de dopamina, era paradójico su efecto como calmante en los niños hiperactivos. Sin embargo, los estudios presentados a comienzos de 1999 señalaron que el fármaco, a las dosis bajas que se emplean con estos niños, en realidad ejerce sus efectos calmantes elevando las concentraciones de serotonina.



Ritalina
(metil fenidilacetato)

Igual que la acetilcolinesterasa limita las descargas de las sinapsis colinérgicas, también dos enzimas regulan la acción de las neuronas adrenérgicas. Estas

enzimas son la **catecolamina *O*-metiltransferasa (COMT),** que cataliza una transmetilación dependiente de AdoMet, y la **monoamino oxidasa (MAO),** una flavoproteína que oxida las aminas primarias a aldehídos.

Neurotransmisión excitadora e inhibidora

La necesidad de muchos tipos de neurotransmisores y de los correspondientes tipos de sinapsis deriva probablemente de la complejidad de los sistemas nerviosos de los vertebrados. Los neurotransmisores y las sinapsis en las que participan tienen propiedades muy diversas. Algunos son de acción rápida y otros son lentos. Hay sinapsis, como las colinérgicas nicotínicas, y las sinapsis en las que interviene el glutamato, que son estimuladoras y promueven un potencial de acción en la célula postsináptica. Otras, como las que utilizan como transmisor al ácido γ-aminobutírico (GABA), son inhibidoras, de forma que un impulso recibido en estas sinapsis, *dificulta* la transmisión de un potencial de acción en la neurona receptora. Esta inhibición puede producirse, por ejemplo, por la apertura de canales de cloruro. El hecho de que la neurona realice o no una descarga depende de la suma neta de los impulsos estimuladores e inhibidores que le llegan. Teniendo en cuenta que el GABA, que es un neurotransmisor inhibidor importante procede del glutamato, resulta interesante el hecho de que el glutamato en sí sea un neurotransmisor excitador importante. El glutamato ingerido en grandes cantidades, en forma de potenciador de sabor glutamato monosódico (GMS), puede dañar el sistema nervioso central por un exceso de estimulación. Por este motivo, el GMS fue retirado de la mayor parte de las leches artificiales infantiles hace dos décadas, debido a que el sistema nervioso en fase de desarrollo es especialmente sensible a la lesión. El GMS es un componente importante de la salsa de soja, y algunas personas presentan sudoración, sofocos y cefaleas al comer alimentos con GMS.

Un segundo tipo de receptor de acetilcolina, el **receptor de acetilcolina muscarínico,** es bastante diferente. Este receptor, que tiene una estructura distinta, puede ser inhibidor, aunque no por el mecanismo del canal del cloruro. Así pues, el hecho de que la acetilcolina sea estimuladora o inhibidora depende del tipo de receptor al que se une. Las sinapsis inhibidoras desempeñan una función importante en la regulación de la transmisión nerviosa. Una célula nerviosa característica, como la neurona motora que se muestra en la Figura 21.35, recibe impulsos de los axones de muchas neuronas distintas. En la Figura 21.36 se presenta una ilustración esquemática de la transmisión y la inhibición en una red nerviosa.

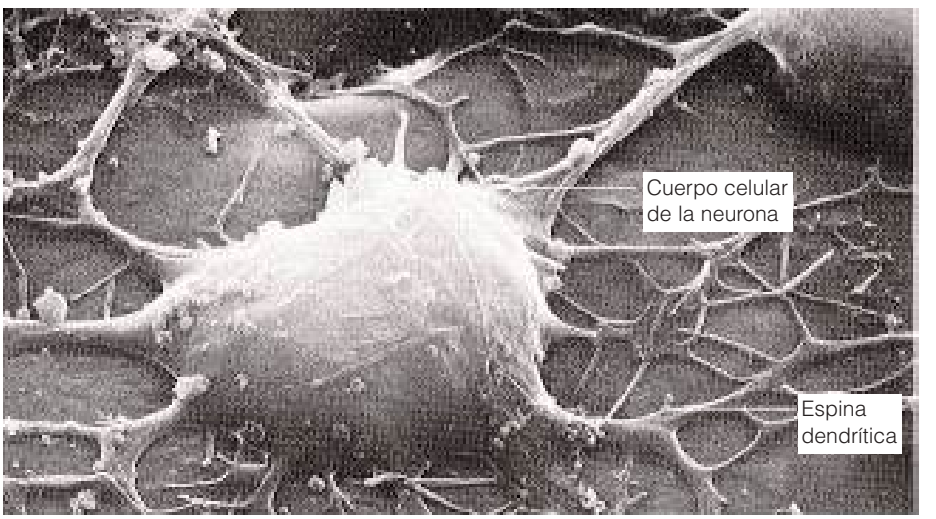


FIGURA **21.35**

Múltiples sinapsis en el cuerpo de una única neurona. Esta fotografía de microscopia electrónica da una idea de la complejidad de las interconexiones del sistema nervioso. Algunas de estas sinapsis son estimuladoras y otras son inhibidoras.

© Manfred Kage/Peter Arnold, Inc.

Determinados péptidos pequeños, como la **somatostatina,** la **neurotensina** y las **encefalinas,** pueden actuar también como neurotransmisores (Tabla 21.2). En algunos casos, estos compuestos presentan una segunda función como **neurohormonas,** que se describe en el apartado siguiente.

Por último, existen incluso sinapsis especializadas que no utilizan en absoluto sustancias neurotransmisoras. Aunque la transmisión a través de una sinapsis mediante neurotransmisores puede ser muy rápida (aproximadamente un milisegundo), algunas respuestas han de ser aún más rápidas de lo que este mecanismo permite. En estos casos se produce una conducción eléctrica-iónica directa entre las células nerviosas, utilizando uniones de intervalo (véase el Capítulo 10). Estas **sinapsis eléctricas** se encuentran con frecuencia en los animales que viven en entornos fríos y tienen que realizar, a pesar de ello, movimientos rápidos. Las bajas temperaturas corporales de estos animales harían los procesos químicos y de difusión de las sinapsis químicas aún más lentos. La conducción directa soluciona este problema.

Receptores de neurotransmisores y psicofarmacología

Los últimos años han visto un crecimiento explosivo de nuestros conocimientos de las relaciones entre determinados neurotransmisores y los receptores, por un lado, y por el otro los patrones específicos de comportamiento y las anomalías, incluyendo el comportamiento agresivo, la ansiedad, los cambios bioquímicos que acompañan al aprendizaje y las enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia y la adicción a las drogas. La mayor parte de nuestros mayores conocimientos han surgido del descubrimiento de múltiples clases de receptores, como los cuatro receptores diferentes de dopamina mencionados antes. Esto ha permitido dos líneas de ataque: (1) los enfoques psicofarmacológicos, en los que los estudios sobre las proteínas receptoras recombinantes están permitiendo el diseño de agonistas y antagonistas específicos de uno o dos subtipos de receptores, para los estudios tanto en animales de experimentación como en el ser humano, y (2) los enfoques de la genética molecular, en los que el establecimiento de modelos animales transgénicos (véase Herramientas de la Bioquímica 25B) permiten la eliminación selectiva del gen de un determinado subtipo en un animal experimental, normalmente un "ratón knockout" (Herramientas de la Bioquímica 25B).

La investigación actual sobre la bioquímica de la adicción a las drogas proporciona buenos ejemplos de lo que se está aprendiendo sobre el control molecular del comportamiento. Se ha sospechado desde hace tiempo que el metabolismo de la dopamina está íntimamente conectado con la adicción, ya que todas las drogas adictivas producen un aumento de la concentración de dopamina en el **núcleo acumbens,** la sección del cerebro de la "recompensa". En un estudio se vio que en ratas los agonistas de los receptores de dopamina muy relacionados D1 y D2 ejercían efectos opuestos sobre la tendencia del animal a do-

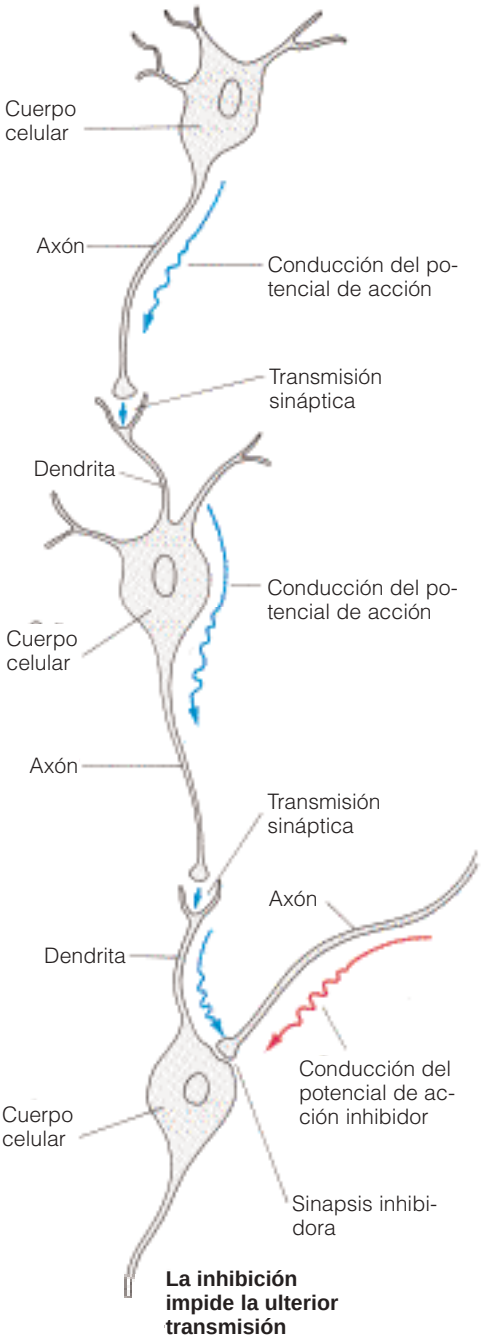


FIGURA **21.36**

Transmisión e inhibición en las redes nerviosas. En el ejemplo hipotético que se muestra, pasa un potencial de acción desde el axón en la parte superior, a través de la neurona del centro, para alcanzar la neurona de la parte inferior. Sin embargo, otra señal ha generado una respuesta inhibidora en una sinapsis sobre el cuerpo celular inferior, bloqueando la posterior transmisión del potencial de acción.

TABLA **21.2 Algunos péptidos que actúan como neurohormonas (H) o neurotransmisores (T)**

Nombre	H/T	Secuencia[a]
β-Endorfina	H	YGGFMTSFKSQTPLVTLFKNAIIKNAYKKGE
Met-encefalina	H, T	YGGFM
Leu-encefalina	H, T	YGGFL
Neurotensina	T	pELYENKPRRPYIL
Somatostatina	T	AGCKNFFWKTFTSC

[a] La subsecuencia YGGF, común a la β-endorfina y las encefalinas, parece ser esencial para los efectos narcóticos. La p en el extremo N-terminal de la neurotensina significa que el glutamato se ha ciclado a la forma "piro".

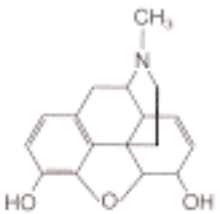
sificarse a sí mismo con cocaína tras una experiencia inicial con la droga. En otro estudio, la pérdida específica del receptor D4 en ratones los hacía hipersensibles al etanol, la cocaína y la metanfetamina.

Sin embargo, algunos trabajos recientes han implicado también a los receptores de glutamato en el control del comportamiento adictivo. La inhibición en ratas de la neurotransmisión por glutamato modula el comportamiento compulsivo de búsqueda de droga tras una experiencia inicial con la droga, y los neurocientíficos están ilusionados con la perspectiva de diseñar terapias que utilicen antagonistas de glutamato, que pueden incrementar la posibilidad de que un adicto pudiera permanecer "limpio" tras el tratamiento. Los receptores de glutamato se encuentran también ligados con fuerza a la acción de la fenciclidina (PCP, o "polvo de ángel"). Este compuesto bloquea la unión del glutamato a la clase de receptores de glutamato *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), induciendo de esta forma un estado semejante a la esquizofrenia que se creía hasta hace poco era consecuencia de una neurotransmisión "glutamatérgica" disminuida. Sin embargo, los neurocientíficos han encontrado que disminuyendo las concentraciones cerebrales de glutamato con otro fármaco se disminuye en gran medida la eficacia de la PCP, lo que sugiere un posible nuevo camino en el tratamiento de la esquizofrenia.

Los receptores de glutamato están recibiendo una gran atención en otros aspectos. Un subtipo determinado de receptor se fosforila por la quinasa dependiente de calmodulina durante la "potenciación a largo plazo", una respuesta neurofisiológica asociada con el aprendizaje, lo cual sugiere que esta modificación covalente del receptor puede estar asociada con la memoria a largo plazo.

Neurohormonas

Mientras que las sustancias transmisoras llevan realmente una señal a través de la sinapsis, hay otras sustancias de los sistemas nerviosos que modifican la forma en la que las células nerviosas responden a los transmisores. Estas sustancias incluyen los péptidos denominados *neurohormonas*, que fueron descubiertas originalmente como resultado de los estudios de Solomon Snyder sobre la adicción a los opiáceos como la **morfina.** Snyder detectó receptores específicos para la unión de los opiáceos en el tejido cerebral. Dado que parecía improbable que los cerebros de los vertebrados contuvieran receptores específicos para un producto de la planta adormidera, se buscaron ligandos naturales que se unieran a estos lugares. En los años 1970, esta búsqueda llevó al descubrimiento de varios péptidos pequeños, denominados *encefalinas* y **endorfinas,** que son analgésicos naturales (véase la Tabla 21.2). La modificación de las señales nerviosas por estas sustancias parece ser la responsable de la insensibilidad al dolor que se experimenta en situaciones de gran estrés o de shock. La eficacia de los analgésicos opiáceos como la morfina es una consecuencia, tal vez accidental, del reconocimiento de estos opiáceos por receptores neurohormonales, a pesar de sus diferencias estructurales respecto a las neurohormonas.



Morfina

Las endorfinas y encefalinas se sintetizan como parte del precursor hormonal mucho más largo *prepro-opiomelanocortina*. Como se describirá en el Capítulo 23, este precursor se fragmenta para liberar tanto las neurohormonas como diversas otras hormonas con funciones completamente diferentes.

RESUMEN

Los aminoácidos se sintetizan a partir de intermediarios del ciclo del ácido cítrico, la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato. Los aminoácidos desempeñan numerosas funciones como intermediarios de la biosíntesis de otros metaboli-

tos, como los nucleótidos de purina (glutamina, glicina, serina), los nucleótidos de pirimidina (aspartato, glutamina), las poliaminas (metionina), el glutatión (glutamato, cisteína, glicina), la creatina fosfato (arginina), los neurotransmisores (tirosina, triptófano, glutamato, arginina), la lignina, los compuestos aromáticos y los pigmentos (fenilalanina), las hormonas (tirosina, histidina), las porfirinas (glicina y glutamato en las plantas) y otros aminoácidos. Las funciones de los aminoácidos como neurotransmisores y precursores de neurotransmisores son especialmente importantes, como lo son sus funciones en la síntesis de porfirinas. La neurotransmisión comporta la difusión de una pequeña molécula desde el extremo de una neurona hasta una célula diana, que puede ser una célula muscular o una neurona, de manera que pueda propagarse el potencial de acción. Los agonistas y antagonistas de los neurotransmisores están revelando las bases bioquímicas del aprendizaje y la memoria, las enfermedades mentales y el comportamiento adictivo. En la síntesis de porfirina, la glicina se condensa con el succinato para dar un compuesto con un anillo heterocíclico, el porfobilinógeno, que es el precursor de los cuatro anillos pirrólicos del hemo y otras porfirinas. La degradación de las porfirinas en los animales produce hierro, que se reutiliza, y bilirrubina, un tetrapirrol insoluble, que se excreta.

BIBLIOGRAFÍA

Superfamilia del ciclo del ácido cítrico

Cooper, J. B., J. A. Chen, G.-J. van Holst y J. E. Varner (1987) Hydroxyproline-rich glycoproteins of plant cell walls. *Trends Biochem. Sci.* 12:24-27. Durante mucho tiempo se pensó que la hidroxiprolina estaba presente únicamente en las proteínas del tejido conjuntivo de los animales. Este artículo resume su presencia y su función en las proteínas estructurales de las plantas.

Ecker, J. R. (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 268:667-675. Oportuna revisión de la síntesis y las acciones de esta importante hormona de las plantas.

Kivirikko, K. I., R. Myllylä y T. Pihlajaniemi (1989) Protein hydroxylation: Prolyl 4-hydroxylase, an enzyme with four cosubstrates and a multifunctional subunit. *FASEB J.* 3:1609-1617. Revisión del mecanismo de hidroxilación de la prolina y de su papel en la síntesis del colágeno.

Mayer, B. y B. Hemmens (1997) Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* 22:477-481. Sorprendentemente amplia para una mini-revisión de cuatro páginas.

Perry, J. M. y M. A. Marletta (1998) Effects of transition metals on nitric oxide synthase catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:11101-11106. Un estudio reciente del papel de la tetrahidrobiopterina en esta reacción, por un líder en el análisis del mecanismo de la óxido nítrico sintasa.

Theologis, A. (1992) One rotten apple spoils the whole bushel: The role of ethylene in fruit ripening. *Cell* 70:181-184. Una mini-revisión que describe la biosíntesis del etileno y sus funciones.

Wilson, E. K. (1998) Impotence drugs: Beyond Viagra. *Chem. Eng. News*, número del 29 de junio. Este artículo de noticias explica de forma clara los efectos del Viagra sobre el metabolismo del óxido nítrico y los razonamientos sobre el desarrollo de fármacos análogos.

Withers, H. L. y K. Nordström (1998) Quorum-sensing acts at initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15694-15699. Un trabajo de investigación reciente sobre la detección de quorum, con referencias anteriores.

Aminoácidos que contienen azufre

Banerjee, R. V. y R. G. Matthews (1990) Cobalamin-dependent methionine synthase. *FASEB J.* 4:1450-1459. Un tratamiento integrado del mecanismo, la genética y las posibilidades de manipulación terapéutica.

Cohen, S. S. (1998) *Biochemistry of the Polyamines*. Oxford University Press, Nueva York. Una revisión que abarca todo sobre el metabolismo y las funciones de las poliaminas, escrito por un líder de este campo durante muchos años.

Cowley, G. y A. Underwood (1999) What is SAMe? *Newsweek*, número del 5 de julio, pp. 46-50. Un artículo de noticias que se ocupa de la *S*-adenosilmetionina como un fármaco maravilloso para la depresión, la artritis y las enfermedades hepáticas.

Pickett, C. B. y A. Y. H. Lu (1989) Glutathione S-transferases: Gene structure, regulation, and biological function. *Annu. Rev. Biochem.* 58:743-764. Un tratamiento de esta importante clase de enzimas desactivadoras de toxicidad.

Aminoácidos aromáticos

Brennan, M. M. (1998) New age paper and textiles. *Chem. Eng. News*, número del 23 de marzo, pp. 39-47. Un artículo de tipo noticias que describe la utilización de reactivos biológicos para degradar la lignina y sus aplicaciones en la producción de papel y textiles.

Goodwin, T. W. y E. I. Mercer (1983) *Introduction to Plant Biochemistry*, 2.ª ed. Pergamon, Oxford. Las diferentes secciones de este libro tratan con detalle temas como la biosíntesis de la lignina, el metabolismo de los flavonoides, el glifosato y sus acciones, y la conversión del ácido homogentísico en vitamina E y sus derivados.

Kaufman, S. (1993) New tetrahydrobiopterin-dependent systems. *Annu. Rev. Nutr.* 13:261-286. La tetrahidrobiopterina, descu-

bierta inicialmente como cofactor de la fenilalanina hidroxilasa, tiene múltiples funciones coenzimáticas.

Miles, E. W., S. Rhee y D. R. Davies (1999) The molecular basis of substrate channeling. *J. Biol. Chem.* 274:12193-12196. Esta minirrevisión considera la triptófano sintasa y otros ejemplos.

Okun, M. R. (1997) The role of peroxidase in neuromelanin synthesis: A review. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 29:15-22. Esta minirrevisión resume las pruebas que indican que la síntesis de melanina, al menos en algunos tejidos de los mamíferos, requiere dos enzimas.

Pan, P., E. Woehl y M. F. Dunn (1997) Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *Trends Biochem. Sci.* 22:22-27. Un resumen elegante que relaciona los análisis estructural y cinético de este ejemplo bien conocido de la canalización de metabolitos.

Scriver, C. R., S. Kaufman, R. C. Eisensmith y S. L. C. Woo (1995) The hyperphenylalaninemias. En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7.ª ed., editado por Scriver, C. R., A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle, pp. 1015-1076. McGraw-Hill, Nueva York. Éste es el primero de 12 artículos de este compendio que trata las enfermedades metabólicas hereditarias del metabolismo de los aminoácidos.

Valina, leucina e isoleucina

Yeaman, S. J. (1986) The mammalian 2-oxoacid dehydrogenases: A complex family. *Trends Biochem. Sci.* 11:293-296. En esta mini-revisión se comparan y contrastan los complejos que intervienen en la oxidación del piruvato, el α-cetoglutarato y los cetoácidos de cadena ramificada.

Metabolismo de las porfirinas

Jahn, D., E. Verkamp y D. Söll (1992) Glutamyl-transfer RNA: A precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 17:215-218. En este artículo se trata el papel inesperado del RNA en la δ-ALA sintetasa.

Warren, M. J., J. B. Cooper, S. P. Wood y P. M. Shoolingin-Jordan (1998) Lead poisoning, haem synthesis and 5-aminolaevulinic acid dehydratase. *Trends Biochem. Sci.* 23:217-221. Bases estructurales de la porfiria adquirida en el envenenamiento por plomo.

Warren, M. J., M. Jay, D. M. Hunt, G. H. Elder y J. G. Rôhl (1996) The maddening business of King George III and porphyria. *Trends Biochem. Sci.* 21:229-234. Una mezcla fascinante de historia y bioquímica, ilustrada con escenas de la película.

Neurotransmisores

Barondes, S. H. (1994) Thinking about Prozac. *Science* 263:1102-1103. Un tratamiento breve sobre la amplia gama de enfermedades que pueden tratarse con este fármaco.

Barria, A., D. Muller, V. Derkach, L. C. Griffith y T. R. Soderling (1997) Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* 276:2042-2045. Éste y un artículo de noticias que lo acompaña presentan la fosforilación del receptor como un hecho clave en el aprendizaje y la memoria.

Hayaishi, O. (1994) Tryptophan, oxygen, and sleep. *Annu. Rev. Biochem.* 63:1-24. Un artículo autobiográfico por una de las autoridades en este campo.

Kandel, E. y T. Abel (1995) Neuropeptides, adenylyl cyclase, and memory storage. *Science* 268:825-826. Una mini-revisión oportuna y bien referenciada.

Moghaddam, B. y B. W. Adams (1998) Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science* 281:1349-1354. Este artículo y una relación de noticias que lo acompaña elevan la posibilidad de que el metabolismo del glutamato pueda presentar dianas atrayentes para el tratamiento de la esquizofrenia.

Rubinstein, M. y 14 coautores (1997) Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine. *Cell* 90:991-1001. Un ejemplo de la utilización de los ratones "knockout" para valorar las funciones de las clases de receptores específicas.

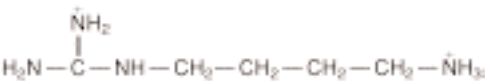
Snyder, S. H. y T. Narahashi, eds. (1990) Diseases of receptors and channels. *FASEB J.* 4:2707-2816. Un número especial de esta revista dedicado al parkinsonismo, la esquizofrenia y otras enfermedades de la función del receptor.

Taubes, G. (1994) Will new dopamine receptors offer a key to schizophrenia? *Science* 265:1034-1035. Un artículo de noticias que describe la excitación motivada por el descubrimiento de nuevos receptores de dopamina.

Wickelgren, I. (1998) Teaching the brain to take drugs. *Science* 280:2045-2047. Un artículo de tipo noticias que describe los estudios que relacionan los receptores de glutamato con la adicción a las drogas.

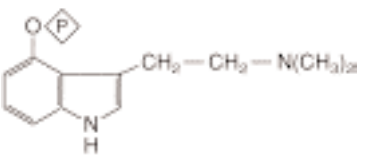
PROBLEMAS

1. Una prueba clínica que se utiliza a veces para diagnosticar la carencia de folato o la carencia de B_{12} es la prueba de tolerancia a la histidina, en la que se inyecta una dosis alta de histidina en el torrente sanguíneo y se realizan luego diversas determinaciones bioquímicas. ¿Qué metabolito de la histidina esperaría que se acumulara en un paciente con una carencia de folato o de B_{12} y por qué?
2. En las bacterias, gran parte de la putrescina se sintetiza, no a partir de la ornitina sino a partir de la arginina, que se descarboxila para dar *agmatina*. Formule una ruta plausible que vaya de la arginina a la putrescina, utilizando este intermediario.



Agmatina

3. La forma mitocondrial de la carbamoil fosfato sintetasa se activa alostéricamente por el *N*-acetilglutamato. Describa brevemente una justificación de este efecto.
4. La *psilocibina* es un compuesto alucinógeno que se encuentra en algunas setas. Presente una ruta sencilla para su biosíntesis a partir de uno de los aminoácidos aromáticos.



Psilocibina

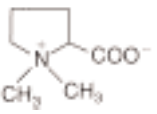
*5. Es posible identificar a las personas fenilcetonúricas y a los portadores de la enfermedad (heterocigotos) mediante una prueba de tolerancia a la fenilalanina. Se inyecta una dosis grande de fenilalanina en el torrente sanguíneo y se determina su eliminación de la sangre mediante mediciones de las concentraciones séricas de fenilalanina a intervalos regulares. Dibuje esquemáticamente las curvas de las concentraciones relativas de fenilalanina en sangre respecto al tiempo que cabría prever en (a) un paciente con fenilcetonuria, (b) un heterocigoto y (c) una persona normal. ¿Qué clase de prueba de tolerancia podría diseñarse para diferenciar una fenilcetonuria debida a un déficit de fenilalanina hidroxilasa de la debida a un déficit de dihidropteridina reductasa?

6. (a) El formaldehído reacciona de manera no enzimática con el tetrahidrofolato para generar 5,10-metilentetrahidrofolato. El [^{14}C]formaldehído puede utilizarse para preparar serina marcada en el carbono β. ¿Qué más se necesita?
   (b) La [^{14}C]serina, preparada como se ha descrito antes, es útil para muchas cosas, pero probablemente no la utilizaría para los estudios sobre la síntesis proteica ya que marcaría los ácidos nucleicos, los hidratos de carbono y los lípidos, además de las proteínas. Indique cómo podría marcarse cada una de estas clases de compuestos mediante este precursor.

7. Si la oxidación de la acetil-CoA produce 12 ATP por mol a través del ciclo del ácido cítrico, ¿cuántos ATP se obtendrán a partir de la oxidación metabólica completa de 1 mol de alanina en un mamífero? ¿Será la producción de energía correspondiente superior o inferior en un pez? ¿Por qué? ¿Cuánta energía se obtendría de la oxidación metabólica de 1 mol de leucina a CO_2, H_2O y NH_3? ¿Y de 1 mol de tirosina?

8. Algunas bacterias contienen tres formas diferentes de aspartoquinasa, cada una de ellas con su propio modo de regulación. Basándose en las funciones de la aspartoquinasa, que se comentan en el texto, proponga un esquema de regulación aplicable a cada forma de la aspartoquinasa.

9. La prolina betaína es un supuesto osmoprotector en las plantas y las bacterias, que ayuda a evitar la deshidratación de las células.

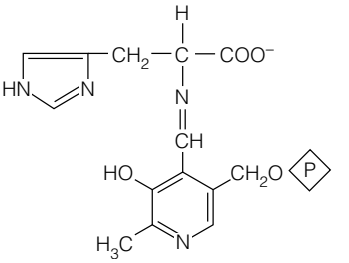


Proponga una ruta plausible para la biosíntesis de este compuesto.

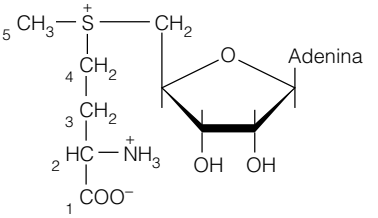
10. La mayor parte de los mutantes bacterianos que requieren isoleucina para su crecimiento necesitan también valina. ¿Por qué? ¿Qué enzima o reacción sería deficitaria en un mutante que requiriera tan sólo isoleucina (y no valina) para su crecimiento?

11. Describa una serie de reacciones alostéricas que pudieran controlar de manera adecuada la biosíntesis de valina, leucina e isoleucina.

12. La estructura que se muestra a continuación es un intermediario en la síntesis ¿de qué amina biógena? Utilice flechas para indicar cómo se forma el siguiente intermediario en esta reacción, y dibuje la estructura del mismo.



13. Identifique en esta estructura los átomos de carbono, según la numeración, que se incorporan a:



   (a) Creatina fosfato_____
   (b) Espermidina_____
   (c) Etileno_____
   (d) Putrescina_____
   (e) Glicina betaína_____
   (f) Adrenalina_____

14. ¿Por qué es un trastorno más grave la fenilcetonuria debida a un déficit de dihidropteridina reductasa que la fenilcetonuria causada por un déficit de fenilalanina hidroxilasa?

*15. Proponga un mecanismo para la reacción catalizada por la dopamina β-hidroxilasa. Suponga que el cobre de la enzima une O_2 y que el cobre puede cambiar su estado de oxidación durante la reacción.

16. Proponga una ruta plausible para la biosíntesis de ovotiol a partir de histidina, indicando la intervención de cofactores.

17. El glifosato, que inhibe la reacción de la EPSP sintasa de la ruta del ácido sikímico, es un ácido fosfónico derivado de la glicina; de ahí su nombre (glicina fosfato). Basándose en el conocimiento de la reacción de la EPSP sintasa (véanse las páginas 852-853), ¿cabría prever que la inhibición fuera competitiva o no competitiva en relación con cada uno de los sustratos? Explique brevemente su respuesta.

18. En la evaluación de los pacientes ictéricos, los clínicos determinan con frecuencia si la bilirrubina que se acumula en la sangre es fundamentalmente bilirrubina libre o el diglucurónido. ¿Qué forma se acumularía principalmente en una enfermedad hepática crónica? ¿Y en la obstrucción de la vía biliar por un cálculo? ¿Y en una anemia hemolítica, como la que se asocia al déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (véase el Capítulo 14)? Explique brevemente sus respuestas.

19. Proponga otros sustratos y cofactores que puedan participar en cada una de las tres primeras reacciones de la ruta de biosíntesis de flavonoides que se presenta en la página 856.

20. Escriba una respuesta de una línea para cada pregunta.
   (a) ¿Por qué el daño hepático produce ictericia?
   (b) ¿Por qué las personas con porfiria eritropoyética congénita se hacen anémicos?
   (c) ¿Por qué un déficit genético de la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa produce homocistinuria?

CAPÍTULO 22

Metabolismo de los nucleótidos

HEMOS ENCONTRADO A LOS NUCLEÓTIDOS REPETIDAS VECES DURANTE NUESTRA exploración de la bioquímica. Actúan como precursores de los ácidos nucleicos, como elementos cruciales en el metabolismo energético, como transportadores de metabolitos activados para la biosíntesis (como los nucleósido difosfato azúcares), como grupos estructurales de las coenzimas y, finalmente, como reguladores metabólicos y moléculas señal (especialmente el AMP cíclico). En este capítulo consideramos las rutas de biosíntesis y degradación de los nucleótidos de purina y pirimidina, y exploramos la regulación de estos procesos, especialmente cruciales en las rutas que conducen a la replicación del DNA. Consideramos las enzimas de la biosíntesis de los nucleótidos como objetivos para la acción de los fármacos antimicrobianos y anticancerosos, y describimos las consecuencias metabólicas de determinadas alteraciones hereditarias del metabolismo de los nucleótidos. Las funciones de los nucleótidos en la regulación metabólica o genética se consideran en otro lugar del libro, en relación con los procesos específicos que regulan.

Antes de iniciar este capítulo, puede ser útil revisar la información sobre la estructura de los nucleótidos del Capítulo 4. También debe recordar la distinción entre nucleósidos y nucleótidos. En la hidrólisis completa, un *nucleósido* produce como mínimo un mol de un azúcar y otro de una base heterocíclica, mientras que un *nucleótido* produce al menos 1 mol de azúcar, otro de una base y otro de fosfato inorgánico. Un *mononucleótido* contiene 1 mol de base y otro de azúcar, pero puede contener más de uno de fosfato. Si contiene, por ejemplo, tres fosfatos, se denomina *nucleósido trifosfato*. Los *desoxirribonucleótidos*, que se utilizan en la síntesis del DNA, se forman a partir de los *ribonucleótidos* (componentes del RNA) mediante rutas que se considerarán más adelante en este capítulo.

Esquema de las rutas del metabolismo de los nucleótidos

RUTAS DE BIOSÍNTESIS: RUTAS DE NOVO Y DE SALVAMENTO

A diferencia de las demás clases de metabolitos que hemos encontrado, ni los nucleótidos ni las bases o los nucleósidos a partir de los cuales se forman, son necesarios para satisfacer las necesidades nutritivas, con la excepción de algunos

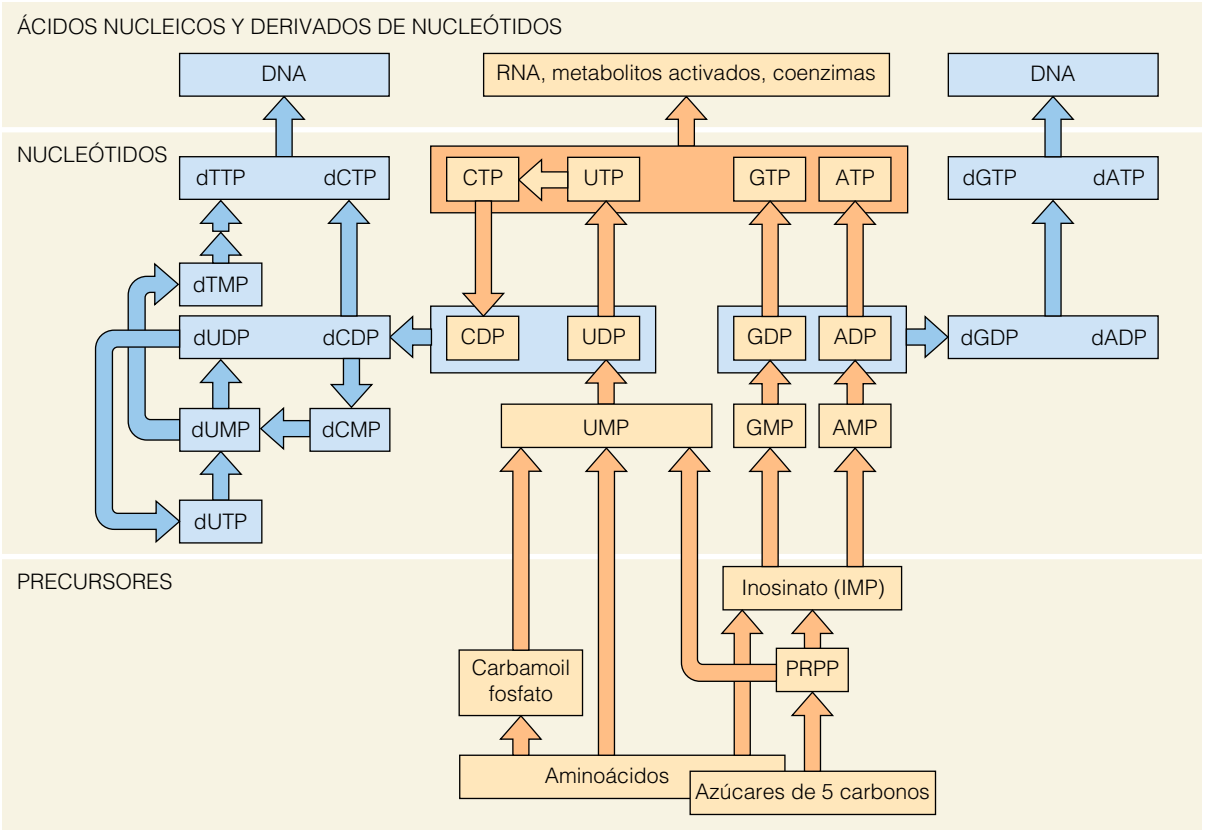


FIGURA **22.1**

Visión general del metabolismo de los nucleótidos. Rutas de novo para la síntesis y utilización de los ribonucleótidos (naranja) y los desoxirribonucleótidos (azul).

Los nucleótidos se forman mediante una síntesis de novo a partir de precursores de bajo peso molecular, o mediante el salvamento de los nucleósidos o las bases.

parásitos protozoarios. La mayoría de los organismos pueden sintetizar nucleótidos de purina y pirimidina a partir de precursores de bajo peso molecular, en cantidades suficientes para satisfacer sus necesidades. Estas denominadas **rutas de novo** son prácticamente idénticas en todo el mundo biológico (Figura 22.1). La mayoría de los organismos pueden sintetizar también los nucleótidos a partir de los nucleósidos o las bases de los que disponen por haberlos ingerido con los alimentos o por haberlos obtenido mediante la degradación enzimática de los ácidos nucleicos. Estos procesos se denominan **rutas de salvamento,** ya que en ellas se utilizan los compuestos de purina y pirimidina preformados que, de lo contrario, se perderían mediante la biodegradación. Como veremos, las rutas de salvamento constituyen objetivos importantes para el tratamiento de las enfermedades microbianas o parasitarias, lugares para la manipulación de los sistemas biológicos (por ejemplo, en los estudios de mutagénesis o en la preparación de anticuerpos monoclonales), y procesos biológicos en los que las alteraciones genéticas tienen consecuencias graves y de largo alcance.

DEGRADACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS E IMPORTANCIA DEL SALVAMENTO DE NUCLEÓTIDOS

Dado que el salvamento o reutilización de las bases de purina y pirimidina implica moléculas liberadas por la degradación de los ácidos nucleicos, empezaremos considerando brevemente estos procesos (Figura 22.2). La degradación puede producirse intracelularmente (a través del recambio de las especies de RNA mensajero inestables o a través de las rutas de reparación del DNA), como consecuencia de la muerte celular o, en los animales, por la digestión de los ácidos nucleicos ingeridos en el alimento.

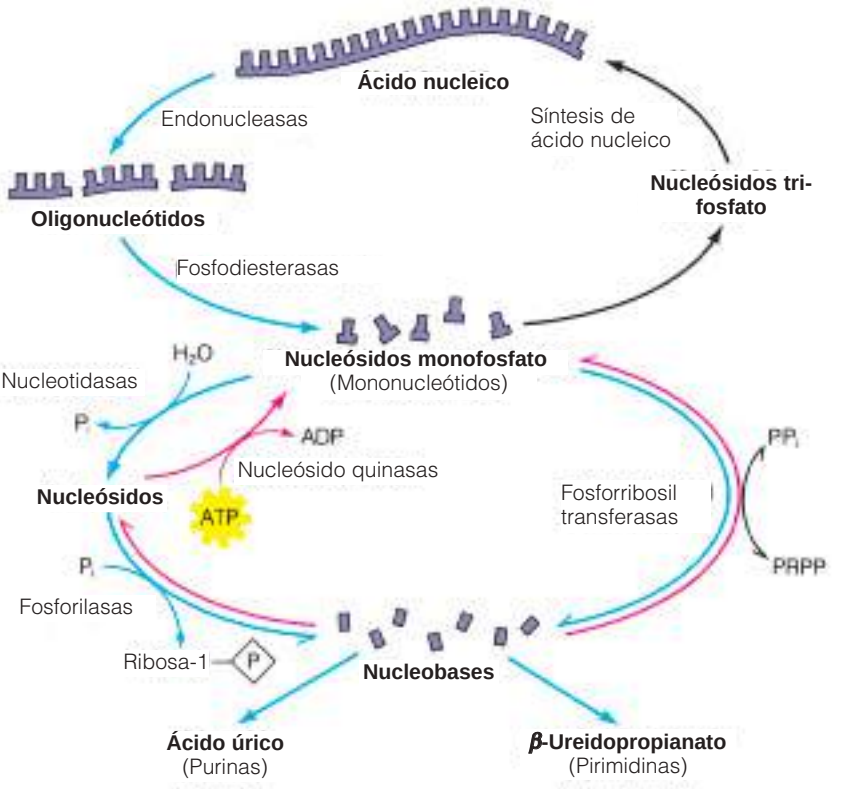
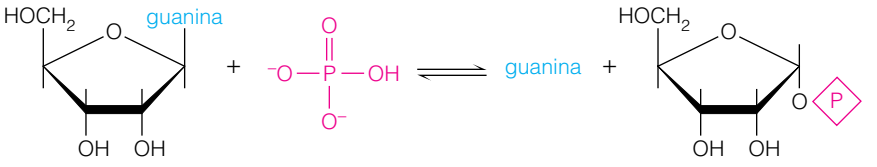


FIGURA **22.2**

Reutilización de las bases púricas y pirimidínicas. En la figura se muestran las relaciones entre el catabolismo de los ácidos nucleicos (en azul) y la nueva síntesis de nucleótidos mediante las rutas de salvamento (en rojo).

En los animales, la hidrólisis extracelular de los ácidos nucleicos ingeridos constituye la principal vía de obtención de bases y nucleósidos. Los procesos de degradación son comparables a los que intervienen en la digestión proteica. La fragmentación se inicia en los enlaces internos, en este caso los enlaces fosfodiéster. La catálisis se produce mediante las **endonucleasas,** como la ribonucleasa o la desoxirribonucleasa pancreáticas, que actúan digiriendo los ácidos nucleicos en el intestino delgado. La fragmentación endonucleolítica da lugar a oligonucleótidos, que posteriormente se fragmentan de forma **exonucleolítica** (en enlaces próximos a los extremos de las moléculas) por la acción de enzimas inespecíficas denominadas **fosfodiesterasas.** Los productos son mononucleótidos, nucleósidos 5′- o 3′-monofosfato, según las especificidades de las enzimas en cuestión. Los nucleótidos pueden fragmentarse posteriormente de forma hidrolítica, mediante un grupo de fosfomonoesterasas denominadas **nucleotidasas,** para dar ortofosfato y el correspondiente nucleósido. Aunque se produce la ruptura hidrolítica del nucleósido resultante, la vía más común de ruptura hacia la base implica la acción de la **nucleósido fosforilasa.** Como la glucógeno fosforilasa, las nucleósido fosforilasas rompen un enlace glucosídico mediante la adición a través de él de los elementos del fosfato inorgánico, dando lugar a la correspondiente base más ribosa-1-fosfato (o desoxirribosa-1-fosfato si el sustrato es un desoxirribonucleósido):



Guanosina **Ribosa-1-fosfato**

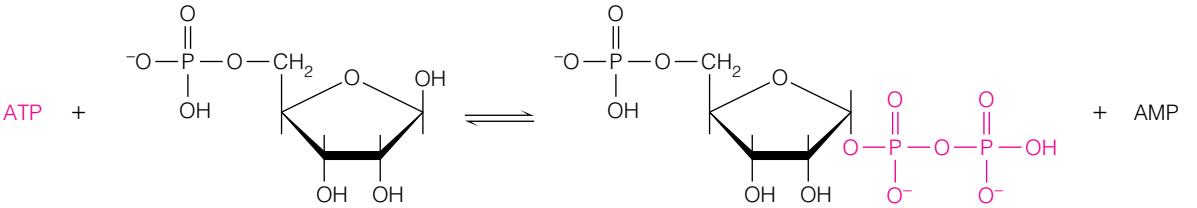
Estas reacciones son fácilmente reversibles, de manera que una nucleósido fosforilasa puede catalizar también el primer paso de la síntesis de salvamento de nucleótidos a partir de las nucleobases libres. Cuando esto ocurre, el nucleósido producido puede fosforilarse por el ATP, mediante la acción de una **nucleósido quinasa.** Estas enzimas no son universales. Así, por ejemplo, las células animales no contienen una guanosina quinasa ni una uridina fosforilasa, aunque estas enzimas sí se encuentran en otros organismos.

Si las bases o los nucleósidos no se reutilizan para la síntesis de ácidos nucleicos a través de las rutas de salvamento, las bases púricas y pirimidínicas continúan degradándose, hasta ácido úrico o β-ureidopropionato, respectivamente, como se indica en la Figura 22.2. Consideraremos estas rutas más adelante en este mismo capítulo.

EL PRPP: UN METABOLITO CENTRAL EN LAS RUTAS DE NOVO Y DE SALVAMENTO

El PRPP es un derivado activado de la ribosa-5-fosfato que se utiliza tanto en las rutas de salvamento como en las de síntesis de novo.

Una ruta de salvamento alternativa, que se muestra también en la Figura 22.2, sintetiza los nucleósidos 5′-fosfato directamente a partir de las bases libres. En esta ruta interviene una clase de enzimas denominadas **fosforribosiltransferasas** y un azúcar fosfato activado, el **5-fosfo-α-D-ribosil-1-pirofosfato (PRPP).** El PRPP, que se ha identificado en el Capítulo 21 como intermediario en la biosíntesis de histidina y triptófano, es un intermediario clave en la síntesis de novo de los nucleótidos púricos y pirimidínicos. Se forma por la acción de la **PRPP sintetasa,** que activa el carbono 1 de la ribosa-5-fosfato mediante la transferencia al mismo del grupo pirofosfato del ATP:



Ribosa-5-fosfato **5-Fosfo-α-D-ribosil-1-pirofosfato (PRPP)**

Una reacción fosforribosiltransferasa cataliza la transferencia reversible de una base libre a la ribosa del PRPP, produciendo un nucleósido monofosfato y pirofosfato. Dado que en la mayoría de las células no hay el análogo desoxirribosa del PRPP, estas enzimas no participan directamente en el metabolismo de los desoxirribonucleótidos.



PRPP **GMP**

En principio, una reacción de este tipo podría intervenir en la degradación de los nucleótidos. Sin embargo, in vivo, el pirofosfato se fragmenta rápidamente por la pirofosfatasa para dar fosfato inorgánico. Ello hace que las fosforribosil-

transferasas actúen la mayor parte de las veces en la dirección de la biosíntesis de los nucleótidos.

Biosíntesis de novo de los nucleótidos de purina

ESTUDIOS INICIALES SOBRE LA SÍNTESIS DE NOVO DE LAS PURINAS

Las reacciones de la biosíntesis de novo de los nucleótidos de purina se identificaron en los años 1950 en los laboratorios de John Buchanan y Robert Greenberg. La determinación de la ruta se inició con la observación de que los pájaros excretan la mayor parte de su exceso de compuestos nitrogenados en forma de *ácido úrico*, que es una purina oxidada (véase el Capítulo 20). Así pues, los investigadores fueron capaces de identificar los precursores de bajo peso molecular de las purinas mediante la administración de compuestos marcados isotópicamente a palomas, cristalizando el ácido úrico de las deposiciones y determinando, mediante degradación química selectiva, las posiciones que estaban marcadas con cada precursor. Este método proporcionó el patrón que se muestra en la Figura 22.3. En ese momento no se conocía el 10-formiltetrahidrofolato, pero compuestos como el formato o la serina marcados en el carbono hidroximetilo marcaban con facilidad el C-2 y el C-8 del ácido úrico.

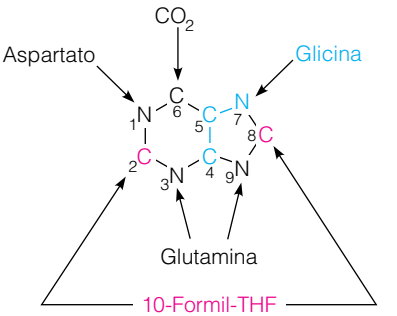
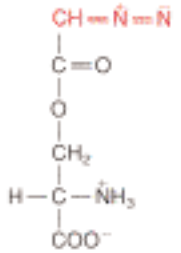


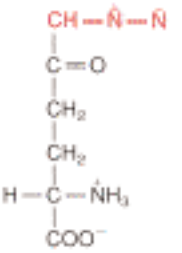
FIGURA **22.3**

Precursores de bajo peso molecular para el anillo de purina. El origen de cada átomo del anillo, según lo establecido en los estudios con trazadores isotópicos de la síntesis de ácido úrico.

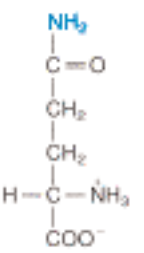
Posteriormente, se identificaron dos antibióticos relacionados, la **azaserina** y la **6-diazo-5-oxonorleucina (DON)**, como inhibidores potentes de la síntesis de los nucleótidos de purina. El reconocimiento de que estos compuestos son análogos estructurales de la glutamina llevó a la determinación final de que la azaserina y la 6-diazo-5-oxonorleucina son inhibidores irreversibles de una clase de enzimas denominadas **glutamina amidotransferasas**, que catalizan la transferencia, dependiente de ATP, del nitrógeno amido de la glutamina a un aceptor. Tres de estas reacciones se producen en la síntesis de los nucleótidos de purina (y una en la síntesis de los nucleótidos de pirimidina).



Azaserina

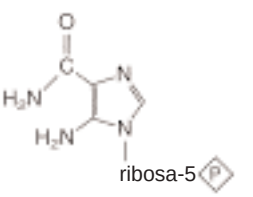


6-Diazo-5-oxonorleucina (DON)



Glutamina

En experimentos posteriores, se trató a bacterias con sulfamidas, como la sulfanilamida. Las bacterias excretaban grandes cantidades de un compuesto rojo que se identificó como un producto de oxidación del **5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (AICAR)**, que se parece a un nucleótido purínico incompleto. Este hallazgo sugirió que el AICAR es un intermediario de la biosíntesis, cuya utilización se bloqueaba de alguna forma por el fármaco. Dado que las sulfamidas bloquean la síntesis de las coenzimas de folato, la acumulación de AICAR sugirió que en la siguiente reacción participa una coenzima de folato. Además, estas observaciones sugirieron que la ruta actuaba a nivel de los nucleótidos, es decir, que el anillo de purina se formaba mientras estaba ya unido a la ribosa-5-fosfato.



5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (AICAR)

SÍNTESIS DE PURINAS A PARTIR DE PRPP HASTA EL ÁCIDO INOSÍNICO

Las purinas se sintetizan a nivel del nucleótido, partiendo de la conversión del PRPP en fosforribosilamina y el ensamblaje del anillo de purina sobre el grupo amino.

En la Figura 22.4 se resume la ruta que conduce desde el PRPP, el primer intermediario, hasta el primer nucleótido de purina totalmente formado, la **inosina 5′-monofosfato (IMP),** también denominado **ácido inosínico.** Este compuesto es el 5′-ribonucleótido de la base púrica **hipoxantina.** Obsérvese que en el proceso se producen dos reacciones de glutamina amidotransferasa, las reacciones 1 y 4. Estas dos reacciones difieren en su mecanismo en que la PRPP amidotransferasa (reacción 1) no requiere ATP, ya que el sustrato ha sido activado por el ATP en el paso anterior. Se produce una inversión de la configuración en la reacción 1, cuando el nitrógeno amido desplaza al grupo pirofosfato. Este último es un excelente grupo de salida, dando un nucleótido simple (5-fosforribosilamina), que tiene la configuración β en el carbono 1 del azúcar, como ocurre con todos los nucleótidos comunes.

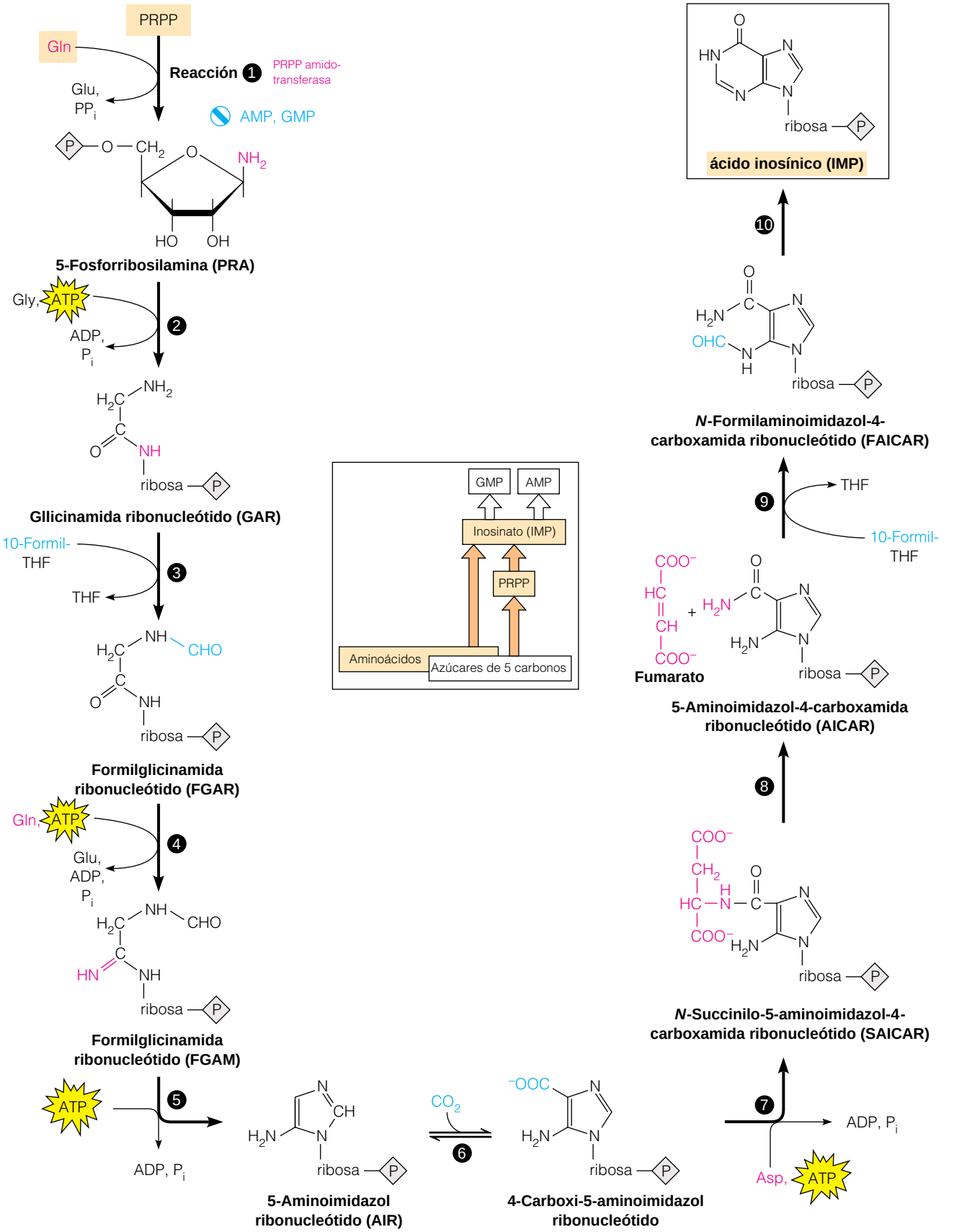
En la reacción 2, se transfiere una molécula de glicina, con la ayuda del ATP, al nitrógeno de la fosforribosilamina. Esto va seguido de una reacción **transformilasa,** en la que un grupo formilo se transfiere desde el 10-formiltetrahidrofolato al anillo de purina en formación. Como hemos señalado, la reacción 4 está catalizada por una amidotransferasa dependiente de ATP. La reacción 5 es un cierre del anillo dependiente de ATP, que da origen a la porción imidazol del anillo de purina. La reacción 6 es una reacción de carboxilación reversible, que es de destacar por el hecho de que *no* requiere biotina. Las reacciones 7 y 8 dan lugar a la transferencia de un nitrógeno del aspartato, mediante un mecanismo idéntico al que se emplea para convertir la citrulina en arginina en el ciclo de la urea (véase el Capítulo 20). En primer lugar, se transfiere toda la molécula de aspartato al grupo carboxilo del 4-carboxi-5-aminoimidazol ribonucleótido (reacción 7). Se produce entonces una reacción de eliminación α,β (reacción 8), que da lugar a AICAR, el intermediario que se acumula en las bacterias tratadas con sulfamida. La reacción 9 es otra reacción transformilasa, con la transferencia de un grupo de un carbono desde el 10-formiltetrahidrofolato. Por último, una reacción de condensación interna (reacción 10) produce el primer compuesto de purina, el ácido inosínico.

Las células de los vertebrados contienen varias de estas actividades en forma de enzimas multifuncionales. Este hecho se descubrió cuando se transfirieron los genes clonados correspondientes a estas enzimas a *E. coli* y se encontró que los correspondientes genes clonados aislados complementaban (es decir, sustituían la función de) dos o tres genes bacterianos mutantes. Así, por ejemplo, un solo cDNA clonado (véase Herramientas de la Bioquímica 25B) permitía el crecimiento de bacterias auxótrofas de purina que carecían de E_2, E_3 o E_5. Un análisis posterior demostró que el DNA clonado de los vertebrados contenía un único gen que codificaba una enzima que catalizaba estas tres reacciones. Otras observaciones semejantes confirmaron que las reacciones 6 y 7 están catalizadas por una única enzima bifuncional.

Las dos enzimas transformilasa, que catalizan las reacciones 3 y 9, no existen como una enzima bifuncional, sino como un complejo multiproteico, asociado con la serina transhidroximetilasa, y una enzima trifuncional, la formilmetenil-

FIGURA **22.4** (ver página siguiente)

Biosíntesis de novo del anillo de purina, desde el PRPP hasta el ácido inosínico. En esta figura y en las siguientes, ribosa —Ⓟ indica un grupo de ribosa-5-fosfato en un nucleótido. Las enzimas que intervienen son: (1) PRPP amidotransferasa, (2) GAR sintetasa, (3) GAR transformilasa, (4) FGAR amidotransferasa, (5) FGAM ciclasa, (6) AIR carboxilasa, (7) SAICAR sintetasa, (8) SAICAR liasa, (9) AICAR transformilasa y (10) IMP sintasa.


PRPP
Gln
Glu, PPi
Reacción 1
PRPP amido-transferasa
AMP, GMP
5-Fosforribosilamina (PRA)
Gly, ATP
ADP, Pi
2
Gllicinamida ribonucleótido (GAR)
10-Formil-THF
THF
3
Formilglicinamida ribonucleótido (FGAR)
Gln, ATP
Glu, ADP, Pi
4
Formilglicinamida ribonucleótido (FGAM)
ATP
5
ADP, Pi
5-Aminoimidazol ribonucleótido (AIR)
CO2
6
4-Carboxi-5-aminoimidazol ribonucleótido
7
ADP, Pi
Asp, ATP
N-Succinilo-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (SAICAR)
8
5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (AICAR)
Fumarato
9
THF
10-Formil-THF
N-Formilaminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (FAICAR)
10
ácido inosínico (IMP)
GMP
AMP
Inosinato (IMP)
PRPP
Aminoácidos
Azúcares de 5 carbonos

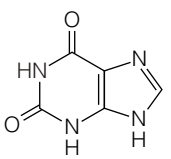
metilen-tetrahidrofolato sintetasa (Figura 22.5). Esta última proteína realiza tres actividades de síntesis de coenzimas de folato (véase la página 821). Tanto si las actividades corresponden a una enzima multifuncional como si las realiza un complejo multienzimático, las ventajas de la yuxtaposición de lugares catalíticos son fáciles de apreciar: protección de las coenzimas de tetrahidrofolato lábiles, regulación conjunta de las actividades enzimáticas secuenciales y "canalización" de intermediarios escasos (es decir, facilitación de su transferencia directa de un lugar catalítico al siguiente).

El control de la biosíntesis del ácido inosínico se realiza mediante la regulación por retroacción de los pasos iniciales de la síntesis de los nucleótidos de purina. La PRPP sintetasa se inhibe por diversos nucleótidos de purina, en especial AMP, ADP y GDP, y la PRPP amidotransferasa (reacción 1 de la Figura 22.4) se inhibe alostéricamente por AMP, ADP, GMP y GDP. En *E. coli*, la expresión de los genes que codifican estas enzimas está controlada por una proteína represora (véase el Capítulo 26), el producto del gen *purR*. Esta proteína une hipoxantina o guanina, y el complejo proteína-base púrica resultante se une a lugares del DNA previos a varios genes de la síntesis de las purinas (y pirimidinas), con lo que se inhibe su transcripción.

SÍNTESIS DE ATP Y GTP A PARTIR DEL ÁCIDO INOSÍNICO

El IMP, el primer nucleótido de purina completo que se forma, constituye un punto de ramificación entre la biosíntesis de los nucleótidos de adenina y la de los de guanina.

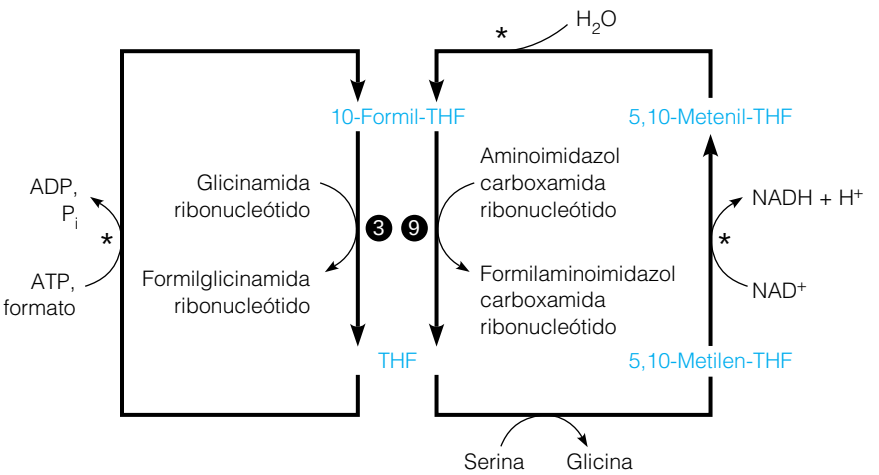
El ácido inosínico constituye un punto de ramificación en la síntesis de los nucleótidos de purina. En la Figura 22.6 se presenta un esquema de la conversión de este compuesto en adenosina 5′-monofosfato y en guanosina 5′-monofosfato. La ruta de los nucleótidos de guanina se inicia con una hidroxilación del anillo de purina, dependiente de NAD^+, que da lugar al nucleótido **xantosina monofosfato (XMP)**, que contiene la base xantina. Se produce a continuación una reacción amidotransferasa dependiente de la glutamina, que da lugar a GMP. La ruta para la producción de AMP comporta la transferencia de nitrógeno desde el aspartato al IMP, mediante un mecanismo similar al de las reacciones 7 y 8 de la síntesis de novo del anillo de purina. En primer lugar se forma un intermediario succinilonucleótido, y a continuación una reacción de eliminación α,β da lugar a AMP y fumarato. En realidad, es la misma enzima la que cataliza ambas reacciones de eliminación. Obsérvese en la Figura 22.6 que la energía que impulsa la reacción de transferencia de aspartato no procede del ATP sino del GTP. Ello puede constituir una forma de controlar las proporciones de IMP que van a parar a la síntesis de nucleótidos de adenina y de guanina. La acumulación de GTP tendería a fomentar la ruta destinada a los nucleó-



Xantina

FIGURA **22.5**

Reacciones de transformilación en la síntesis de los nucleótidos de purina. Las enzimas transformilasas que se muestran en la Figura 22.4 (reacciones 3 y 9) forman parte de un complejo multienzimático que cataliza las reacciones de transformilación en la síntesis de los nucleótidos de purina. Una enzima trifuncional para la síntesis de las coenzimas de tetrahidrofolato es también parte del complejo; sus tres actividades se indican con un asterisco. La reacción de serina transhidroximetilasa se muestra en el extremo inferior derecho.



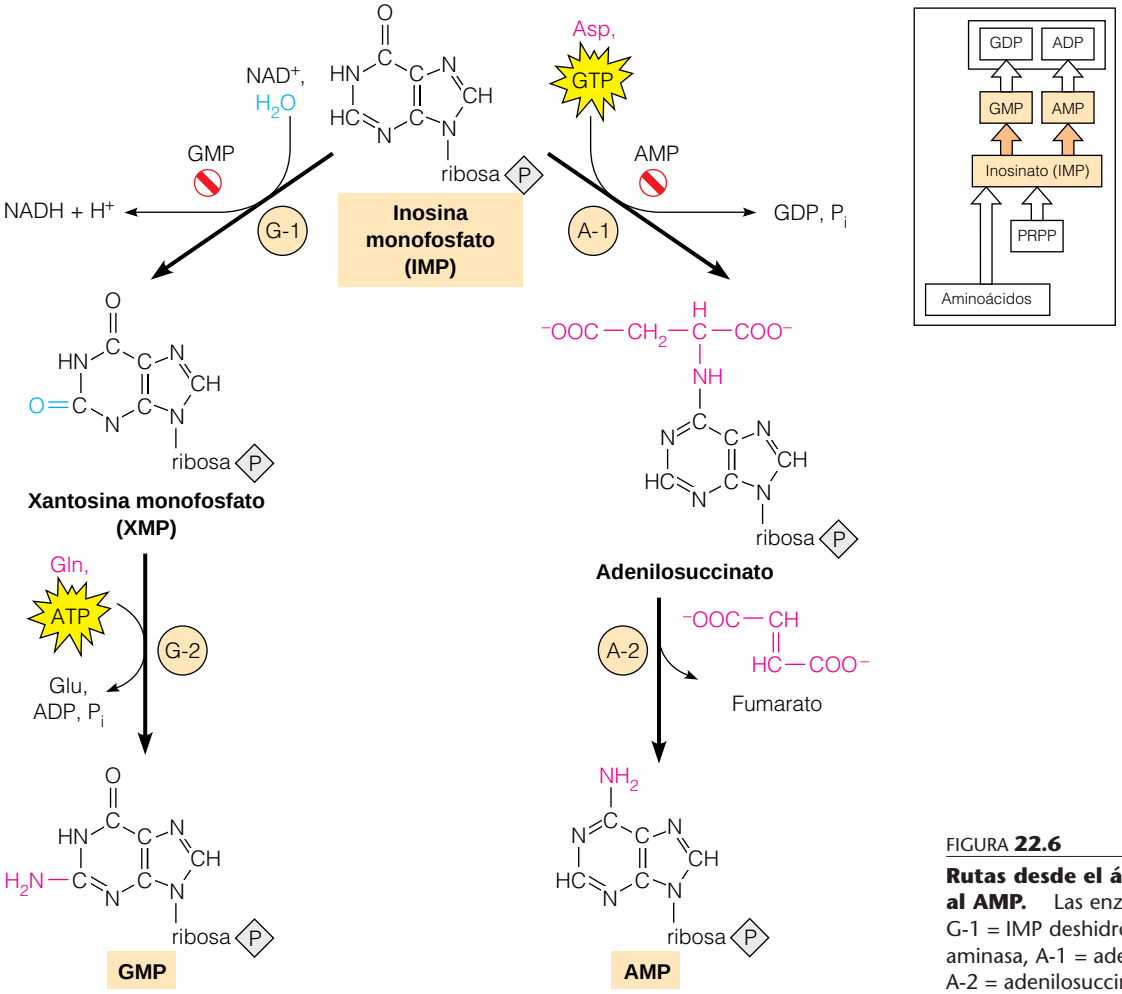


FIGURA **22.6**

Rutas desde el ácido inosínico al GMP y al AMP. Las enzimas son las siguientes: G-1 = IMP deshidrogenasa, G-2 = XMP aminasa, A-1 = adenilosuccinato sintetasa y A-2 = adenilosuccinato liasa.

tidos de adenina. Además, dado que la conversión de XMP en GMP es un proceso que depende del ATP, la acumulación de ATP podría fomentar la síntesis de nucleótidos de guanina.

Los nucleótidos son activos en el metabolismo, principalmente en forma de nucleósidos trifosfato. El GMP y el AMP se convierten en sus correspondientes trifosfatos a través de dos reacciones de fosforilación sucesivas. La conversión en los difosfatos comporta la acción de quinasas específicas dependientes de ATP.

$$\text{GMP} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{Guanilato quinasa}} \text{GDP} + \text{ADP}$$

$$\text{AMP} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{Adenilato quinasa}} 2\text{ADP}$$

La fosforilación del ADP a ATP se produce a través del metabolismo energético (fosforilación oxidativa o fosforilaciones a nivel de sustrato o, en las plantas, fotofosforilación). El ATP puede formarse también a partir de ADP por la acción de la adenilato quinasa, que actúa en la dirección contraria a la mostrada aquí.

El ATP es el donador de fosfato para la conversión del GDP (y otros nucleósidos difosfato) al nivel de trifosfatos, mediante la acción de la **nucleósido difosfato quinasa.** Esta enzima es muy activa, pero tiene una especificidad amplia con respecto al grupo fosforilo, tanto donador como aceptor.

$$\text{GDP} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{NDP quinasa}} \text{GTP} + \text{ADP} \qquad \Delta G^{\circ\prime} = 0$$

La nucleósido difosfato quinasa, una enzima impulsada por el equilibrio, transfiere un grupo fosforilo desde el ATP en la síntesis de todos los demás nucleósidos trifosfato.

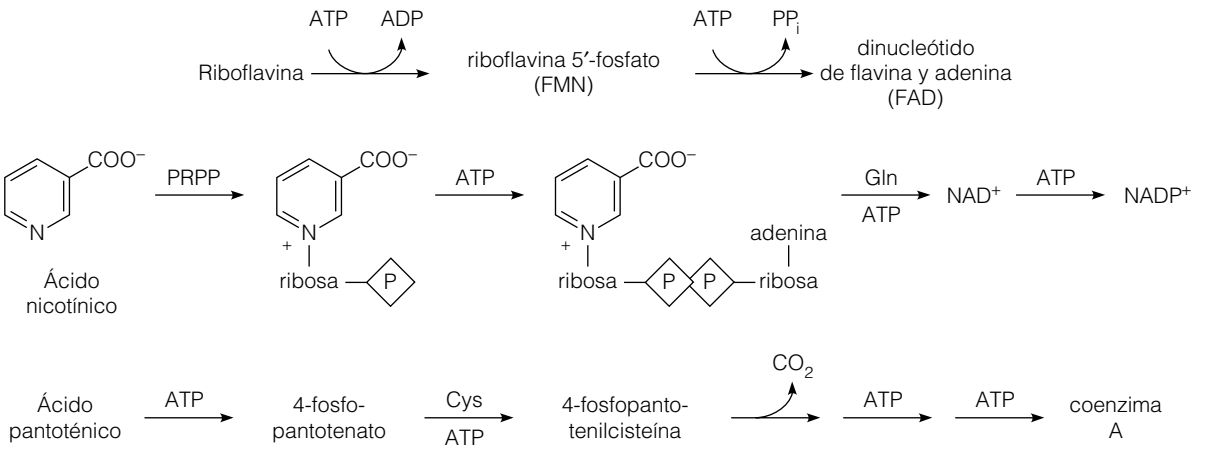
Dado que el ATP es, con mucho, el nucleósido trifosfato más abundante en la mayor parte de las células, las consideraciones de equilibrio y de acción de masas hacen que se utilice con mayor facilidad como donador del fosfato γ (externo) en la síntesis de otros nucleósidos trifosfato.

En la mayor parte de los organismos, la biosíntesis de los desoxirribonucleótidos para la síntesis del DNA se inicia a nivel del ribonucleósido difosfato, con la reducción de la ribosa a 2′ desoxirribosa. Este proceso se presentará con mayor detalle más adelante. En el metabolismo de las purinas, la posterior fosforilación por la nucleósido difosfato quinasa da lugar a los desoxirribonucleósidos trifosfato, dATP y dGTP.

Resumamos brevemente los puntos de regulación mediante retroacción en la biosíntesis de novo de las purinas. Hemos descrito ya el control de la síntesis de IMP, fundamentalmente a través de una regulación por retroacción de la PRPP amidotransferasa. A partir de este punto, el GMP controla su propia biosíntesis mediante la inhibición de la conversión del IMP en XMP, y el AMP controla su propia formación mediante una inhibición de la síntesis de adenilosuccinato. Se ejerce un control adicional a nivel de la biosíntesis de los desoxirribonucleótidos, como comentaremos más adelante.

UTILIZACIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS DE ADENINA EN LA BIOSÍNTESIS DE COENZIMAS

Una función metabólica importante de los nucleótidos de purina es la que desempeñan en la síntesis de coenzimas, fundamentalmente las que contienen un grupo adenilato. Entre ellas se encuentran los nucleótidos de flavina, los nucleótidos de nicotinamida y la coenzima A, como se muestra en el siguiente resumen:



Degradación de las purinas y trastornos clínicos del metabolismo de las purinas

Toda la degradación de purinas da lugar a ácido úrico. En algunos animales se produce una degradación adicional.

FORMACIÓN DE ÁCIDO ÚRICO

El catabolismo de los nucleótidos de purina da lugar a ácido úrico, a través de las rutas que se muestran en la Figura 22.7. Las rutas específicas utilizadas varían en los diversos organismos y en distintos tejidos del mismo organismo. Así, por ejemplo, el AMP, o bien se desamina para producir ácido inosínico (IMP), o se hidroliza para producir adenosina. La desaminación es especialmente activa en el músculo, mientras que la hidrólisis predomina en la mayor parte de los demás tejidos animales.

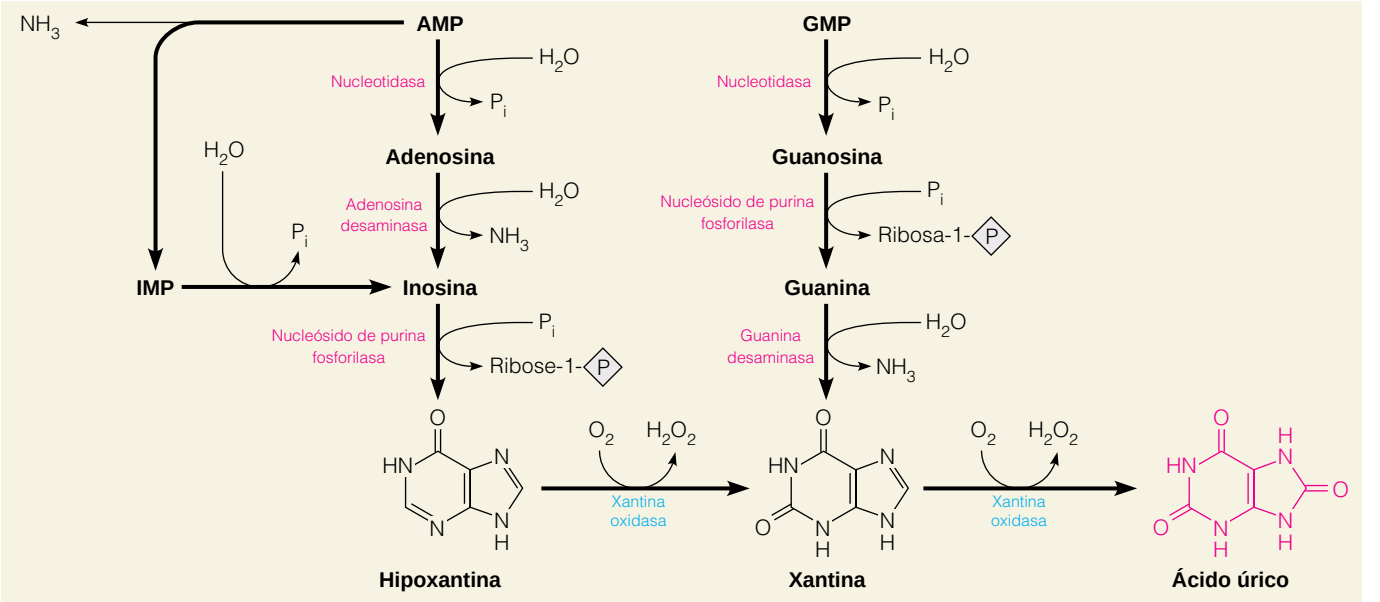


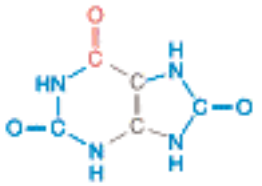
FIGURA **22.7**
Catabolismo de los nucleótidos de purina hasta ácido úrico.

En las rutas de degradación, la adenosina se desamina por la **adenosina desaminasa** (**ADA**) para dar inosina. Tanto la inosina como la guanosina pueden formarse por hidrólisis de los respectivos nucleósidos monofosfato, sobre los que actúa la **nucleósido de purina fosforilasa** (**PNP**) para dar hipoxantina y guanina, respectivamente. La guanina se desamina a xantina por la **guanina desaminasa,** una enzima abundante en el cerebro y en el hígado de los mamíferos. La hipoxantina se oxida a xantina, y la xantina a ácido úrico, por la acción de la **xantina oxidasa.** Esta enzima, que oxida otros varios compuestos nitrogenados heterocíclicos, contiene unido FAD, molibdeno y hierro no hemo. Los electrones obtenidos de la oxidación de los sustratos se transfieren a cada uno de estos transportadores, que finalmente reducen el oxígeno a H_2O_2, sobre el que actúa la catalasa (véase la página 620).

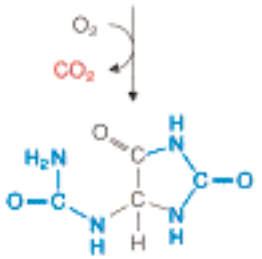
El catabolismo de las purinas en los primates termina en el ácido úrico, que se excreta. Sin embargo, la mayoría de los animales oxidan en mayor medida el anillo de purina, a **alantoína** y luego a **ácido alantoico,** que se excreta (como hacen algunos peces) o se cataboliza a urea (en la mayoría de los peces, algunos moluscos y los anfibios) o amoníaco (en algunos invertebrados marinos). En la Figura 22.8 se muestra la ruta que va del ácido úrico al CO_2.

ACUMULACIÓN EXCESIVA DE ÁCIDO ÚRICO: GOTA

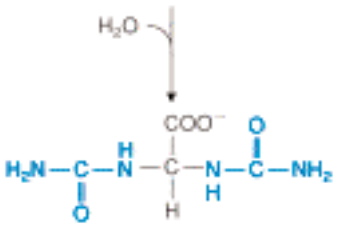
El ácido úrico y sus sales de urato son muy insolubles. Esta propiedad es ventajosa para los animales que ponen huevos, puesto que les proporciona una ruta de eliminación del exceso de nitrógeno en un entorno cerrado: el material de desecho simplemente precipita in situ. Sin embargo, la insolubilidad de los uratos puede plantear dificultades en el metabolismo de los mamíferos. En el ser humano, aproximadamente 3 personas de cada 1000 sufren **hiperuricemia,** elevación crónica de las concentraciones de ácido úrico en sangre por encima de los límites normales. Aunque las causas bioquímicas de la hiperuricemia son diversas, el trastorno se conoce con el nombre clínico único de **gota.** La elevación prolongada o aguda de las concentraciones de urato en sangre causa su precipitación, en forma de cristales de urato sódico, en el líquido sinovial de las articulaciones. Estos precipitados producen inflamación, que causa una artritis do-



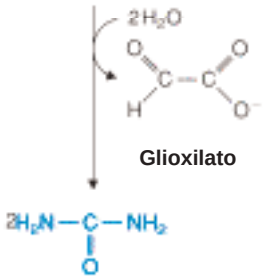
Ácido úrico



Alantoína



Ácido alantoico



Glioxilato

Urea

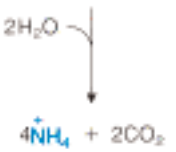


FIGURA **22.8**

Catabolismo del ácido úrico a amoníaco y CO_2.

lorosa que, si no se trata, conduce finalmente a una degeneración grave de las articulaciones. El comer y beber alimentos con abundantes purinas puede provocar ataques agudos de gota en las personas susceptibles. Dado que estos alimentos incluyen aquellos propios de los "ricos", como el hígado, las galletas, las anchoas y el vino, históricamente la gota se ha asociado a un nivel de vida excesivamente alto.

La gota se debe, o bien a una sobreproducción de nucleótidos de purina, que da lugar a una síntesis excesiva de ácido úrico, o bien a un deterioro de la excreción de ácido úrico a través de los riñones. Existen varios defectos enzimáticos específicos que pueden llevar a un exceso de síntesis de purinas, como se muestra en la Figura 22.9. Una forma de gota se caracteriza por una actividad elevada de la PRPP sintetasa (defecto 1), que puede deberse a una falta de sensibilidad a la retroinhibición ejercida por los nucleótidos de purina. Dado que la actividad de la PRPP amidotransferasa está controlada en parte, probablemente, por las concentraciones de los sustratos, una elevación de la cantidad total de PRPP existente en el estado estacionario hace aumentar el flujo a través de la reacción amidotransferasa, que constituye el paso limitante de la velocidad de la biosíntesis de novo de las purinas (véase la Figura 22.4). La gota puede deberse también a mutaciones de la PRPP amidotransferasa que hacen que ésta sea menos sensible a la retroinhibición ejercida por los nucleótidos de purina (defecto 2 de la Figura 22.9). Esta pérdida del control hace aumentar también el flujo a través del paso regulado principal. Otra forma de gota es la que se debe a un déficit de la enzima de salvamento **hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT)** (defecto 3). Ésta es una de las dos fosforribosiltransferasas del metabolismo de las purinas en los animales; la otra es específica de la adenina.

Todavía no conocemos exactamente por qué el déficit de HGPRT comporta un aumento de la tasa de síntesis de los nucleótidos de purina. Una explicación razonable es que la reacción de la HGPRT, cuando está activa, consume PRPP. La disminución del flujo a través de esta reacción, cuando existe un déficit de la enzima, podría hacer aumentar la concentración de estado estacionario del PRPP, con lo que se incrementaría la actividad intracelular de la PRPP amidotransferasa a través de una acción de masa.

Como se ha indicado antes, la gota se debe también a un deterioro de la excreción de ácido úrico. Los pacientes que sufren algunas formas de enfermedad

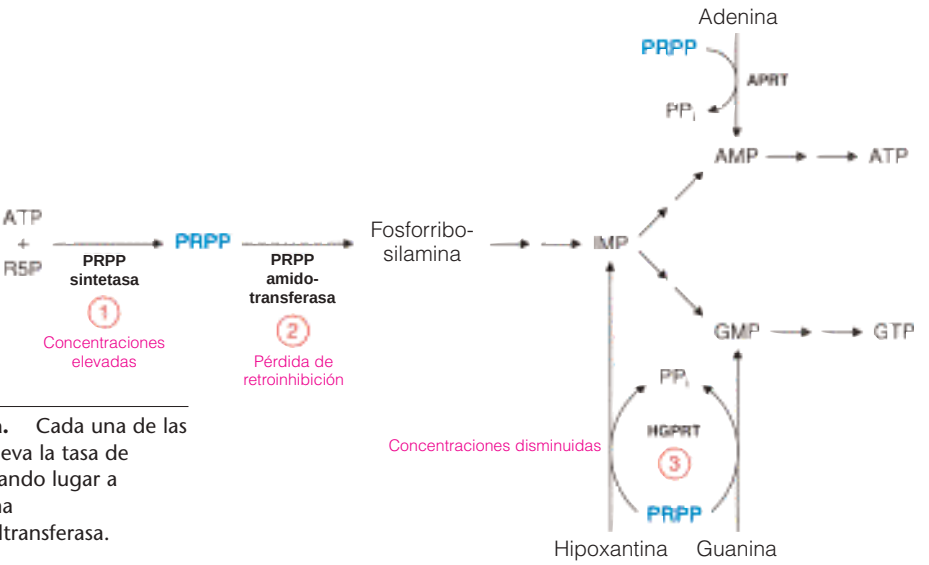


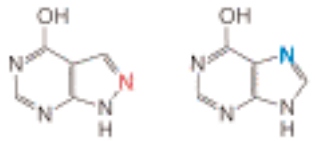
FIGURA **22.9**

Anomalías enzimáticas en tres tipos de gota. Cada una de las tres anomalías enzimáticas que se muestran aquí eleva la tasa de biosíntesis de novo de los nucleótidos de purina, dando lugar a hiperuricemia y gota. HGPRT = hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa; APRT = adenina fosforribosiltransferasa.

de almacenamiento de glucógeno son gotosos. Evidentemente, una hipoglucemia prolongada produce la acumulación de ácidos orgánicos (lactato y similares), y esta acumulación interfiere con la secreción tubular de ácido úrico en el riñón. La gota es también una consecuencia de la quimioterapia del cáncer, presumiblemente como consecuencia de una sobrecarga de purinas causada por la degradación de los ácidos nucleicos tras la muerte de las células tumorales.

Muchos casos de gota se tratan con éxito utilizando el antimetabolito **alopurinol,** un análogo estructural de la hipoxantina que inhibe intensamente a la xantina oxidasa. Esta inhibición produce la acumulación de hipoxantina y xantina, sustancias ambas que son más solubles y, por tanto, más fáciles de excretar que el ácido úrico.

Varias alteraciones genéticas conocidas del metabolismo de las purinas pueden dar lugar a un exceso de síntesis de purinas, a una sobreproducción de ácido úrico y a gota.



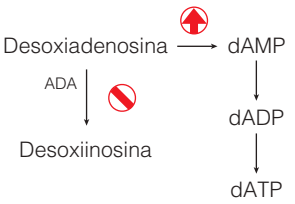
Alopurinol **Hipoxantina**

CONSECUENCIAS DRAMÁTICAS DE UN DÉFICIT GRAVE DE HGPRT: EL SÍNDROME DE LESCH-NYHAN

Un análisis cuidadoso de los pacientes con gota simple debida a un déficit de HGPRT revela unas concentraciones residuales bajas, pero significativas, de la enzima afectada. Evidentemente, las mutaciones que causan la enfermedad alteran la actividad catalítica de la enzima pero no causan una abolición completa de la misma. Las consecuencias de las "mutaciones nulas", que causan una ausencia total de la enzima, son mucho más graves. Este trastorno fue descrito por primera vez en 1964 por el estudiante de medicina Michael Lesch y su tutor de la Facultad, William Nyhan. El síndrome de Lesch-Nyhan es un rasgo ligado al sexo, ya que el gen estructural de la HGPRT está situado en el cromosoma X. Los pacientes con este trastorno presentan una artritis gotosa grave, pero también sufren una disfunción dramática del sistema nervioso, que se manifiesta en trastornos de la conducta, discapacidad para el aprendizaje y comportamientos hostiles o agresivos, a menudo contra sí mismos. En los casos más extremos, los pacientes se muerden las puntas de los dedos o, si no se les impide, los labios, causandose automutilaciones graves. Nyhan ha asimilado esta conducta a la de "morderse las uñas, con el volumen al máximo". La causa bioquímica de este patrón de comportamiento extraño no se conoce, pero el trastorno, aunque raro, tiene un gran interés, puesto que todas las aberraciones derivan en última instancia del déficit de una sola enzima bien caracterizada que afecta a las concentraciones de HGPRT. En la actualidad no disponemos de ningún tratamiento eficaz, y las personas afectadas presentan una artritis gotosa tan grave que rara vez superan los 20 años de vida. No obstante, el trastorno puede diagnosticarse prenatalmente mediante amniocentesis, ya que las células de los fetos con Lesch-Nyhan no son capaces de incorporar la hipoxantina marcada radiactivamente a los ácidos nucleicos.

CONSECUENCIAS IMPREVISTAS DEL CATABOLISMO DEFECTUOSO DE LAS PURINAS: INMUNODEFICIENCIA

Una característica sorprendente del metabolismo de las purinas en el ser humano es la que se descubrió en 1972, en los estudios realizados sobre un trastorno hereditario denominado **síndrome de inmunodeficiencia combinada grave.** Los pacientes con esta alteración son vulnerables a las enfermedades infecciosas y, a menudo, fallecen por esta causa, debido a su total incapacidad para poner en marcha una respuesta inmunitaria ante la exposición antigénica. En este trastorno están afectados tanto los linfocitos B como los T; ninguna de estas dos clases de células es capaz de proliferar como debiera hacerlo para sintetizar anticuerpos. En muchos de estos casos, la inmunodeficiencia se debe a una ausencia hereditaria de la enzima degradativa adenosina desaminasa (ADA).

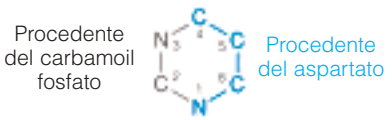


¿Cuál es el fundamento de esta inesperada relación? En primer lugar, la adenosina desaminasa actúa también sobre la desoxiadenosina, que procede de la degradación del DNA. En segundo lugar, los glóbulos blancos poseen unas concentraciones elevadas de las enzimas de salvamento, como las nucleósido quinasas; así pues, la adenosina y la desoxiadenosina que se acumulan se convierten con facilidad en los leucocitos en sus respectivos nucleótidos. Estos nucleótidos incluyen el dATP, que es un inhibidor potente de la replicación del DNA, ya que inhibe la síntesis de los desoxirribonucleótidos a partir de los ribonucleótidos (véase la página 911). Para que se produzca una respuesta inmunitaria, los glóbulos blancos deben proliferar. Esta proliferación requiere una síntesis abundante de DNA y de sus precursores. Pueden intervenir también otros mecanismos adicionales, ya que se ha observado que el dATP causa la muerte de los glóbulos blancos aunque no estén en fase de proliferación. Uno de estos mecanismos se descubrió en 1997, cuando se publicó que el dATP es un agente de señalización que ayuda a desencadenar los acontecimientos metabólicos iniciales que conducen a la apoptosis (Capítulo 28).

El déficit de adenosina desaminasa es la primera enfermedad tratada mediante genoterapia. En 1995, dos niñas con la enfermedad fueron tratadas con un vector vírico en el que se había introducido, mediante tecnología de DNA recombinante, el gen de la adenosina desaminasa, con la esperanza de que el virus modificado pudiera establecerse a sí mismo en bastantes células para proporcionar una cantidad suficiente de enzima para degradar los compuestos de desoxiadenosina acumulados. Tres años después del tratamiento experimental, las dos pacientes gozaban de buena salud.

Una inmunodeficiencia menos grave es la que se debe a la falta de otra enzima de degradación de las purinas, la purina nucleósido fosforilasa (PNP). La actividad reducida de esta enzima lleva a la acumulación fundamentalmente de dGTP. Esta acumulación afecta también a la replicación del DNA, pero de manera menos grave que el exceso de dATP. Es interesante señalar que el déficit de fosforilasa destruye tan sólo la clase T de linfocitos y no las células B.

Metabolismo de los nucleótidos de pirimidina



La síntesis de los nucleótidos de pirimidina se produce principalmente al nivel de la base libre, con la conversión al nucleótido en una fase posterior de la ruta no ramificada.

BIOSÍNTESIS DE NOVO DEL ANILLO DE PIRIMIDINA

Pasemos ahora a la biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina, que es mucho más sencilla que la formación de los nucleótidos de purina, que son estructuralmente mucho más complejos. Al igual que la biosíntesis de purinas, esta ruta es idéntica en la práctica totalidad de los organismos que se han estudiado. Sin embargo, como se resume en la Figura 22.10, existen dos diferencias importantes respecto a la ruta de las purinas. En primer lugar, el anillo de pirimidina se ensambla en forma de una base libre, y la conversión en un nucleótido se produce en una fase posterior de la ruta, cuando la base **ácido orótico** se convierte en orotidina monofosfato u OMP. En segundo lugar, la ruta de las pirimidinas no está ramificada. La uridina trifosfato, uno de los dos ribonucleósidos trifosfato comunes y, por tanto, un producto final de la ruta, es también el sustrato de la formación de citidina trifosfato, que es el otro producto final.

CONTROL DE LA BIOSÍNTESIS DE PIRIMIDINAS EN LAS BACTERIAS

La síntesis de pirimidinas se inicia con la formación de carbamoil fosfato, una reacción que se ha presentado en el Capítulo 20 (véase la página 803 y la reacción 1 de la Figura 22.10). Sin embargo, la primera reacción dirigida de manera exclusiva a la síntesis de pirimidinas es la formación del carbamoil asparta-

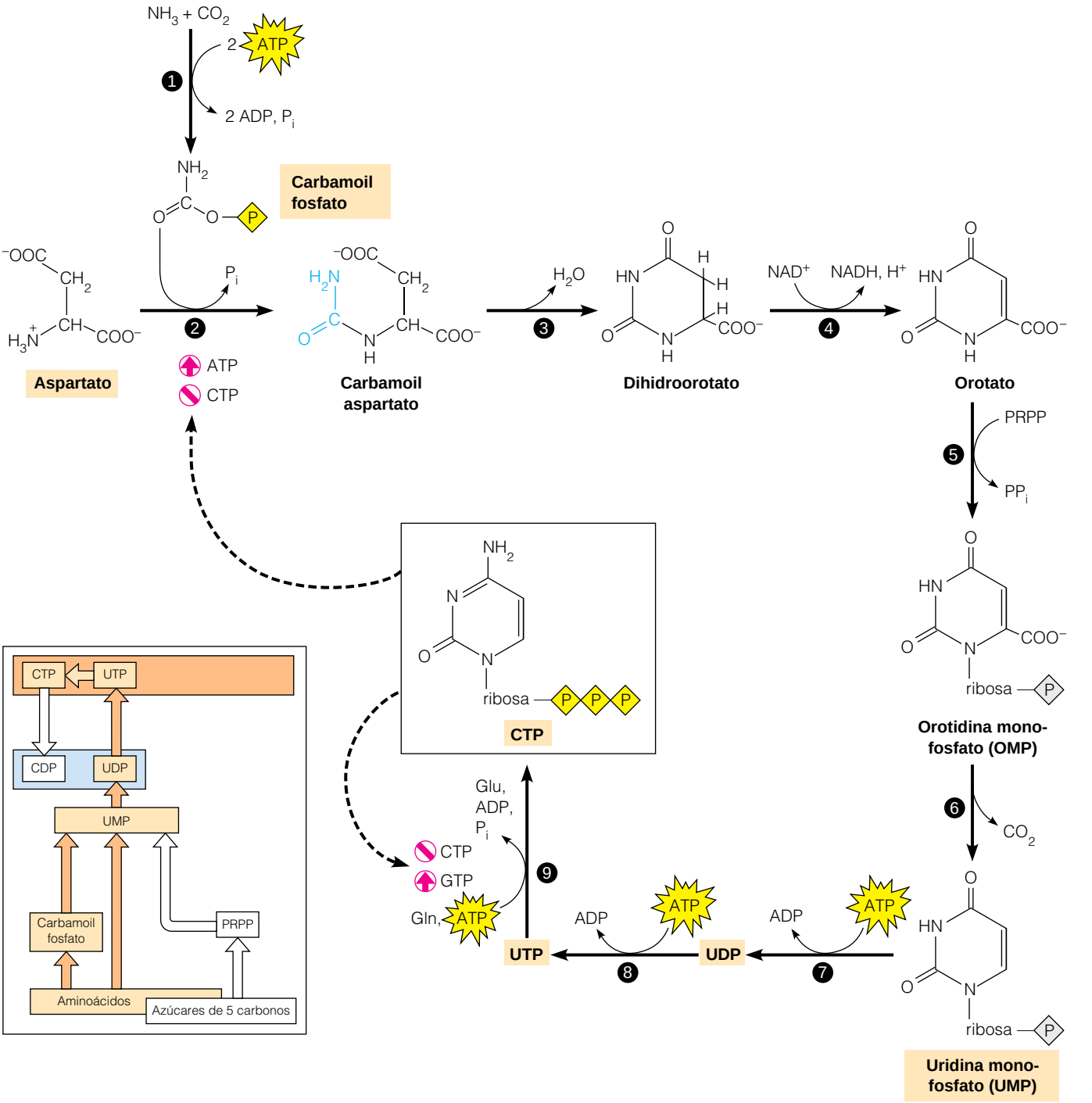


FIGURA **22.10**

Síntesis de novo de los nucleótidos de pirimidina. Se indican los lugares de control alostérico. Las enzimas son las siguientes: (1) carbamoil fosfato sintetasa, (2) aspartato transcarbamoilasa, (3) dihidroorotasa, (4) dihidroorotato deshidrogenasa, (5) orotato fosforribosiltransferasa, (6) orotidilato descarboxilasa, (7) UMP quinasa, (8) nucleósido difosfato quinasa y (9) CTP sintetasa.

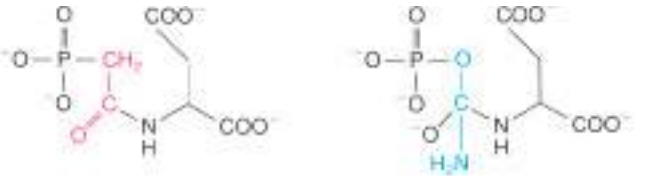
to a partir de carbamoil fosfato y aspartato, catalizada por la aspartato transcarbamoilasa, o ATCasa (reacción 2). En las bacterias entéricas, esta enzima constituye un maravilloso ejemplo de control por retroacción, como se ha manifestado ampliamente en el Capítulo 11. Recuérdese que la enzima se inhibe por el producto final CTP y se activa por el ATP; esto último representa probablemente un mecanismo para mantener en equilibrio la biosíntesis de purinas y pirimidinas. Recuérdese también que la enzima contiene seis de cada uno de los dos tipos de subunidades, dispuestas en forma de dos trímeros catalíticos y tres dímeros reguladores.

Las bacterias regulan también el metabolismo de las pirimidinas a través del control de la *síntesis* de la ATCasa y las otras enzimas. La tasa de transcripción de un operón que codifica las dos subunidades de la ATCasa puede variar hasta 150 veces, en función de la concentración intracelular de UTP. Cuanto mayor es la concentración de UTP, menor es la tasa de transcripción de estos genes.

En los eucariotas, las tres primeras reacciones de la síntesis de pirimidinas están catalizadas por una enzima multifuncional, la proteína CAD.

ENZIMAS MULTIFUNCIONALES EN LA SÍNTESIS DE PIRIMIDINAS DE LOS EUCARIOTAS

La aspartato transcarbamoilasa de los eucariotas difiere notablemente de la enzima de *E. coli*. Esto se descubrió mediante el análisis de la inhibición de la ATCasa por el ***N*-fosfonoacetil-L-aspartato (PALA).**



PALA **Supuesto complejo del estado de transición**

Este compuesto, que se sintetiza como un análogo del supuesto complejo del estado de transición formado entre los dos sustratos, inhibe la síntesis de pirimidinas en las células de los mamíferos. Sin embargo, con el tiempo las células adquieren resistencia al mismo, ya que las concentraciones de ATCasa aumentan en estas células hasta superar la capacidad del PALA de inhibir toda la actividad. Sorprendentemente, estas células resistentes contienen unas concentraciones similarmente elevadas de carbamoil fosfato sintetasa (véase la reacción 1 de la Figura 22.10) y dihidroorotasa (reacción 3). La explicación de esta observación se obtuvo con el descubrimiento de una única proteína que contenía tres cadenas polipeptídicas idénticas, cada una con un M_r de aproximadamente 230 000, que cataliza las tres reacciones.

George Stark ha asignado a esta enzima trifuncional el acrónimo **CAD** (de la primera letra del nombre de cada enzima). Este autor demostró que la proteína se acumula en las células resistentes al PALA debido a que el gen que codifica la proteína se amplifica como consecuencia de la presión selectiva ejercida por el PALA; las células resistentes contienen muchas más copias del gen que el complemento normal de dos copias por célula diploide. Este fenómeno de **amplificación** génica se ha observado ahora muchas veces en las células eucariotas expuestas a un estrés prolongado y específico. Comentaremos los mecanismos que intervienen en este proceso en el Capítulo 25.

En las células de los mamíferos, las reacciones 5 y 6 de la Figura 22.10 están catalizadas también por una sola proteína, a la que se ha denominado **UMP sintasa.** No conocemos mucho de la forma en que esto afecta a la regulación de la biosíntesis de pirimidinas, pero la yuxtaposición de los lugares activos puede permitir la canalización, como se ha mencionado para las proteínas multifuncionales de la síntesis de purinas. Nos falta aún mucho por averiguar respecto a cómo se canalizan los intermediarios de la biosíntesis de las pirimidinas, si ello ocurre, ya que la dihidroorotato deshidrogenasa (véase la reacción 4 de la Figura 22.10) está situada en la membrana mitocondrial externa, mientras que las enzimas bifuncionales y trifuncionales son ambas citosólicas. Teniendo en cuenta que los intermediarios deben entrar y salir de las mitocondrias, la ventaja cinética que proporciona la canalización del primer y último paso parece quedar anulada. No se entiende la lógica metabólica de esta canalización metabólica incompleta.

Otro lugar de control de la síntesis de nucleótidos de pirimidina es la amidotransferasa, **CTP sintetasa,** que convierte el UTP en CTP (reacción 9). Esta enzima se inhibe alostéricamente por su producto el CTP y se activa por el GTP.

SÍNTESIS DE SALVAMENTO Y CATABOLISMO DE LAS PIRIMIDINAS

Los nucleótidos de pirimidina se sintetizan también mediante rutas de salvamento, en las que intervienen fosforilasas y quinasas, comparables a las que se han presentado para las purinas. Las rutas catabólicas para las pirimidinas, que se resumen en la Figura 22.11, son más sencillas que las de las purinas. Dado que los intermediarios son relativamente solubles, existen pocas alteraciones conocidas de la degradación de las pirimidinas. Uno de los productos de degradación, la β-alanina, se utiliza en la biosíntesis de la coenzima A.

Biosíntesis y metabolismo de los desoxirribonucleótidos

La mayoría de las células contienen una cantidad de RNA que es de 5 a 10 veces la de DNA. Además, como hemos visto, los ribonucleótidos desempeñan un gran número de funciones metabólicas, mientras que los desoxirribonucleótidos sólo se emplean como constituyentes del DNA. En consecuencia, la mayor parte del carbono que fluye por las rutas de síntesis de nucleótidos va a parar al depósito de ribonucleósidos trifosfato (rNTP). Sin embargo, la fracción relativamente pequeña que se deriva hacia la síntesis de los desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP) es de una importancia capital para la vida de la célula. Los dNTP se utilizan casi exclusivamente en la biosíntesis del DNA. Por consiguiente, existen unas relaciones reguladoras especialmente estrechas entre la síntesis de DNA y el metabolismo de los dNTP, en mayor medida que las observadas entre otras biosíntesis macromoleculares y las rutas que aportan sus precursores. En la Figura 22.12 se presentan las rutas completas de la biosíntesis de los dNTP.

Si recordamos que el DNA difiere químicamente del RNA en la naturaleza del azúcar y en la identidad de una de las bases pirimidínicas, podemos centrar nuestra consideración de la biosíntesis de los desoxirribonucleótidos en dos procesos específicos: la conversión de la ribosa en desoxirribosa y la conversión del uracilo en timina. Ambos procesos se producen a nivel del nucleótido, y ambos tienen un gran interés desde el punto de vista del mecanismo, como objetivos de la quimioterapia del cáncer o de las enfermedades infecciosas, y desde el punto de vista de la regulación. Presentaremos, pues, ambos procesos con cierto detalle.

REDUCCIÓN DE LOS RIBONUCLEÓTIDOS A LOS DESOXIRRIBONUCLEÓTIDOS

Desde el punto de vista del mecanismo, la reducción de la ribosa a desoxirribosa comporta la sustitución del hidroxilo de C-2 por un ion hidruro, conservando la configuración. Peter Reichard demostró que esta reacción difícil se produce a nivel del nucleótido, lo cual condujo al descubrimiento de la enzima importante **ribonucleótido reductasa.** En todos los organismos estudiados hasta ahora, una sola enzima reduce los cuatro ribonucleótidos comunes a los correspondientes 2′-desoxirribonucleótidos. En la reacción interviene un mecanismo de radicales libres. Aunque la evolución ha creado tres mecanismos muy diferentes para generar un radical libre funcional, las tres clases de ribonucleótido reductasa evidentemente utilizan todas la misma química fundamental para

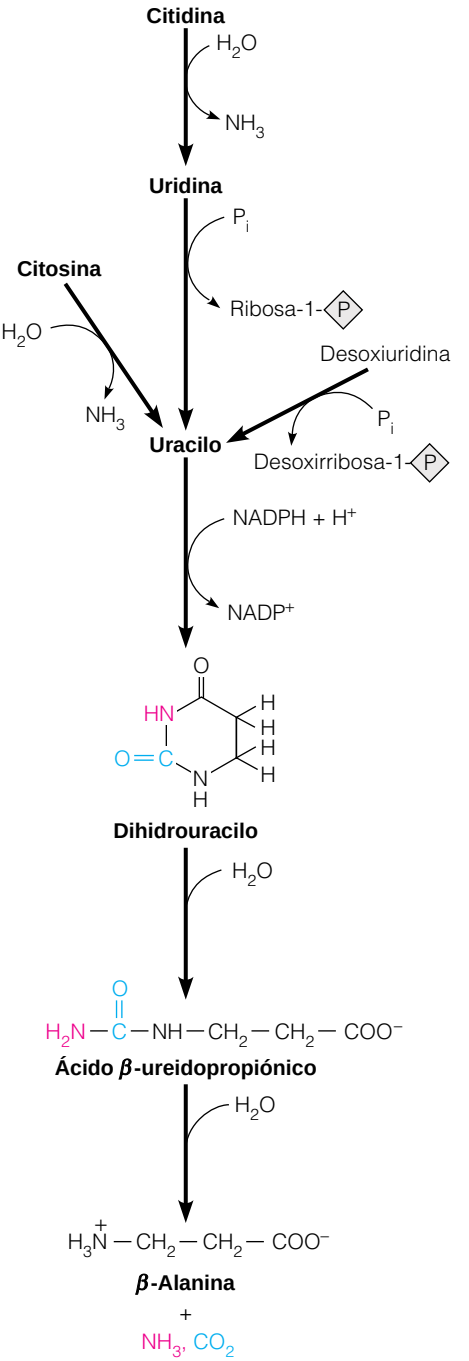
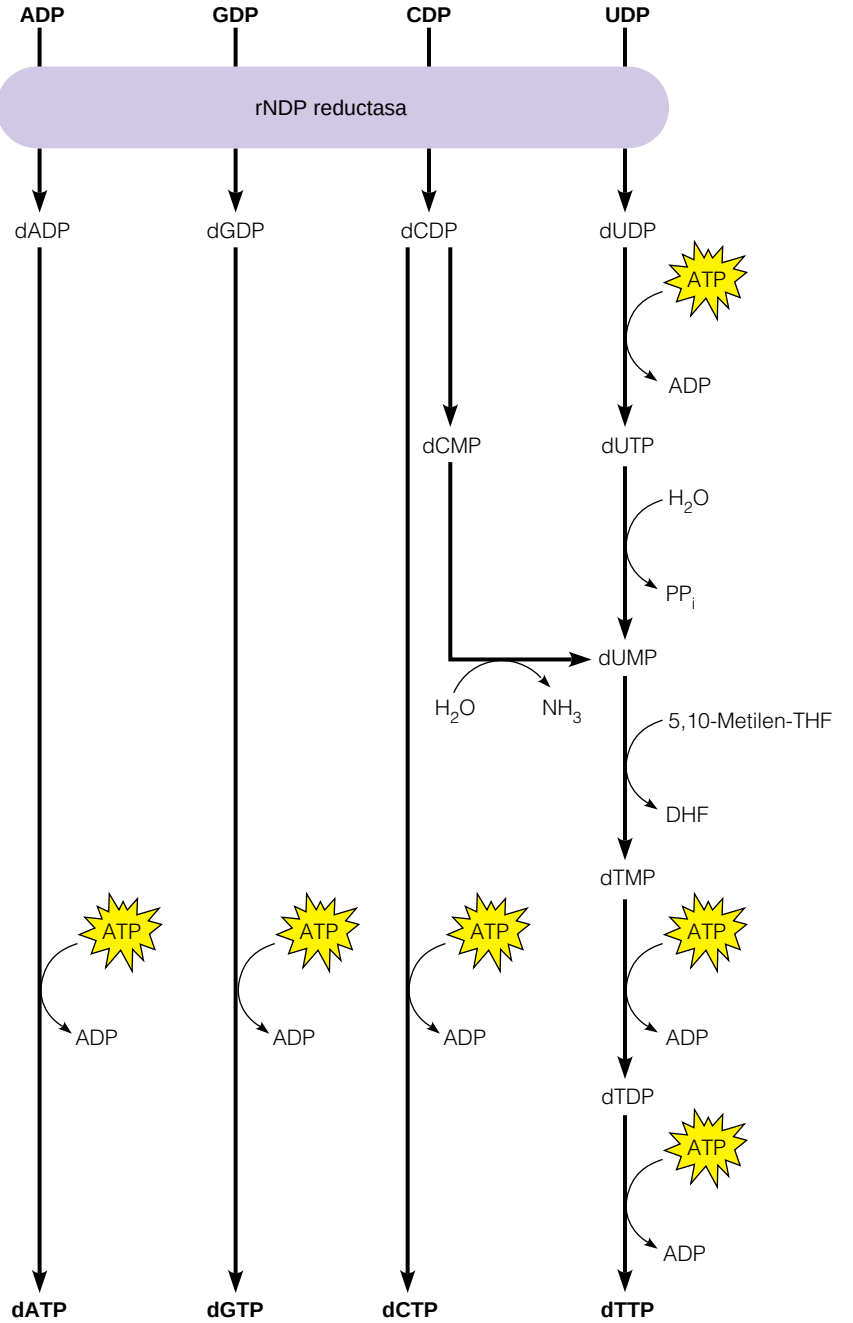


FIGURA **22.11**

Rutas catabólicas en el metabolismo de los nucleótidos de pirimidina.

FIGURA **22.12**
Visión general de la biosíntesis de los desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP).



Una enzima, la ribonucleótido reductasa, reduce los cuatro ribonucleótidos a sus derivados desoxirribo.

reducir los sustratos. La forma enzimática más extendida, denominada ribonucleótido reductasa de clase I, actúa sobre los ribonucleósidos difosfato como sustratos, por lo que también se la denomina **rNDP reductasa.** Esta enzima genera su radical sobre un residuo específico de tirosina, con la ayuda de un puente de oxígeno diférrico (véase la página 910). Las enzimas de clase II, que se encuentran en las cianobacterias, algunas bacterias y *Euglena*, actúan sobre los ribonucleósidos trifosfato como sustratos y utilizan adenosilcobalamina, una coenzima de B_{12}, para generar un radical libre. Las enzimas de tipo III, que sólo se encuentran en los anaerobios facultativos u obligados, actúan sobre los ribonucleósidos trifosfato como sustratos. Estas enzimas utilizan *S*-adenosilmetionina y un centro hierro-azufre para generar el radical catalítico esencial sobre un

residuo de glicina. Nuestra exposición se centrará en la clase I, la forma más extendida, cuya acción se muestra en la Figura 22.12.

Estructura de la rNDP reductasa

La ribonucleótido reductasa contiene residuos catalíticos en cada una de sus subunidades: tioles activos redox y un radical libre de tirosina estabilizado por un complejo hierro-oxígeno.

Tal como se encuentra en *E. coli* y en las células de los mamíferos, la rNDP reductasa de clase I es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$. La enzima de *E. coli* contiene dos proteínas: R1, con dos cadenas polipeptídicas α idénticas y con un M_r de 87 000 cada una, y R2, formada por dos cadenas β de 43 000 dalton. En la Figura 22.13 se ilustra la estructura de la enzima. El lugar catalítico se encuentra en la proteína grande (R1). En este lugar hay tres residuos de cisteína, que están conservados en diferentes rNDP reductasas. Dos de los tioles de cisteína son **activos redox,** y se les da este nombre porque sufren una oxidación y reducción cíclicas durante la reacción. La tercera cisteína funciona evidentemente como parte del mecanismo del radical libre que se describe en el apartado siguiente.

El dímero R2 contiene un radical libre de tirosina poco común, que interviene en la reacción, y un átomo de oxígeno que forma un puente entre dos iones férricos. Este **centro de hierro dinuclear** estabiliza el radical libre. La proteína R1 contiene dos clases de lugares reguladores, que consideraremos en breve. Por último, la proteína R1 contiene un par adicional de grupos tiol activos re-

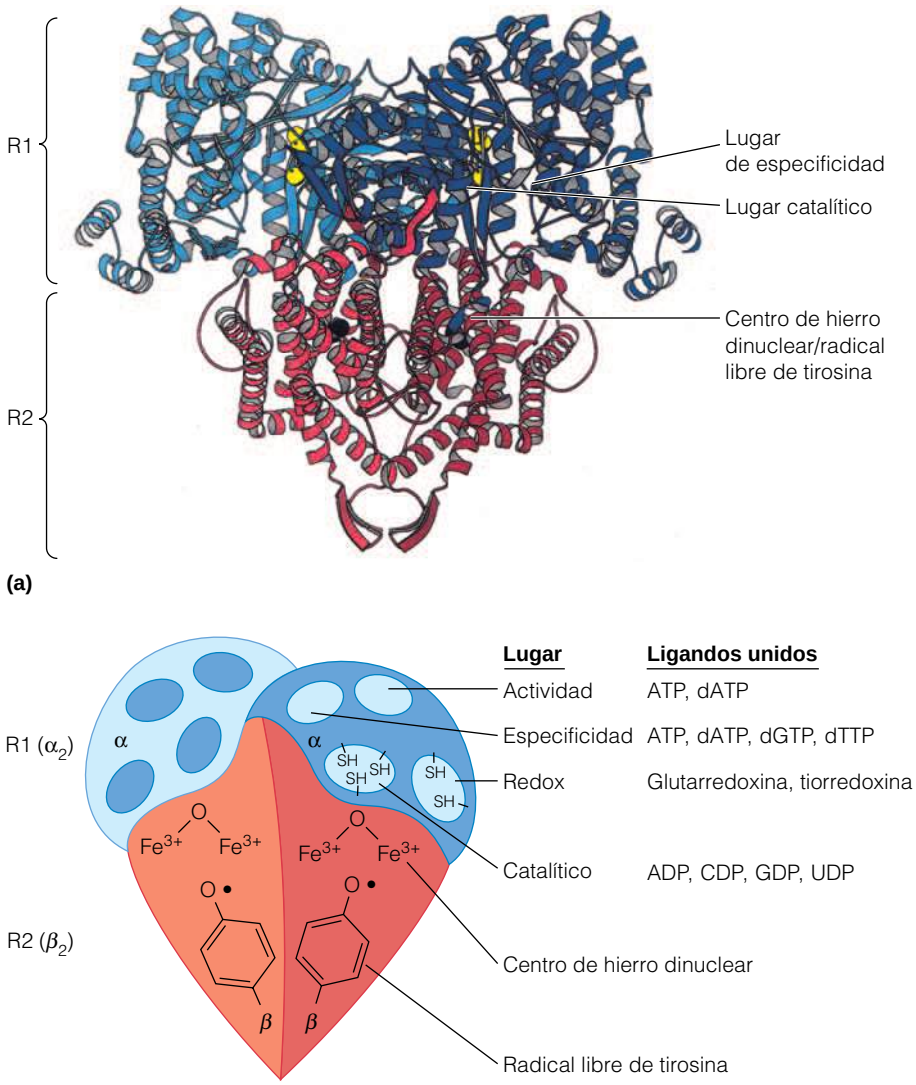
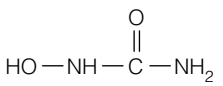


FIGURA **22.13**

Estructura de la ribonucleósido difosfato reductasa de *E. coli*. **(a)** Modelo de la estructura molecular de la holoenzima R1R2, basado en el análisis cristalográfico de las proteínas homodiméricas R1 (azul) y R2 (rojo) separadas. Las esferas amarillas son cisteínas del lugar activo. **(b)** Diagrama esquemático que identifica el centro funcional de R2: un radical libre de tirosina y un centro de hierro dinuclear con un oxígeno de puente. También se muestran los lugares de unión del ligando en R1: un lugar redox para la interacción con un donador de electrones externo, el lugar catalítico, el lugar de actividad y el lugar de especificidad de sustrato. Los lugares de actividad y especificidad están controlados alostéricamente. El lugar redox contiene dos residuos de cisteína funcionales, y el lugar catalítico contiene tres.

(a) Tomado de U. Uhlin y H. Eklund, *Nature* (1994) 370:533-539. © 1994 Macmillan Magazines, Ltd.



Hidroxiurea

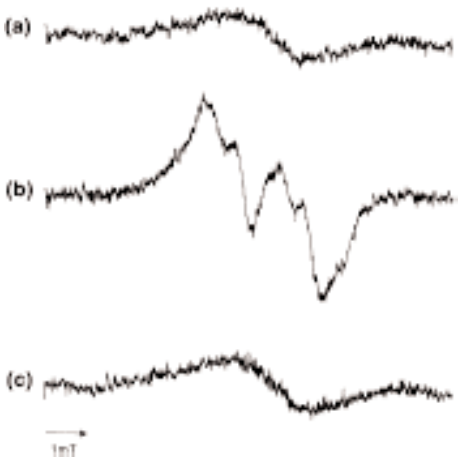


FIGURA **22.14**

Pruebas de que la tirosina 122 de la proteína R2 de *E. coli* lleva el radical libre esencial. La figura muestra los espectros de resonancia paramagnética electrónica de células de *E. coli* que contienen un gen clonado que sobreexpresa R2. **(a)** Bacterias que no contienen ningún clon (la concentración normal de la proteína R2 es demasiado baja para crear una señal espectral significativa). **(b)** Bacterias que contienen el gen silvestre clonado. **(c)** Bacterias que contienen un gen clonado mutante en el que la tirosina 122 se ha cambiado por fenilalanina. El tratamiento de la enzima purificada con hidroxiurea proporciona un espectro como el que se presenta en (c).

Tomado de Å. Larsson y B. M. Sjöberg, *EMBO J.* (1986) 3:2038. Con permiso de Oxford University Press.

dox, que interaccionan con un cofactor reductor externo. La enzima de los mamíferos tiene una estructura similar.

Mecanismo de la reducción de los ribonucleótidos

Aunque todavía no conocemos el mecanismo completo de la reacción de la rNDP reductasa, podemos formular un mecanismo plausible basándonos en las siguientes observaciones. (1) Los estudios de marcaje radiactivo indican que durante la reacción se produce la ruptura del enlace C-3′—H de la ribosa. (2) La reacción se produce conservando la configuración de C-2′, lo cual descarta un desplazamiento del grupo hidroxilo por un ion hidruro en una reacción S_N2. (3) Los grupos tioles se oxidan durante la reacción. (4) El radical libre de tirosina participa en la reacción. Esto se demostró por primera vez al observar que la **hidroxiurea,** un inhibidor de la rNDP reductasa, destruía reversiblemente el radical libre. En la Figura 22.14 se presenta una demostración más elegante. El radical libre produce un espectro de resonancia paramagnética electrónica (RPE) característico. La tirosina 122, que es el residuo que se cree genera el radical en la enzima de *E. coli*, se cambió por una fenilalanina mediante una mutagénesis de lugar dirigida del gen clonado de R2. La proteína modificada era inactiva y no presentaba un espectro de RPE; en consecuencia, no había indicios de la existencia de un radical libre. Sin embargo, dado que el radical está situado lejos del lugar catalítico, como demuestra la cristalografía (véase la Figura 22.13), debe postularse la existencia de algún tipo de proceso de largo alcance mediante el cual el electrón desapareado del radical de la tirosina atrae un electrón de un residuo del lugar activo. Los datos existentes indican que (1) este residuo es la cisteína 439 en la enzima de *E. coli*, y (2) participan en el proceso de transporte electrónico de largo recorrido un conjunto específico de residuos de aminoácidos de R1 y R2.

Un mecanismo plausible para la rNDP reductasa, basado en las observaciones anteriores, es el que se muestra en la Figura 22.15. En primer lugar, la cisteína 439 del lugar activo se convierte en un **radical libre tiilo,** mediante la pérdida de un electrón, en una cadena de transporte electrónico que da lugar a la reducción de la tirosina 122 (paso 1). A continuación, el radical tiilo participa en la extracción de un átomo de hidrógeno del C-3′ del sustrato (paso 2). Esto va seguido por la pérdida de un ion hidróxido de C-2′, que produce un ion radical carbonio estabilizado por resonancia (pasos 2 y 3). La enzima transfiere un par de electrones desde los tioles de cisteína activa redox y un átomo de hidrógeno desde la cisteína 439 (paso 4), para dar el producto nucleótido. El residuo de cistina resultante se reduce entonces por un intercambio de disulfuro con otro par de tioles activos redox de la subunidad R1; este paso no se muestra en la figura. El disulfuro resultante es reducido por un cofactor externo (que se indica con Grx; véase el apartado siguiente), con lo que se regenera la forma activa de la enzima.

El mecanismo que se muestra en la Figura 22.15 es incompleto, puesto que quedan por resolver varias cuestiones importantes. En primer lugar, no conocemos el papel del centro de hierro en la formación del radical libre. Un mecanismo posible, que recuerda la activación del citocromo P450, es el que se muestra en el margen. Además, como se considera en el apartado siguiente, no está claro cómo se transfiere el poder reductor externo a través de un par de tioles en el lugar redox de R1, al otro par en el lugar catalítico.

Origen de los electrones para la reducción de los rNDP

Los electrones para la reducción de los ribonucleótidos proceden en última instancia del NADPH, pero son trasladados a la rNDP reductasa por una coenzima que es poco habitual, ya que es una proteína (Figura 22.16). El primer

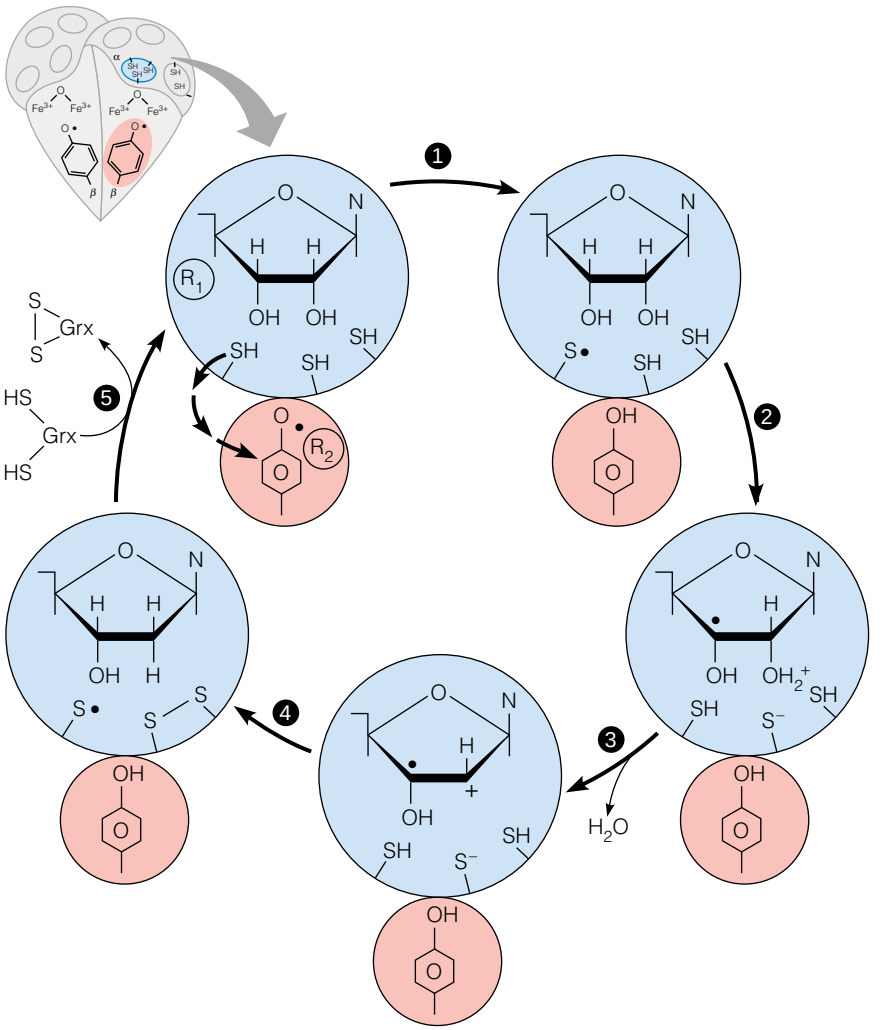


FIGURA **22.15**

Reducción de un ribonucleósido difosfato por la rNDP reductasa. Este mecanismo parcial concuerda con los datos existentes al respecto. N es adenina, citosina, guanina o uracilo. **Paso 1:** una cisteína del lugar catalítico R1 (Cis 439 en *E. coli*) pierde un electrón para pasar a ser un radical tiilo, y una cadena de transporte electrónico reductora reduce el radical libre de tirosina situado en R2 a un residuo de tirosina. **Paso 2:** el nucleótido sustrato interactúa con el radical, creando un radical en C-3′. **Pasos 2 y 3:** la protonación y deshidratación en C-2′ crean un catión radical. **Paso 4:** la reducción en C-2′ por las cisteínas activas redox (225 y 462 en *E. coli*) y la transferencia de un electrón a C-3′ dan lugar al producto desoxirribonucleótido y regeneran el radical tiilo. **Paso 5:** los tioles activos redox se reducen mediante la interacción con la glutarredoxina (Grx), y la disociación del dNDP (no mostrada) permite la unión del sustrato rNDP.

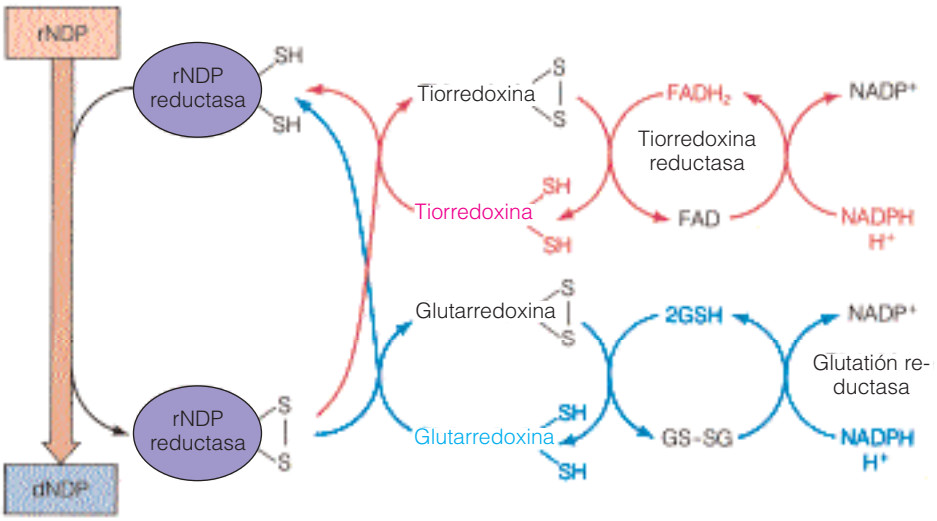
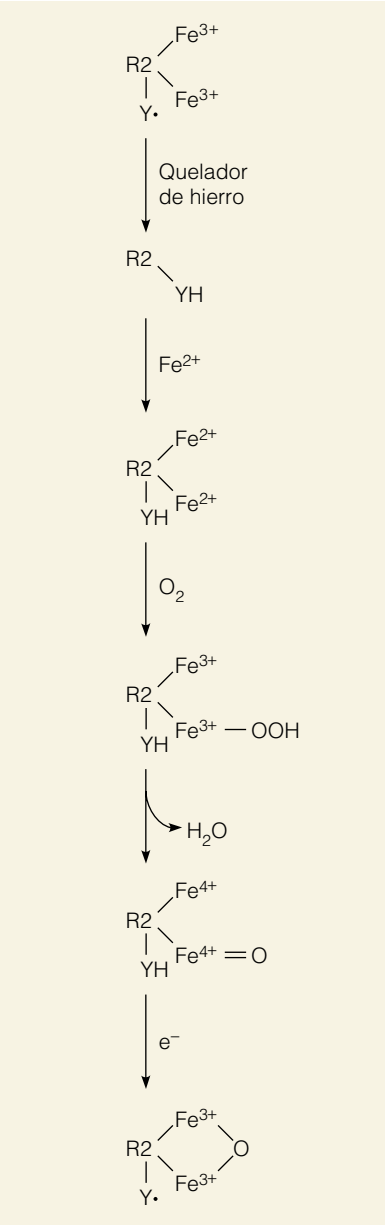


FIGURA **22.16**

Secuencia de transporte electrónico reductora en la acción de la rNDP reductasa. La tiorredoxina o la glutarredoxina pueden reducir la forma oxidada de la reductasa.

miembro conocido de esta clase de proteínas activas redox es la **tiorredoxina,** una proteína pequeña ($M_r \cong 12\,000$), con dos grupos tioles en la secuencia Cys-Gly-Pro-Cys. Estos tioles experimentan una oxidación reversible a disulfuro, con lo que reducen los azufres del lugar activo de la rNDP reductasa. La tiorredoxina



La ribonucleótido reductasa utiliza un cofactor proteico, la tiorredoxina o la glutarredoxina, para proporcionar electrones para la reducción del sustrato ribonucleótido. No obstante, el donador final de los electrones es el NADPH.

oxidada se reduce por el NADPH a través de la acción de una enzima flavoproteica, la **tiorredoxina reductasa.**

Tras su descubrimiento, se ha comprobado que la tiorredoxina tiene múltiples actividades in vitro, lo cual sugiere una gama sorprendente de funciones biológicas. Algunas de ellas se indican en la Tabla 22.1. El hecho de que la tiorredoxina fuera el verdadero cofactor intracelular para la reducción de los ribonucleótidos se puso en duda con el aislamiento de mutantes de *E. coli* que carecían de esta proteína. Dado que estos mutantes eran capaces de realizar la replicación del DNA, los investigadores buscaron en estas células otras proteínas redox que pudieran interaccionar con la rNDP reductasa. Se encontró una proteína de este tipo a la que se denominó **glutarredoxina,** por su capacidad para reducirse por el glutatión. Existen mutantes viables que carecen de tiorredoxina y de glutarredoxina, pero necesitan cisteína para su crecimiento. Esta observación confirma el papel que desempeña la tiorredoxina en la utilización del sulfato (véase la página 842), y sugiere la existencia de un tercer transportador electrónico. De hecho, se han descubierto otras especies moleculares adicionales de glutarredoxina. Sea cual sea el transportador que actúe como cofactor principal para la rNDP reductasa, el origen último de los electrones es el NADPH.

Regulación de la actividad de la ribonucleótido reductasa

Dado que los desoxirribonucleótidos se utilizan únicamente en la síntesis del DNA, y puesto que se emplea un solo sistema enzimático para la reducción de los cuatro sustratos ribonucleótidos, la regulación de la *actividad* y de la *especificidad* de la ribonucleótido reductasa es esencial para mantener unas cantidades equilibradas de los precursores del DNA. Esta regulación se lleva a cabo mediante la unión de efectores nucleósido trifosfato a dos clases de lugares reguladores en la subunidad R1 (dos de cada lugar por molécula en la enzima de *E. coli*; véase la Figura 22.13). Los **lugares de actividad** unen ATP o dATP, con una afinidad relativamente baja, mientras que los **lugares de especificidad** unen ATP, dATP, dGTP o dTTP, con una alta afinidad para todos ellos. La unión de ATP a los lugares de actividad tiende a aumentar la eficacia catalítica de la rNDP reductasa para todos los sustratos, mientras que el dATP actúa como inhibidor general de las cuatro reacciones. La unión de los nucleótidos en los lugares de especificidad modula las actividades de la enzima respecto a diferentes sustratos, de manera que se mantiene un equilibrio en la producción de los cuatro dNTP. Así, por

TABLA 22.1 Actividades biológicas de la tiorredoxina

Actividad	Organismo
Cofactor para la reducción de ribonucleótidos	Todos los organismos
Plegado de proteínas (la tiorredoxina fomenta la formación correcta de los enlaces disulfuro)	Todos los organismos
Posible control de las concentraciones de insulina, mediante el control de la reducción de la insulina	Animales
Control de la formación de melanina (las personas con concentraciones elevadas de tiorredoxina reductasa se broncean con facilidad)	Animales
Regulación de la fijación fotosintética del carbono (véase el Capítulo 17)	Plantas
Reducción del sulfito (véase el Capítulo 21)	Plantas, bacterias
Subunidad esencial de la DNA polimerasa vírica	Bacteriófago T7
Maduración de los fagos filamentosos por un mecanismo desconocido	Bacteriófagos con DNA de una sola cadena

ejemplo, la unión del dTTP (con ATP unido al lugar de actividad) activa la enzima para la reducción del GDP, pero reduce su capacidad de reducir el UDP o el CDP. En la Tabla 22.2 se resumen los principales efectos reguladores.

La ribonucleótido reductasa tiene dos clases de lugares alostéricos. Los lugares de actividad influyen sobre la eficacia catalítica, y los lugares de especificidad determinan la especificidad para uno o más de los cuatro sustratos.

Estos efectos se observan in vitro con enzimas purificadas. Existen amplias razones para llegar a la conclusión de que en las células intactas actúan también unos efectos reguladores semejantes. Así, por ejemplo, la desoxiadenosina o la timidina inhibirán la síntesis de DNA cuando se administren a las células intactas. Las determinaciones de las cantidades intracelulares de dNTP indican que en las células tratadas con desoxiadenosina, la cantidad de dATP aumenta (como es de prever por los efectos de las rutas de salvamento), mientras que la cantidad de dTTP, dGTP y dCTP disminuye. Ésta es probablemente la causa de que los leucocitos no puedan proliferar en la medida necesaria en los estados de inmunodeficiencia asociados con una falta de adenosina desaminada (véase la página 901): la acumulación de dATP en estas células bloquea la síntesis de desoxirribonucleótidos y, por tanto, la replicación del DNA.

Otro ejemplo procede de la biología celular. Los investigadores **sincronizan** frecuentemente los cultivos celulares, es decir, manipulan las células para que todas ellas se encuentren en la misma fase del ciclo celular. La sincronía puede conseguirse mediante el **bloqueo de timidina,** en el que se añade timidina a las células para inhibir la síntesis de DNA. Esto impide el paso de las células de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, y se acumulan las células en este punto, como los coches parados en un semáforo en rojo. La transferencia de las células a un medio que no contenga timidina es como una luz verde, que revierte la inhibición y permite a las células iniciar la replicación del DNA de manera sincrónica. Las determinaciones de las cantidades de dNTP en las células con un bloqueo de timidina indican que se acumula dTTP, como es de prever por la síntesis de salvamento, mientras que se produce una disminución específica de dCTP, como cabe prever por los efectos del dTTP sobre la actividad ribonucleótido reductasa. De hecho, la adición de desoxicitidina restablece las cantidades normales de dCTP (por síntesis de salvamento) y alivia el bloqueo de timidina.

La inhibición de la síntesis del DNA por la timidina o la desoxiadenosina comporta la inhibición alostérica de la ribonucleótido reductasa por el dTTP o el dATP, respectivamente.

Otros datos en favor del control de la actividad de la rNDP reductasa in vivo proceden del aislamiento de líneas celulares mutantes de mamíferos, cuyo crecimiento no se inhibe por los desoxirribonucleósidos. La rNDP reductasa procedente de estas células alteradas presenta modificaciones en los lugares de actividad o en los lugares de especificidad, que hacen que estas enzimas sean menos sensibles a la inhibición por los efectores dNTP. Algunas de estas líneas celulares presentan anomalías de las cantidades de dNTP y también **fenotipos mutadores.** Es decir, presentan un aumento de la tasa de mutaciones espontáneas en todos los loci genéticos analizados. Se han realizado observaciones

TABLA 22.2 Regulación de las actividades de la ribonucleótido reductasa de los mamíferos

Nucleótido unido en			
Lugar de actividad	**Lugar de especificidad**	Activa la reducción de	Inhibe la reducción de
ATP	ATP o dATP	CDP, UDP	
ATP	dTTP	GDP	CDP, UDP
ATP	dGTP	ADP	CDP, UDP[a]
dATP	Cualquier efector		ADP, GDP, CDP, UDP

[a] La unión de dGTP inhibe la reducción de los nucleótidos de pirimidina por la enzima de mamíferos pero no por la enzima de *E. coli.*

comparables con células mutantes con alteraciones de la CTP sintetasa o la desoxicitidilato desaminasa. Estos hallazgos sugieren que cuando se modifican las concentraciones de dNTP en los lugares de la replicación del DNA, se incrementa la probabilidad de errores de la replicación, que causan mutaciones. Este punto se considerará con mayor detalle en el Capítulo 24.

El razonamiento metabólico para todos los efectos que se presentan en la Tabla 22.2 no está claro a primera vista. Por ejemplo, ¿por qué debe activar el dATP en el lugar de especificidad tanto la reducción de CDP como de UDP? Parte de la respuesta es que la reducción de UDP es una ruta relativamente menor. La mayor parte del dTTP procede de los nucleótidos de desoxicitidina, a través de la reacción de la dCMP desaminasa (véase más adelante).

BIOSÍNTESIS DE LOS DESOXIRRIBONUCLEÓTIDOS DE TIMINA

En el apartado anterior se ha estudiado la primera reacción metabólica dedicada de manera específica a la síntesis del DNA, la formación de los desoxirribonucleósidos difosfato mediante la acción de la rNDP reductasa. Una vez formados, tres de los difosfatos (dADP, dGDP y dCDP) se convierten directamente en los correspondientes trifosfatos por la acción de la nucleósido difosfato quinasa. La biosíntesis de desoxitimidina trifosfato se produce, en parte, a partir del dUDP producido mediante la reductasa, y en parte a partir de los nucleótidos de desoxicitidina; la proporción varía en las distintas células y organismos. Obsérvese que utilizamos los términos *timidina* y *desoxitimidina* de forma intercambiable. Ello se debe a que los *ribonucleótidos* de timina no son metabolitos normales, por lo que no es necesario identificar específicamente como desoxirribonucleósido al nucleósido que contiene timina y desoxirribosa.

El dUMP, que es el sustrato para la síntesis de timidilato, puede formarse por reducción y desfosforilación del UDP o por desaminación de un nucleótido de desoxicitidina.

Las rutas se resumen en las Figuras 22.12 y 22.17. Las dos rutas de novo que se presentan conducen a desoxiuridina monofosfato (dUMP), que es el sustrato para la síntesis de nucleótidos de timina: (1) el dUDP se fosforila a dUTP, que se rompe luego por una difosfohidrolasa muy activa, la **dUTPasa.** (2) El dCDP se desfosforila a dCMP, que sufre entonces una desaminación a dUMP por una aminohidrolasa denominada **dCMP desaminasa.** Esta última reacción constituye un punto de ramificación para la síntesis de los dNTP pirimidínicos; la enzima requiere dCTP como activador alostérico y se inhibe por el dTTP. *E. coli* y algunas otras bacterias utilizan una ruta diferente hasta el dUMP. La desaminación se realiza a nivel del trifosfato por la **dCTP desaminasa,** y el dUTP resultante se rompe por la dUTPasa a dUMP y PP_i.

En la reacción catalizada por la timidilato sintasa, el 5,10-metilentetrahidrofolato actúa como donador de un grupo de un carbono y de un par de electrones para reducir ese grupo hasta el nivel metilo.

Sea cual sea el mecanismo de formación, el dUMP actúa como sustrato para la formación de timidina monofosfato (dTMP), catalizada por la **timidilato sintasa.** Esta enzima transfiere una unidad de un carbono, al nivel de oxidación de metileno, y lo reduce a nivel de metilo. El donador de un carbono es el 5,10-metilentetrahidrofolato, que en esta reacción poco habitual actúa también como cofactor redox, para dar dihidrofolato como el otro producto de la reacción (Figura 22.18). El cofactor debe reducirse luego, por la dihidrofolato reductasa, y ha de captar otro grupo metileno, la mayor parte de las veces a través de la serina transhidroximetilasa. La interrupción de cualquiera de estos pasos del ciclo interfiere en la formación del nucleótido de timina. El dTMP, una vez formado, se convierte en dTTP mediante dos fosforilaciones sucesivas.

METABOLISMO DE LOS NUCLEÓTIDOS DE DESOXIURIDINA

Además de la función biosintética de la dUTPasa en la formación de dUMP para la formación de los nucleótidos de timina, la enzima desempeña un papel importante en la exclusión del uracilo del DNA. Si el dUTP no se degradara rá-

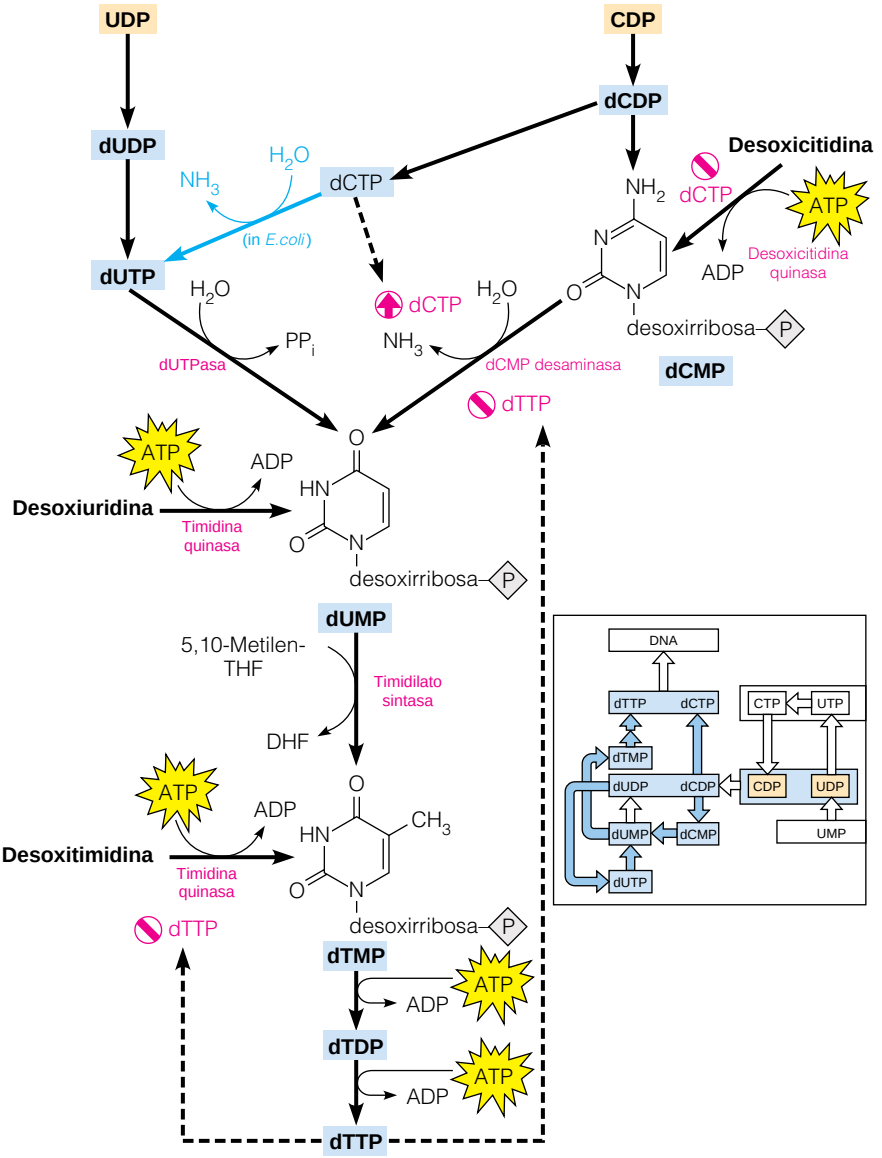


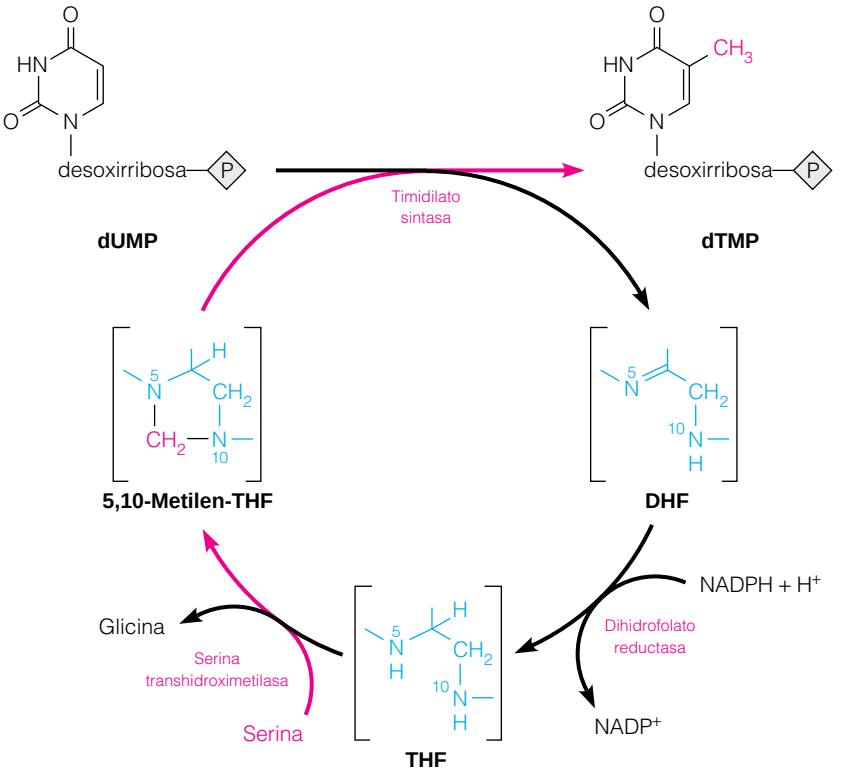
FIGURA **22.17**

Rutas de síntesis de salvamento y de novo hacia los nucleótidos de timina. Las rutas de novo se inician con UDP o CDP, que se indican en la parte superior.

pidamente, podría actuar como sustrato satisfactorio para las DNA polimerasas. De hecho, como se expondrá en el Capítulo 24, las células disponen de un mecanismo bastante complejo para asegurar que cualquier residuo de dUMP que va a parar al DNA sea eficazmente eliminado. Dado que el uracilo es prácticamente idéntico a la timina en lo que respecta a sus propiedades de apareamiento de bases, ¿por qué es tan importante para la célula permitir que tan sólo la timina se incorpore de manera estable al DNA? La respuesta radica probablemente en el hecho de que los residuos de dUMP pueden aparecer en el DNA no sólo mediante la incorporación de dUTP sino también mediante la desaminación espontánea de residuos de dCMP. Este último proceso, que se produce en una medida apreciable, modificaría el sentido de un mensaje genético, por lo que parece útil para la célula mantener la estabilidad genética disponiendo de un sistema de vigilancia que elimine los residuos de dUMP sea cual sea su forma de origen. Una cuestión relacionada es por qué se seleccionó originalmente la timidina en lugar del uracilo como base en el DNA. Los estudios termodinámicos indican que el grupo metilo de la timidina contribuye de for-

FIGURA **22.18**

Relación entre la timidilato sintasa y las enzimas del metabolismo del tetrahidrofolato. Tan sólo se muestra la porción activa de la coenzima de folato.



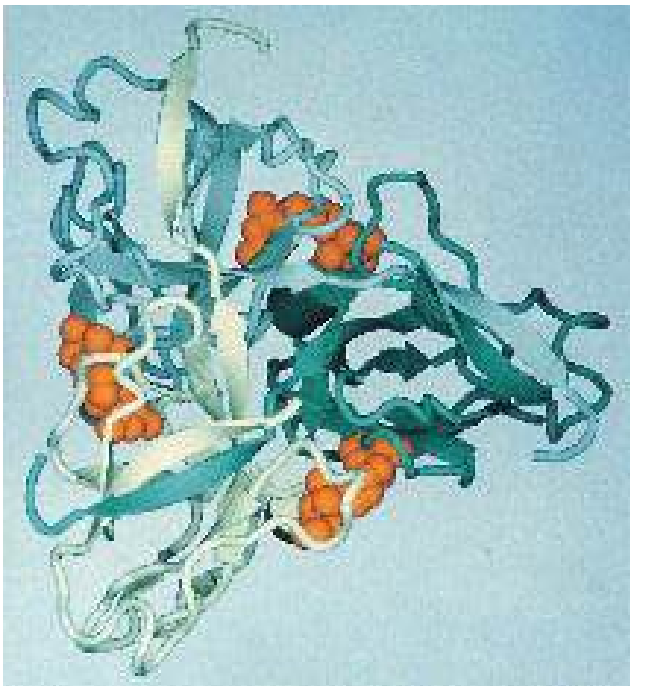
ma significativa a las interacciones hidrófobas que estabilizan el DNA de doble hélice.

La dUTPasa tiene una estructura no habitual (Figura 22.19). La enzima de *E. coli* es un homotrímero, de tal manera que cada uno de sus tres lugares activos incorpora residuos de aminoácidos procedentes de dos subunidades polipeptídicas adyacentes.

FIGURA **22.19**

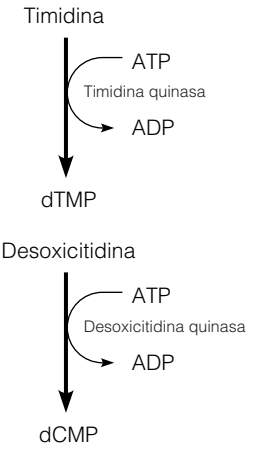
Estructura cristalina de la dUTPasa de *E. coli*. Una de las tres subunidades del homotrímero se muestra de color blanco, otra de color azul claro y otra de color azul oscuro. Cada subunidad contiene un brazo C-terminal que envuelve una unidad adyacente. Un inhibidor competitivo, el dUDP (se muestra de color naranja), está unido a cada uno de los tres lugares catalíticos y cada lugar se forma en una zona de unión entre las subunidades.

Cortesía de Elle Cedergren-Zeppenzauer y Gunilla Larsson.

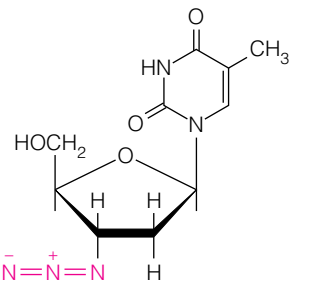


RUTAS DE SALVAMENTO PARA LA SÍNTESIS DE DESOXIRRIBONUCLEÓTIDOS

Como se ha señalado previamente, el salvamento de purinas utiliza reacciones de fosforribosiltransferasas, que generan ribonucleósidos monofosfato a partir de las bases púricas y el PRPP. Tras la fosforilación a nivel de los difosfatos, estos compuestos penetran en el metabolismo de los desoxirribonucleótidos a través de la ribonucleótido reductasa. No obstante, las desoxirribonucleósido quinasas, que llevan directamente a los desoxirribonucleósidos monofosfato, están muy extendidas y ellas utilizan tanto purinas como pirimidinas. Las células y los organismos varían mucho en sus contenidos de ribo- y desoxirribonucleósido quinasas. Las células humanas contienen cuatro desoxirribonucleósido quinasas: (1) timidina quinasa, que se encuentra en el citosol; (2) desoxicitidina quinasa, también una enzima citosólica, que fosforila la desoxiadenosina y la desoxiguanosina, así como la desoxicitidina, aunque únicamente a concentraciones elevadas; (3) desoxiguanosina quinasa, que es de origen mitocondrial; y (4) una isoforma mitocondrial de la timidina quinasa, que tiene una especificidad de sustrato más amplia que la enzima citosólica y actúa también sobre desoxicitidina y desoxiuridina.



Como se presentará posteriormente en este capítulo, varios análogos de nucleósidos se emplean o se están analizando en el tratamiento del cáncer y diversas enfermedades víricas. De manera invariable, estos fármacos deben convertirse en desoxirribonucleótidos para ser eficaces, y esto ha centrado la atención en las desoxirribonucleósido quinasas. Por ejemplo, un efecto secundario de la **3′-azido-2′,3′-didesoxitimidina** (AZT, página 922), el primer fármaco que se aprobó para el tratamiento de las infecciones del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), es la cardiotoxicidad (lesión del músculo cardíaco). La ruta principal de utilización de la azidotimidina es la isoforma mitocondrial de la timidina quinasa, llamada también TK2. Los datos obtenidos sugieren que los desoxirribonucleótidos de azidotimidina interfieren con la función mitocondrial, posiblemente inhibiendo la replicación o la transcripción del DNA mitocondrial, y probablemente éste es el fundamento de la cardiotoxicidad. Por lo tanto, la investigación actual se dirige a la obtención de análogos cuya activación metabólica no tenga lugar en las mitocondrias.



3′-Azido-2′,3′-didesoxitimidina

De las cuatro desoxirribonucleósido quinasas, tres de ellas se sintetizan de forma constitutiva, produciéndose de forma constante durante el ciclo celular. La excepción es la timidina quinasa citosólica (TK1) cuya expresión es mayor cuando se replica el DNA y en este aspecto se asemeja a las enzimas de la síntesis de novo de los desoxirribonucleótidos, como la ribonucleótido reductasa. Por razones que aún no se entienden, la TK1 salva la timidina exógena de forma muy eficaz. Los experimentos con precursores marcados radiactivamente muestran que el dTTP que procede de la síntesis de salvamento se incorpora habitualmente al DNA con preferencia a los nucleótidos de timidina generados por la síntesis de novo. Éste es el fundamento de la técnica extendida de estimación de las tasas de replicación del DNA midiendo la incorporación de timidina marcada radiactivamente en el DNA. Sin embargo, como se describió en Herramientas de la Bioquímica 12A, una medida exacta de la tasa de síntesis de DNA a partir de los datos de incorporación de timidina requiere la medida de la radiactividad específica del total de dTTP marcado. No obstante, debido a la gran eficacia con la que se utiliza la timidina en las células, las medidas sencillas de incorporación de timidina habitualmente proporcionan estimaciones exactas de las tasas de replicación del DNA.

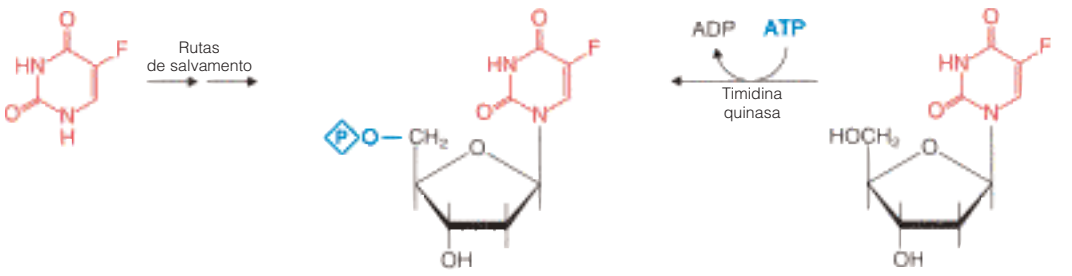
Timidilato sintasa: una enzima diana de la quimioterapia

Uno de los objetivos de la **quimioterapia,** el tratamiento de las enfermedades con agentes químicos, es aprovechar una diferencia bioquímica entre el proceso patológico y el tejido del hospedador, con objeto de interferir selectivamente en el proceso patológico. Muchos agentes quimioterapéuticos se descubrieron inicialmente por azar, mediante el análisis de análogos de los metabolitos normales. La efectividad de la mayoría de estos agentes está limitada por unos efectos secundarios imprevistos, por una selectividad incompleta, y por la aparición de resistencia al agente. Uno de los campos más atractivos de la moderna farmacología bioquímica es la arquitectura de los fármacos, es decir, el diseño de inhibidores específicos basados en el conocimiento de la estructura molecular del lugar al que el inhibidor se unirá y del mecanismo de acción de la molécula diana. Para los fármacos cuyo objetivo es una enzima, es necesario conocer la estructura tridimensional de la enzima y su mecanismo de acción. La obtención de esta información requiere una combinación de la cristalografía de rayos X, la química bioorgánica clásica, la mutagénesis de lugar dirigida, y los gráficos moleculares asistidos por ordenador. La timidilato sintasa constituye un ejemplo excelente de la utilidad de estos métodos.

La inhibición de la timidilato sintasa es uno de los enfoques utilizados en la quimioterapia del cáncer, al producir una inhibición específica de la síntesis de DNA.

Como se ha señalado aquí y en el Capítulo 20, el objetivo de la quimioterapia es atacar selectivamente a un proceso metabólico que es específico del trastorno patológico. Dado que la timidilato sintasa participa en la síntesis de un desoxirribonucleótido, cualquier enfermedad que comporte una proliferación celular incontrolada puede tratarse, en principio, con inhibidores de la timidilato sintasa. El bloqueo de la producción de un precursor esencial del DNA debe inhibir la replicación del DNA con unos efectos mínimos sobre otros procesos. Las células que no están experimentando una proliferación rápida deben ser relativamente inmunes a estos agentes. Así pues, el cáncer y una amplia gama de enfermedades infecciosas deben ser susceptibles a un tratamiento de este tipo.

Nada de esto se sabía a mediados de los años 1950. De hecho, la timidilato sintasa todavía no se había descubierto. Se sabía, sin embargo, que determinadas células tumorales captaban y metabolizaban el uracilo de manera mucho más rápida que las células normales. Sin conocer de forma detallada los posibles destinos metabólicos del uracilo, Charles Heidelberger pensó que podría destruir selectivamente las células tumorales mediante el tratamiento con análogos que bloquearan el metabolismo del uracilo en las células tumorales. Con este fin realizó la síntesis química del **5-fluorouracilo** (**FUra**) y su desoxirribonucleósido la **5-fluorodesoxiuridina** (**FdUrd**). Observó que ambos compuestos eran inhibidores potentes de la síntesis del DNA. Su acción como inhibidores se basa en la conversión intracelular en **5-fluorodesoxiuridina monofosfato** (**FdUMP**), un análogo del dUMP que actúa como inhibidor irreversible de la timidilato sintasa.



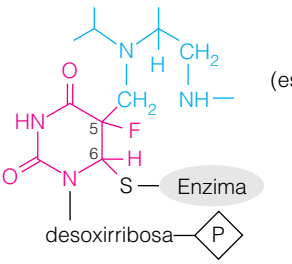
5-Fluorouracilo (FUra) | **5-Fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP)** | **5-Fluorodesoxiuridina (FdUrd)**

Tanto el fluorouracilo como la fluorodesoxiuridina se utilizan en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, las pirimidinas fluoradas no son completamente selectivas en sus efectos. Así, por ejemplo, el fluorouracilo puede incorporarse al RNA mediante rutas de salvamento que normalmente se usan para el uracilo, con lo que interfiere en la función del RNA mensajero, tanto en las células cancerosas como en las células normales. Evidentemente, un conocimiento detallado del lugar activo de la timidilato sintasa podría conducir al diseño de inhibidores enzimáticos completamente específicos.

El análisis de la unión de la 5-fluorodesoxiuridina monofosfato a la timidilato sintasa ha abierto la puerta al conocimiento del mecanismo de reacción de la enzima y de la estructura del lugar activo. El FdUMP es un verdadero **inhibidor basado en el mecanismo,** por cuanto la unión irreversible se produce tan sólo en presencia de 5,10-metilentetrahidrofolato. Presumiblemente, la unión de la coenzima induce un cambio conformacional en el lugar activo que duplica los pasos iniciales de la reacción catalítica y conduce a la unión irreversible del FdUMP. La digestión proteolítica del complejo ternario, que contiene FdUMP, metilentetrahidrofolato y la enzima, llevó a los investigadores de los laboratorios de Charles Heidelberger y Daniel Santi a aislar un fragmento peptídico de la enzima que contenía el inhibidor y la coenzima. Finalmente, se comprobó que el FdUMP estaba ligado al carbono metileno de la coenzima a través del C-5 del anillo de pirimidina, y a la enzima a través de un azufre de cisteína unido covalentemente al C-6 de la pirimidina. La estructura del complejo sugirió que la reacción enzimática comienza con el ataque nucleófilo del tiol de la cisteína sobre el C-6 del sustrato dUMP.

La estructura del complejo entre el FdUMP unido a la enzima y el 5,10-metilen-THF sugirió el mecanismo que se presenta en la Figura 22.20. Como se ha indicado antes, un ion tiolato de cisteína de la enzima inicia un ataque nucleófilo sobre el C-6 del dUMP (paso 1). Esto genera un anión enolato estabilizado por resonancia, y el C-5 se hace nucleófilo y ataca al carbono metileno de la coenzima (paso 2). La pérdida de un protón de C-5 (paso 3) inicia un desplazamiento electrónico que lleva a la transferencia del hidrógeno de C-6 del cofactor a la pirimidina (paso 4), lo que concuerda con las observaciones de que este hidrógeno se incorpora cuantitativamente al grupo metilo del timidilato. Esta transferencia de hidrógeno oxida el cofactor a dihidrofolato, que se disocia en el paso 5. En el paso 6, se rompe el enlace covalente enzima-sustrato, con la formación de nuevo del doble enlace entre C-5 y C-6 del anillo de pirimidina. La inhibición del FdUMP se debe a la electronegatividad del flúor, que genera un enlace C—F en C-5 que no puede romperse. Así pues, la ruta de reacción no puede pasar al paso 3.

La confirmación de este mecanismo se ha obtenido con las pruebas que indican que el sustrato, el dUMP, forma un enlace covalente con la coenzima durante la catálisis normal. Otros datos más importantes son los obtenidos con la determinación de un modelo tridimensional de la timidilato sintasa. En 1987, Robert Stroud, Daniel Santi y sus colaboradores, presentaron un modelo de la enzima de *Lactobacillus casei* (Figura 22.21). La timidilato sintasa está evolutivamente muy conservada, y alrededor de un 20% de sus residuos de aminoácidos se mantienen invariables en las secuencias de mamíferos, bacterias, virus, hongos y protozoos. La estructura cristalina muestra un elevado porcentaje de estos aminoácidos conservados en la hendidura que se cree representa el lugar activo. La proteína es un homodímero, y los residuos conservados de ambas subunidades están situados a lo largo de la hendidura y contribuyen presumiblemente a producir la catálisis. La cisteína 198, el residuo que se une al FdUMP, se encuentra en esta hendidura, cerca de otro residuo conservado, la Arg 218, que puede reducir el valor de pK_a del tiol de cisteína y generar el ion tiolato reacti-



Metilen-THF
(estructura parcial)

Complejo formado entre el FdUMP unido a la enzima y el 5,10-metilen-THF

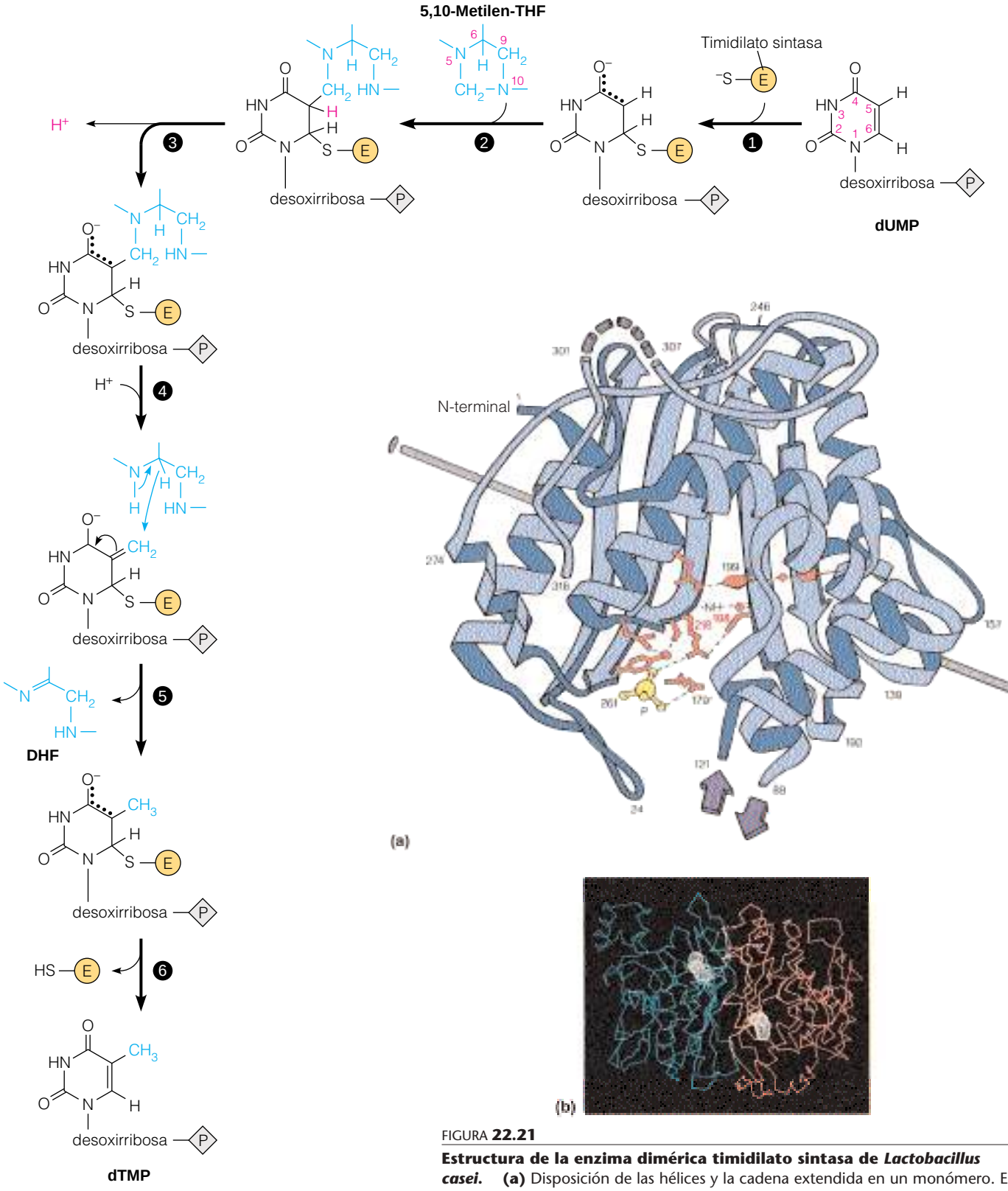


FIGURA **22.20**

Mecanismo de la reacción catalizada por la timidilato sintasa.

FIGURA **22.21**

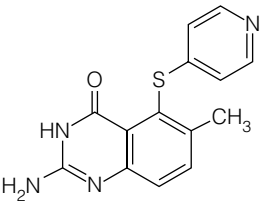
Estructura de la enzima dimérica timidilato sintasa de *Lactobacillus casei*. **(a)** Disposición de las hélices y la cadena extendida en un monómero. El extremo amino es el número 1. La cadena rota en 301-307 y la ruptura entre 89 y 121 corresponden a regiones desordenadas de la estructura. Los residuos de aminoácido conservados se muestran en la hendidura del lugar activo. La Arg 179′ es del monómero adyacente. **(b)** Estructura del homodímero.

Cortesía de L. W. Hardy, J. Finer-Moore, D. V. Santi y R. M. Stroud, *Science* (1987) 235:448-455. © 1987 AAAS.

vo. Varios residuos de lisina conservados están situados en la proximidad, y se cree que corresponden a lugares de unión de la cola de poliglutamato de la coenzima de folato (la timidilato sintasa se une a los poliglutamatos de folato con una fuerza unas 100 veces superior a la del monoglutamato).

Poco después de que se presentara el modelo de la enzima, dos laboratorios cristalizaron la timidilato sintasa de *E. coli* como un complejo con dUMP y un análogo de 5,10-metilentetrahidrofolato. El análisis de estos complejos confirmó las conformaciones del sustrato y el cofactor, unidos al lugar activo (Figura 22.22) y la identificación de los residuos del lugar activo en contacto con estos ligandos. El análisis de las interacciones de unión que intervienen ha llevado al diseño y a la síntesis de análogos del cofactor que no tienen una relación evidente con el 5,10-metilentetrahidrofolato, pero que compiten con él de manera muy eficaz por la unión a la TS (valores de K_i de tan sólo 30 nM). Un inhibidor de este tipo, el Timitaq, se muestra aquí. En 1991 se presentó la cristalización de la enzima humana, y esta enzima ha motivado nuevos trabajos de desarrollo farmacológico. Estos esfuerzos, junto con los estudios del mecanismo de las variantes de la enzima producidas mediante mutagénesis de lugar dirigida y la determinación de las estructuras de las timidilato sintasas de otras especies, deberán facilitar el camino para el diseño lógico de inhibidores enzimáticos eficaces que puedan resultar útiles como fármacos anticancerosos. El mismo tipo de planteamiento está siendo utilizado en docenas de laboratorios, centrados en receptores de fármacos que incluyen proteínas y ácidos nucleicos unidos a membranas o receptores intracelulares, y también enzimas. Un ejemplo señalado del éxito de este planteamiento es la obtención de inhibidores específicos de la proteasa del VIH como fármacos contra el SIDA.

Otros objetivos distintos del cáncer pueden ser también susceptibles al ataque por inhibición de la timidilato sintasa. Así, por ejemplo, algunos protozoos parásitos, como los que causan el paludismo, sintetizan una forma poco habitual de timidilato sintasa, una enzima bifuncional con actividad timidilato sintasa y dihidrofolato reductasa. El conocimiento de la estructura del lugar activo de esta enzima deberá permitir la obtención de inhibidores que bloqueen esta enzima concreta pero no la timidilato sintasa del hospedador animal o humano.

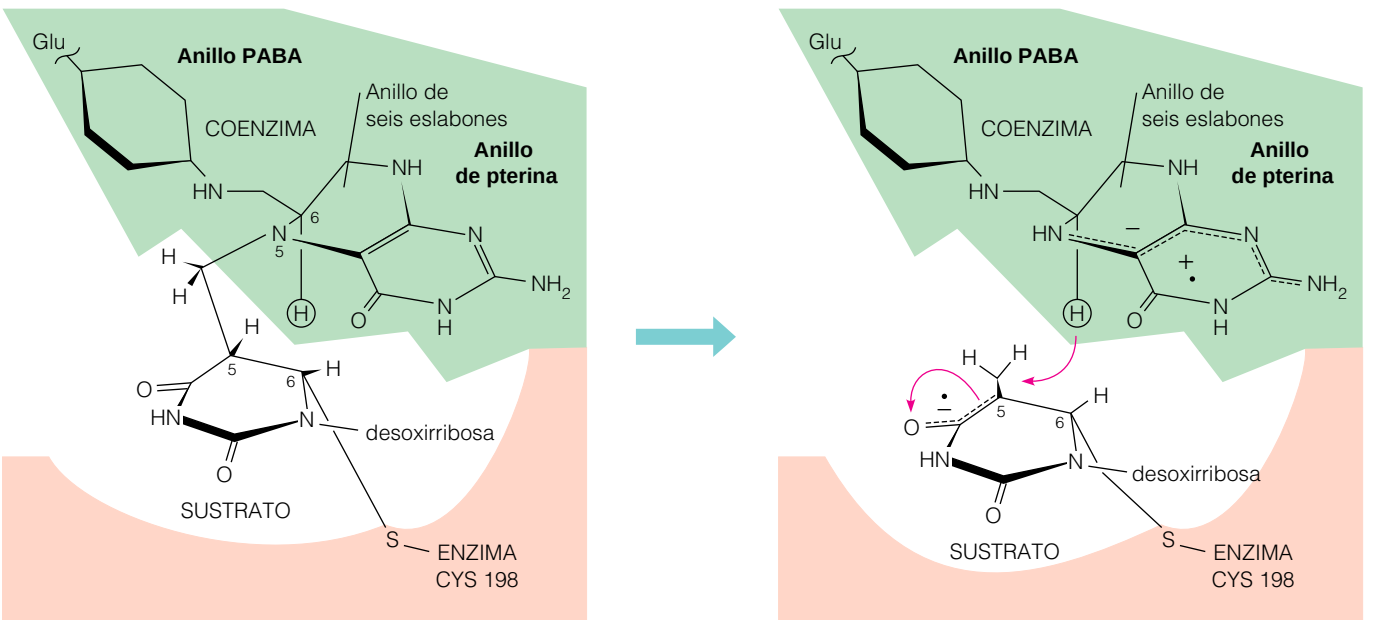


Timitaq, un "análogo" de coenzima, creado por modelado con ordenador

FIGURA **22.22**

Orientación del sustrato y la coenzima en el lugar activo de la timidilato sintasa. Los contactos que se muestran en esta figura se dedujeron de un análisis cristalográfico de un complejo ternario enzima-sustrato-análogo de coenzima. El anillo de pterina y el PABA forman parte de la coenzima 5,10-metilentetrahidrofolato.

Adaptado con permiso de J. S. Finer-Moore, W. R. Montfort y R. M. Stroud, *Biochemistry* (1990) 29:6977-6986. © 1990 American Chemical Society.



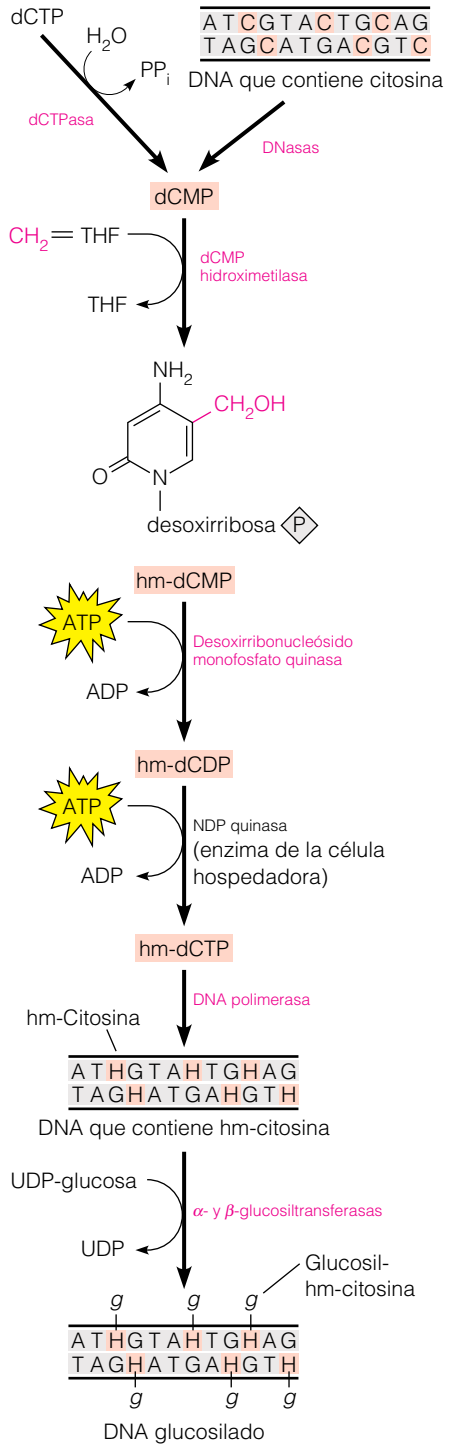
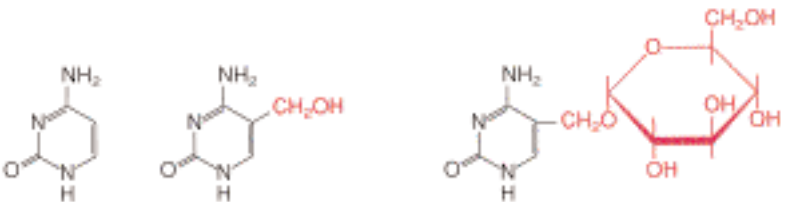


FIGURA **22.23**

Rutas metabólicas que conducen a las modificaciones de los nucleótidos en *E. coli* infectada por los fagos T pares. Las enzimas codificadas por el virus se indican en rojo. hm = hidroximetil.

Alteraciones del metabolismo de los nucleótidos dirigidas por los virus

El hecho de que los virus sean capaces de redirigir el metabolismo de sus células hospedadoras se descubrió por primera vez en 1957 mediante los estudios de la biosíntesis de nucleótidos en bacterias *E. coli* infectadas por los bacteriófagos T pares, T2, T4 y T6. G. R. Wyatt y Seymour Cohen habían demostrado en 1952 que el DNA de estos virus no contiene citosina, sino que en su lugar posee 5-hidroximetilcitosina, y que la mayor parte de los grupos hidroximetilo se modifican luego con enlaces glucosídicos con unidades de glucosa.



Citosina **5-Hidroximetilcitosina** **α-Glucosil-5-hidroximetilcitosina**

La ulterior investigación demostró que la infección inicia la síntesis de enzimas codificadas por el virus, que llevan a cabo estas modificaciones (Figura 22.23). Las principales enzimas de las bacterias infectadas por los fagos T pares son la **dCTPasa,** que rompe el dCTP a dCMP; una **dCMP hidroximetilasa,** que transfiere un grupo de un carbono al dCMP a nivel de oxidación de hidroximetilo; y una **desoxirribonucleósido monofosfato quinasa,** que puede fosforilar el 5-hidroximetil-dCMP resultante. La fosforilación del 5-hidroximetil-dCDP al trifosfato está catalizada por la nucleósido difosfato quinasa en la célula hospedadora. Las reacciones de glucosilación se producen después de que el nucleótido modificado se haya incorporado al DNA. En las bacterias infectadas por el fago T4 se producen dos reacciones de **glucosiltransferasa,** una de las cuales transfiere glucosa en la configuración α y otra en la β. Además, el genoma del virus especifica varias desoxirribonucleasas, que rompen específicamente el DNA que contiene citosina. Este proceso ayuda al virus a abolir la expresión de los genes de las células hospedadoras y también le proporciona una fuente de precursores para la síntesis del DNA del virus.

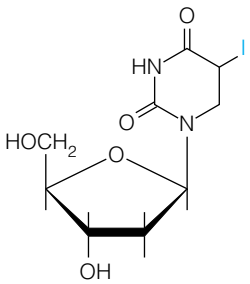
Aunque las sustituciones de bases en el DNA son bastante poco habituales, hasta el momento se han identificado aproximadamente una docena de casos en los que uno de los cuatro desoxirribonucleótidos comunes está sustituido, total o parcialmente, por un derivado modificado químicamente que conserva la especificidad del apareamiento de bases del nucleótido sustituido. Así, por ejemplo, algunos fagos de *Bacillus subtilis* sustituyen uracilo por timina en su DNA. Otros fagos de *B. subtilis* contienen 5-hidroximetiluracilo en lugar de timina. Un fago de *Xanthomonas oryzae* sustituye 5-metilcitosina por cada uno de sus residuos de citosina de su DNA. En todos los casos investigados, el virus dirige las modificaciones de los nucleótidos mediante la síntesis de enzimas codificadas por el virus que crean nuevas rutas metabólicas en las células que infectan.

Los virus de las plantas y de los animales no contienen modificaciones amplias de las bases en los ácidos nucleicos, como las que se encuentran en los bacteriófagos. (La mayor parte de los organismos contienen una proporción significativa de bases de los ácidos nucleicos metiladas, pero estas modificaciones se producen después de la polimerización; véase el Capítulo 25.) Sin embargo, es frecuente que se produzcan enzimas codificadas por el virus para ayudar a la célula infectada a aumentar su síntesis de precursores de los ácidos nucleicos. En

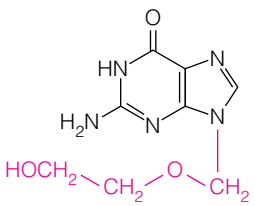
algunos casos, la enzima especificada por el virus difiere de la propia de la célula hospedadora en un grado suficiente para que los científicos puedan diseñar inhibidores enzimáticos selectivos y obtener una quimioterapia específica dirigida contra las células infectadas por el virus. El mejor ejemplo de que disponemos en la actualidad es el empleo del **aciclovir** y de la sustancia relacionada, **ganciclovir,** para el tratamiento de las infecciones por el virus del herpes. Los virus del herpes son virus grandes, que contienen DNA, cuyos genomas codifican varias enzimas, entre las que se encuentra la **desoxipirimidina quinasa.** Esta enzima, que inicialmente se identificó como una timidina quinasa, fosforila también el dTMP. Sin embargo, lo más importante es la especificidad de sustrato extraordinariamente amplia de la actividad nucleósido quinasa de esta enzima. El análogo de la timidina **5-yododesoxiuridina,** utilizado para el tratamiento de las infecciones oculares por herpes simple, se fosforila con facilidad por la desoxipirimidina quinasa y se incorpora al DNA en lugar del timidilato. Más recientemente, se ha demostrado que el aciclovir (también denominado **acicloguanosina**) y la sustancia relacionada ganciclovir también se fosforilan por las desoxipirimidina quinasas víricas, a pesar de que son análogos de un nucleósido de purina, la desoxiguanosina.

Tanto el aciclovir como el ganciclovir se utilizan en la actualidad para el tratamiento tópico y sistémico de las infecciones por el virus del herpes. Los tres análogos se convierten finalmente en el 5′-trifosfato, que interfiere con la replicación del DNA. Las células no infectadas no fosforilan eficazmente el aciclovir ni el ganciclovir, y fosforilan la yododesoxiuridina débilmente, por lo que la replicación del DNA y, por tanto, el crecimiento del virus se inhiben de manera selectiva en las células infectadas.

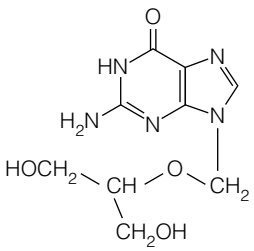
Los procesos metabólicos nuevos inducidos por los virus constituyen objetivos atractivos para la quimioterapia.



5-Yododesoxiuridina



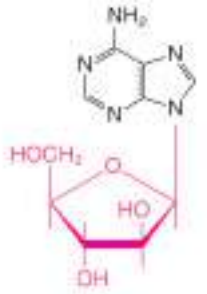
Acicloguanosina (aciclovir)



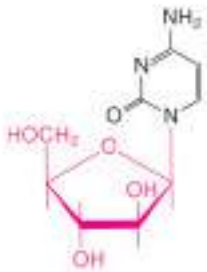
Ganciclovir

Importancia biológica y médica de otros análogos de los nucleótidos

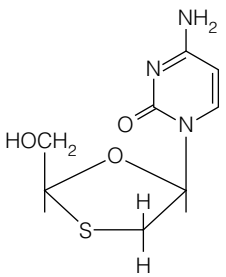
Los ejemplos antes citados han puesto claramente de manifiesto la utilidad de los análogos de los nucleósidos y nucleótidos, fundamentalmente como fármacos. En este apartado consideraremos otros análogos que tienen importancia médica, así como varios que son útiles como reactivos para la investigación. Los nucleótidos se transportan mal al interior de las células debido a la carga de fosfato negativa, por lo que la mayor parte de los compuestos que consideraremos se introducen en las células en forma de nucleósidos o derivados de nucleósidos; en las células son atacados inicialmente por nucleósido quinasas (véase la página 915). Tras la captación y conversión en nucleótidos, estos compuestos interfieren con el metabolismo de varias formas. En este apartado utilizaremos de manera intercambiable los términos *análogos de nucleótidos* y *análogos de nucleósidos.*



Arabinosiladenina (araA)



Arabinosilcitosina (araC)



3′-Tiacitidina

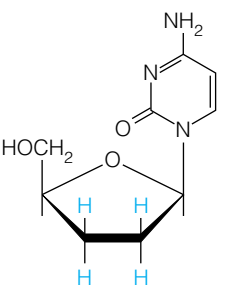
ANÁLOGOS DE NUCLEÓTIDOS COMO AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS

Las enzimas de la síntesis de los nucleótidos se han estudiado mucho como objetivos para la acción de los fármacos antivíricos o antimicrobianos. Como se ha indicado antes, el objetivo consiste en identificar una diferencia bioquímica entre los procesos comparables del hospedador no infectado y el hospedador infectado.

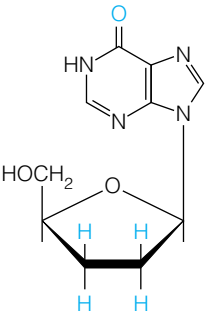
Análogos de nucleósidos antivíricos

Uno de los primeros fármacos antivíricos que fue aprobado para su uso en el ser humano es la **arabinosiladenina** (**araA**). En la actualidad se utiliza para tratar la encefalitis vírica, una enfermedad neurológica causada por otro componente de la familia de los virus del herpes. A diferencia de la aciclo guanosina, la araA se fosforila al nivel de trifosfato por las quinasas celulares. El trifosfato, araATP, es un inhibidor selectivo de las DNA polimerasas codificadas por los virus herpes. Así pues, la araA interfiere selectivamente con la replicación del DNA vírico, a pesar de que todas las células, infectadas y no infectadas, forman el trifosfato. Dado que la araA es vulnerable a la degradación por la adenosina desaminasa, su eficacia puede aumentarse al administrarla con un inhibidor de esta última enzima. El análogo arabinósido de la desoxicitidina, la **arabinosilcitosina** (**araC**), se está utilizando en la quimioterapia del cáncer. La araCTP también interfiere con la replicación del DNA tras la conversión al trifosfato.

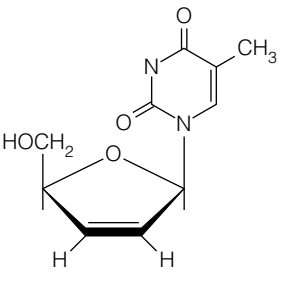
Otros análogos a los que se está prestando mucha atención son los que se utilizan para combatir el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) causado por el VIH. Uno de estos análogos, la 3′-azido-2′,3′-didesoxitimidina (AZT; véase la página 915), se anaboliza al correspondiente 5′-trifosfato, que es un inhibidor de la transcriptasa inversa del virus (la enzima que hace una copia de DNA del RNA del virus; véase el Capítulo 24). Otros análogos de nucleósidos (**2′,3′-didesoxicitidina** (**ddC**), **2′,3′-didesoxiinosina** (**ddI**), **3′-tiacitidina** (**3TC**) y **2′,3′-dideshidro-3′-desoxitimidina** (**d4T**)) actúan mediante la conversión al correspondiente trifosfato, que se incorpora al DNA y bloquea luego el posterior alargamiento replicativo de la cadena debido a la ausencia de una terminación 3′ hidroxilo. Los cuatro análogos han sido aprobados para el tratamiento de las infecciones humanas por el VIH y el AZT y 3TC son componentes, junto con los inhibidores de la proteasa del VIH, de los "cocktails" de tres fármacos que recientemente se han acreditado con la remisión a largo plazo de las infecciones por el VIH. A finales de 1994, dos laboratorios describieron un efecto sinérgico del ddI y la hidroxiurea frente a las infecciones por el VIH, probablemente al privar a la célula de los dNTP para la transcripción inversa (véase la Figura 24.45).



2′,3′-Didesoxicitidina



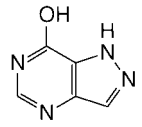
2′,3′-Didesoxiinosina



2′,3′-Dideshidro-3′-desoxitimidina

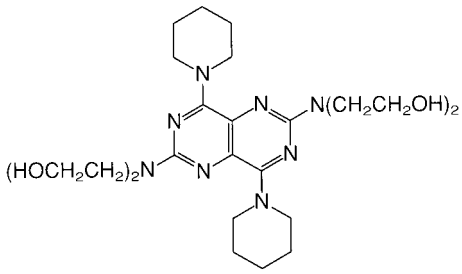
Salvamento de purinas como objetivo

Una anomalía bioquímica importante se encuentra en los protozoos parásitos como *Plasmodium*, que es el causante del paludismo, y *Leishmania*, que causa una enfermedad debilitante, aunque generalmente no mortal, que afecta a la piel y a los órganos internos. Los protozoos parasitarios carecen de la capacidad de síntesis de purinas de novo, y dependen por completo del salvamento de los nucleósidos y las bases que le proporciona el hospedador. Los compuestos como el alopurinol (véase la página 902) y la **formicina B** inhiben el crecimiento de estos organismos en cultivo, en parte por una inhibición de las enzimas de salvamento y en parte por la capacidad de las enzimas de salvamento de anabolizar el análogo, capacidad de la que carecen las correspondientes enzimas del hospedador. Así, por ejemplo, el alopurinol se convierte en un análogo del ácido inosínico y luego en un análogo del AMP que finalmente se incorpora al RNA, en el que interfiere en la codificación del RNA mensajero en la síntesis de proteínas.



Formicina B

La inhibición del salvamento de los nucleósidos puede ser más eficaz si el análogo se administra junto con un inhibidor del transporte de los nucleósidos. En las células animales, una única proteína, el transportador de nucleósidos, parece ser la responsable de la captación de una amplia gama de nucleósidos. El funcionamiento de esta proteína se inhibe por el **dipiridamol**, que bloquea la captación de la mayoría de los nucleósidos.



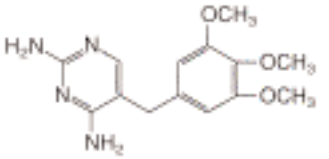
Dipiridamol

Antagonistas del folato

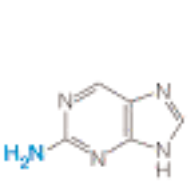
Recuérdese del Capítulo 20 que hace tiempo se descubrió ya, que el análogo del ácido fólico metotrexato induce remisiones de determinadas leucemias agudas. ¿Cuál es el fundamento de esta selectividad? Teniendo en cuenta que los cofactores de folato desempeñan papeles esenciales en la síntesis de precursores del DNA, el RNA, las proteínas *y* los fosfolípidos, cabría prever que la inhibición de la síntesis del tetrahidrofolato fuera tóxica para todas las células. Sin embargo, existe un fundamento para la toxicidad selectiva de los antagonistas del folato contra las células que proliferan. Recuérdese que la reacción de la timidilato sintasa oxida el metilentetrahidrofolato a dihidrofolato; ésta es la única reacción conocida en la que se requiere tetrahidrofolato que no regenera el tetrahidrofolato. A partir de las reacciones que se indican en la Figura 22.18, cabe predecir que la inhibición de la dihidrofolato reductasa bloquee el reciclado del dihidrofolato para producir de nuevo tetrahidrofolato. En estas condiciones, la tasa de oxidación de todos los folatos reducidos intracelulares está directamente relacionada con la actividad intracelular de la timidilato sintasa, la cual está coordinada a su vez con la tasa de síntesis de DNA. Así pues, las células que proliferan, con tasas rápidas de replicación del DNA, agotarán sus reservas de tetrahidrofolato más rápidamente que las células que no proliferan.

La tasa de proliferación celular determina la eficacia de la quimioterapia con inhibidores de la dihidrofolato reductasa, debido a que el flujo de la reacción de la timidilato sintasa determina la tasa con la que el tetrahidrofolato se oxida a dihidrofolato.

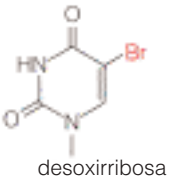
Aunque los antimetabolitos como el fluorouracilo o el metotrexato atacan selectivamente a los tejidos que proliferan, también son tóxicos para las células normales. Los efectos secundarios nocivos se observan en los tejidos que proliferan en el ámbito de su función normal; estos tejidos son la mucosa intestinal, las células pilosas y los componentes del sistema inmunitario. Igualmente grave es la aparición de variantes celulares resistentes al fármaco. En estos casos, las concentraciones de la enzima diana aumentan más allá del punto en que pueden controlarse con inhibidores. Robert Schimke y sus colaboradores investigaron el mecanismo de la elevación de la actividad de la dihidrofolato reductasa, que puede ser varios centenares de veces superior en las líneas celulares resistentes al metotrexato. Observaron que una incubación prolongada de las células en metotrexato produce a menudo una amplificación selectiva del gen que codifica la dihidrofolato reductasa; el número de copias de DNA de este gen



Trimetoprima



2-Aminopurina



5-Bromodesoxiurina

por célula aumenta muchas veces, con una acumulación correspondiente del producto génico, la dihidrofolato reductasa. Otras mutaciones de resistencia se producen mediante mecanismos más convencionales, como la alteración del transporte del fármaco al interior de las células o la modificación de la enzima diana, haciéndola resistente al antimetabolito.

Otra clase de inhibidores de la dihidrofolato reductasa es la que tiene como ejemplo la **trimetoprima**. Este compuesto es un inhibidor específico de las dihidrofolato reductasas de origen procariota. La trimetoprima y otros productos similares se utilizan mucho en el tratamiento de las infecciones bacterianas y de ciertas formas de paludismo. El éxito de estos fármacos se debe a que son inhibidores extraordinariamente débiles de las dihidrofolato reductasas de los vertebrados. La trimetoprima se administra frecuentemente en combinación con una sulfamida para inhibir la *síntesis* del folato y bloquear, por tanto, pasos secuenciales de la misma ruta.

ANÁLOGOS DE NUCLEÓTIDOS Y MUTAGÉNESIS

Algunos análogos de nucleótidos son excelentes mutágenos, que resultan útiles para el aislamiento de mutantes y en los estudios sobre el mecanismo de la mutagénesis. Dos de estos análogos son la **2-aminopurina** (**2AP**) y la **5-bromodesoxiuridina** (**BrdUrd**). La 2-aminopurina se incorpora al DNA en lugar de la adenina, pero cuando el molde que contiene 2AP se replica, el análogo forma pares de bases de manera ocasional con citosina en vez de con timina. Ello hace que la incorporación de 2AP cambie un par A-T del DNA en un par G-C (Figura 22.24).

La bromodesoxiuridina actúa de una forma similar, aunque también tiene otras aplicaciones. Es un excelente análogo de la timidina, puesto que el radio de van der Waals del átomo de bromo es similar al del grupo metilo. En consecuencia, se incorpora de manera eficaz al DNA. Los errores de apareamiento de la BrdUrd con un residuo de desoxiguanosina en la replicación de un molde que contenga BrdUrd pueden ocasionar una mutagénesis al cambiar un par de bases A-T por un par G-C (véase la Figura 22.24). Otra posibilidad es que el BrdUTP puede competir con el dCTP por la incorporación opuesta a G en el molde (no mostrado).

Dado que el bromo es mucho más pesado que un grupo metilo, ello hace que el DNA sustituido tenga una mayor densidad, lo cual constituye una base física para separar el DNA que se replica del que no se replica (véase el Capítulo 24). Por último, los radiobiólogos utilizan la BrdUrd como agente radiosensibilizante. Los residuos de bromo-dUMP del DNA pierden bromo con facilidad cuando el DNA sustituido se irradia con luz UV o próxima al UV. Este proceso genera radicales libres que causan diversos tipos de daños en la estructura del DNA.

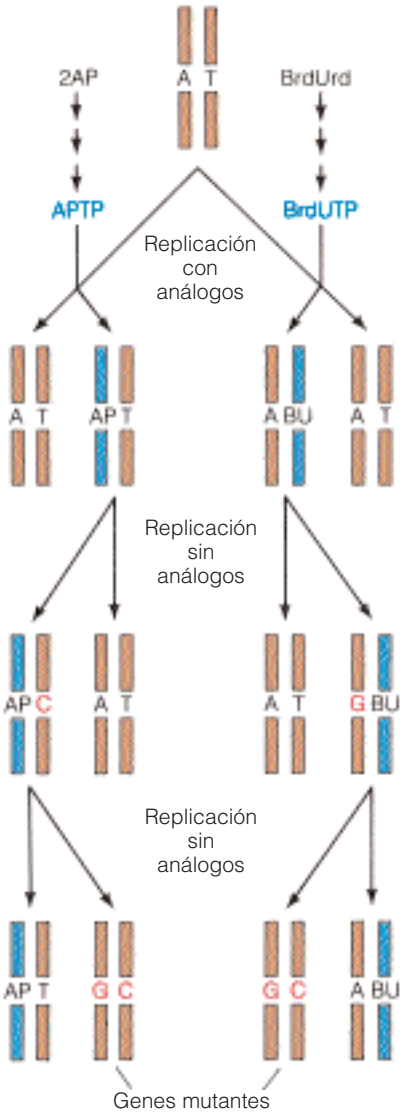
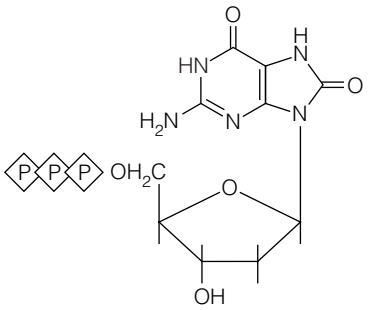


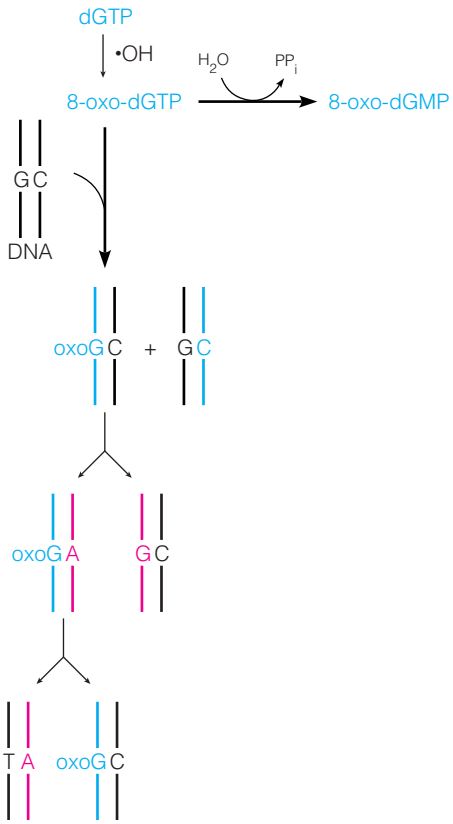
FIGURA **22.24**

Mecanismos de mutagénesis por análogos de los nucleótidos. La 2-aminopurina (2AP) se convierte mediante las rutas de salvamento en dAPTP, el análogo dNTP del dATP. La BrdUrd se convierte en BrdUTP, el análogo dNTP del dTTP. El primer ciclo de replicación se produce en presencia del análogo, y el segundo y tercer ciclos se producen en su ausencia. Se muestra la replicación tan sólo de la doble cadena que contiene el análogo en el segundo y tercer ciclos. AP es un residuo de nucleótido de 2-aminopurina en el DNA, y BU es un residuo de nucleótido de bromodesoxiuridina. En la ruta que se muestra, ambos análogos cambian un par de bases A-T por un par G-C (letras rojas). Se pueden producir también otras rutas.

El interés reciente se ha centrado en un análogo de un nucleótido mutagénico que se forma en el metabolismo normal. Recuérdese del Capítulo 15 que el estrés oxidativo generado, por ejemplo, al tratar a las células con peróxido de hidrógeno, daña las bases del DNA. La oxidación de los residuos de guanina del DNA a 8-oxoguanina es fuertemente mutágena, ya que la 8-oxoguanina se aparea durante la replicación con adenina casi de forma tan eficaz como se aparea con citosina. Este mal apareamiento podría producir la mutación al cambiar un par de bases G-C a un T-A. Recientemente se ha descubierto una enzima que hidroliza de forma específica el nucleótido 8-oxo-dGTP a 8-oxo-dGMP más pirofosfato (el producto del gen *mutT*; véase el Capítulo 25). Las mutaciones que inactivan esta enzima tienen un fenotipo mutador, lo que sugiere que una ruta mutágena significativa es la oxidación de los nucleótidos de guanina a nucleótidos de 8-oxoguanina, seguido de su incorporación al DNA, y esa mutagénesis oxidativa se minimiza por la rotura del 8-oxo-dGTP antes de que pueda producirse su incorporación.



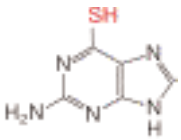
8-oxo-dGTP



Los análogos de nucleótidos con alteraciones de las propiedades de apareamiento de bases son mutágenos, ya que forman pares de bases que no corresponden a los de Watson y Crick cuando en el molde o en un nucleósido trifosfato que entra se encuentra el análogo.

LAS ENZIMAS QUE METABOLIZAN LOS NUCLEÓTIDOS COMO MARCADORES GENÉTICOS SELECCIONABLES

Dado que la mayoría de las células son capaces de sintetizar nucleótidos de novo, las enzimas de la síntesis de salvamento no suelen ser esenciales para la viabilidad celular. Además, como hemos visto, existen muchos inhibidores de estas enzimas. Por consiguiente, las enzimas que metabolizan los nucleótidos y los genes que las codifican constituyen **marcadores genéticos seleccionables,** que tienen diversas aplicaciones. Como implica el término, pueden diseñarse unas condiciones de crecimiento selectivas que hagan que tan sólo crezcan las células que carecen o que poseen una determinada enzima. Así, por ejemplo, la **6-tioguanina** es un análogo de purina que se metaboliza por la HGPRT a un intermediario tóxico. El cultivo de células en un medio que contiene tioguanina permite tan sólo el crecimiento de las células que carecen de HGPRT activa.



6-Tioguanina

De igual modo, pueden aislarse células que carezcan de timidina quinasa mediante la selección de un fenotipo resistente a la bromodesoxiuridina, ya que la TK debe ser activa para anabolizar la BrdUrd a un metabolito tóxico. Así pues, pueden medirse las tasas de aparición de mutaciones hacia delante mediante la observación de la aparición de estos fenotipos resistentes a los fármacos.

Del mismo modo, puede seleccionarse la mutación en sentido inverso ajustando las condiciones de cultivo, de manera que la capacidad de síntesis de salvamento sea esencial para la viabilidad celular. Una técnica de uso frecuente, tanto en el análisis genético de células somáticas como en la preparación de anticuerpos monoclonales (véase Herramientas de la Bioquímica 7A), es la **fusión celular.** Dos líneas celulares de orígenes diferentes se mezclan en unas condiciones en las que algunas de ellas puedan fusionarse físicamente, dando lugar a dos núcleos diferentes en un citoplasma. Pueden seleccionarse estos híbridos celulares mediante un ajuste de las condiciones de cultivo, de tal manera que tan sólo los híbridos crezcan en el **medio HAT** (medio de cultivo celular normal potenciado con *h*ipoxantina, *a*minopterina y *t*imidina). La aminopterina inhibe la dihidrofolato reductasa y bloquea, por tanto, la síntesis de novo de purinas y timidilato. Las células sólo pueden sobrevivir si poseen una HGPRT activa para

Los genes para las enzimas que metabolizan los nucleótidos constituyen unos marcadores seleccionables excelentes. Las rutas separadas de salvamento y de novo permiten la selección de la supervivencia o la muerte de las células con determinados rasgos metabólicos.

utilizar la hipoxantina para la síntesis de purinas, y TK para utilizar la timidina para la síntesis de timidilato.

Los genes con fenotipos seleccionables constituyen un instrumento importante para la tecnología del DNA recombinante, para introducir nuevo material genético en células, de animales, vegetales o microbianas, ya que se pueden introducir moléculas de DNA recombinantes que contienen un marcador seleccionable unido al gen cuya transferencia se desea. La aplicación de unas condiciones selectivas fuerza entonces el crecimiento exclusivo de las células que han adquirido el nuevo par de genes. Una variante curiosa de este método es la que se ha descrito en un informe reciente sobre un tratamiento novedoso de los tumores cerebrales. Se inyectó en el tumor un DNA recombinante que contiene el gen de la desoxipirimidina quinasa del virus del herpes simple. En animales de experimentación, las células proliferantes (tumorales) captaron y replicaron este DNA. Al cabo de varios días se trató a los animales con ganciclovir, y ello produjo la muerte selectiva de las células tumorales debido a la fosforilación selectiva del fármaco en esas células.

RESUMEN

Los nucleótidos se producen en el interior de las células a partir de la degradación de los ácidos nucleicos, de la reutilización (o salvamento) de los nucleósidos o las nucleobases preformadas, o de la biosíntesis de novo. Los nucleótidos de purina se forman a nivel del nucleótido, en una ruta de 10 pasos que conduce desde el PRPP al ácido inosínico. A partir de este punto de ramificación, hay rutas distintas que conducen a los nucleótidos de adenina y de guanina. El catabolismo de las purinas da lugar a ácido úrico, un compuesto insoluble que se forma en una cantidad excesiva en diversos estados patológicos. Las pirimidinas se sintetizan a nivel de las bases, y la conversión en un nucleótido se produce en una fase posterior de la ruta. Una ruta sin ramificaciones conduce al UTP y al CTP. En la mayoría de los organismos, los ribonucleósidos difosfato son los sustratos de la reducción del azúcar ribosa in situ, dando lugar a los desoxirribonucleósidos difosfato, que a su vez dan lugar a los cuatro dNTP precursores del DNA. La ribonucleótido reductasa es un lugar de control importante, en la medida en que constituye la primera reacción metabólica destinada específicamente a la síntesis del DNA. La biosíntesis de los nucleótidos de timina comporta la transferencia del grupo metileno del 5,10-metilentetrahidrofolato a un nucleótido de desoxiuridina, seguida de la reducción del grupo metileno. Las reacciones de la biosíntesis de los desoxirribonucleótidos son objetivos de los inhibidores enzimáticos que han resultado útiles como fármacos anticancerosos, antimicrobianos, antivíricos y antiparasitarios. Otros análogos de nucleótidos han resultado útiles como reactivos de investigación, por ejemplo, en los estudios de mutagénesis o como marcadores de densidad del DNA.

BIBLIOGRAFÍA

Enzimas del metabolismo de los nucleótidos

Blakley, R. L. y S. J. Benkovic (1984) *Folates and Pterins*, Vol. 1. Academic Press, Nueva York. Un libro de múltiples autores que contiene revisiones sobre la dihidrofolato reductasa, el metabolismo de las purinas y la biosíntesis de las pirimidinas.

Elion, G. B. (1989) The purine path to chemotherapy. *Science* 244:41-47. Presentación de la Dra. Elion con motivo de la concesión del Premio Nobel, en la que describe la obtención del alopurinol, el aciclovir, la 6-tioguanina y otros análogos de purina valiosos desde el punto de vista terapéutico.

Kornberg, A. y T. A. Baker (1992) *DNA Replication*, 2.ª ed. Freeman, San Francisco. El primer capítulo contiene un excelente resumen del metabolismo de los nucleótidos.

Plagemann, P. G. W., R. M. Wohlhueter y C. Woffendin (1988) Nucleoside and nucleobase transport in animal cells. *Biochim. Biophys. Acta* 947:405-443. Para que se produzcan las rutas de sal-

vamento, es necesario que sus sustratos entren en las células. Esta revisión describe los procesos de transporte que intervienen en ello.

Smith, J. L., E. J. Zaluzec, J.-P. Wery, L. Niu, R. L. Switzer, H. Zalkin y Y. Satow (1994) Structure of the allosteric regulatory enzyme of purine biosynthesis. *Science* 264:1427-1433. Estructura cristalina de la PRPP amidotransferasa de *B. subtilis*, la enzima reguladora clave de la síntesis de purinas.

Webster, D. R., D. M. O. Becroft y D. P. Suttle (1995) Hereditary orotic aciduria and other disorders of pyrimidine metabolism. En: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7.ª ed., editado por C. R. Scrivener, A. L. Beaudet, W. S. Sly y D. Valle, pp. 1799-1837. McGraw-Hill, Nueva York. Un tratamiento completo de estas enfermedades infrecuentes.

Zalkin, H. y J. E. Dixon (1992) De novo purine nucleotide biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 42:259-287. Una revisión centrada principalmente en la regulación genética en los procariotas y las estructuras de las enzimas, y sus genes en los eucariotas.

Biosíntesis de los desoxirribonucleótidos

Arnér, E. S. J. y S. Eriksson (1995) Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol. Ther.* 67:155-186. Ha crecido el interés en estas enzimas debido a sus actuaciones en la activación metabólica de los fármacos nucleósidos.

Carreras, C. y D. V. Santi (1995) The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu. Rev. Biochem.* 64:721-762. Un análisis del mecanismo que se basa en información estructural reciente.

Danenberg, P. (1977) Thymidylate synthase—A target enzyme in chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta* 473:73-92. Esta vieja revisión resume elegantemente los conocimientos del mecanismo por estudios de la inhibición de la timidilato sintasa por el FdUMP.

Elledge, S., Z. Zhou y J. B. Allen (1992) Ribonucleotide reductase: Regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem. Sci.* 17:119-123. En las levaduras, esta enzima está regulada por el ciclo celular y es inducible por la lesión del DNA, como se considera en esta mini-revisión.

Holmgren, A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* 264:13963-13966. Se consideran los dos transportadores electrónicos conocidos para la rNDP reductasa, así como la posible existencia de otro transportador de este tipo.

Jordan, A. y P. Reichard (1998) Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.* 67:71-98. Una revisión reciente completa que se centra en el significado evolutivo de la existencia de clases muy diferentes de esta importante enzima.

Kunz, B. A., S. E. Kohalmi, T. A. Kunkel, C. K. Mathews, E. M. McIntosh y J. A. Reidy (1994) Deoxyribonucleoside triphosphate levels: A critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutat. Res.* 318:1-64. Esta revisión describe las consecuencias genéticas de los desequilibrios de las cantidades de los desoxirribonucleótidos.

Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri y X. Wang (1997) Cytochrome *c* and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase 9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489. Prueba interesante de que la acumulación de dATP ayuda a desencadenar la apoptosis y destruye las células aun cuando no estén experimentando la replicación del DNA.

Mathews, C. K. (1993) Enzyme organization in DNA precursor biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 44:167-203. Esta revisión resume los datos que indican que las enzimas de la biosíntesis de los dNTP están ligadas en complejos multienzimáticos, que a su vez pueden estar ligados a los lugares de replicación del DNA.

Stubbe, J. (1998) Ribonucleotide reductases in the twenty-first century. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2723-2724. Un comentario breve pero bien referenciado que se centra en temas estructurales y de mecanismos que esperan resolución.

Uhlin, U. y H. Eklund (1994) Structure of ribonucleotide reductase protein R1. *Nature* 370:533-539. Un análisis cristalográfico que presenta un modelo para la holoenzima reductasa.

Análogos de nucleótidos y quimioterapia

Appelt, K. y 31 coautores (1991) Design of enzyme inhibitors using iterative protein crystallographic analysis. *J. Med. Chem.* 34:1925-1934. La nueva era de diseño de fármacos, aplicado a la timidilato sintasa.

Culver, K. W., Z. Ram, S. Wallbridge, H. Ishii, E. H. Oldfield y R. M. Blaese (1992) In vivo gene transfer with retroviral vector—Producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256:1550-1552. Una forma atractiva de utilizar la desoxipirimidina quinasa del virus del herpes como agente selectivo para la destrucción de las células tumorales.

Hardy, L. W., J. S. Finer-Moore, W. R. Montfort, M. O. Jones, D. V. Santi y R. M. Stroud (1987) Atomic structure of thymidylate synthase: Target for rational drug design. *Science* 235:448-455. Describe la determinación de la estructura cristalina de esta enzima y sus implicaciones.

Jackson, R. C., ed. (1999) *Anti-folate drugs—Past and future perspectives* (Series: Cancer Drug Discovery and Development) Humana Press, Inc., Totowa, N.J. 451 páginas. Contiene 22 artículos que describen nuevos enfoques sobre el desarrollo de fármacos.

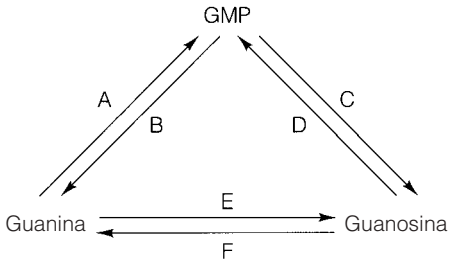
Knighton, D. R., C.-C. Kan, E. Howland, C. A. Janson, Z. Hostomska, K. M. Welsh y D. A. Matthews (1994) Structure of and kinetic channelling in bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase. *Struct. Biol.* 1:186-194. Esta interesante enzima es un objetivo atractivo para la quimioterapia antiprotozoaria.

Mitsuya, H., ed. (1997) *Anti-HIV Nucleosides: Past, Present, and Future*. R. G. Landes, Georgetown, Tex. Este pequeño libro contiene cinco artículos escritos por expertos en el diseño de fármacos contra el VIH.

North, T. W. (1992) Chemotherapy, antiviral agents. En: *Encyclopedia of Human Biology*, Vol. 2, pp. 395-402. Academic Press, Nueva York. Una revisión informativa y de fácil lectura.

PROBLEMAS

1. Identifique cada reacción catalizada por (a) una nucleotidasa, (b) una fosforilasa, (c) una fosforribosiltransferasa.



2. Describa el destino metabólico de la 5-bromodesoxiuridina. ¿Cabría prever que la BrdUrd *inhibiera* la replicación del DNA? Explique brevemente su respuesta.
3. Prediga los efectos de los siguientes compuestos sobre las concentraciones intracelulares de nucleósidos trifosfato. Para cada respuesta, represente la concentración porcentual inicial del nucleótido en función del tiempo transcurrido tras la administración del agente, para cada uno de los cuatro nucleótidos (semicuantitativamente). Considere no sólo el efecto primario del compuesto sino también los posibles efectos indirectos sobre las enzimas alostéricas causados por la acumulación o agotamiento del nucleótido.
   (a) Efecto de la timidina sobre las concentraciones de dNTP
   (b) Efecto de la trimetoprima sobre las concentraciones de rNTP bacterianas
   (c) Efecto de la fluorodesoxiuridina sobre las concentraciones de dNTP
   (d) Efecto de la hidroxiurea sobre las concentraciones de dNTP
   (e) Efecto de la azaserina sobre las concentraciones de rNTP
4. El uracilo radiactivo puede utilizarse para marcar todos los residuos de pirimidinas del DNA. Con el empleo de nombres o estructuras, presente las rutas de conversión del uracilo en dTTP y en dCTP. Para cada reacción indique la intervención de cofactores e identifique los lugares de regulación alostérica.
5. De forma análoga, la hipoxantina (HX) puede utilizarse para marcar los residuos de purinas. Como en el Problema 4, escriba las reacciones que indiquen la conversión de la hipoxantina en dATP y dGTP.
6. La leucemia es una proliferación neoplásica (cancerosa) de los glóbulos blancos. Los clínicos están estudiando en la actualidad la desoxicoformicina, un inhibidor de la adenosina desaminasa, como posible agente antileucémico. ¿Por qué cabría esperar que este tratamiento fuera eficaz?

*7. ¿En qué condiciones cabría prever que un déficit de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa afectara a la velocidad de biosíntesis de nucleótidos de *pirimidina*? ¿Cómo podría calcularse la velocidad de biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina en los animales vivos o en las personas?

*8. Una forma clásica de aislar las bacterias mutantes negativas de la timidilato sintasa es tratar un cultivo bacteriano en crecimiento con timidina y trimetoprima. La mayoría de las células mueren y las supervivientes incluyen una gran cantidad de mutantes negativas para la timidilato sintasa.
   (a) ¿Qué fenotipo le permitiría identificar a estas mutantes?
   (b) ¿Cuál es el fundamento bioquímico de la selección? (Es decir, ¿por qué no se destruyen las mutantes en estas condiciones?)
   (c) ¿Cómo debería modificarse esta técnica para seleccionar células mutantes de mamífero con un déficit de timidilato sintasa?
9. Como se indica en el texto, las células de los mamíferos pueden adquirir resistencia a la acción letal del metotrexato mediante la supervivencia selectiva de las células que contienen un mayor número de copias del gen de la dihidrofolato reductasa, con lo que las concentraciones intracelulares de la enzima se hacen muy elevadas. ¿Qué otros cambios bioquímicos o genéticos de las células podrían hacerlas resistentes al metotrexato?
10. Como se indica en el texto, se han descubierto bacteriófagos con las siguientes sustituciones de bases en su DNA:
    (a) Sustitución completa de dTMP por dUMP
    (b) Sustitución completa de dTMP por 5-hidroximetil-dUMP
    (c) Sustitución completa de dCMP por 5-metil-dCMP
    Para cada uno de estos casos, formule una serie de actividades enzimáticas codificadas por el virus que pudieran conducir a la sustitución observada. Escriba una ecuación equilibrada para cada reacción propuesta.

*11. Las "técnicas suicidas" de isótopos radiactivos se utilizan con frecuencia en la selección de mutantes. En una de estas técnicas, se cultivan células en presencia de [^{3}H]timidina a una actividad específica muy alta. A continuación, se guardan las células congeladas para permitir la desintegración de parte de la radiactividad incorporada. La desintegración radiactiva en los residuos de dTMP del DNA causa una ruptura de cadenas y otras posibles alteraciones letales. En consecuencia, las células que han incorporado timidina en su DNA es muy probable que sean destruidas por este procedimiento.
    (a) Identifique un déficit enzimático que permitiera a una célula mutante sobrevivir a esta técnica.
    (b) Escoja una enzima del metabolismo de los nucleótidos y diseñe una técnica de suicidio que pueda seleccionar mutantes con un déficit de esa enzima.

*12. Para cualquiera de las enzimas multifuncionales de la biosíntesis de nucleótidos de purina o de pirimidina, suponga que la enzima está disponible en forma purificada y proponga uno o dos experimentos para determinar si la enzima "canaliza" los sustratos a través de una secuencia de reacción de múltiples pasos.

13. Escriba ecuaciones equilibradas para las tres reacciones conocidas que transfieren un grupo amino a un sustrato mediante la condensación con aspartato para dar un intermediario que sufra luego una eliminación α,β para dar el producto y fumarato.

*14. La CTP sintetasa cataliza la conversión de UTP en CTP, dependiente de la glutamina. La enzima se inhibe alostéricamente por el producto, CTP. Las células de los mamíferos que presentan un defecto de esta inhibición alostérica muestran un fenotipo complejo: requieren timidina en el medio de crecimiento, poseen unas reservas de nucleótidos desequilibradas y tienen un fenotipo mutador. Explique el fundamento de estas observaciones.

15. Si los nucleótidos de timina se degradan por las mismas enzimas que catabolizan los nucleótidos de uridina, indique la estructura del metabolito de la timina que corresponde al β-ureidopropionato.
16. (a) Explique el fundamento bioquímico del hecho de que puedan sincronizarse las poblaciones celulares tratándolas con desoxitimidina.

(b) Explique la aparente paradoja de que el dATP a concentraciones bajas es un activador de la ribonucleótido reductasa, mientras que a concentraciones mayores pasa a ser un inhibidor.

17. En el texto se indica que el ATP se sintetiza fundamentalmente por el metabolismo energético, mientras que otros nucleósidos trifosfato se forman por la acción de la nucleósido difosfato quinasa. ¿Qué ruta adicional existe para la síntesis de GTP?

CAPÍTULO 23

Coordinación metabólica, control metabólico y transducción de señal

NUESTRA PRESENTACIÓN DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO EN LOS CAPÍTULOS anteriores ha hecho énfasis especialmente en la célula, sus reacciones, sus enzimas individuales y el resto de componentes. En este capítulo integramos estas rutas individuales de dos formas. En primer lugar, revisamos los perfiles metabólicos de los principales órganos de los vertebrados: qué combustibles utilizan, qué combustibles generan y cómo interactúan los órganos en situaciones de estrés para mantener un equilibrio energético adecuado. Las interacciones se controlan en gran parte mediante señales hormonales, algunas de las cuales se han considerado ya. En la segunda parte de este capítulo describimos los mecanismos moleculares de la transducción de señal, ampliando lo que hemos presentado ya en el Capítulo 12. En los últimos años se ha obtenido un notable conocimiento de este tema, con el descubrimiento de elementos de la transducción de señal, como factores de crecimiento, hormonas, factores de transcripción y receptores, alterados por mutaciones en las células cancerosas. Estos descubrimientos han establecido que el cáncer es una enfermedad genética y han aclarado los mecanismos de control de las células normales, al mostrar las consecuencias de una alteración del control.

Las concentraciones de metabolitos constituyen un mecanismo de control intracelular importante.

Al considerar la integración metabólica, debe tenerse en cuenta que el metabolismo se controla en gran medida por la disponibilidad de los sustratos en las rutas metabólicas específicas. En general, las concentraciones de sustratos en el interior de las células se sitúan por debajo de las concentraciones de saturación de las enzimas que los metabolizan. En consecuencia, los flujos de reacción a través de determinadas enzimas varían en función de las variaciones de las concentraciones del sustrato. Un buen ejemplo es la adaptación metabólica que se produce durante una carrera de maratón. Una vez agotadas las reservas de glucógeno del hígado y del músculo, el flujo a través de la glucólisis se reduce en el músculo, no por una razón hormonal sino simplemente porque hay menos glucosa fosfato disponible. Se producen entonces ajustes hormonales para permitir un mayor uso de los ácidos grasos en el músculo, pero el factor principal en la decisión metabólica que toma la célula, la de qué sustrato catabolizar para obtener energía, es la concentración de cada uno de los sustratos utilizables.

Interdependencia de los principales órganos en el metabolismo de los combustibles en los vertebrados

En este apartado analizamos el metabolismo, no como las actividades que puede realizar una sola célula, sino como la totalidad de las reacciones químicas que tienen lugar en un animal multicelular complejo. Resaltamos las funciones especializadas que desempeña cada uno de los órganos importantes en el metabolismo de los combustibles (cerebro, músculo, hígado, tejido adiposo y corazón) y describimos las diversas relaciones entre estos órganos cuando el animal se encuentra en distintas condiciones fisiológicas.

ENTRADAS Y SALIDAS DE COMBUSTIBLE

En un organismo diferenciado, cada tejido debe recibir combustibles que pueda utilizar, en cantidades suficientes para satisfacer sus propias necesidades energéticas y realizar sus funciones especializadas. Así, por ejemplo, el riñón debe generar ATP para el trabajo osmótico del transporte de solutos en contra de un gradiente de concentración en la excreción. El músculo debe generar ATP para el trabajo mecánico de la contracción, y en el músculo cardíaco el aporte de energía debe ser continuo. El hígado genera ATP para las funciones de biosíntesis, ya sea la síntesis de proteínas plasmáticas, la generación de colesterol, la síntesis de ácidos grasos, la gluconeogénesis o la producción de urea para la excreción del nitrógeno. La producción de energía debe satisfacer unas necesidades muy variables, en función del grado de esfuerzo, la composición de las moléculas combustibles de la alimentación, el tiempo transcurrido tras la última ingestión de alimento, etcétera. Así, por ejemplo, en el ser humano el consumo calórico diario puede variar hasta 4 veces dependiendo en parte del nivel de ejercicio, desde 1500 a 6000 kcal/día en una persona media, o en unidades termodinámicas, desde 6000 a 25 000 kJ/día.

Los principales órganos que intervienen en el metabolismo de los combustibles presentan diferencias en cuanto a sus concentraciones de enzimas específicas, de manera que cada órgano está especializado en el almacenamiento, uso y generación de distintos combustibles. Los principales depósitos de combustible son los *triacilgliceroles*, que se almacenan principalmente en el tejido adiposo, las *proteínas*, que en su mayor parte se encuentran en el músculo esquelético, y el *glucógeno*, que se almacena en el hígado y el músculo. En general, un órgano especializado en la *producción* de un determinado combustible carece de las enzimas que *utilizan* ese combustible. Así, por ejemplo, en el hígado el catabolismo de los cuerpos cetónicos es escaso. Revisemos ahora cómo se controla la movilización de cada una de las reservas y la forma en que los órganos que intervienen se comunican entre sí para satisfacer las necesidades energéticas del animal. Esta información se resume en la Figura 23.1 y en la Tabla 23.1.

Las principales reservas de combustible son los triacilgliceroles (tejido adiposo), las proteínas (músculo) y el glucógeno (músculo e hígado).

DIVISIÓN METABÓLICA DEL TRABAJO ENTRE LOS PRINCIPALES ÓRGANOS

Cerebro

El cerebro es el más exigente de los órganos y uno de los más voraces. Debe generar ATP en grandes cantidades para mantener los potenciales de membrana que son esenciales para la transmisión de los impulsos nerviosos. En condiciones normales, el cerebro sólo utiliza glucosa para satisfacer sus enormes requerimientos energéticos, que ascienden a alrededor del 60% de la utilización de

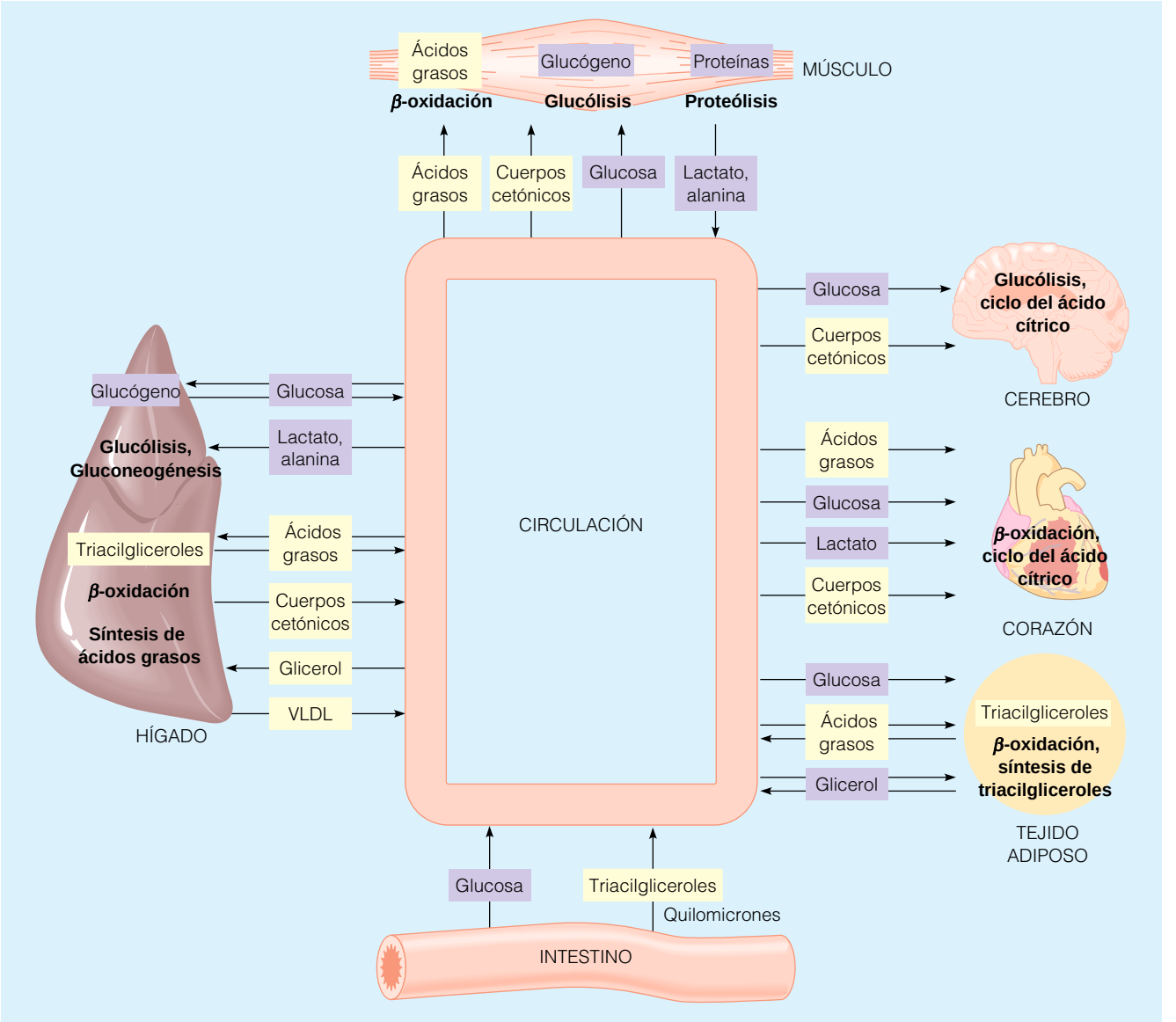


FIGURA **23.1**

Interacciones metabólicas entre los principales órganos que metabolizan los combustibles. Se presentan los principales metabolitos combustibles importados y exportados por cada órgano, junto con las principales rutas energéticas y las reservas de combustible de cada órgano.

TABLA **23.1** **Perfiles de los principales órganos de los vertebrados en el metabolismo de los combustibles**

Tejido	Combustible almacenado	Combustible preferido	Combustibles exportados
Cerebro	Ninguno	Glucosa (cuerpos cetónicos durante la inanición)	Ninguno
Músculo esquelético (reposo)	Glucógeno	Ácidos grasos	Ninguno
Músculo esquelético (durante el ejercicio)	Ninguno	Glucosa	Lactato, alanina
Músculo cardíaco	Ninguno	Ácidos grasos	Ninguno
Tejido adiposo	Triacilgliceroles	Ácidos grasos	Ácidos grasos, glicerol
Hígado	Glucógeno, triacilgliceroles	Aminoácidos, glucosa, ácidos grasos	Ácidos grasos, glucosa, cuerpos cetónicos

glucosa del ser humano en reposo. La necesidad que tiene el cerebro de unos 120 gramos de glucosa al día es equivalente a 1760 kJ, alrededor de un 15% de la energía total consumida por una persona. Los requerimientos cuantitativos de glucosa del cerebro se mantienen bastante constantes, aun cuando un animal esté en reposo o dormido. El cerebro es un órgano muy aerobio y su metabolismo requiere alrededor del 20% del oxígeno total consumido por un ser humano. Dado que el cerebro no posee unas reservas importantes de glucógeno o de otros combustibles, el aporte de oxígeno y de glucosa no puede interrumpirse, ni siquiera por un período de tiempo breve. De lo contrario se produce una lesión cerebral irreversible. Sin embargo, durante un período de ayuno, el cerebro puede adaptarse al empleo de cuerpos cetónicos (véase el Capítulo 18) en vez de glucosa como combustible principal.

Músculo

El músculo puede utilizar diversos combustibles: glucosa, ácidos grasos y cuerpos cetónicos. El músculo esquelético presenta amplias diferencias en cuanto a sus demandas energéticas y a los combustibles que utiliza, en consonancia con sus amplias variaciones de actividad. En el músculo en reposo, los ácidos grasos constituyen la principal fuente de energía, mientras que durante el ejercicio la fuente principal es la glucosa. Al inicio del período de ejercicio, esa glucosa procede de la movilización de las reservas de glucógeno del músculo. Posteriormente, al agotarse las reservas de glucógeno, el combustible dominante son los ácidos grasos. El músculo esquelético almacena aproximadamente las tres cuartas partes del glucógeno total en el ser humano, y la mayor parte del restante se almacena en el hígado. Sin embargo, la glucosa liberada del glucógeno muscular no puede liberarse por la célula para su uso por otros tejidos. El músculo carece de la enzima glucosa-6-fosfatasa, por lo que la glucosa fosfato derivada del glucógeno no puede convertirse en glucosa y liberarse por la célula.

Durante el ejercicio, la velocidad del flujo a través de la glucólisis supera a la del ciclo del ácido cítrico, con lo que se acumula lactato que se libera. Otro producto metabólico es la alanina, producida a través de la transaminación del piruvato en el ciclo glucosa-alanina (véase la página 816 en el Capítulo 20). Tanto el lactato como la alanina se transportan por el torrente sanguíneo al hígado, en donde se reconvierten mediante la gluconeogénesis en glucosa, para volver al músculo y otros tejidos mediante el ciclo de Cori. No obstante, el principal destino del lactato es la reoxidación en el corazón (Capítulo 16).

El músculo contiene otra fuente de energía fácilmente movilizable, sus propias proteínas. Sin embargo, la degradación de las proteínas musculares para satisfacer las necesidades energéticas es un despilfarro energético y peligrosa para el animal, que debe desplazarse para sobrevivir. La degradación proteica se regula de manera que se reduzca al mínimo el catabolismo de los aminoácidos, excepto en la inanición.

Por último, recuérdese que el músculo posee una reserva energética adicional en la creatina fosfato, que genera ATP sin necesidad de metabolizar combustibles (véase la página 476 en el Capítulo 12). Esta reserva se agota pronto en un período de esfuerzo y debe reponerse, junto con las reservas de glucógeno, cuando el músculo está en reposo después de un ejercicio prolongado.

Corazón

El metabolismo del músculo cardíaco difiere del músculo esquelético en tres aspectos importantes. En primer lugar, la variación del trabajo realizado es muy inferior a la que se observa en el músculo esquelético. En segundo lugar, el corazón es un tejido completamente aerobio, mientras que el músculo esqueléti-

co puede funcionar de forma anaerobia durante períodos limitados. Las mitocondrias están agrupadas de manera mucho más densa en el corazón que en otras células, y constituyen casi la mitad del volumen de una célula cardíaca. En tercer lugar, el corazón contiene unas reservas energéticas desdeñables en forma de glucógeno o lípidos, aunque sí contiene una pequeña cantidad de creatina fosfato. En consecuencia, el aporte de oxígeno y de combustibles procedentes de la sangre debe ser continuo para satisfacer las demandas energéticas ilimitadas del corazón. Este órgano utiliza diversos combustibles, principalmente ácidos grasos, pero también glucosa, lactato y cuerpos cetónicos.

Tejido adiposo

El tejido adiposo constituye el principal depósito de combustible de un animal. Los triacilgliceroles totales almacenados ascienden a aproximadamente 565 000 kJ (135 000 kcal) en una persona de tamaño medio. Éste es combustible suficiente, si no hay complicaciones metabólicas, para mantener la vida durante un par de meses en ausencia de ingestión calórica.

El adipocito, o célula grasa, está diseñado para la síntesis y degradación continua de triacilgliceroles, de tal manera que la degradación se controla en gran parte mediante la activación de la lipasa sensible a las hormonas. Dado que los adipocitos carecen de la enzima glicerol quinasa, debe producirse un cierto catabolismo de la glucosa para que tenga lugar la síntesis de triacilgliceroles, concretamente la formación de dihidroxiacetona fosfato para su reducción a glicerol-3-fosfato (véase la página 742 en el Capítulo 18). La glucosa actúa como un sensor del metabolismo del tejido adiposo. Cuando las concentraciones de glucosa son suficientes, la producción continuada de dihidroxiacetona fosfato genera el glicerol-3-fosfato suficiente para volver a sintetizar los triacilgliceroles a partir de los ácidos grasos liberados. Cuando disminuyen las concentraciones intracelulares de glucosa, la concentración de glicerol-3-fosfato disminuye también, y se liberan los ácidos grasos del adipocito para su exportación, unidos a la albúmina, a otros tejidos (véase la página 708 en el Capítulo 18).

Hígado

La función principal del hígado es la síntesis de combustibles para su uso por otros órganos. De hecho, la mayor parte de los metabolitos de peso molecular bajo que aparecen en la sangre tras la digestión son captados por el hígado para este procesado metabólico. El hígado es una localización principal de la síntesis de los ácidos grasos. También produce glucosa, tanto a partir de sus propias reservas de glucógeno como a partir de la gluconeogénesis; para esta última utiliza el lactato y la alanina procedentes del músculo, el glicerol del tejido adiposo y los aminoácidos que no son necesarios para la síntesis proteica. Los cuerpos cetónicos también se forman en gran parte en el hígado. En el hígado, la concentración de malonil-CoA, que está relacionada con el estado energético de la célula, es un factor determinante del destino de las acil-CoA. Cuando hay abundancia de combustible, la malonil-CoA se acumula e inhibe la carnitina aciltransferasa I, impidiendo el transporte de las acil-CoA a las mitocondrias para la β-oxidación y la cetogénesis. En cambio, la reducción de las reservas de malonil-CoA constituye una señal celular para el transporte de los ácidos grasos dentro de las mitocondrias para la generación de energía y combustibles.

Una función importante del hígado es la de amortiguar las concentraciones de glucosa en sangre. Esta acción se realiza en gran parte mediante la acción de la glucoquinasa, una enzima propia del hígado, con una K_M para la glucosa elevada (aproximadamente 10 mM), y en parte mediante una proteína transportadora de K_M elevada, el **transportador de glucosa,** una proteína de membrana (en realidad, una familia de proteínas) que lleva a cabo la difusión faci-

Una de las funciones más importantes del hígado es la de actuar como un "glucostato", controlando y estabilizando la concentración de glucosa en sangre.

litada de la glucosa. Así pues, el hígado tiene unas características únicas en cuanto a que es capaz de responder a las concentraciones elevadas de glucosa en sangre mediante un aumento de la captación y fosforilación de la glucosa, que finalmente da lugar a su depósito en forma de glucógeno. La acumulación de glucosa-6-fosfato activa la forma D de la glucógeno sintasa. Además, la misma glucosa se une a la glucógeno fosforilasa *a*, con lo que aumenta la sensibilidad de la fosforilasa *a* a la desfosforilación (véase la Figura 13.18), con la consiguiente inactivación. Así pues, además de los efectos hormonales, que se describen en breve, el hígado detecta el estado de ingesta y actúa almacenando el combustible derivado de la glucosa. El hígado detecta también el estado de ayuno y aumenta la síntesis y la exportación de glucosa cuando las concentraciones de glucosa en sangre son bajas. (Otros órganos detectan también el estado de ingesta, en especial el páncreas, que adapta en consecuencia su producción de glucagón y de insulina.)

Para satisfacer sus necesidades energéticas internas, el hígado puede utilizar diversos tipos de combustible, como la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos.

Sangre

Todos los órganos que hemos considerado están conectados mediante el torrente sanguíneo, que transporta lo que para un órgano pueden ser un producto de desecho pero para otro es un combustible (por ejemplo, la alanina del músculo al hígado). La sangre transporta también el oxígeno de los pulmones a los tejidos, lo que permite que se produzcan las rutas oxidativas exergónicas, seguidas del transporte del CO_2 resultante de nuevo a los pulmones para que sea espirado, como se describió en el Capítulo 7. Además, como se ha descrito en el Capítulo 18, los componentes lipoproteicos del plasma sanguíneo desempeñan funciones indispensables en el transporte de lípidos. Naturalmente, la sangre es también el medio de transporte de las señales hormonales de un tejido a otro, y la vía de salida de los productos finales del metabolismo, como la urea, hacia los riñones.

Por lo que respecta al metabolismo energético de la propia sangre, la ruta más importante es la glucólisis que tiene lugar en el eritrocito. Las células sanguíneas constituyen casi la mitad del volumen de la sangre y los eritrocitos constituyen más del 99% de las células sanguíneas. Los eritrocitos de los mamíferos no contienen mitocondrias y dependen exclusivamente de la glucólisis anaerobia para satisfacer sus necesidades energéticas.

Regulación hormonal del metabolismo de los combustibles

El mantenimiento de la concentración de glucosa en sangre dentro de unos límites estrechos es crucial para el funcionamiento del cerebro.

En los animales tiene una importancia primordial el mantenimiento de las concentraciones sanguíneas de glucosa dentro de unos límites bastante estrechos, en especial para un funcionamiento adecuado del sistema nervioso. Naturalmente, las concentraciones sanguíneas de glucosa varían en función del estado nutricional. Varias horas después de una comida, la concentración normal en el ser humano es de aproximadamente 80 mg por 100 mL de sangre, o 4.4 mM. Inmediatamente después de una comida, esa concentración puede aumentar hasta 120 mg por 100 mL. En respuesta a ello, entran en funcionamiento los mecanismos homeostáticos que promueven la captación de glucosa en las células y su uso por los tejidos. De igual modo, cuando las concentraciones de glucosa disminuyen, varias horas después de una comida, actúan otros

mecanismos que promueven la liberación de glucosa a partir de las reservas de glucógeno intracelulares, y la gluconeogénesis, de manera que se mantiene la concentración normal. Algunos de los mecanismos homeostáticos se han citado ya en la sección anterior; otros implican la regulación hormonal. Aunque consideramos los mecanismos moleculares de la acción hormonal más adelante en este capítulo, conviene analizar aquí a nivel fisiológico algunas de las hormonas que participan en el metabolismo de los combustibles.

ACCIONES DE LAS PRINCIPALES HORMONAS

Las hormonas clave que regulan el metabolismo de los combustibles son la insulina, que impulsa la utilización de la glucosa, y el glucagón y la adrenalina, que aumentan la concentración de glucosa en sangre.

La hormona más importante que impulsa la captación y el uso de la glucosa es la insulina, mientras que tanto el glucagón como la adrenalina tienen el efecto contrario y aumentan las concentraciones de glucosa en sangre. Los principales efectos de estos agentes se resumen en la Tabla 23.2. La Figura 23.2 ilustra la interrelación existente entre las dos hormonas pancreáticas, insulina y glucagón.

Insulina

La insulina es una proteína de 5.8 kilodalton (véase la página 159) que se sintetiza en el páncreas. Este órgano posee **células endocrinas,** que segregan hormonas directamente al torrente sanguíneo, y **células exocrinas,** que segregan precursores zimógenos de las enzimas digestivas a la parte alta del intestino delgado. El tejido endocrino, que adopta la forma de agrupaciones celulares denominadas islotes de Langerhans, contiene al menos cuatro tipos celulares diferentes, cada uno de ellos especializado en la síntesis de una hormona. Las células A producen glucagón; las células D, **somatostatina,** y las células P, una **hormona pancreática** descubierta recientemente. La insulina se sintetiza en las células B, que detectan las concentraciones de glucosa y segregan insulina en respuesta a una concentración aumentada de glucosa.

La forma más sencilla de describir las diversas acciones de la insulina es afirmar que *la insulina señala el estado de ingesta* y por tanto impulsa: (1) la cap-

TABLA 23.2 Principales hormonas que controlan el metabolismo de los combustibles en los mamíferos

Hormona	Acciones bioquímicas	Acciones fisiológicas
Insulina	↑ Permeabilidad celular a la glucosa (en el músculo y el tejido adiposo) ↑ Glucólisis ↑ Síntesis de glucógeno ↑ Síntesis de triacilgliceroles ↓ Gluconeogénesis ↓ Lipólisis ↓ Degradación de proteínas ↑ Síntesis de proteínas, DNA y RNA	Señala el estado de ingesta ↓ Concentración de glucosa en sangre ↑ Almacenamiento de combustible ↑ Crecimiento y diferenciación celulares
Glucagón	↑ Concentración de cAMP en el hígado y tejido adiposo ↑ Glucogenólisis ↓ Síntesis de glucógeno ↑ Hidrólisis de triacilgliceroles ↑ Gluconeogénesis ↓ Glucólisis	↑ Liberación de glucosa del hígado ↑ Concentración de glucosa en sangre
Adrenalina	↑ Concentración de cAMP en músculo ↑ Movilización de triacilgliceroles ↑ Glucogenólisis ↓ Síntesis de glucógeno	↑ Liberación de glucosa del hígado ↓ Uso de glucosa por el músculo ↑ Concentración de glucosa en sangre

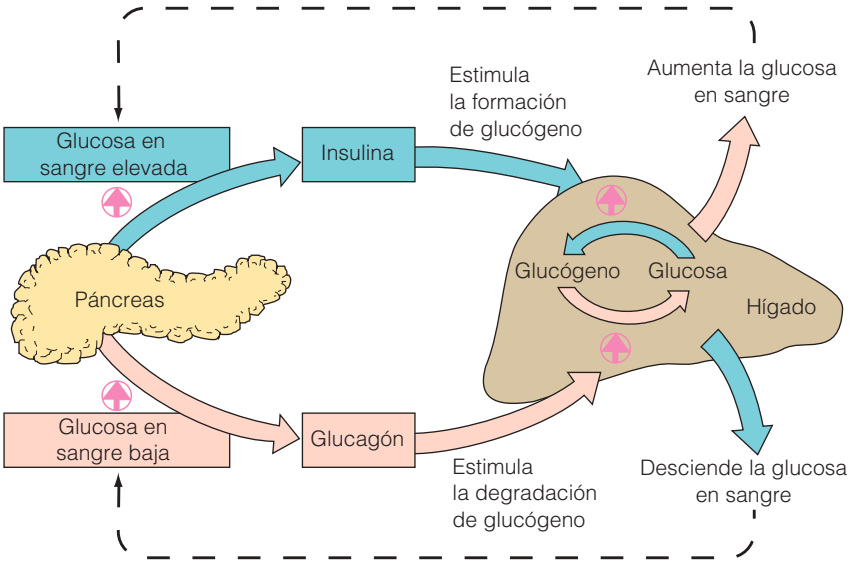


FIGURA **23.2**

Aspectos del control de la concentración de glucosa en sangre mediante la secreción pancreática de insulina y glucagón. Las condiciones que se producen con concentraciones elevadas de glucosa se indican en color azul, y las que se dan con concentraciones bajas de glucosa, en color rosa.

tación de sustratos combustibles en algunas células, (2) el almacenamiento de combustibles (lípidos y glucógeno), y (3) la biosíntesis de macromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas). Los efectos específicos consisten en el aumento de la captación de glucosa en el músculo y el tejido adiposo; la activación de la glucólisis en el hígado; el aumento de la síntesis de ácidos grasos y triacilgliceroles en el hígado y el tejido adiposo; la inhibición de la gluconeogénesis en el hígado; el aumento de la síntesis de glucógeno en el hígado y el músculo; el aumento de la captación de aminoácidos en el músculo con la consiguiente activación de la síntesis de proteínas musculares, y la inhibición de la degradación proteica. Debido a estos impulsos de las biosíntesis, es apropiado considerar a la insulina como una hormona de crecimiento.

El mecanismo mediante el cual la insulina estimula la captación de glucosa en las células musculares y adiposas es un campo de investigación intensa. Una acción importante es la del transportador de glucosa. En las células que no se estimulan por la insulina, algunos miembros de esta familia de proteínas se encuentran en el citosol. La proteína sufre una translocación a la superficie celular en respuesta a la insulina. Una consecuencia importante de la captura de glucosa en los adipocitos es su conversión a glicerol-3-fosfato, que se combina con ácidos grasos para estimular la síntesis de triacilgliceroles.

Glucagón

El glucagón, un polipéptido de 3.5 kilodalton, se sintetiza en las células A de los islotes de Langerhans del páncreas. Estas células endocrinas detectan la concentración de glucosa en sangre y liberan la hormona en respuesta a las concentraciones bajas (véase la Figura 23.2). Tanto la síntesis como la liberación de glucagón se controlan por la insulina.

El objetivo principal del glucagón es el hígado, y su efecto principal consiste en aumentar las concentraciones de AMP cíclico en las células hepáticas, como se indica en la Figura 23.3. Las cascadas metabólicas resultantes, que se han considerado en los Capítulos 13 y 16, impulsan la glucogenólisis e inhiben la síntesis de glucógeno. Además, al activar la hidrólisis de la fructosa-2,6-bisfosfato, el cAMP inhibe la glucólisis y activa la gluconeogénesis. El glucagón produce también la inhibición de la piruvato quinasa (PK) del hígado, causando la acumulación de fosfoenolpiruvato (PEP). La concentración de piruvato dis-

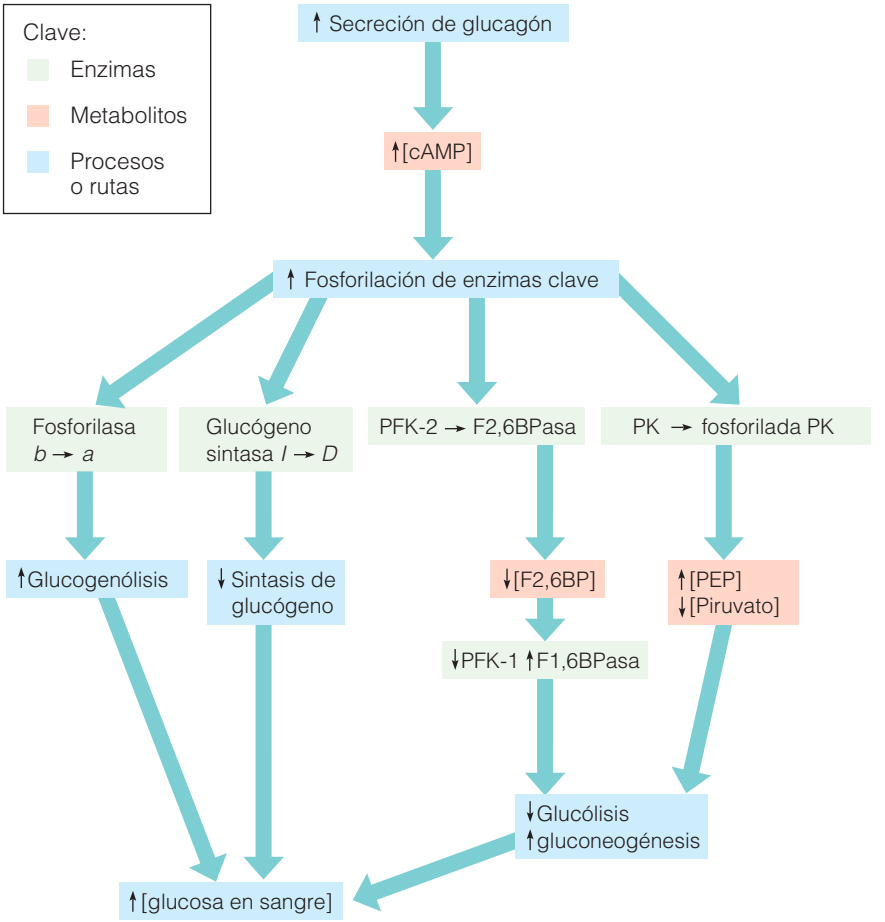


FIGURA **23.3**

Acciones del glucagón en el hígado que dan lugar a una elevación de la glucosa en sangre. Los corchetes indican la concentración; las flechas hacia arriba y hacia abajo indican el aumento o la disminución, respectivamente, de la actividad enzimática, el flujo por la ruta o la concentración del metabolito.

minuye, tanto porque se bloquea su síntesis a partir del PEP como porque persiste su conversión en PEP a través de las reacciones de la piruvato carboxilasa y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Aunque la acumulación de PEP es pequeña, es suficiente para impulsar la gluconeogénesis, mientras que la inhibición de la piruvato quinasa reduce el flujo glucolítico.

El glucagón incrementa también las concentraciones de cAMP en el tejido adiposo. El efecto principal del cAMP en este tejido consiste en promover la movilización de los triacilgliceroles mediante la fosforilación de la lipasa sensible a las hormonas, produciendo glicerol y ácidos grasos.

Adrenalina

Las catecolaminas adrenalina y noradrenalina, cuando se liberan de las terminaciones nerviosas presinápticas, actúan como neurotransmisores (véase el Capítulo 21). Cuando se liberan por la médula suprarrenal en respuesta a las concentraciones bajas de glucosa en sangre, la adrenalina interactúa con sistemas de segundos mensajeros en muchos tejidos, con efectos diversos. En el músculo, la adrenalina activa la adenilato ciclasa, con la activación simultánea de la glucogenólisis y la inhibición de la síntesis de glucógeno (véanse los Capítulos 13 y 16). La degradación de los triacilgliceroles en el tejido adiposo también se estimula, lo que aporta combustible al tejido muscular. En consecuencia, la captación de glucosa en el músculo se reduce, y ello contribuye a aumentar las concentraciones de glucosa en sangre. La adrenalina inhibe también la secreción de insulina y estimula la secreción de glucagón. Estos efectos tienden a elevar la producción de glucosa y su liberación por el hígado. El resulta-

do neto es aumentar las concentraciones sanguíneas de glucosa. A diferencia del glucagón, las catecolaminas tienen unos efectos metabólicos de corta duración. Como se expuso en el Capítulo 13, la acción de la adrenalina sobre las células musculares esqueléticas y cardíacas es una parte crucial de la respuesta de "lucha o huye".

RESPUESTAS AL ESTRÉS METABÓLICO: INANICIÓN, DIABETES

Una forma excelente de comprender cómo integran realmente el metabolismo del combustible las relaciones entre los órganos y las relaciones hormonales que hemos descrito es examinar los efectos del estrés metabólico. En este apartado consideraremos dos ejemplos: el ayuno prolongado, en el que la ingestión de sustratos combustibles es insuficiente, y la **diabetes mellitus,** en la que existe una insuficiencia funcional de insulina que deteriora la capacidad del organismo para utilizar la glucosa, a pesar de que el azúcar esté presente en abundancia.

Revisemos en primer lugar de qué manera se mantienen las concentraciones de glucosa durante los ciclos de alimentación normales (Figura 23.4). La elevación de la glucosa en sangre que se produce inmediatamente después de una comida que contiene hidratos de carbono estimula la secreción de insulina y suprime la secreción de glucagón. Estos efectos promueven, conjuntamente, la captación de glucosa en el hígado, estimulan la síntesis de glucógeno y suprimen la degradación de glucógeno. El flujo a través de la glucoquinasa aumenta en respuesta a las concentraciones elevadas de glucosa, proporcionando sustratos para la síntesis de glucógeno. Además, la activación de la acetil-CoA carboxilasa en el hígado estimula la síntesis de ácidos grasos, con un transporte posterior al tejido adiposo en forma de triacilgliceroles en las lipoproteínas de muy baja densidad. Allí, las concentraciones elevadas de intermediarios glucolíticos y de ácidos grasos estimulan la síntesis de triacilgliceroles. Finalmente, el aumento de la captación de glucosa en los músculos aumenta las concentraciones de sustratos para la síntesis de glucógeno también en ese tejido.

Varias horas después, cuando las concentraciones de glucosa en sangre empiezan a caer, los procesos citados se invierten. La secreción de insulina se hace más lenta y la secreción de glucagón aumenta. Esto promueve la movilización del glucógeno en el hígado a través de mecanismos de cascada dependientes de cAMP que activan la glucógeno fosforilasa e inactivan la glucógeno sintasa. La degradación de los triacilgliceroles en los adipocitos se activa también, a través de la acción de la lipasa sensible a las hormonas, generando ácidos grasos para su uso como combustible por el hígado y el músculo. Al mismo tiempo, la disminución de las concentraciones de insulina reduce el empleo de glucosa por el músculo, el hígado y el tejido adiposo. Consecuentemente, casi toda la glucosa producida en el hígado se exporta a la sangre y puede utilizarse por el cerebro.

Inanición

Supongamos que no puede ingerirse alimento no sólo durante unas horas, como acabamos de describir, sino durante muchos días. Dado que una persona de 70 kg puede almacenar como máximo el equivalente a 6700 kJ de energía en forma de glucógeno, esta fuente de glucosa sanguínea se agotará en pocas horas. Debido a que es esencial para el funcionamiento del cerebro que las concentraciones de glucosa en sangre se mantengan próximas a 4.4 mM, el organismo se adapta metabólicamente aumentando el empleo de otros combustibles distintos de los hidratos de carbono.

Antes de considerar los ajustes metabólicos que se producen, analicemos las otras reservas energéticas importantes: unos 565 000 kJ en forma de triacilgliceroles, que se encuentran en gran parte en el tejido adiposo, y 100 000 kJ en

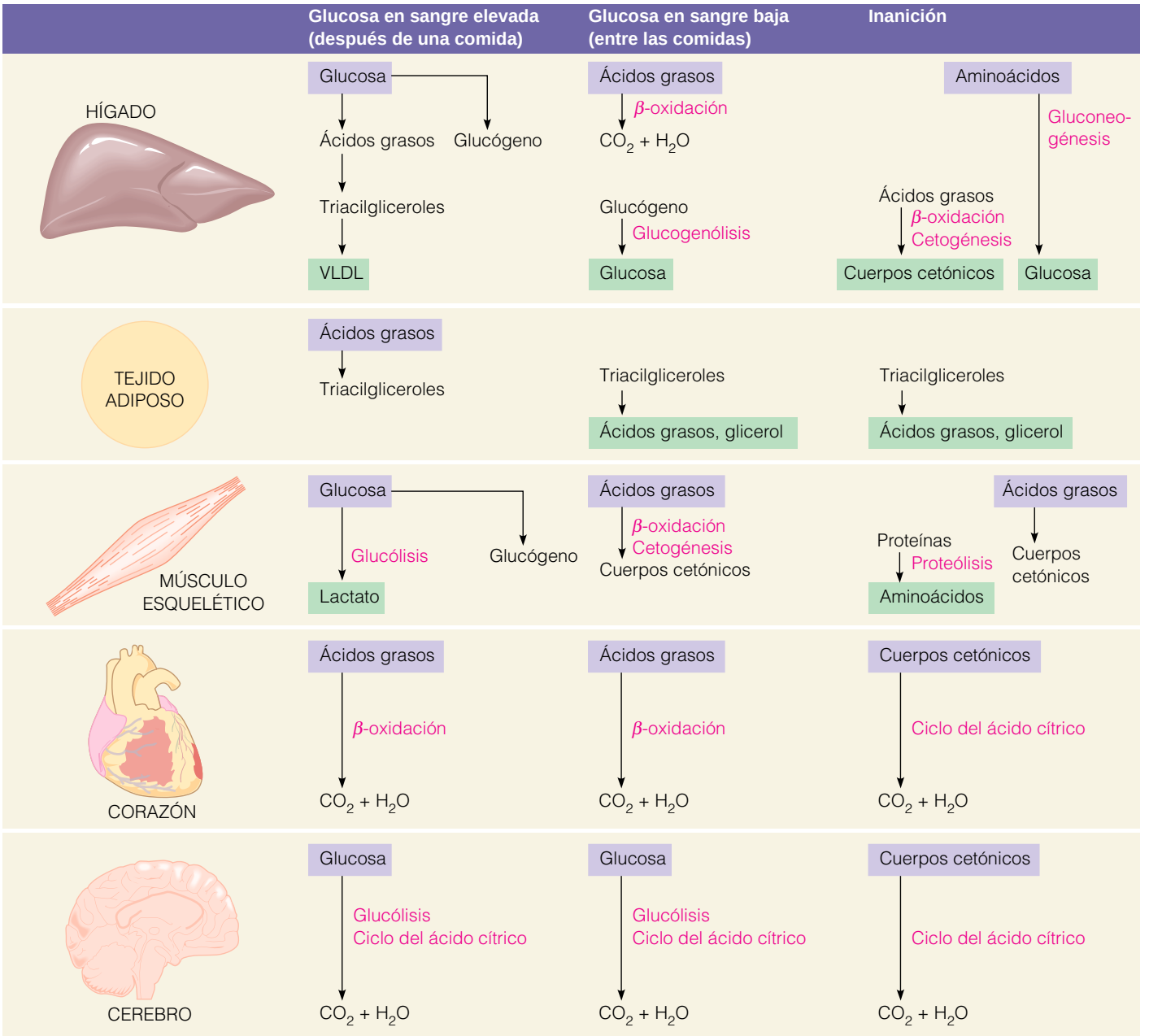
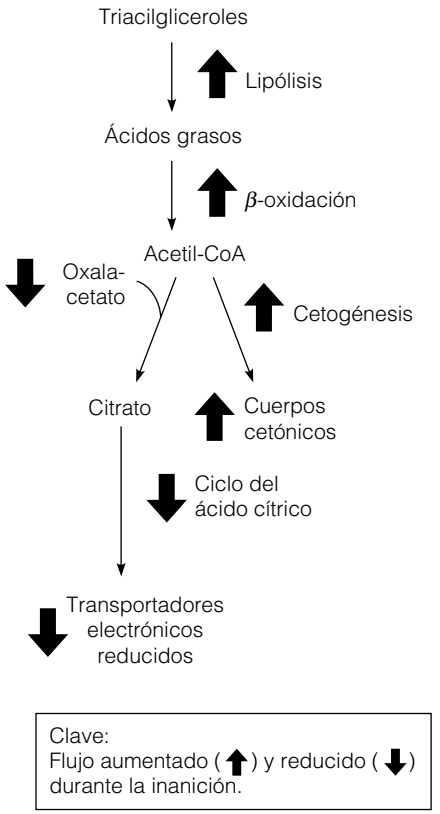


FIGURA **23.4**

Principales procesos de almacenamiento, recuperación y uso de combustibles en los estados de ingesta y de ayuno, y al comienzo de la inanición. El color morado indica combustibles importados al tejido; el color verde indica combustibles exportados del tejido.

forma de proteínas movilizables, en su mayor parte en el músculo. Estas reservas aportan la energía suficiente para permitir la supervivencia durante varios meses. Sin embargo, el uso de estas reservas plantea algunos problemas. La movilización de los triacilgliceroles genera energía en gran parte en forma de acetil-CoA, cuya ulterior oxidación en el ciclo del ácido cítrico requiere la presencia de oxalacetato. Recuérdese del Capítulo 14 que el oxalacetato y otros intermediarios del ciclo del ácido cítrico se utilizan en otras reacciones metabólicas y han de reponerse a través de las rutas anapleróticas. El más importante de estos procesos es la reacción de la piruvato carboxilasa, en donde la mayor parte del piruvato procede del catabolismo de los hidratos de carbono. Cuando la disponibilidad de los hidratos de carbono está limitada, el nuevo aporte de intermediarios del ciclo del ácido cítrico está limitado, y el flujo a través de este ciclo puede reducirse.



Las adaptaciones metabólicas impulsan el empleo de combustibles alternativos durante la inanición, con lo que la homeostasis de la glucosa se mantiene durante varias semanas.

Mientras exista limitación de los hidratos de carbono, los intermediarios del ciclo del ácido cítrico pueden provenir de otras fuentes. Así, por ejemplo, puede utilizarse el glicerol liberado en la lipólisis, pero esta sustancia no se produce en cantidades suficientes para mantener las concentraciones de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Otra posibilidad es la producción de estos intermediarios a partir del catabolismo de las proteínas y la transaminación. Sin embargo, este proceso constituye un despilfarro energético y tiene el efecto indeseable de desgastar al músculo y debilitar a la persona en ayuno. No obstante, la proteólisis se acelera durante los primeros días de inanición, debido a que los aminoácidos necesarios para la síntesis proteica no están presentes en cantidades suficientes para contrarrestar la degradación proteica, que continúa a un ritmo normal. Uno de los principales destinos de los aminoácidos liberados es la gluconeogénesis, al intentar el cuerpo afrontar la ausencia de las reservas de glucógeno mediante la síntesis de su propia glucosa. Durante este período, el hígado y el músculo pasan a utilizar ácidos grasos como combustibles principales para su propio uso.

Mientras tanto, el aumento del uso de carbono para la gluconeogénesis reduce la cantidad de oxalacetato disponible para combinarse con la acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico. Debido a que se ha activado la degradación de las grasas, se acumulan tanto la acetil-CoA como los transportadores electrónicos reducidos en el hígado, hasta el punto de que la acetil-CoA no puede oxidarse en su totalidad, y empiezan a acumularse los cuerpos cetónicos. La acumulación de acetoacetato y β-hidroxibutirato aumenta el flujo a través de las reacciones que catabolizan estos cuerpos cetónicos. De esta forma, el cerebro se adapta a las concentraciones reducidas de glucosa con un aumento del empleo de los cuerpos cetónicos como sustratos energéticos alternativos. Esta tendencia continúa durante todo el período de inanición. Al tercer día, el cerebro obtiene aproximadamente una tercera parte de la energía que necesita a partir de los cuerpos cetónicos; al llegar al día 40, ese uso ha aumentado hasta las dos terceras partes. Esta adaptación reduce la necesidad de gluconeogénesis y evita la movilización de proteínas del músculo. De hecho, la pérdida de las proteínas musculares *disminuye* aproximadamente 4 veces en una fase avanzada de la inanición, pasando de los aproximadamente 75 gramos consumidos al día 3 a unos 20 gramos al día 40. Las alteraciones metabólicas que acompañan a la inanición comprometen las capacidades del organismo para responder a nuevas situaciones de estrés, como el frío extremo o la infección. Sin embargo, las adaptaciones permiten mantener la vida durante muchas semanas sin ingestión de alimento, hasta un período total que viene dado en gran parte por el tamaño de los depósitos de grasa.

Diabetes

En la inanición, la utilización de la glucosa es anormalmente baja a causa de que los suministros de glucosa son insuficientes. En la **diabetes mellitus,** la utilización de la glucosa es también baja, pero en este caso la razón es que el estímulo hormonal para la utilización de la glucosa, es decir, la insulina, es deficiente. Como consecuencia de ello, la glucosa está presente de hecho en cantidades excesivas. Las consecuencias del déficit de insulina son comparables a las de la inanición en cuanto a que ponen de manifiesto aspectos importantes de las relaciones metabólicas entre los órganos.

La diabetes mellitus es la tercera causa de muerte en Estados Unidos, y afecta a alrededor del 5% de la población. No se trata de una sola enfermedad, sino más bien de una familia de enfermedades. La **diabetes dependiente de la insulina,** denominada anteriormente diabetes juvenil por su inicio temprano, comporta, a menudo, una destrucción autoinmunitaria de las células B del

páncreas, que puede deberse a diversos factores, incluyendo la infección vírica. Algunas formas de diabetes tienen un origen genético. Las mutaciones de la estructura de la insulina pueden hacer que la hormona sea inactiva, y otras mutaciones causan defectos de la conversión de la preproinsulina o la proinsulina en la hormona activa (véase el Capítulo 5). En estos casos, el tratamiento comporta la administración de insulina. Sin embargo, algunas formas de la enfermedad implican mutaciones de la estructura del receptor de la insulina o de sus actividades intracelulares que promueven la utilización de la glucosa. Estas últimas formas de la enfermedad se denominan **diabetes resistentes a la insulina,** ya que los pacientes no pueden responder a las dosis terapéuticas de insulina.

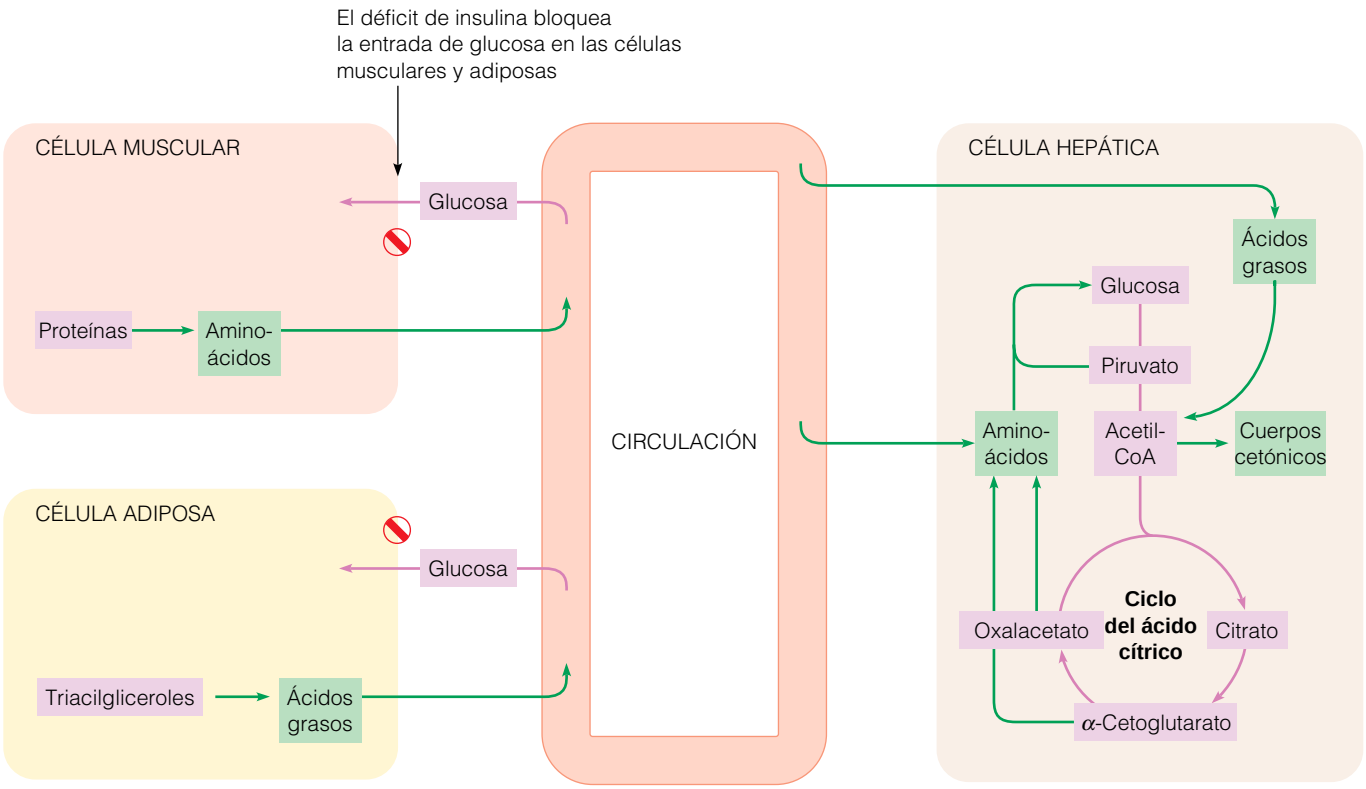
Sea cual sea la causa del déficit funcional de insulina, la diabetes mellitus puede considerarse realmente una "inanición en medio de la abundancia". El fracaso de la insulina para actuar normalmente impulsando la utilización de glucosa, con su consiguiente acumulación en sangre, priva a las células de nutrientes y promueve unas respuestas metabólicas similares a las del ayuno (Figura 23.5). Las células hepáticas intentan generar más glucosa mediante la estimulación de la gluconeogénesis. La mayor parte de los sustratos proceden de los aminoácidos, que a su vez proceden en gran parte de la degradación de las proteínas musculares. La glucosa no puede reutilizarse para volver a sintetizar aminoácidos o ácidos grasos, por lo que los diabéticos pueden perder peso aunque consuman lo que en condiciones normales sería una cantidad de calorías adecuada en la alimentación.

Cuando las células intentan generar fuentes de energía utilizables, los depósitos de triacilgliceroles se movilizan en respuesta a las concentraciones elevadas de glucagón. La oxidación de los ácidos grasos se eleva, con la consiguiente generación de acetil-CoA. El flujo a través del ciclo del ácido cítrico puede disminuir, debido a la acumulación de transportadores electrónicos reducidos, a la

La diabetes es consecuencia bien de un déficit de insulina o de defectos del mecanismo de respuesta a la insulina.

FIGURA **23.5**

Anomalías metabólicas en la diabetes. El déficit de insulina bloquea la captación de glucosa en el músculo y el tejido adiposo, y reduce el catabolismo de la glucosa en todos los tejidos. La proteólisis del músculo y la lipólisis del tejido adiposo se incrementan. En el hígado, la gluconeogénesis a partir de aminoácidos y de intermediarios del ciclo del ácido cítrico se estimula cuando las células intentan compensar la falta percibida de glucosa utilizable, y se incrementa también la oxidación de ácidos grasos y la cetogénesis. El color verde indica las rutas activadas; el color rosa indica las rutas que disminuyen.



limitación del oxalacetato, o a ambas cosas. En el hígado, ambos efectos aceleran la formación de cuerpos cetónicos, generando unas concentraciones elevadas de ácidos orgánicos en sangre. Estos ácidos pueden reducir el pH de la sangre, que pasa del valor normal de 7.4 a una cifra de 6.8 o inferior. La descarboxilación del acetoacetato, que se estimula a un pH bajo, genera acetona, cuyo olor puede detectarse en el aliento de los pacientes en situaciones diabéticas descontroladas graves. Un peligro especial es que estas personas pueden perder el conocimiento, y esto, junto con el olor orgánico dulce del aliento pueda hacer pensar que están bebidos, cuando en realidad sus vidas están en peligro.

Las concentraciones excesivas de glucosa en los líquidos corporales generan otros problemas metabólicos, muy distintos de los observados en la inanición. A concentraciones de glucosa superiores a 10 mM, el riñón no es capaz de reabsorber toda la glucosa que le llega en el filtrado de la sangre, y se pierde glucosa en la orina, a veces en cantidades que se aproximan a los 100 gramos diarios. De hecho, el nombre en latín de *diabetes mellitus* significa literalmente "orina dulce como la miel". La excreción de glucosa crea una carga osmótica, que causa también la excreción de grandes cantidades de agua, y en estas condiciones el riñón no es capaz de reabsorber la mayor parte de esta agua. De hecho, los primeros signos de una diabetes son con frecuencia una micción excesiva, combinada con un exceso de sed. Mucho antes de que la bioquímica fuera una ciencia, la pérdida de nutrientes, la micción excesiva y la degradación de las grasas y las proteínas se identificaron como los elementos diferenciales característicos de la diabetes. En el primer siglo de nuestra era, la diabetes se describía como "la carne y los huesos corriendo juntos en la orina".

Cuando la diabetes afecta a los niños (la forma dependiente de insulina de la enfermedad, que constituye alrededor del 10% del total de casos), el desequilibrio metabólico suele ser más grave y difícil de controlar que en la forma adulta más leve y más frecuente. Esta última puede controlarse a menudo con una restricción de los hidratos de carbono de la alimentación, mientras que el tratamiento de la diabetes juvenil suele requerir la autoinyección diaria de insulina. Durante muchos años esta insulina se purificó del páncreas bovino, y su alto coste, junto con los problemas ocasionales que causaban las pequeñas diferencias estructurales entre la insulina humana y la bovina, condujeron a la incipiente industria de la biotecnología a intentar producir insulina humana mediante técnicas de DNA recombinante. A finales de los años 1970, se clonó el gen de la insulina humana en *E. coli* en una forma que permitía su expresión, y en 1982 la insulina humana clonada se convirtió en el primer producto de la tecnología del DNA recombinante aprobado para su uso en el ser humano.

Mecanismos de acción hormonal

Tras haber considerado las acciones de varias hormonas en la integración del metabolismo de los combustibles, pasamos ahora a considerar los mecanismos moleculares de la acción hormonal. Recuérdese de la presentación de la transducción de señal del Capítulo 12 que las señales extracelulares que controlan el metabolismo incluyen no sólo las hormonas, sino también los neurotransmisores, los factores de crecimiento y las feromonas. Cada uno de estos tipos de sustancias se sintetizan en una clase de células y se liberan, para transmitirse a las **células diana** y controlar sus actividades.

La insulina, el glucagón y la adrenalina son *hormonas* (del griego "activar o excitar"). Este término se acuñó en 1904 para describir la **secretina,** una sustancia que se libera en la porción superior del intestino delgado y que actúa en

el estómago estimulando el flujo del jugo gástrico como ayuda para la digestión. La investigación inicial sobre las hormonas aportó poca información sobre su forma de acción, pero sí mostró unas semejanzas básicas entre las distintas hormonas. En primer lugar, se segregan por tejidos específicos, que ahora se denominan **glándulas endocrinas.** En segundo lugar, se segregan directamente al torrente sanguíneo en vez de excretarse mediante conductos o almacenarse en reservorios. Así pues, la respuesta a una señal hormonal es una consecuencia directa y rápida de su secreción. En la Figura 23.6 se indican las localizaciones de los principales órganos endocrinos del cuerpo humano.

Las hormonas suelen estimular actividades metabólicas en tejidos situados a distancia del órgano secretor. Son activas a concentraciones extraordinariamente bajas, del orden micromolar o picomolar. Además, la mayor parte de las hormonas se metabolizan rápidamente, por lo que sus efectos son a menudo de corta duración, y permiten adaptaciones rápidas a los cambios metabólicos. Las bajas concentraciones de las hormonas y su labilidad metabólica han dificultado la determinación de las concentraciones de cualquier hormona en particular, que es esencial si pretendemos elucidar su mecanismo de acción. Hasta los años 1960, generalmente era necesario utilizar un bioanálisis. Así, por ejemplo, la **oxitocina,** que estimula las contracciones del útero en el parto, se analizaba mediante la adición de la hormona a tiras de músculo uterino y la medida de la longitud de las tiras antes y después de administrar la hormona. La introducción del *radioinmunoanálisis* revolucionó el campo de los análisis hormonales. Esta técnica se describe en Herramientas de la Bioquímica 23A.

Una clase especial de hormonas es la de los eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) que se abordaron en el Capítulo 19. Estos mediadores actúan como hormonas, pero difieren de ellas en su extrema labilidad me-

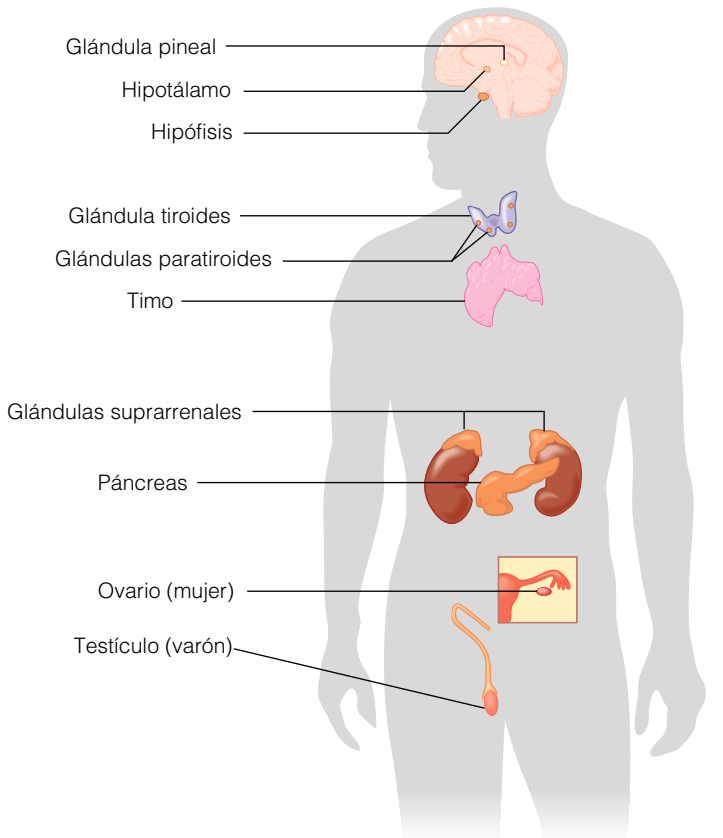


FIGURA **23.6**

Principales glándulas endocrinas del ser humano y sus centros de control en el sistema nervioso central. Algunos otros tejidos producen también hormonas, como por ejemplo el revestimiento de algunas zonas del tubo digestivo.

tabólica, su síntesis en muchos tipos celulares en vez de en una sola glándula endocrina y sus acciones fundamentalmente en las células que están próximas a aquellas que los segregan.

La transducción de señal comporta la comunicación entre células, a través de neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento y feromonas.

Las hormonas difieren en algunos aspectos de otros mediadores intracelulares como las **feromonas,** que se transmiten entre células de distintos organismos, los **neurotransmisores,** que actúan inmediatamente a través de una unión sináptica desde sus lugares de liberación (véase el Capítulo 21), y los **factores de crecimiento,** que difieren de las hormonas en que sus actividades de estimulación del crecimiento son continuas en vez de ser de corta duración en respuesta a un estallido de secreción. Las distinciones entre estas clases de reguladores son poco definidas. Así, por ejemplo, recuérdese que las catecolaminas actúan como neurotransmisores y también como hormonas, según cuál sea su lugar de síntesis y liberación.

ESQUEMA GENERAL DE LA ACCIÓN HORMONAL

Hasta los años 1950 conocíamos poco sobre los mecanismos moleculares de la acción hormonal. Una teoría muy popular era la de que una hormona estimula una ruta metabólica al unirse directamente a la enzima limitante de la velocidad de esa ruta y activarla. Nuestro conocimiento actual se basa en gran parte en la investigación que se ha tratado en el Capítulo 13, a saber, los estudios del efecto de la adrenalina sobre la estimulación de la movilización del glucógeno. Estas investigaciones, llevadas a cabo en gran parte en los laboratorios de Earl Sutherland y Edwin Krebs, demostraron que la adrenalina no penetra en las células, como debiera hacer si activara directamente una enzima limitante de la velocidad. En su lugar, como se muestra en las Figuras 12.13 y 13.18, la adrenalina se une a un receptor macromolecular situado en la superficie de la célula y estimula la formación de AMP cíclico, que actúa como un segundo mensajero y estimula a su vez la fosforilación de las enzimas diana. La hormona en sí es el primer mensajero. Actualmente sabemos que todas las hormonas investigadas hasta el momento actúan a través de la unión a receptores específicos, aunque esos receptores estén situados dentro de la célula diana o en la superficie celular. La presencia de receptores específicos en tipos celulares específicos determina cómo las hormonas, que se segregan al torrente sanguíneo, afectan sólo a determinados tejidos. Los segundos mensajeros se utilizan con frecuencia para la transmisión del mensaje a la ruta metabólica diana, aunque no todas las acciones hormonales implican un segundo mensajero.

La acción hormonal puede influir sobre (1) la actividad enzimática (a través de segundos mensajeros), (2) la síntesis de proteínas específicas, o (3) la permeabilidad de la membrana a iones o metabolitos pequeños.

Desde el punto de vista químico, las hormonas del metabolismo de los vertebrados son de los siguientes tipos: (1) *péptidos* o polipéptidos, como la insulina o el glucagón, (2) *esteroides*, como los glucocorticoides y las hormonas sexuales, y (3) *derivados de aminoácidos*, como las catecolaminas y la tiroxina. Los mecanismos hormonales son de los siguientes tipos: (1) activación o inhibición enzimática a través de segundos mensajeros, como se ha señalado para la adrenalina y para el glucagón, (2) estimulación de la síntesis de determinadas proteínas mediante la activación de genes específicos y (3) aumento selectivo de la captación celular de determinados metabolitos. En esta última categoría se incluyen algunos receptores que actúan directamente como canales iónicos, de tal manera que la unión de la hormona produce un cambio conformacional que abre el canal, y otros receptores que estimulan la captación a través de mecanismos todavía desconocidos, como los de los efectos de la insulina en la captación de glucosa.

Las hormonas actúan uniéndose en primer lugar a un receptor específico que está situado en la membrana plasmática o en el interior de la célula. La mayoría de las hormonas que interactúan con *receptores intracelulares* (denomi-

nados también receptores nucleares) ejercen sus efectos a nivel génico. El complejo hormona-receptor migra al núcleo, donde interactúa con lugares específicos del DNA y afecta a las velocidades de transcripción de los genes cercanos. Entre estas hormonas se encuentran los esteroides, las hormonas tiroideas y las formas hormonales de la vitamina D. Además, los **retinoides** procedentes del ácido retinoico (relacionado con la vitamina A), ejercen efectos reguladores en el desarrollo embrionario, a través de las interacciones con receptores intracelulares (véase el Capítulo 28).

Distinguimos tres clases principales de *receptores unidos a la membrana*. En primer lugar están los receptores, como los que se han presentado en el Capítulo 12, que interactúan con proteínas G e influyen sobre la síntesis de segundos mensajeros. En segundo lugar están los receptores que son ellos mismos canales iónicos, comparables al receptor de acetilcolina nicotínico (Figura 21.34). Las hormonas peptídicas y la adrenalina actúan fundamentalmente a través de estas dos clases de receptores. Una tercera categoría que tiene como ejemplo el receptor de insulina, es una proteína transmembrana con un lugar de unión del ligando en el lado extracelular y un dominio catalítico en el lado citosólico. En el receptor de insulina, ese catalizador es una proteína quinasa, que se estimula por la unión de la insulina al dominio extracelular para fosforilar residuos de tirosina en las proteínas diana.

Los receptores de membrana incluyen: (1) proteínas que influyen en la síntesis de segundos mensajeros, (2) canales iónicos y (3) proteínas con una actividad enzimática intrínseca.

Los mecanismos de las hormonas que actúan a través de los receptores ligados a la membrana mediante el primero y el tercer mecanismo se resumen en la Figura 23.7. Obsérvese que el resultado final de la mayoría de las interacciones entre una hormona y un receptor de membrana es la activación de una o más proteína quinasas, tanto si interviene o no un segundo mensajero. Cuando Edwin Krebs y Edmond Fischer describieron a finales de los años 1950 la secuencia de fosforilaciones proteicas reversibles en la cascada glucogenolítica inducida por la adrenalina, no había indicio alguno del grado en que la fosforilación proteica iba a dominar los mecanismos de señalización celular. En la actualidad se han descrito más de 100 proteína quinasas diferentes en las células de los vertebrados, todas ellas relacionadas, según determinan las homologías de las secuencias de aminoácidos. La importancia de la fosforilación proteica fue reconocida con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología de 1992, concedido a Krebs y Fischer. Otros trabajos más recientes están descubriendo una serie de proteínas fosfatasas específicas que están sujetas también a un control a través de mecanismos de señalización celular.

El resultado final de muchos fenómenos de transducción de señal es la fosforilación o desfosforilación de proteínas diana.

NATURALEZA JERÁRQUICA DEL CONTROL HORMONAL

La regulación hormonal implica una jerarquía de tipos celulares que actúan unos sobre otros estimulando o modulando la liberación y la acción de una hormona. La secreción de hormonas por las células endocrinas se estimula mediante señales químicas procedentes de las células reguladoras que ocupan una posición más alta en esta jerarquía (Figura 23.8). La acción hormonal se controla, en última instancia, por el sistema nervioso central. En los mamíferos el coordinador maestro es el **hipotálamo,** un centro especializado del cerebro. El hipotálamo recibe y procesa los impulsos sensitivos procedentes del entorno a través del sistema nervioso central. En respuesta a ello produce diversas hormonas hipotalámicas, algunas de las cuales se denominan **factores liberadores.** Estos factores actúan sobre la hipófisis que está situada inmediatamente por debajo del hipotálamo. Los factores de liberación estimulan en la parte anterior de la hipófisis la liberación de hormonas específicas. Otras hormonas hipotalámicas inhiben la secreción de determinadas hormonas hipofisarias. Algunas hormonas hipofisarias estimulan directamente los tejidos diana. Así, por ejemplo,

Los factores liberadores de hormonas específicos del hipotálamo controlan la liberación y, por tanto, la acción, de otras hormonas.

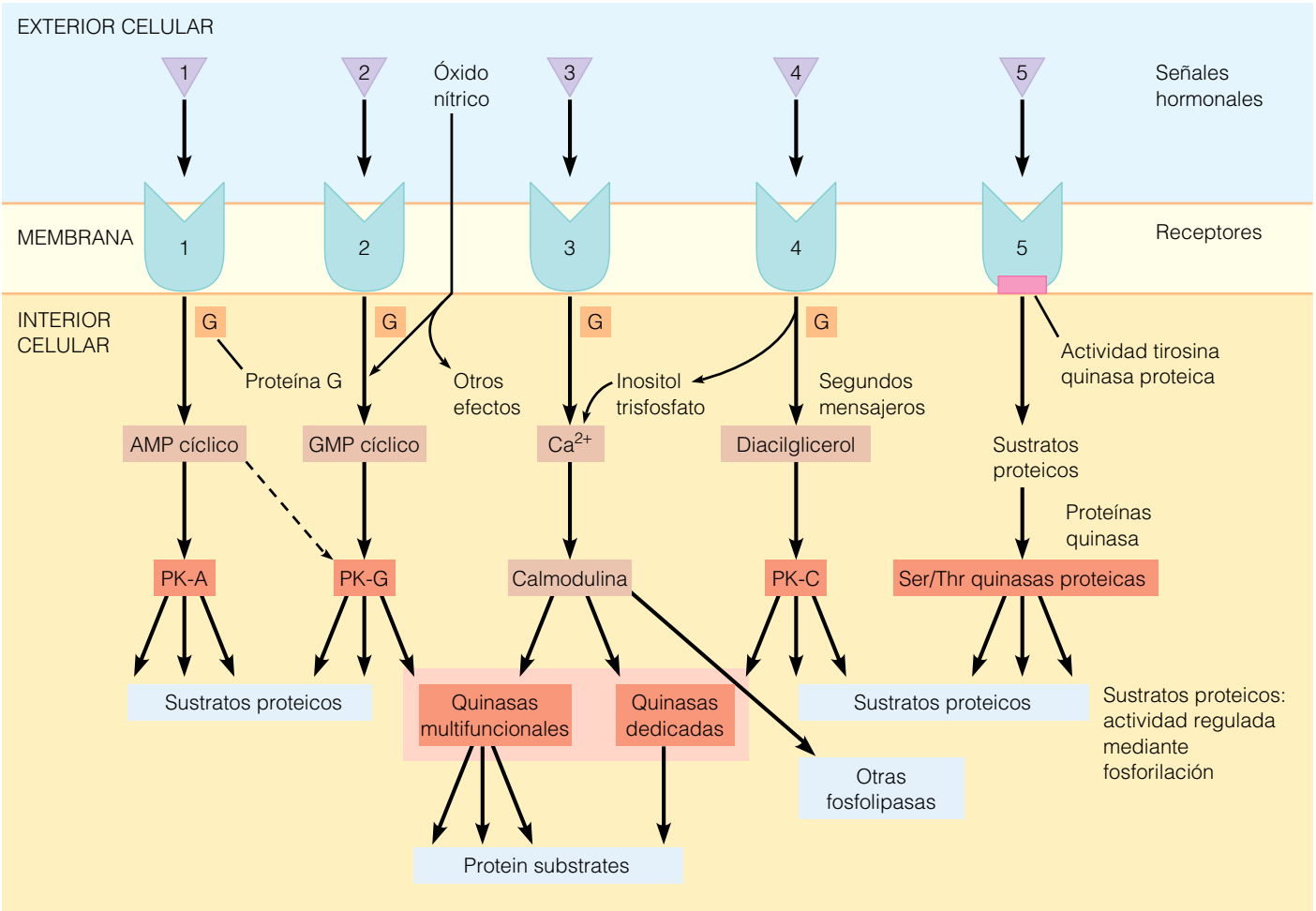


FIGURA **23.7**

Sistemas de transducción de señal eucariotas en los que intervienen receptores de membrana (1-5), y/o segundos mensajeros (1-4). Se muestra el óxido nítrico, aunque éste carece de receptor de membrana, puesto que difunde al interior de la célula e interactúa con los sistemas de segundo mensajero. El resultado final de cada ruta es la fosforilación de una o más proteínas, de las que se han identificado algunas pero no todas. En el Capítulo 21 se consideraron otros efectos del óxido nítrico. Existen datos recientes que indican que algunas rutas presentan una activación cruzada, como se muestra aquí mediante la flecha de trazo discontinuo que indica el control de la PK-G por el AMP cíclico. PK-A = proteína quinasa dependiente del AMP cíclico, PK-G = proteína quinasa dependiente del GMP cíclico, PK-C = proteína quinasa C. Las proteínas quinasas se presentan en color naranja, incluyendo el dominio tirosina quinasa proteico intrínseco del sistema 5.

la **prolactina** estimula la producción de leche en las glándulas mamarias. Sin embargo, la mayor parte de las hormonas hipofisarias actúan sobre glándulas endocrinas que ocupan una posición intermediaria, o secundaria, en la jerarquía, y las estimulan para producir hormonas que ejercen las acciones últimas sobre los tejidos diana. Las hormonas hipofisarias que actúan sobre otras glándulas endocrinas se denominan **hormonas trópicas** o **tropinas.** Un ejemplo de ello es la **hormona corticotrópica suprarrenal** (ACTH), también denominada ***β*-corticotropina.** Este péptido se segrega por la hipófisis anterior, y estimula la corteza suprarrenal para que ésta produzca glucocorticoides y mineralocorticoides, que actúan a su vez sobre numerosos tejidos, entre otros, el riñón, el músculo y el sistema inmunitario.

La acción de una hormona es autolimitante, debido a la existencia de bucles de retroacción, en los que la secreción de una hormona pone en marcha una serie de fenómenos que conducen a la inhibición de esa secreción. Así, por ejemplo, como se muestra en la Figura 23.9, la secreción de *β*-corticotropina por la hipófisis se estimula por el **factor liberador de corticotropina** (CRF), una hormona hipotalámica que es un polipéptido de 41 residuos. Las células hipotalámicas contienen receptores para los glucocorticoides, que detectan las concentraciones elevadas de glucocorticoides circulantes, como el cortisol, procedentes de la estimulación de la corteza suprarrenal. La unión de los glucocorticoides a estos receptores tiene como efecto una inhibición de la ulterior liberación de CRF, con lo que se completa el bucle de retroacción.

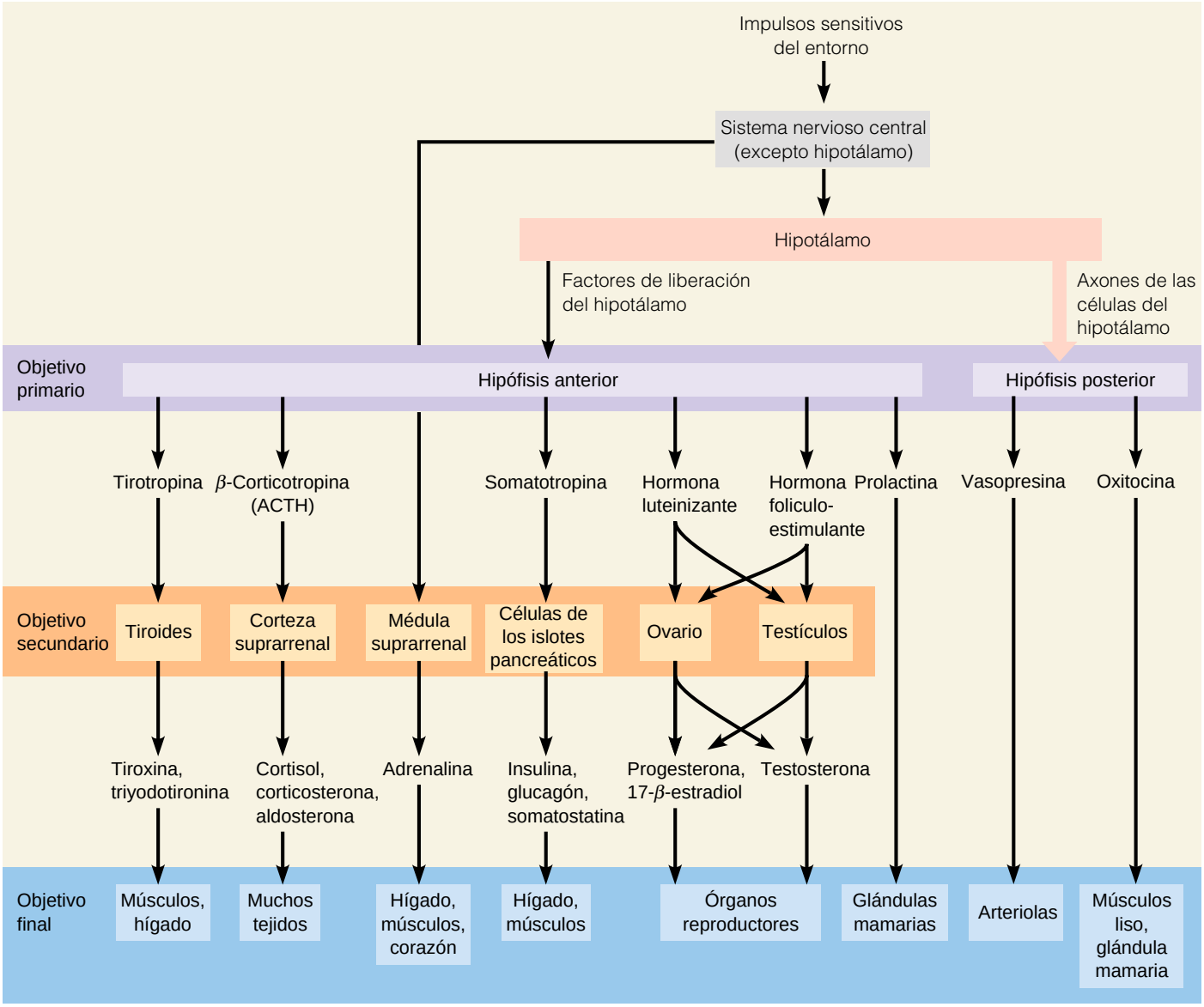


FIGURA **23.8**

Naturaleza jerárquica de la acción hormonal en los vertebrados. La hipófisis representa el primer objetivo y está bajo control hipotalámico. Las hormonas hipofisarias actúan luego sobre los objetivos secundarios, principalmente otras glándulas endocrinas, cuyos productos hormonales influyen conjuntamente en la práctica totalidad de los demás órganos y tejidos. La estimulación nerviosa de la médula suprarrenal controla la liberación de adrenalina.

Podemos resumir la naturaleza jerárquica de la acción hormonal de la siguiente forma. El sistema nervioso central transmite señales al hipotálamo, que produce factores que o bien estimulan o bien inhiben la liberación de hormonas por la hipófisis. Estas hormonas estimulan a otras glándulas endocrinas, y cada una de ellas libera una hormona que actúa sobre un tejido diana y desencadena una respuesta metabólica específica. Otra posibilidad es que una hormona hipofisaria pueda actuar directamente sobre un tejido diana. La acción de una hormona pone en marcha una serie de fenómenos que en última instancia limitan esa acción.

La acción hormonal es autolimitante, debido a la existencia de bucles de retroacción.

SÍNTESIS DE LAS HORMONAS: PRECURSORES DE LAS HORMONAS PEPTÍDICAS

Hemos presentado ya la síntesis de las hormonas esteroideas (véase el Capítulo 19) y de las catecolaminas y las hormonas tiroideas (véase el Capítulo 21), que se producen en ambos casos a través de rutas metabólicas simples. Casi todas las

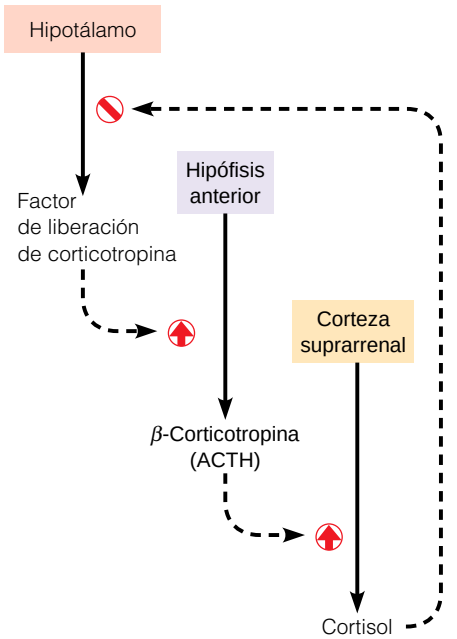


FIGURA **23.9**

Ejemplo de regulación por retroacción de una hormona. El factor liberador de corticotropina (CRF) estimula la liberación de β-corticotropina (ACTH) por la hipófisis anterior. La ACTH estimula la liberación de cortisol por la corteza suprarrenal, que retroactúa sobre el hipotálamo inhibiendo la ulterior liberación de CRF.

La síntesis de hormonas peptídicas comporta casi siempre la ruptura proteolítica de un precursor proteico.

hormonas peptídicas se sintetizan en forma de precursores inactivos que se convierten posteriormente en hormonas activas mediante un procesado proteolítico. Los estudios sobre la síntesis de la insulina proporcionaron los primeros indicios de este fenómeno (véase la Figura 5.21, página 163). Recuérdese que esta hormona contiene dos cadenas polipeptídicas, de 21 y 30 residuos, con dos puentes disulfuro entre las cadenas y un puente intracatenario (véase la Figura 5.15, página 159). Estas cadenas se forman a partir de la ruptura de un polipéptido de 81 residuos denominado **proinsulina.** El primer producto de la traducción del gen de la insulina es la **preproinsulina,** que tiene 105 residuos. La separación de la preproinsulina de una "secuencia señal" de 24 residuos del N-terminal da lugar a la proinsulina, que experimenta un plegado, la formación de un enlace disulfuro y una ruptura para dar lugar a la hormona activa, la insulina. La secuencia señal participa en el transporte de proteínas a través de las membranas (véase el Capítulo 27).

Todas las hormonas polipeptídicas conocidas se sintetiza en la forma "prepro", con una secuencia señal y otra(s) secuencia(s) adicional(es) que se desprende(n) durante la maduración de la hormona. Un caso especialmente interesante es el que se observa cuando una única secuencia polipeptídica contiene dos o más hormonas diferentes. El ejemplo más complejo es el de un precursor de varias hormonas hipofisarias, que contiene secuencias para la β-lipotropina y γ-lipotropina, las α-, β- y γ-hormona estimulante de melanocitos (MSH), la endorfina y la encefalina, así como la ACTH. Este precursor, denominado **pro-opiomelanocortina,** recibe este nombre por su función de precursor de los *opiá*ceos endógenos, hormona *melano*citoestimulante y *corti*cotropina. Una característica destacable de la pro-opiomelanocortina es que se fragmenta en lugares diferentes en distintas células, de manera que distintos tipos celulares producen diferentes conjuntos de hormonas a partir de este precursor único. Los lugares de ruptura se indican en rojo en la Figura 23.10. En la hipófisis anterior, la fragmentación genera ACTH y β-lipotropina y el procesado posterior en el sistema nervioso central da lugar a endorfina y encefalina, entre otros productos.

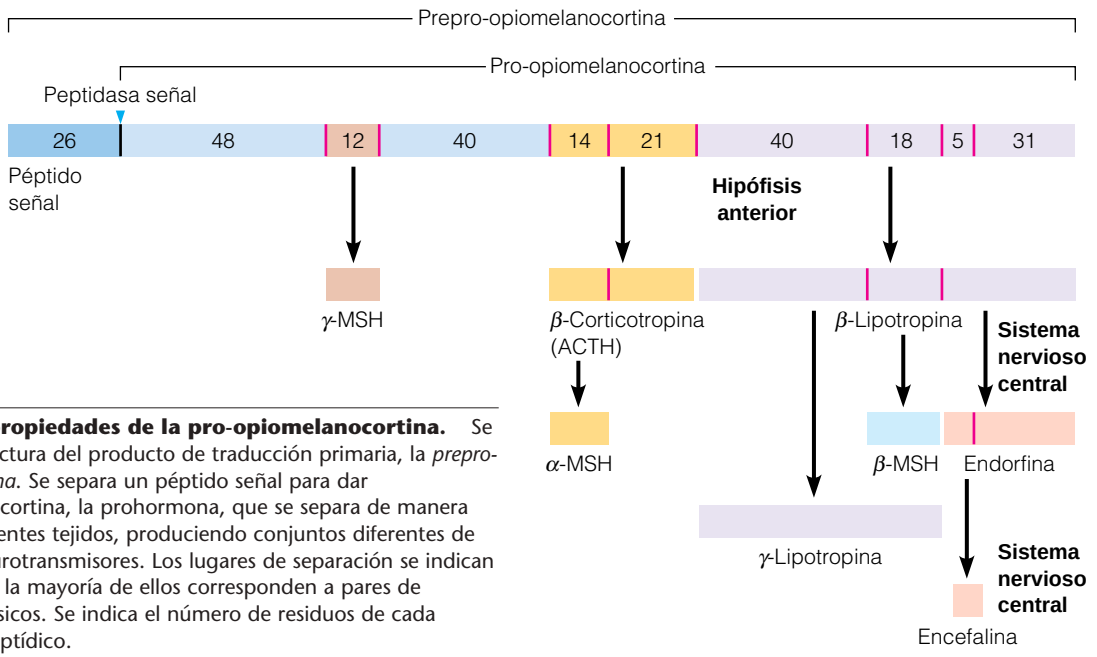


FIGURA **23.10**

Estructura y propiedades de la pro-opiomelanocortina. Se muestra la estructura del producto de traducción primaria, la *prepro-opiomelanocortina.* Se separa un péptido señal para dar pro-opiomelanocortina, la prohormona, que se separa de manera distinta en diferentes tejidos, produciendo conjuntos diferentes de hormonas y neurotransmisores. Los lugares de separación se indican con líneas rojas; la mayoría de ellos corresponden a pares de aminoácidos básicos. Se indica el número de residuos de cada producto polipeptídico.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL: RECEPTORES

Centrémonos ahora en las características moleculares de la acción hormonal, describiendo la estructura y la función de los principales participantes, empezando con los receptores. Como se ha indicado antes, todas las hormonas conocidas interactúan con las células diana mediante la unión inicial a un receptor macromolecular, situado en la membrana plasmática o en el interior de la célula. Dado que el receptor participa en la transducción de la señal desde el mensajero externo a algún componente de la maquinaria metabólica, debe tener al menos un lugar funcional adicional. La actividad de este lugar se modifica por la unión de la hormona, de la misma forma que el lugar catalítico de una enzima alostérica se modifica por la unión de efectores en lugares distantes.

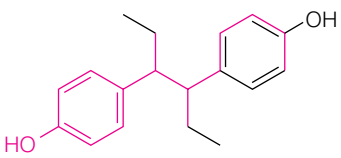
Estudio experimental de los receptores

La unión de las hormonas a los receptores es saturable, comparable a la unión de los sustratos a las enzimas.

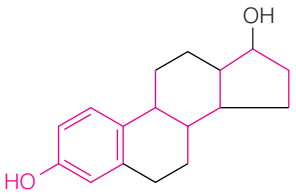
Las interacciones moleculares en las que intervienen los receptores hormonales pueden estudiarse experimentalmente mediante métodos comparables a los que se utilizan en enzimología. La unión de una hormona a su receptor es saturable, y la cinética se parece a la cinética de Michaelis-Menten. La mayoría de las hormonas presentan una unión estrecha, con constantes de disociación del orden de 0.1 μM a 1.0 pM. La capacidad de un tejido para responder a la estimulación hormonal es una función de la densidad de receptores de las células de ese tejido.

Puede utilizarse la unión de la hormona radiactiva o de un análogo para identificar y cuantificar los receptores, ya sea como un método de análisis al purificar los receptores, ya sea para determinar la densidad de los mismos en un determinado tipo celular. La unión estrecha entre las hormonas y sus receptores puede aprovecharse también para el diseño de protocolos de purificación en los que se utiliza la cromatografía de afinidad. De hecho, una de las primeras aplicaciones de esta técnica fue la purificación del receptor de insulina, con el empleo de columnas de insulina inmovilizada. Este avance facilitó una tarea que normalmente es muy difícil por dos motivos. En primer lugar, los receptores unidos a la membrana han de solubilizarse antes de la purificación, sin que se produzca una inactivación irreversible. En segundo lugar, la mayor parte de los receptores hormonales están presentes en cantidades extraordinariamente bajas. Así, por ejemplo, el tejido adiposo contiene tan sólo unas 10^4 moléculas del receptor de la insulina por célula.

Otra técnica útil es el marcaje de fotoafinidad, que crea un enlace covalente entre un análogo hormonal y un receptor. En esta técnica, se modifica una molécula de hormona con un grupo fotorreactivo, como uno azido ($—N_3$). La mezcla de un análogo hormonal marcado radiactivamente con un extracto celular, seguido de la irradiación UV, une el análogo a su receptor, creando un marcaje radiactivo que puede emplearse para aislar el receptor.



Dietilestilbestrol



17-β-Estradiol

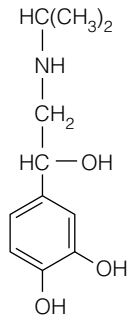
Agonistas y antagonistas

Con frecuencia, el ligando que se utiliza en los análisis de unión de receptores o en la purificación cromatográfica de afinidad no es la propia hormona sino un análogo que se une al receptor, a veces de manera más estrecha que la hormona natural. El análogo puede presentar escasa o ninguna semejanza estructural con el ligando natural, pero puede presentar una relación estereoquímica que se pone claramente de manifiesto en los modelos tridimensionales. Un ejemplo de ello es el potente estrógeno sintético **dietilestilbestrol.** Este compuesto es 3 veces más potente que el 17-β-estradiol, que a su vez, es 10 veces más potente que otros estrógenos naturales. El dietilestilbestrol se ha utilizado para la purifica-

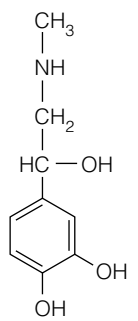
ción y caracterización de los receptores estrogénicos. La hormona sintética se ha utilizado también fuera de laboratorio, por ejemplo, añadiéndola al alimento para estimular el crecimiento del ganado bovino, hasta que se comprobó que era cancerígena. En la actualidad no sabemos si el poder cancerígeno del dietilestilbestrol está relacionado con su actividad estrogénica o con alguna otra propiedad biológica aún no descubierta.

El dietilestilbestrol es un ejemplo de un agonista hormonal, es decir, un análogo que se une de forma productiva a un receptor e imita la acción de la hormona endógena (véase también la página 880 en el Capítulo 21). Un agonista es comparable a un sustrato alternativo de una enzima: su unión al receptor es productiva, por cuanto evoca una respuesta metabólica comparable a la de la unión de la hormona. En cambio, un antagonista hormonal se une a los receptores pero no provoca la respuesta biológica normal. Un antagonista es para un receptor como un inhibidor competitivo es para una enzima, por cuanto que tanto los antagonistas como los inhibidores competitivos compiten con un ligando normal (hormona o sustrato, respectivamente) por la unión a un lugar específico de una proteína y, al unirse, inhiben un proceso biológico normal.

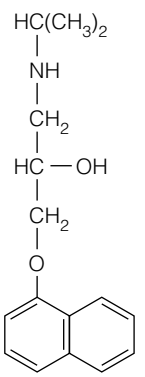
Un agonista hormonal mimetiza a la hormona al unirse productivamente a un receptor. Un antagonista se une de manera no productiva, inhibiendo la acción de la hormona natural.



Isoproterenol



Adrenalina



Propranolol

Los agonistas y antagonistas han sido de gran utilidad en los estudios de la estereoquímica de los lugares de unión en los receptores. A su vez, estas investigaciones son útiles para el diseño de fármacos, destinados a activar o inactivar determinadas clases de receptores. Así, por ejemplo, el agonista, **isoproterenol** se utiliza para el tratamiento del asma, porque imita los efectos de las catecolaminas en cuanto a la relajación de los músculos bronquiales del pulmón. Este efecto se obtiene mediante la interacción con una clase específica de **receptores adrenérgicos** (a los que se da este nombre porque unen la **adrenalina**). Otro fármaco importante, que se utiliza para controlar la presión sanguínea y la frecuencia del pulso en los pacientes cardíacos, es el **propranolol,** un antagonista de otra clase de receptores adrenérgicos, que controlan la presión arterial y la frecuencia cardíaca.

Clases de receptores de catecolaminas

Los estudios realizados sobre un gran número de agonistas y antagonistas de las catecolaminas han revelado la existencia en los vertebrados de cuatro tipos de receptores de catecolaminas, cada uno de los cuales posee un patrón diferente de respuesta a estos análogos. Se les denomina receptores adrenérgicos α_1-, α_2-, β_1- y β_2. Los receptores del tipo β son los que hemos encontrado antes, en nuestra exposición de la glucogenólisis y la lipólisis inducidas por la adrenalina (véanse los Capítulos 13 y 18). Los receptores adrenérgicos de distintos tipos, en diferentes tejidos, poseen varios efectos fisiológicos, algunos de los cuales se resumen en la Tabla 23.3.

Receptores y adenilato ciclasa como componentes diferenciados de los sistemas de transducción de señal

En las fases iniciales de la investigación sobre las hormonas, cuando la movilización del glucógeno estimulada por la adrenalina era la única respuesta bioquímica definida de la interacción hormona-receptor, se observó que la adenilato ciclasa, que sintetiza AMP cíclico, era una enzima unida a la membrana. Dado que el receptor también estaba unido a la membrana, se pensó durante un tiempo que el receptor era la adenilato ciclasa y que la unión de la adrenalina activaba la enzima. Sin embargo, dos observaciones iban en contra de esta interpretación. En primer lugar, se observó que otras hormonas activaban la adenilato ciclasa, de las que se conocen en la actualidad más de una docena, como el glucagón, la ACTH, la hormona estimulante de los melanocitos y la hormona luteinizante. Parecía improbable que la adenilato ciclasa tuviera tantos lugares

TABLA 23.3 Algunas acciones biológicas asociadas a los receptores adrenérgicos

Clase de receptor	Tejido diana	Efecto de la hormona o el agonista
α_1	Iris del ojo	Contracción
	Intestino	Disminución de la motilidad
	Glándulas salivales	Secreción de potasio y agua
α_2	Células pancreáticas B	Disminución de la secreción
	Plaquetas sanguíneas	Agregación
	Adipocitos	Disminución de la lipólisis
	Estómago	Disminución de la motilidad
α (subtipo no identificado)	Arteriolas de la piel, mucosa	Constricción
	Esfínter de la vejiga	Constricción
	Órganos sexuales masculinos	Eyaculación
β_1	Corazón	Aumento de la frecuencia, fuerza y profundidad de la contracción
	Adipocitos	Aumento de la lipólisis
	Intestino	Disminución de la motilidad
β_2	Pulmón	Relajación muscular
	Hígado	Aumento de la glucogenólisis
	Intestino	Disminución de la motilidad

Fuente: Adaptado de L. S. Goodman y A. C. Gilman, eds., *Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7.ª ed. (Nueva York: Macmillan, 1985), p. 72. © 1985 McGraw-Hill, Inc.

de unión hormonal. En segundo lugar, se observó que la unión de las catecolaminas a los receptores de la clase α_2 *inhibía* la adenilato ciclasa, lo cual sugería que distintas clases de proteínas interaccionan con la adenilato ciclasa para producir diferentes efectos metabólicos.

Estas dos observaciones indicaban que el receptor y la adenilato ciclasa son proteínas diferentes. De hecho, la distinción entre los receptores adrenérgicos β y la adenilato ciclasa se obtuvo experimentalmente en 1977. Este avance fue importante, puesto que demostró que este sistema de respuesta hormonal tiene una flexibilidad y versatilidad mucho mayores de lo que antes se había pensado. Una amplia gama de hormonas pueden ejercer multitud de efectos biológicos a través de un mecanismo común, la activación o la inhibición de la síntesis de AMP cíclico. La diversidad de señales y respuestas se ponía de manifiesto en la diversidad de receptores y en la diversidad de enzimas de las células diana cuyas actividades podían estimularse o inhibirse por la fosforilación estimulada por el AMP cíclico. Pronto se averiguó que la transducción de la señal hormonal a la adenilato ciclasa comportaba una tercera clase de proteínas, las proteínas G que hemos presentado en el Capítulo 12. Estos avances fueron reconocidos con la concesión del Premio Nobel de 1994 a Martin Rodbell, que demostró que los receptores son distintos de la adenilato ciclasa y a Alfred Gilman, por el descubrimiento de las proteínas G.

Las hormonas que actúan a través de segundos mensajeros utilizan un módulo de tres proteínas: receptor, transductor (proteína G) y efector (adenilato ciclasa o enzima relacionada).

Dado que los receptores están incluidos en la membrana y se encuentran en cantidades muy bajas, su aislamiento en cantidades suficientes para el análisis estructural es una tarea monumental. La clonación de los genes de los receptores, mediante las técnicas descritas en Herramientas de la Bioquímica 25A-25E, ha sido indispensable para poder obtener la información completa en cuanto a la secuencia de aminoácidos. Entre las diversas proteínas receptoras para las que se ha determinado la secuencia de aminoácidos, como las de los receptores adrenérgicos α_2 y β_2, existen algunas semejanzas estructurales sorprendentes. Las proteínas tienen un tamaño comparable, de 415 a 480 resi-

duos, y poseen siete regiones conservadas que contienen abundantes aminoácidos hidrófobos. Parece claro que éstos corresponden a regiones de hélice α que están incluidas en la membrana y ligadas por bucles hidrófilos, que se proyectan hacia el medio extracelular y el citosol, con el lugar de reconocimiento de la hormona o del neurotransmisor en el lado extracelular. La estructura del receptor adrenérgico β_2 se muestra en la Figura 23.11. La mutagénesis de lugar dirigida de los genes de los receptores clonados se está utilizando para identificar regiones de estas proteínas grandes que están en contacto con la hormona y otros componentes de la maquinaria de transducción de señal. Esta clase de receptores recibe el nombre de receptores serpentina debido a que serpentean hacia atrás y hacia delante a través de la membrana.

El espectro de funciones que se controlan a través de los receptores serpentina se acentuó de forma espectacular en 1998 con el descubrimiento de un gen en *Drosophila* denominado *matusalén*. Las mutaciones de este gen, que codifica una proteína que parece ser un receptor serpentina, amplían un 35% la duración de la vida de las moscas de la fruta mutantes.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL: PROTEÍNAS G

Como se ha indicado antes, en los mecanismos de transducción de señal dependientes del AMP cíclico intervienen tres proteínas distintas: (1) un receptor hormonal, (2) la adenilato ciclasa, y (3) una proteína G. Esta tercera clase se denomina así por la capacidad de estas proteínas para unir nucleótidos de guanina. En 1971, se observó que la guanosina trifosfato era necesaria para la activación de la adenilato ciclasa de los agonistas adrenérgicos β, y posteriormente en esa misma década se descubrió el motivo de esta necesidad: las proteínas de

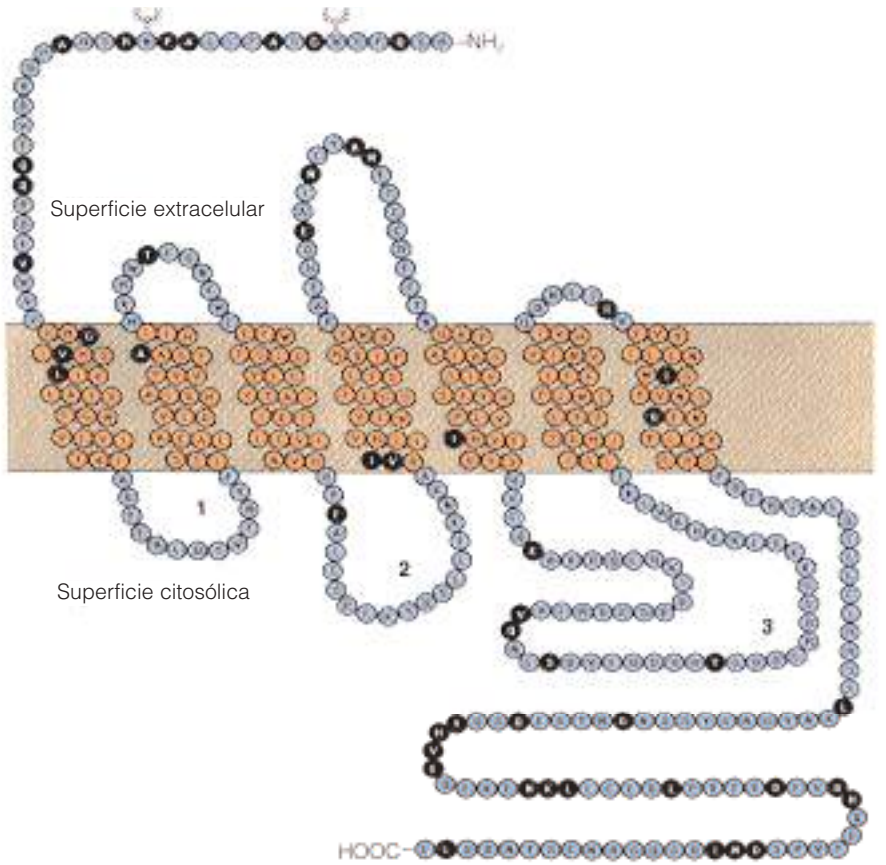


FIGURA **23.11**

Secuencia de aminoácidos del receptor adrenérgico β_2 humano. Los siete dominios transmembrana conservados se indican de color naranja. Obsérvense también los tres bucles extracelulares y los tres bucles citoplasmáticos y las dos unidades de oligosacáridos en el lado extracelular (unidas a residuos de asparagina). La interacción del receptor con las proteínas G se controla en parte por la fosforilación reversible de los residuos de serina y treonina cerca del C-terminal. Los aminoácidos indicados en negro son los que difieren en la secuencia del receptor adrenérgico β_2 del hámster.

Marx, J. R., *Science* (1987) 238:615-616. © 1987 AAAS.

membrana que unen GTP interaccionan con los sistemas de receptores que activan o inhiben la adenilato ciclasa. De las diversas proteínas G conocidas, las dos que están mejor caracterizadas son las G_s, una familia de proteínas G que intervienen en la *estimulación* de la adenilato ciclasa, y las G_i, una familia estrechamente relacionada que interviene en las respuestas que *inhiben* la adenilato ciclasa. Aunque ambos tipos de proteínas G interactúan también con otros receptores (y con proteínas diana distintas de la adenilato ciclasa), resulta útil describir sus funciones en relación con los receptores adrenérgicos.

Acciones de las proteínas G

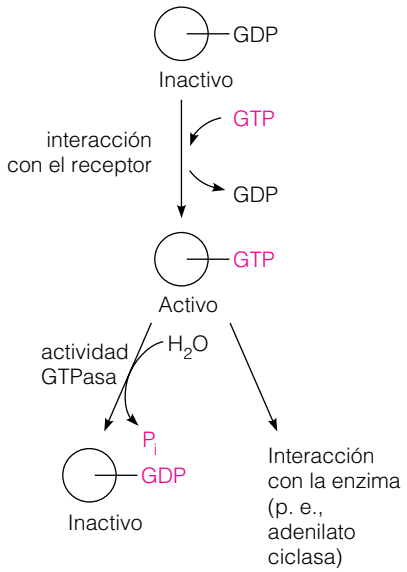
Las proteínas G son proteínas de membrana que en el estado *inactivo* unen guanosina difosfato (GDP). Como hemos comentado en el Capítulo 12, una respuesta hormonal que dé lugar a la estimulación de la adenilato ciclasa, la unión de una hormona extracelular o de un agonista a un receptor, como por ejemplo un receptor adrenérgico β, produce un cambio conformacional que estimula al receptor para interaccionar con una molécula G_s próxima. Ésta estimula a su vez un intercambio del GDP unido por GTP, es decir, la disociación del GDP de la G_s, para ser sustituido por GTP. De esta forma, la G_s se convierte en una proteína que activa la adenilato ciclasa, produciendo AMP cíclico a partir de ATP. Ello da lugar a la activación de la proteína quinasa dependiente del cAMP (proteína quinasa A), con la consiguiente fosforilación de las proteínas diana, como la fosforilasa *b* quinasa en las células que activan la fosforólisis del glucógeno. En resumen, esta ruta de transducción de señal comporta: (1) la unión de la hormona al receptor, (2) la interacción del receptor con la G_s, que estimula la liberación de GDP y la asociación del GTP con la G_s, (3) la estimulación de la adenilato ciclasa por la G_s con GTP unido, (4) la estimulación por el cAMP de la fosforilación proteica, (5) la estimulación o inhibición de las reacciones metabólicas. La reacción de intercambio inicial (paso 2) está generalmente asistida por una proteína perteneciente a una clase denominada factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF).

La activación continuada de la G_s depende de la presencia de GTP unido. La respuesta hormonal está limitada y, por tanto, controlada, por la presencia de una actividad GTPasa lenta sobre la proteína G. Así, el GTP unido se rompe lentamente a GDP, con la consiguiente pérdida de capacidad de estimulación de la adenilato ciclasa. Este proceso, igual que la activación inicial, está asistido por una proteína, en este caso una proteína activadora de la GTPasa (GAP).

La proteína G_i funciona de una forma similar, pero en respuesta a las señales extracelulares cuya respuesta es la *inhibición* de la adenilato ciclasa, generalmente, los agonistas α_2. En este caso, la unión del GTP provoca una interacción inhibidora de la G_i con la adenilato ciclasa, que reduce la síntesis de cAMP.

Estructura de las proteínas G

Los estudios estructurales indican que las proteínas G_s, G_i y otras proteínas G tienen una estructura de trímeros $\alpha\beta\gamma$ (Figura 23.12): una subunidad α de 39 a 46 kilodalton, una subunidad β de 37 kilodalton y una subunidad γ de 8 kilodalton. Como se indica más adelante, se encuentran varias formas diferentes de cada proteína, lo cual permite que exista una amplia variedad de proteínas G diferentes. En la mayor parte de ellas la subunidad γ está **prenilada,** es decir, contiene una porción isoprenoide C_{20} unida covalentemente a la cisterna C-terminal, que ayuda a anclar la proteína en la membrana y puede facilitar las interacciones proteína-proteína. La subunidad α está **miristilada** en G_i y G_o, y palmitilada en G_s. Esto es, contiene un grupo ácido mirístico o ácido palmítico con un enlace amida con la glicina C-terminal. El lugar de unión de los nucleótidos de guanina y su actividad GTPasa asociada se encuentran en la subuni-



La activación de las proteínas G comporta el desplazamiento por GTP del GDP unido a la subunidad α y la disociación del complejo $\beta\gamma$. La acción hormonal está limitada por la hidrólisis lenta del GTP unido.

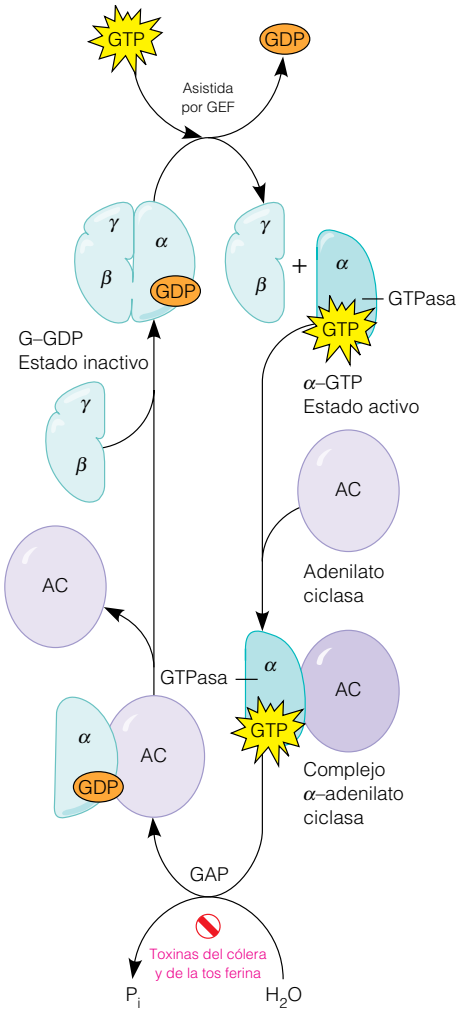


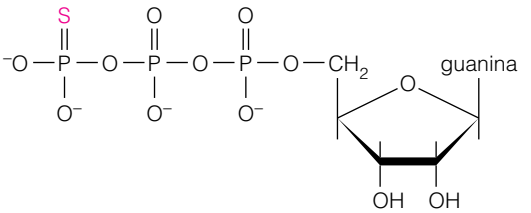
FIGURA **23.12**

Ciclo de disociación y reasociación de la proteína G. α, β y γ indican las tres subunidades de la proteína G. La forma activa es el complejo α-GTP (azul verdoso oscuro), mientras que los complejos inactivos de GDP se indican en color azul verdoso claro. Se muestran también los lugares de acción de las toxinas de la tos ferina y el cólera. GEF = factor de intercambio del nucleótido de guanina; GAP = proteína activadora de la GTPasa.

dad α. Un estímulo hormonal conduce al intercambio de GDP por GTP y a la disociación de la proteína G, con un desplazamiento del complejo α-GTP a lo largo de la membrana hasta que encuentra una molécula de adenilato ciclasa o de otra enzima diana. La actividad GTPasa lenta que se ha indicado antes acaba reconvirtiendo finalmente la α-GTP en α-GDP, y el complejo α-GDP se disocia de la adenilato ciclasa y se vuelve a unir al complejo $\beta\gamma$.

Consecuencias del bloqueo de la GTPasa

La importancia de la actividad GTPasa para el control de la respuesta hormonal puede apreciarse en las consecuencias de su bloqueo. El bloqueo puede obtenerse in vitro mediante la sustitución del GTP por **GTPγS,** un análogo del GTP en el que un oxígeno del fosfato γ del GTP se ha sustituido por un átomo de azufre, y que la actividad GTPasa no puede romper. En un sistema dependiente de G_s, el resultado es la activación irreversible de la adenilato quinasa diana.



GTPγS

Más notables aún son los efectos de las toxinas bacterianas que tienen a las proteínas G como objetivos biológicos. La toxina de *Vibrio cholerae* es una proteína enzimática capaz de romper el NAD^+ y transferir su parte ADP-ribosa a un lugar específico de la subunidad α de la G_s Esta modificación de la G_s inhibe su actividad GTPasa y convierte α en un activador irreversible de la adenilato ciclasa.

$$NAD^+ + \alpha_s \longrightarrow \text{nicotinamida} + \text{ADP-ribosil-}\alpha_s$$

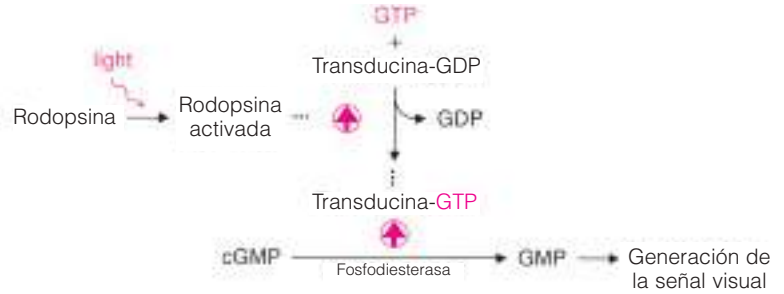
En el intestino, la acumulación del cAMP resultante fomenta una respuesta fisiológica controlada por el cAMP (secreción incontrolable de agua y Na^+) y es la causa de la diarrea grave y la consiguiente deshidratación y la pérdida de sal que acompañan al cólera. Un componente de la toxina de *Bordetella pertussis*, que causa la tos ferina, tiene un efecto similar sobre la subunidad α de la proteína G_i, con unos efectos fisiológicos diferentes: reducción de la glucosa en sangre e hipersensibilidad a la histamina.

Las proteínas G en el proceso visual

Existen notables semejanzas entre las acciones de las proteínas G en la transmisión de las señales hormonales y sus acciones en la transmisión de las señales de la luz. Gran parte de nuestro conocimiento de las proteínas G en la transducción de señales hormonales procede de los estudios de una proteína G denominada **transducina** en el proceso visual. El estímulo extracelular y el punto final bioquímico son muy diferentes en la visión y en la acción hormonal, pero los procesos de señalización transmembrana son casi idénticos.

Como se ha indicado en el Capítulo 19, en la visión la señal extracelular es un fotón de luz y el receptor de membrana es la **rodopsina,** una proteína de membrana abundante en el segmento externo de los bastones de la retina. Un cambio fotoquímico en la estructura de la rodopsina hace que ésta active la transducina de manera que una GTP. El complejo transducina-GTP activa una **fosfodiesterasa** específica, que rompe un nucleótido cíclico, el **guanosina 3′,5′-**

monofosfato (GMP cíclico o cGMP). La ruptura del cGMP estimula, a su vez, las reacciones intracelulares que generan una señal visual hacia el cerebro. Así pues, la *hidrólisis* estimulada del cGMP es el análogo visual de la *síntesis* estimulada de cAMP en las respuestas β-adrenérgicas.



Un examen más detallado de las subunidades de la proteína G

El mecanismo de las proteínas G se utiliza en muchas rutas de transducción de señal. La clonación de los cDNA humanos revela la existencia de al menos 24 proteínas α diferentes, 5 proteínas β y 6 proteínas γ. Las combinaciones de estas proteínas explican el gran número de proteínas G existentes, que proporcionan una gran flexibilidad de respuesta a este elemento de transducción de señal. La interacción con las enzimas diana es una función de las subunidades α. Algunas de ellas interactúan con la adenilato ciclasa, otras con los canales iónicos y las hay que interactúan con las fosfolipasas. Una subfamilia de las proteínas G, denominada G_{olf}, se encuentra en las células olfatorias de la nariz y actúa con un gran número de receptores que participan en la recepción sensitiva de los olores. En la Tabla 23.4 se resume la información existente sobre las acciones de las principales clases de proteínas G.

Las subunidades α de las proteínas G son parte de una familia de pequeñas proteínas de unión de GTP que son activas cuando está unido el GTP e inactivas en presencia de GDP. A esta familia pertenecen las proteínas Ras especificadas por el oncogén (véase la página 970) y los factores de elongación de unión de GTP que participan en la síntesis de proteínas (Capítulo 27). En los últimos años se ha aprendido mucho de los estudios cristalográficos de cómo la unión del GTP activa esta clase de proteínas y cómo a su vez la proteína activada

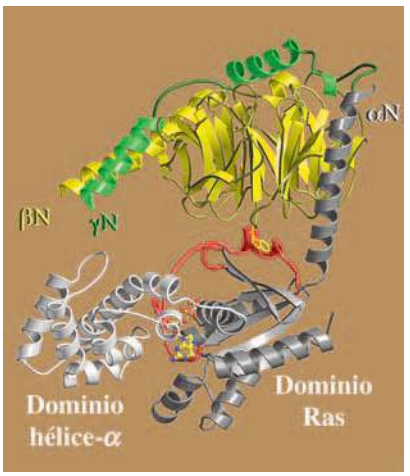
TABLA 23.4 Propiedades de las proteínas G de los mamíferos

Familia	Sensibilidad a la toxina	Distribución en los tejidos	Receptores	Efectores
G_s	Cólera	Ubicua	β-adrenérgicos Glucagón Hormona liberadora de tirotropina	Adenilato ciclasa Canales de Ca^{2+} Canales de Na^+
G_{olf}	Cólera	Epitelio olfatorio	Odorante	Adenilato ciclasa
G_i	Tos ferina	Ubicua	M_2-colinérgico α_2-adrenérgico	Canales de K^+ Canales de Ca^+ Adenilato ciclasa Fosfolipasa C
Transducina (G_t)	Cólera, tos ferina	Bastones retinianos	Rodopsina	cGMP fosfodiesterasa
G_q	?	Casi ubicua	M_1-colinérgico α_1-adrenérgico	Fosfolipasa C
G_{12}	?	Ubicua	?	?
G_o	?	?	M_2-colinérgico	Canales de Ca^{2+}

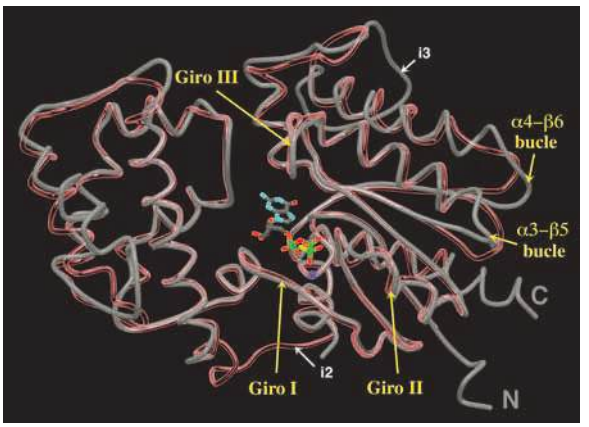
Fuente: Adaptado de J. R. Hepler y A. G. Gilman, *Trends Biochem. Sci.* (1992) 17:384. © 1992 con permiso de Elsevier Science.

interactúa con su diana. La Figura 23.13a presenta la estructura de un complejo proteína G heterotrímero $\alpha\beta\gamma$-GDP, con la subunidad α procedente de una proteína G_i. La región "de cambio II", que se muestra en rojo, es un dominio que cambia de conformación cuando se hidroliza el GTP. El panel b muestra la estructura de una proteína $G_{s\alpha}$ superpuesta a una subunidad $G_{i\alpha}$; ambas proteínas están uniendo GTPγS, un análogo no hidrolizable del GTP. Los puntos de divergencia estructural son los que se espera determinen si la interacción de la proteína α con una enzima diana, como la adenilil ciclasa, activa o inhibe esa enzima. El panel c muestra un complejo entre una $G_{s\alpha}$ unida al GTPγS y el centro catalítico de la adenilil ciclasa. La región de cambio II de la proteína α está muy cerca de la enzima diana y participa en su activación.

Como se señaló antes, los acontecimientos en la transducción de señal están controlados mediante bucles de retroacción. Al menos dos de estos bucles participan en la regulación de los acontecimientos mediados por las proteínas G. En primer lugar, la actividad GTPasa de algunas proteínas α es ineficaz, lo cual hace a la inactivación de la proteína G un proceso lento. Una familia de proteínas de activación de la GTPasa (GAP) aceleran este proceso mediante la interacción con el complejo α-GTP y estimulan la actividad GTPasa, algunas veces, varios órdenes de magnitud. En segundo lugar, una familia de enzimas denominadas receptores quinasas acopladas a las proteínas G fosforilan las proteínas receptoras específicas, conduciendo a su inactivación y, de aquí, a la limitación de la respuesta inducida por la hormona. Este efecto está mediado por complejos $\beta\gamma$.



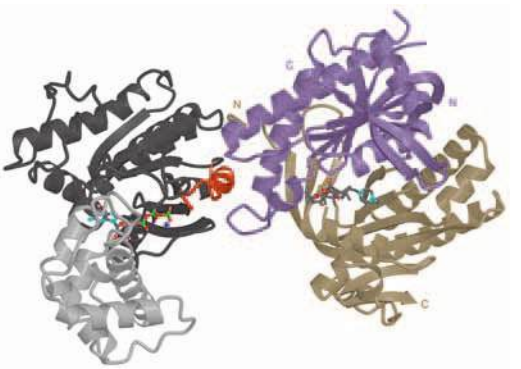
(a)



(b)

FIGURA **23.13**

Estructuras de las proteínas G. **(a)** Complejo heterotrímero $\alpha\beta\gamma$, con la subunidad α procedente de la proteína α G_i. La subunidad α está en gris, la β en amarillo y la γ en verde. Se muestran los N-terminales de las tres proteínas; obsérvese que las modificaciones lipídicas de estos lugares no se encuentran presentes en estas proteínas recombinantes. En rojo se muestra un GDP unido a la subunidad α y la región II de cambio en α. **(b)** Superposición de una proteína α de G_i (rosa transparente) y un complejo proteína G_s α -GTPγS (gris). Se muestran con flechas blancas dos inserciones en la proteína $G_{\alpha s}$ con relación a $G_{\alpha i}$ (i2 e i3). Las estructuras son idénticas en las regiones de unión del GTP. **(c)** Complejo entre $G_{s\alpha}$-GTPγS (a la izquierda) y el centro catalítico de la adenilil ciclasa (a la derecha). Se piensa que la parte superior se enfrenta a la membrana plasmática. La proteína α consta de dos dominios principales, un dominio "helicoidal" (gris ceniza) y un dominio "semejante a ras" (carbón). Se muestran también dos dominios de la adenilil ciclasa (malva y caqui). El GTPγS se presenta como un bastón rojo y verde, y la región II de cambio de la proteína α en rojo.



(c)

(a) Cortesía de S. R. Sprang de M. A. Wall, B. A. Posner y S. R. Sprang, *Structure* (1998) 6:1169-1183; **(b)** cortesía de S. R. Sprang de R. K. Sunahara et al., *Science* (1997) 278:1943-1947, con permiso de *Science*; **(c)** cortesía de S. R. Sprang de J. J. G. Tesmer et al., *Science* (1997) 278:1907-1918, con permiso de *Science*.

SISTEMAS DE SEGUNDOS MENSAJEROS

Como se ha presentado en el Capítulo 12 y se ha detallado aquí, muchos fenómenos de transducción de señal implican las acciones ligadas del receptor, la proteína G y la adenilato ciclasa. Estos fenómenos estimulan o inhiben la síntesis de un segundo mensajero, el AMP cíclico, en el interior de la célula. Muchos procesos intracelulares están controlados a su vez por la concentración del segundo mensajero. Uno de estos procesos, que no hemos mencionado todavía, es la síntesis de las propias proteínas receptoras. El AMP cíclico se une y activa la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) que a su vez fosforila una proteína denominada CREB (proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP: cAMP response element binding protein), y la proteína fosforilada resultante controla la transcripción de los genes, entre los que se encuentran los que codifican determinados receptores. Algunas de estas acciones constituyen una adaptación de una célula a la acción de una hormona.

El AMP cíclico no es el único segundo mensajero. Hemos mencionado al GMP cíclico (véase la página 956 y el Capítulo 21) y el sistema de fosfoinosítidos (Capítulos 12 y 19; véase la página 960). Ha habido un gran interés en el GMP cíclico, en especial con la observación reciente de que el óxido nítrico actúa estimulando la síntesis de este nucleótido. Muchas células contienen una proteína quinasa estimulada por el cGMP que, a diferencia de la enzima activada por el cAMP, contiene dominios catalíticos y reguladores en una cadena polipeptídica de una proteína homodímera. Los conocimientos de las funciones del cGMP en la transducción de señal han llegado hace poco debido a que sus concentraciones intracelulares son de 10 a 100 veces menores que las del cAMP.

El ion calcio se ha considerado también un segundo mensajero. Muchas células responden a los estímulos extracelulares mediante una modificación de su concentración intracelular de calcio, que provoca a su vez modificaciones bioquímicas, por sí mismo o a través de su interacción con la calmodulina (véase el Capítulo 13). Las concentraciones de calcio en sí se controlan en gran parte por segundos mensajeros, como el cAMP. En muchas células nerviosas y musculares, la activación de la adenilato ciclasa da lugar a una entrada de calcio extracelular. El cAMP activa un canal de calcio dependiente del voltaje en la membrana nerviosa presináptica, que permite la entrada de iones calcio a la célula, desencadenando una transmisión sináptica (véase el Capítulo 21). Esa activación puede comportar la fosforilación, mediante una proteína quinasa dependiente de cAMP, de un componente proteico del canal. En las células musculares, la entrada de calcio desencadena la contracción muscular (véase el Capítulo 8) y es la responsable, por ejemplo, del aumento de la frecuencia y la fuerza de los latidos cardíacos que producen los agonistas β-adrenérgicos. Dado que el cAMP regula la entrada de calcio, puede ser más adecuado considerar al calcio un tercer mensajero en vez de un segundo mensajero.

Las concentraciones citosólicas de calcio pueden aumentar también por la liberación desde los depósitos *intracelulares* de calcio. El acceso a estos depósitos intracelulares se controla por otra serie de mensajeros, el **sistema de fosfoinosítidos.** Aunque semejante en muchos aspectos al sistema de la adenilato ciclasa, el sistema de fosfoinosítidos se diferencia en que el estímulo hormonal activa una reacción que genera *dos* segundos mensajeros. Las primeras observaciones experimentales respecto a este sistema de transducción de señal se remontan a 1953, en que Mabel Hokin y Lowell Hokin observaron que la administración de acetilcolina a células secretoras pancreáticas conducía a una rápida síntesis y recambio de la fracción de fosfatidilinositol de los fosfolípidos de la membrana. Se realizaron observaciones similares en otros sistemas estimulados por hormonas, neurotransmisores o factores de crecimiento. Sin embar-

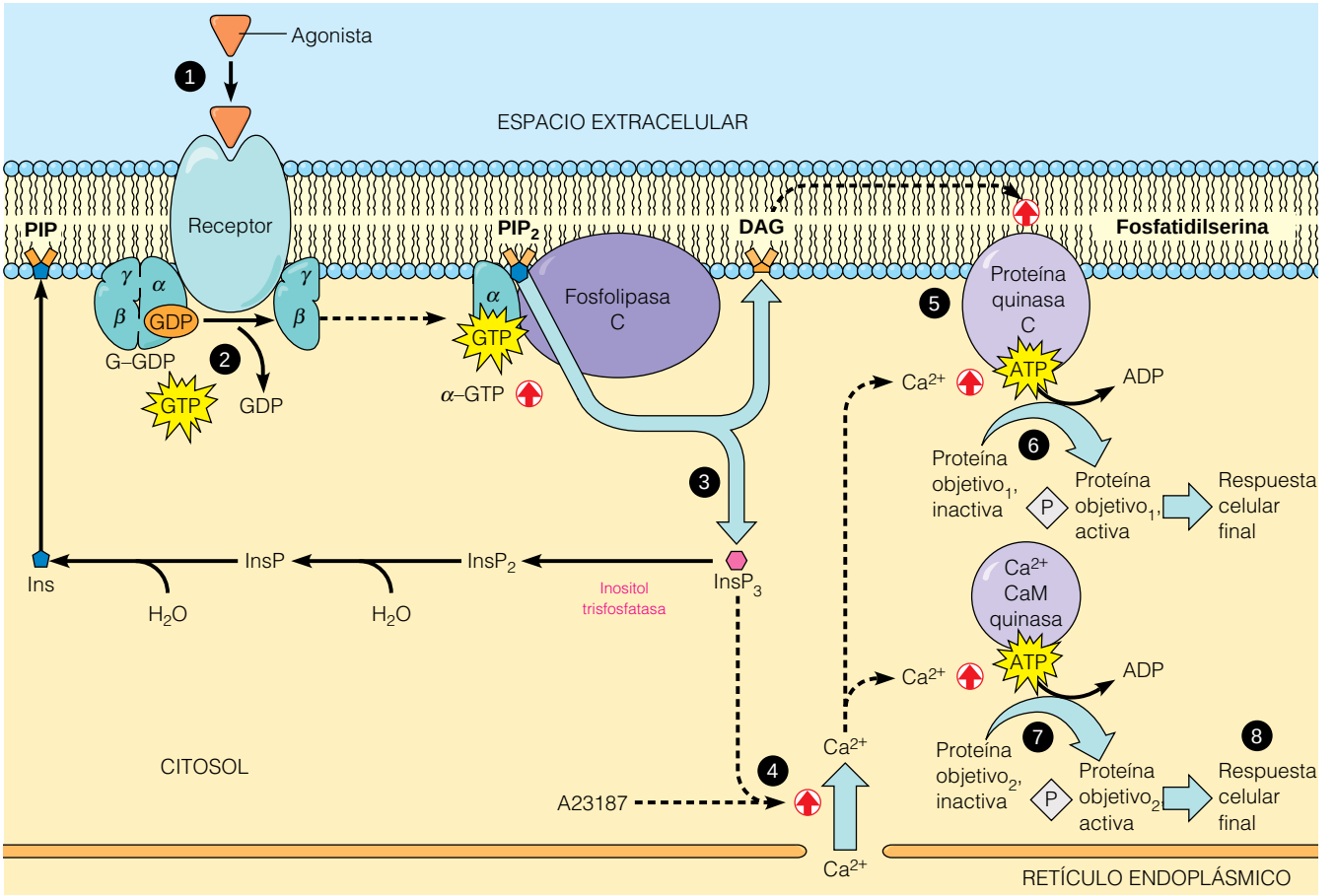
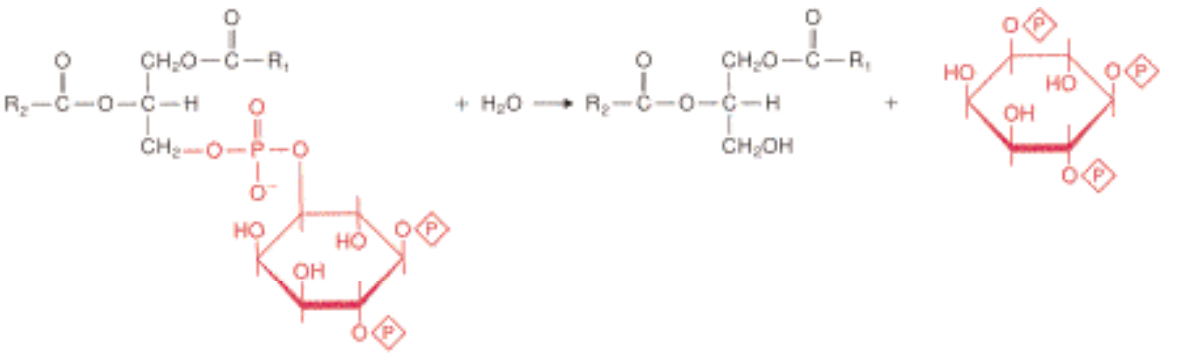


FIGURA **23.14**

Rutas de transducción de señal que implican el recambio de los fosfoinosítidos. DAG = *sn*-1,2-diacilglicerol, Ins = inositol, InsP = inositol monofosfato, PIP = fosfatidilinositol-4-fosfato, PIP_2 = fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, $InsP_3$ = inositol 1,4,5-trisfosfato, $InsP_2$ = inositol 1,4-bisfosfato. La mayor parte de los efectos del calcio se deben a su unión a la calmodulina (CaM). El A23187 es un ionóforo de calcio, que puede utilizarse experimentalmente para liberar el calcio de las reservas intracelulares. La liberación de iones calcio estimula la proteína quinasa C y la calmodulina quinasa.

go, transcurrieron más de dos décadas antes de que surgiera un concepto unificador para explicar estas observaciones.

Actualmente sabemos que un lípido específico de la familia de los fosfoinosítidos, el **fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2)**, constituye una forma de almacenamiento asociada a la membrana de dos segundos mensajeros. Como se muestra en la Figura 23.14, la unión de un agonista a un receptor (paso 1) estimula una proteína G para que una GTP (paso 2), de la misma forma que se produce durante la activación de la adenilato ciclasa. Sin embargo, esta proteína G activa una enzima diferente, unida a la membrana, una **fosfolipasa C**, la cual a su vez rompe el PIP_2 para dar dos productos (paso 3), el ***sn*-1,2-diacilglicerol** (DAG) y el **inositol 1,4,5-trisfosfato ($InsP_3$)**.



Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2)

***sn*-1,2-Diacilglicerol (DAG)**

Inositol 1,4,5-trisfosfato ($InsP_3$)

Ambos productos actúan como segundos mensajeros. En consecuencia, la ruptura del PIP_2 por la fosfolipasa C es el equivalente funcional de la síntesis de AMP cíclico por la adenilato ciclasa.

Recientemente, se ha aislado una familia de fosfoinosítido 3-quinasas. Algunos de los productos, el fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato y el –3,4,5-trisfosfato, actúan como el AMP cíclico y estimulan la actividad de las proteínas quinasas específicas.

La función de segundo mensajero del inositol trisfosfato consiste en estimular la liberación de calcio de las reservas intracelulares del retículo endoplásmico (paso 4 en la Figura 23.14). Esta liberación tiene diversos efectos sobre el metabolismo intracelular, como se ha indicado antes, pero contribuye también al papel de segundo mensajero del diacilglicerol, que es la activación de la proteína quinasa C unida a la membrana (paso 5). Esta enzima requiere para su actividad *calcio* (de ahí la designación de "C") y un *fosfolípido* (específicamente, fosfatidilserina). El otro segundo mensajero, el diacilglicerol, estimula la actividad de la proteína quinasa C mediante un notable aumento de la afinidad de la enzima por los iones calcio. Esta exigencia es específica del *sn*-1,2-DAG, pues ni el isómero 1,3 ni el 2,3 son activos. La enzima fosforila residuos específicos de serina y treonina en las proteínas diana (paso 6). Al igual que ocurre con la proteína quinasa estimulada por el cAMP, las respuestas celulares específicas a la activación de la proteína quinasa C, como la fosforilación de la calmodulina que se muestra en la Figura 23.14, dependen del conjunto de proteínas diana que se fosforilan en una determinada célula. Otras proteínas diana conocidas son el receptor de insulina, el receptor β-adrenérgico, el transportador de glucosa, la HMG-CoA reductasa, el citocromo P450 y la tirosina hidroxilasa.

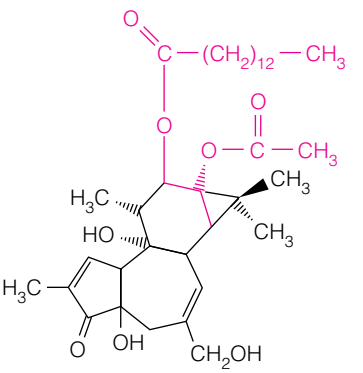
Consideremos ahora brevemente el metabolismo del inositol trisfosfato ($InsP_3$) tras su liberación del PIP_2. Tres pasos hidrolíticos secuenciales producen inositol, que se reincorpora entonces al fosfatidilinositol, como se consideró en el Capítulo 19, para regenerar el PIP y el PIP_2. El último paso hidrolítico, la hidrólisis del inositol monofosfato a inositol, se inhibe específicamente por el **ion litio.** Este bloqueo inhibe la nueva síntesis del $InsP_3$ al causar un agotamiento del inositol de la célula.

$$\text{Inositol monofosfato} + H_2O \longrightarrow \text{inositol} + P_i$$

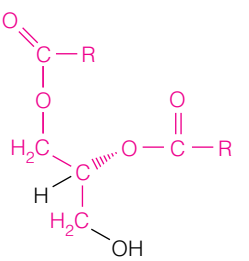
Dado que el sistema mensajero de los fosfoinosítidos se utiliza mucho en el tejido nervioso, esta acción del litio puede estar relacionada con su eficacia en el tratamiento del síndrome bipolar, denominado anteriormente trastorno maniacodepresivo.

Dado que muchos procesos metabólicos se controlan por los flujos de calcio y por la fosforilación de proteínas específicas, el sistema de fosfoinosítidos tiene una gran versatilidad como mecanismo de control. El hecho de que una célula pueda utilizar DAG o $InsP_3$ o ambos mecanismos como resultado de un único estímulo extracelular aumenta aún más esta versatilidad. En la Tabla 23.5 se presenta una relación parcial de los procesos controlados por el sistema de los fosfoinosítidos.

Varias observaciones implican que el sistema de los fosfoinosítidos interviene no sólo en la regulación metabólica, sino también en el control de la diferenciación celular. En primer lugar cabe citar la actividad de un grupo de productos naturales denominados **ésteres de forbol,** parte de cuya estructura se parece a la del DAG (que se indica en rojo). Estos compuestos se denominan **promotores tumorales.** Aunque no son cancerígenos de por sí, estimulan la formación de tumores cuando se aplican conjuntamente con un cancerígeno a animales de experimentación. Se ha observado que algunos ésteres de forbol activan la proteína



Un éster de forbol, 1-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato



***sn*-1,2-Diacilglicerol (DAG)**

TABLA 23.5 Algunos procesos celulares controlados por el sistema de segundo mensajero fosfoinosítido

Señal extracelular	Tejido diana	Respuesta celular
Acetilcolina	Páncreas	Secreción de amilasa
	Páncreas (células de los islotes)	Liberación de insulina
	Músculo liso	Contracción
Vasopresina	Hígado	Glucogenólisis
Trombina	Plaquetas sanguíneas	Agregación plaquetaria
Antígenos	Linfoblastos	Síntesis de DNA
	Mastocitos	Secreción de histamina
Factores de crecimiento	Fibroblastos	Síntesis de DNA
Espermatozoides	Óvulos (erizo de mar)	Fertilización
Luz	Fotorreceptores (*Limulus*)	Fototransducción
Hormona de liberación de tirotropina	Lóbulo anterior de la hipófisis	Secreción de prolactina

Fuente: Adaptado de M. J. Berridge, *Sci. Am.* (1985) Oct., p. 147. © 1985 Andrew Christie.

quinasa C de manera independiente del diacilglicerol. Este hallazgo concuerda con la hipótesis de que la activación de la proteína quinasa C forma parte de los procesos de control de la proliferación normales que se alteran en la tumorogénesis. Otro indicio de la existencia de una relación entre el metabolismo de los fosfoinosítidos y el control de la proliferación es la función de determinados factores de proliferación celulares. Se sabe que algunos de ellos, en especial el **factor de proliferación que deriva de las plaquetas (PDGF)**, interactúan con los receptores de la superficie celular estimulando la hidrólisis del fosfatidilinositol.

Cada vez está más claro que otras fosfolipasas distintas de la fosfolipasa C se estimulan también por las proteínas G. Recuérdese del Capítulo 19 que el ácido araquidónico, liberado a partir de la fosfatidilcolina, es el principal precursor metabólico de los eicosanoides. La fosfolipasa A_2, que libera este ácido graso, forma parte también de una ruta de transducción de señal en la que intervienen las proteínas G, y se cree que la fosfolipasa D participa asimismo en la transducción de señal a través de la formación de diacilglicerol. Además, algunas fosfolipasas están controladas por el Ca^{2+}.

Recapitulando, el AMP cíclico fue el primer segundo mensajero conocido. Sin embargo, actualmente se conocen varios segundos (o terceros) mensajeros comparables, como el GMP cíclico, el ion calcio, el inositol trisfosfato y el diacilglicerol. Los estudios mencionados antes sobre las fosfoinosítido 3-quinasas y las fosfolipasas A_2 y D sugieren que hay otros segundos mensajeros a la espera de ser descubiertos.

Entre los segundos mensajeros se encuentran el AMP cíclico, el GMP cíclico, el ion calcio, el inositol trisfosfato y el diacilglicerol.

EL RECEPTOR DE INSULINA Y OTROS RECEPTORES RELACIONADOS CON ACTIVIDAD PROTEÍNA QUINASA

Algunos receptores hormonales y de factores de proliferación se distinguen por contener una actividad enzimática intrínseca y un único dominio que se extiende de lado a lado de la membrana. Algunos de estos receptores interacciona con sistemas de segundo mensajero, pero otros, entre los que se encuentra el receptor de insulina, no lo hacen. El receptor de insulina fue la primera de esta clase de proteínas cuya estructura se determinó mediante el análisis de la secuencia de cDNA clonados.

El receptor de insulina (Figura 23.15) es una glucoproteína con una estructura tetramérica $\alpha_2\beta_2$, estabilizada mediante enlaces disulfuro intercadena. Tanto la

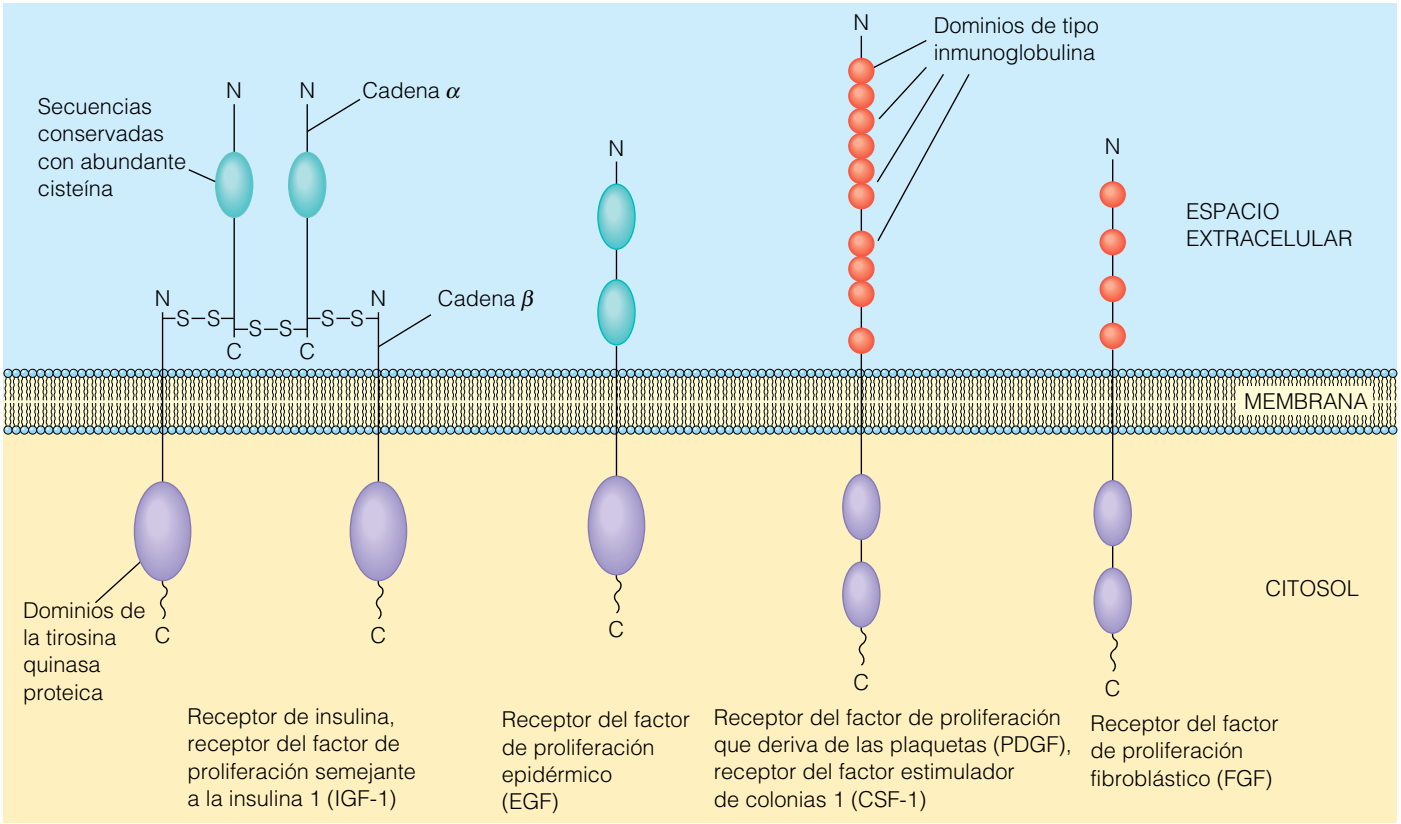


FIGURA **23.15**

El receptor de insulina y su relación estructural con otros receptores transmembrana con actividad tirosina quinasa proteica. Se muestran proteínas representativas de cada una de las cuatro subfamilias. Se han descrito también otras cinco subfamilias. Obsérvese que dos de las familias de receptores que se muestran (a la derecha) poseen dos dominios proteína quinasa.

Adaptado de A. Ullrich y J. Schlessinger, *Cell* (1990) 61:203. © 1990 Cell Press.

cadena α, de 735 residuos, como la cadena β, de 620 residuos, se traducen a partir de un único mRNA, que da origen a una cadena polipeptídica que sufre luego un procesado proteolítico. La cadena α, que se cree que no se extiende de lado a lado de la membrana, parece unir la insulina cerca de su C-terminal. La cadena β posee un dominio transmembrana, con su C-terminal en el interior celular. La región C-terminal es el lugar de una actividad tirosina quinasa proteica, que se estimula por la unión de la insulina a la parte extracelular del receptor. La actividad quinasa es esencial para la actividad biológica del receptor de insulina, ya que algunos casos de diabetes no dependiente de insulina se asocian con mutaciones del receptor que suprimen la actividad quinasa. Se han identificado varios sustratos proteicos de la tirosina quinasa del receptor, que están siendo caracterizados en la actualidad en cuanto a su función en la transducción de señal.

Dado que la insulina puede considerarse un factor de crecimiento, es interesante la observación de que la actividad tirosina quinasa proteica se encuentra también en otros receptores de factores de crecimiento, como los del **factor de proliferación epidérmico** (EGF), del **factor de proliferación que deriva de las plaquetas** (PDGF), del **factor estimulador de colonias 1** (CSF-1) y del **factor de proliferación fibroblástico** (FGF), así como del péptido **factor de proliferación semejante a la insulina 1** (IGF-1). Estos receptores constituyen una familia de proteínas estrechamente relacionadas (véase la Figura 23.15), puesto que los dominios de tirosina quinasa comparten homología de la secuencia de aminoácidos. Además, existen datos que indican que la acción de la insulina como factor de proliferación se produce a través de su unión a uno de estos receptores, el receptor de IGF-1. Diremos más sobre las actividades de señalización de estos receptores tirosina quinasas posteriormente en este capítulo.

Otros receptores de membrana con una relación más lejana poseen otras actividades enzimáticas. Las proteínas de la familia del factor de proliferación

El receptor de insulina y varios receptores de factores de proliferación relacionados contienen un dominio transmembrana por cadena polipeptídica y tienen una actividad intrínseca de tirosina quinasa proteica.

transformante β (TGF-β) se unen a un receptor que tiene una actividad serina/treonina quinasa proteica (como la proteína quinasa dependiente de cAMP). El **factor natriurético auricular,** que controla el volumen sanguíneo, se une a un receptor que posee una actividad guanilato ciclasa y una actividad prevista serina/treonina quinasa proteica.

HORMONAS ESTEROIDEAS Y TIROIDEAS: RECEPTORES INTRACELULARES

Las hormonas que actúan a través de receptores nucleares tienen efectos más duraderos que las que interactúan con receptores de membrana.

Los efectos hormonales que se producen a través de receptores de membrana tienden a ser de corta duración. Al igual que la cascada glucogenolítica inducida por la adrenalina, constituyen respuestas ante demandas fisiológicas rápidas y urgentes, y comportan una activación o inhibición de enzimas preexistentes. En cambio, los efectos de las hormonas esteroideas producen cambios a largo plazo, como la activación de un sistema de transporte o la conversión de una célula en reposo en una célula en proliferación. Los esteroides y las hormonas relacionadas (tiroideas, vitamina D y hormonas del ácido retinoico) actúan intracelularmente. En virtud de su naturaleza hidrófoba, atraviesan la membrana plasmática y ejercen sus efectos dentro de la célula, en realidad dentro del núcleo, en donde controlan las actividades de genes específicos. En la mayor parte de los casos se activan los genes diana. En la Tabla 23.6 se indican varias proteínas cuya síntesis está influida por estas hormonas.

TABLA 23.6 Órganos diana para las hormonas esteroideas y tiroideas y principales proteínas cuya síntesis se ve afectada

Clase de hormona	Órgano diana	Proteína[a]
Glucocorticoides	Hígado	Tirosina aminotransferasa
		Triptófano oxigenasa
		α-Fetoproteína (↓)
		Metalotioneína
	Hígado, retina	Glutamina sintetasa
	Riñón	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
	Oviducto	Ovoalbúmina
	Hipófisis	Pro-opiomelanocortina
Estrógenos	Oviducto	Ovoalbúmina
		Lisozima
	Hígado	Vitelogenina
		apo-VLDL
Progesterona	Oviducto	Ovoalbúmina
		Avidina
	Útero	Uteroglobina
Andrógenos	Próstata	Aldolasa
	Riñón	β-Glucuronidasa
	Oviducto	Albúmina
1,25-Dihidroxivitamina D_3	Intestino	Proteína ligadora de calcio
Hormonas tiroideas	Hígado	Carbamoil fosfato sintetasa
		Enzima málica
	Hipófisis	Hormona de crecimiento
		Prolactina (↓)
Ecdisona (en insectos)	Epidermis	Dopa descarboxilasa
	Cuerpo graso[b]	Vitelogenina

[a] La síntesis de cada proteína indicada se incrementa por la hormona, excepto las dos identificadas con (↓).
[b] El cuerpo graso es un órgano de los insectos que desempeña algunas funciones equivalentes a las del hígado y el tejido adiposo.

Estos efectos reguladores se producen a nivel de la transcripción de genes que responden a los esteroides. Los esteroides y las hormonas relacionadas actúan mediante la unión en el citosol a proteínas receptoras específicas, que forman dímeros bajo la influencia de la hormona. La unión en el citosol va seguida de un movimiento del complejo hormona-receptor hacia el núcleo, en donde el complejo interacciona con lugares específicos del DNA denominados **elementos que responden a las hormonas** (**HRE**). La unión del complejo al DNA influye sobre la velocidad de transcripción de los genes próximos, mediante mecanismos que están siendo investigados intensamente en la actualidad. Debido a su lugar de acción, los miembros de esta familia de proteínas se denominan también receptores nucleares.

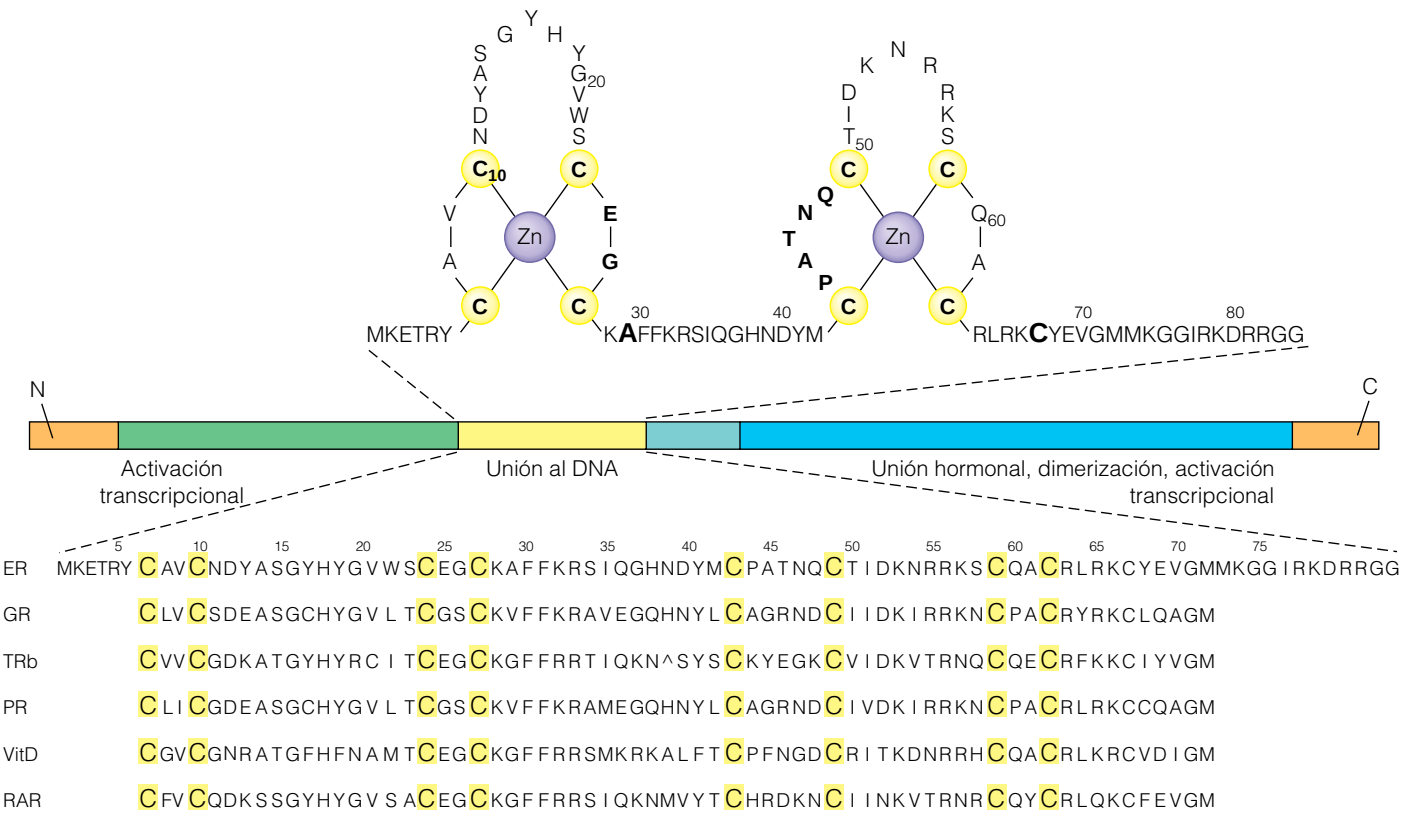
Los receptores nucleares se encuentran a concentraciones de tan sólo unas 10^4 moléculas por célula, lo cual hace que su purificación resulte difícil. Sin embargo, dado que se unen a las hormonas de forma muy estrecha, ha sido posible purificar estas proteínas mediante cromatografía de afinidad. El análisis de la secuencia del cDNA ha revelado la existencia de semejanzas estructurales entre esta clase de receptores, y el empleo de técnicas de DNA recombinante para crear receptores híbridos ha permitido identificar, sin ambigüedad alguna, dominios de función dentro de la molécula receptora. Cada proteína receptora de esta familia contiene un dominio central conservado de unos 80 residuos, que participa en la unión al DNA (Figura 23.16). En el lado N-terminal de este dominio hay una región esencial para la activación de la transcripción. Hacia el C-terminal se encuentran los dominios que se encargan de la unión de la hormona, la dimerización de la proteína y la activación de la transcripción.

Todos los receptores conocidos de esta familia contienen zinc unido, que es esencial para la unión al DNA, y las secuencias de unión al DNA presentan una distribución de los residuos de cisteína completamente conservada. Estas

FIGURA **23.16**

Dominio de unión al DNA conservado en los receptores esteroideos. En el centro se encuentran los dominios estructurales de los receptores esteroideos, que se ilustran para el receptor de estrógenos. Por encima se encuentra el dominio de unión al DNA del receptor estrogénico, que muestra residuos de cisteína conservados que contactan con iones zinc ligados (un motivo de unión dedo de zinc; véase el Capítulo 28). En la parte inferior se encuentran las secuencias del dominio de unión al DNA de los receptores humanos relacionados, en los que se resaltan los residuos de cisteína conservados. ER = receptor de estrógenos; GR = receptor de glucocorticoides, TRb = receptor de hormonas tiroideas; PR = receptor de progesterona; VitD = receptor de vitamina D; RAR = receptor de ácido retinoico.

J. W. R. Schwabe y D. Rhodes, *Trends Biochem. Sci.* (1991) 16:292. © 1991 con permiso de Elsevier Science.



La familia de receptores de esteroides contiene una secuencia conservada de unión al DNA que contiene zinc y un dominio C-terminal de unión de la hormona.

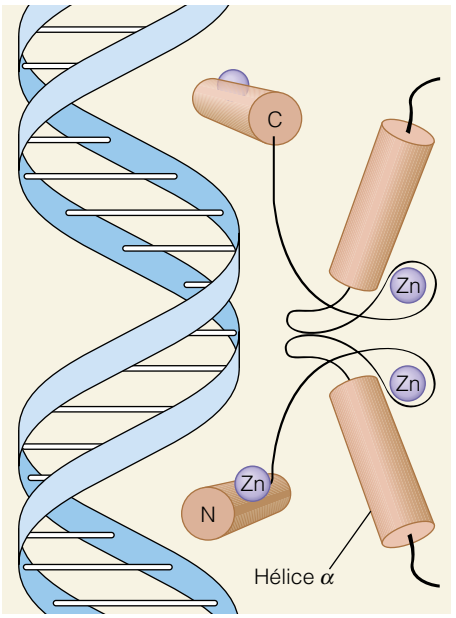


FIGURA **23.17**

Unión del receptor de estrógenos al DNA, según se deduce de la espectroscopia de RMN. La proteína receptora dímera tiene dos regiones de hélice α idénticas, que se unen a los dos extremos de una secuencia de DNA simétrica (AGGTCAXXXTGACCT), dentro del surco principal.

J. W. R. Schwabe y D. Rhodes, *Trends Biochem. Sci.* (1991) 16:292.

observaciones sugirieron que los átomos de zinc podían formar complejos con los azufres de la cisteína con un patrón similar al del "dedo de zinc" que es un motivo estructural que se repite en otras muchas proteínas reguladoras de la transcripción en los eucariotas (véase el Capítulo 28). Esta predicción se ha visto respaldada por los estudios de RMN de alta resolución de los complejos receptor-DNA (Figura 23.17).

La utilidad de una serie de reguladores de acción prolongada se pone claramente de manifiesto con un par de ejemplos. Los estrógenos y la progesterona regulan el ciclo reproductor femenino. En el ser humano estas hormonas interactúan a lo largo de un ciclo de 4 semanas para preparar al útero para la implantación de un óvulo fertilizado. La proliferación del endometrio, el revestimiento epitelial del útero, es el proceso principal. Evidentemente requiere la síntesis de nuevas proteínas y un aumento del flujo sanguíneo hacia el útero. Estos procesos se detienen cuando una señal hipofisaria desencadena una reducción de la liberación de las hormonas, causando el desprendimiento de las células del revestimiento uterino y el inicio de la hemorragia menstrual.

Las acciones de los glucocorticoides son comparables, por cuanto el control de la síntesis de determinadas proteínas permite la adaptación metabólica a largo plazo. Mientras que los estrógenos ejercen el control del metabolismo de la reproducción a lo largo de un período de varias semanas, la secreción de glucocorticoides constituye una forma de adaptación a un estrés de mayor duración. Esta adaptación comporta la estimulación de la gluconeogénesis y la síntesis de diversas proteínas, entre ellas algunas que contrarrestan los efectos de la inflamación. A diferencia de los estrógenos, que actúan principalmente en los tejidos reproductores, los glucocorticoides influyen sobre células en diversos tipos de tejidos diana.

Las investigaciones de la acción de los glucocorticoides como agentes antiinflamatorios y como inmunosupresores ha iluminado la acción de otra ruta de señalización importante que implica a un activador de la transcripción denominado NF-κB. Esta proteína estimula la transcripción de genes de una clase de proteínas denominada **citoquinas,** que estimulan varias reacciones de la respuesta inmunitaria, entre otras la proliferación de las células productoras de anticuerpos. Normalmente, el NF-κB está unido a una proteína inhibidora denominada IκBα, que impide su traslado al núcleo. La unión de un estimulador inmunitario, como el **factor de necrosis tumoral** (TNF), a su receptor de la membrana plasmática conduce a la ubiquitinización de IκBα y a su degradación consiguiente por el proteasoma de 26S (Capítulos 21 y 28). Esto a su vez permite al NF-κB trasladarse al núcleo y activar la síntesis de citoquinas. Uno de los genes diana de la activación del complejo glucocorticoide-receptor es el gen de IκBα. Estimulando la síntesis de esta proteína, los glucocorticoides contrarrestan la degradación del complejo NF-κB–IκBα y, de esta forma, suprimen la transcripción de los genes que responden al NF-κB. En la Figura 23.18 se resumen estas relaciones.

Los receptores de las hormonas esteroideas son objetivos utilizados por diversos fármacos importantes. El **tamoxifeno** se une a los receptores de estrógenos pero no activa los genes de respuesta estrogénica. La proliferación de algunas células tumorales mamarias se activa por los estrógenos. El tratamiento con tamoxifeno de los pacientes con estos tumores, después de la intervención quirúrgica y la quimioterapia, a menudo antagoniza la unión de los estrógenos en las células tumorales residuales y retarda su proliferación. Sin embargo, las pacientes que toman tamoxifeno tras la cirugía del tumor de mama deben controlarse cuidadosamente, ya que existe también un riesgo aumentado de cáncer de útero. El **RU486,** que fue desarrollado en Francia, se une a los receptores de

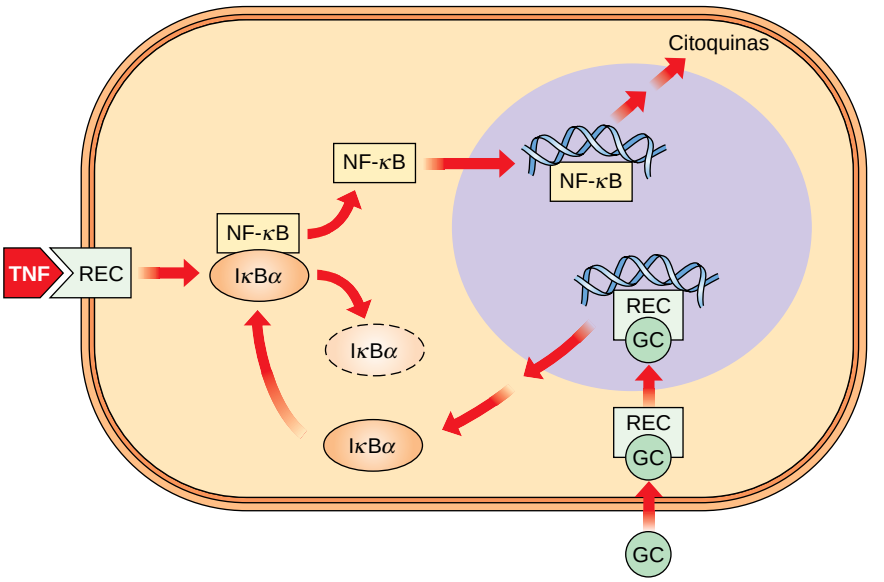
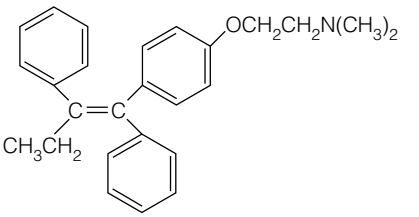


FIGURA **23.18**

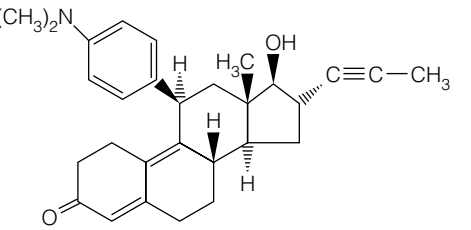
Acción de los glucocorticoides (GC) en la supresión de las reacciones inmunitaria e inflamatoria mediadas por las citoquinas. REC = receptor; véase el texto para las otras abreviaturas.

Cortesía de J. Marx, *Science* (1995) 270:232-233. © 1995 AAAS.

progesterona y bloquea los procesos que son esenciales para la implantación de un óvulo fertilizado en el útero. De ahí que el RU486 sea un agente anticonceptivo eficaz, a pesar de que se tome después de la relación sexual.



Tamoxifeno



RU486

Transducción de señal, oncogenes y cáncer

Uno de los campos de investigación más fructíferos en las ciencias biológicas ha sido el de los estudios que se están realizando sobre las diferencias genéticas entre las células cancerosas y las células normales. Estas investigaciones han revelado, en una amplia gama de células tumorales, formas de proteínas alteradas por mutaciones que intervienen en la transducción de señal, como proteínas quinasas, proteínas G, receptores de esteroides, factores de proliferación y receptores de factores de proliferación alterados. Algunas células tumorales contienen una proteína de transducción de señal normal, pero en cantidades excesivas. Los genes responsables de estas alteraciones se denominan **oncogenes.** Los estudios de los productos proteicos de los oncogenes, denominados **oncoproteínas,** han aclarado las funciones de las formas normales de estas proteínas en la regulación del metabolismo y la proliferación celulares y han aportado luz sobre la forma en que los mecanismos de control normales pueden alterarse en una célula cancerosa.

ONCOGENES CELULARES Y VÍRICOS

Dos actuaciones son particularmente notorias en la historia del estudio del cáncer, una relativa a los virus tumorales y la otra al análisis genético de los tumores humanos. Por lo que se refiere a la primera de estas actuaciones, se sabe desde hace tiempo que determinados virus causan cáncer en los animales infectados. El primer virus tumoral conocido fue el **virus del sarcoma de Rous,** descubierto en 1911 por Peyton Rous, y que se demostró que causaba tumores en los pollos.

Tanto si el virus contiene RNA (como el virus del sarcoma de Rous) como si contiene DNA, hay determinadas características comunes en las infecciones víricas que causan cáncer. En primer lugar, las células sufren una **transformación.** Es decir, pierden los mecanismos normales de control de la proliferación

y en un cultivo celular continúan proliferando en las condiciones que detienen la proliferación de las células normales. En segundo lugar, las células transformadas son ellas mismas tumorogénicas, ya que su inyección en animales produce tumores. En tercer lugar, parte del genoma vírico o todo él se inserta linealmente en los cromosomas de las células transformadas. En los virus de RNA como el del sarcoma de Rous, el genoma vírico debe convertirse en un DNA de doble cadena antes de que pueda producirse esta inserción. La enzima vírica que sintetiza el DNA a partir de un molde de RNA de una sola cadena se denomina **transcriptasa inversa** y los virus que contienen esta enzima se denominan **retrovirus** (véase el Capítulo 24).

Existen numerosos mutantes no tumorogénicos del virus del sarcoma de Rous. El cartografiado de las mutaciones de estas cepas identificó el *src*, el oncogén vírico responsable de la transformación de las células infectadas. Algunos de estos mutantes contienen pérdidas amplias que permitieron a Raymond Erikson utilizar las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos (véase el Capítulo 26) y, en 1978, clonar un cDNA correspondiente al gen *src* del virus. Se hicieron dos observaciones sorprendentes. En primer lugar, la expresión del gen clonado produjo una proteína con actividad tirosina quinasa proteica. Así pues, una actividad enzimática específica, que podría asociarse con una transducción de señal, estaba también asociada con el producto oncogénico. En segundo lugar, un nuevo análisis de hibridación de ácidos nucleicos demostró que las secuencias correspondientes al gen *src* del virus estaban presentes en las células normales. Este hallazgo sugirió que los oncogenes víricos tenían su origen en genes celulares normales, o viceversa. Una forma de explicar la transferencia de un oncogén, o de un precursor del oncogén, desde las células a los virus, es proponer un fenómeno de escisión de genoma raro, como se expone en la Figura 23.19. Si una infección hubiera causado la inserción del genoma del virus junto a un precursor del oncogén (o **protooncogén**), y si una escisión posterior hubiera eliminado parte del protooncogén o todo él, así como el genoma del virus, esta escisión equivocada habría creado un nuevo genoma vírico, que contendría un gen celular. La posterior evolución del virus podría modificar el gen celular, creando un oncogén. La acción del oncogén contribuiría a producir la transformación en una infección posterior.

Los oncogenes víricos son protooncogenes celulares errantes, que en su mayor parte codifican elementos de transducción de señal que se han introducido en genomas víricos y han sufrido mutaciones posteriores.

El análisis de la secuencia del gen *src* procedente de los virus y de las células reveló la existencia de pequeñas diferencias. Así pues, actualmente hablamos de *v-src*, la forma vírica del gen, y de *c-src*, la forma celular. El análisis de otros muchos virus tumorales produjo más de dos docenas de oncogenes adicionales. Los correspondientes protooncogenes codifican diversas proteínas que participan en la señalización celular, algunas de las cuales se identifican en la Tabla 23.7. Un análisis más detallado de las infecciones causantes de tumorogénesis demostró que la alteración por mutación del protooncogén no siempre es necesaria. En algunos casos, el genoma del virus se inserta junto a un protooncogén. Los elementos del genoma del virus estimulan la transcripción de las secuencias de DNA que flanquean el lugar de integración. Así pues, la tumorogénesis puede producirse a causa de una sobreexpresión de los genes normales que codifican la maquinaria de transducción de señal.

Aunque la proteína Src es una tirosina quinasa proteica, es diferente de las tirosina quinasas receptoras ya que se encuentra en el citoplasma en lugar de la membrana. La publicación en 1997 de la estructura cristalina del producto del gen humano *c-src* reveló pistas que deben ayudarnos a entender cómo funciona esta proteína en el metabolismo normal. Obsérvese que, por convenio, el nombre del gen (*src*) se indica en cursiva, mientras que el nombre de la proteína correspondiente (Src) sin cursiva.

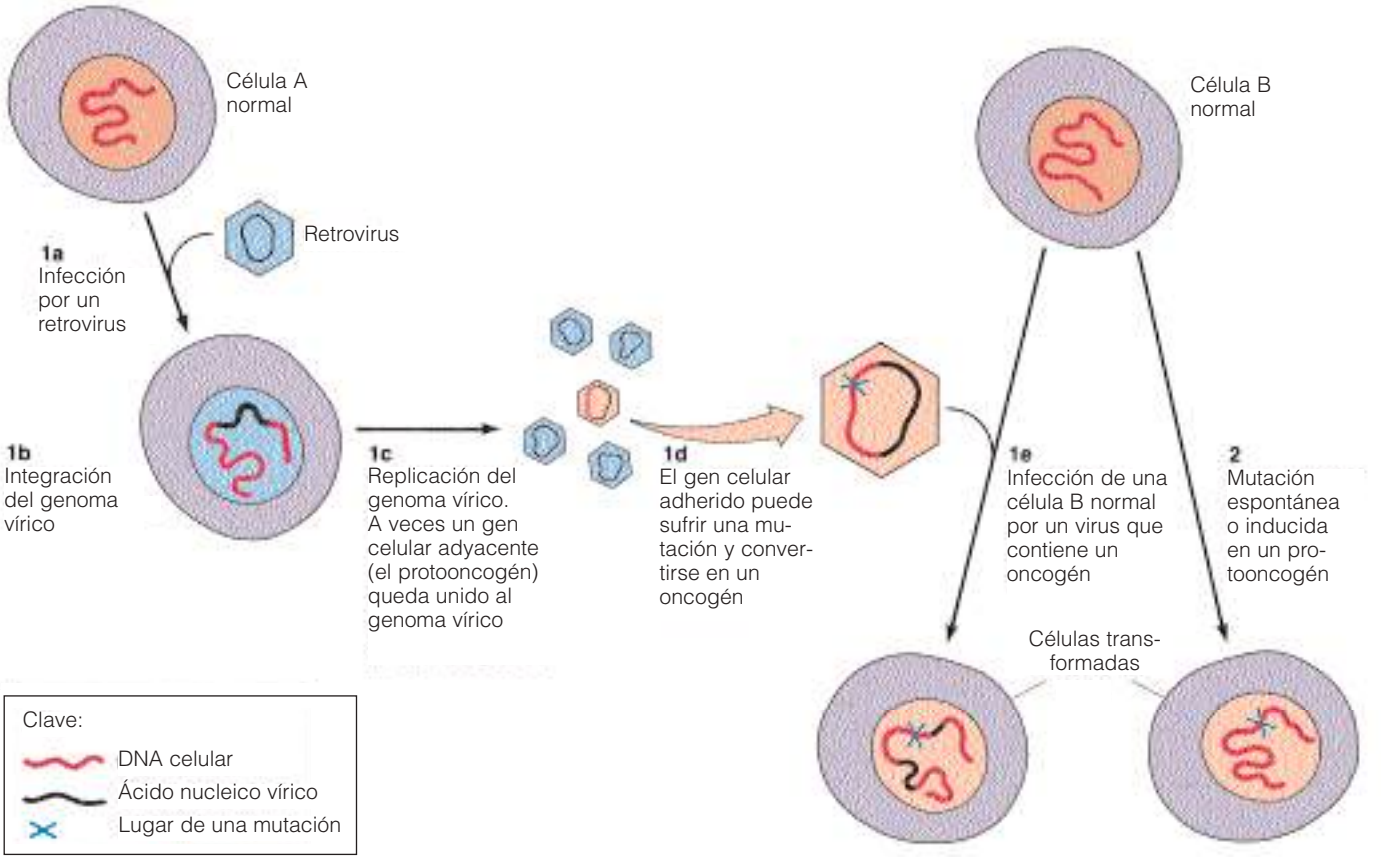


FIGURA **23.19**

Rutas mediante las cuales los protooncogenes pueden convertirse en oncogenes. Un protooncogén es un gen celular normal que puede convertirse en un oncogén y causar la transformación en una célula cancerosa. Este proceso puede producirse de dos formas: (1) infección por un retrovirus, que se integra en un lugar cromosómico próximo a un protooncogén y transporta ese gen en su propio genoma cuando el virus se replica, o (2) mutación de un protooncogén celular. En el primer caso, cuando el DNA celular pasa a formar parte de un genoma vírico, puede sufrir una mutación que convierta el protooncogén en un oncogén. El oncogén puede causar luego la transformación cuando el virus infecta a otra célula.

TABLA 23.7 Productos de oncogenes como elementos de las rutas de transducción de señal

Elemento de transducción de señal	Oncogén	Aislado de	Producto génico
Factores de proliferación	*sis*	Retrovirus	Factor de proliferación que deriva de las plaquetas
Receptores de factores de proliferación	*erbB*, *neu*	Retrovirus	Receptor del factor de proliferación epidérmico
	fms	Retrovirus	Receptor del factor estimulador de colonias 1
	trk	Tumor	Receptor del factor de proliferación nervioso
	ros	Retrovirus	Receptor de insulina
	kit	Retrovirus	Receptor PDGF
	flg	Retrovirus	Receptor del factor de proliferación fibroblástico
Transductores intracelulares	*src*	Retrovirus	Tirosina quinasa proteica
	abl	Retrovirus	Tirosina quinasa proteica
	raf	Retrovirus	Serina quinasa proteica
	gsp	Tumor	Subunidad α de proteína G
	ras	Tumor, retrovirus	Proteína de unión de GTP/GDP
Factores de transcripción nucleares	*jun*	Retrovirus	Factor de transcripción (AP-1)
	fos	Retrovirus	Factor de transcripción (AP-1)
	myc	Tumor, retrovirus	Proteína de unión al DNA
	erbA	Retrovirus	Receptor tiroideo

Fuente: Adaptado de J. D. Watson, M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller, *Recombinant DNA*, 2.ª ed. (Nueva York: Scientific American Books, 1992), p. 339.
© 1992 James D. Watson.

ONCOGENES EN LOS TUMORES HUMANOS

Se han aislado de tumores humanos oncogenes activados, muy relacionados con los oncogenes víricos.

Debido a que no se sabía que existían virus tumorales humanos, la trascendencia de los oncogenes víricos en los virus animales para el conocimiento del cáncer humano no fue evidente de forma inmediata. La relevancia de esta información se puso de manifiesto claramente a finales de los años 1980 gracias al trabajo de Robert Weinberg y otros investigadores sobre el aislamiento y análisis de los genes transformantes a partir de tumores humanos. Weinberg aisló DNA del tejido del cáncer de vejiga y lo utilizó para una **transfección** en fibroblastos (células precursoras del tejido conjuntivo) normales de ratón. Esto es, se introdujo el DNA en estas células, y se aislaron las células transformadas después de su proliferación. Se recuperó el DNA de las células transformadas y se demostró que contenía secuencias humanas. Después de otros varios pases de transfección, se secuenció el DNA humano asociado a los fibroblastos de ratón transformados. Se demostró que el gen causante de la transformación era casi idéntico a un oncogén descrito con anterioridad en el virus del sarcoma de la *ra*ta *H*arvey, denominado gen ***H-ras.*** El análisis de secuencia demostró que la secuencia génica del *H-ras* era idéntica a la del *c-ras*, el gen de las células no transformadas, pero con una sola diferencia, una mutación en el codón número doce que cambiaba un codón de glicina en el *c-ras* a un codón de valina en el oncogén aislado del tejido tumoral. Así pues, se demostró que los tumores humanos contenían un oncogén que estaba presente en algunos virus tumorales, y en una forma alterada que presumiblemente activaba el proceso tumorogénico.

La proteína Ras, que está alterada por una mutación en muchos tumores humanos, es una proteína que une GTP y participa en la transducción de señal de receptores de factores de proliferación en la membrana plasmática, que dan lugar a activaciones de genes específicos en el núcleo.

Se sabe que los genes *ras* codifican una familia de proteínas, todas ellas de unos 21 kilodalton, con regiones homólogas a las secuencias de la subunidad α de las proteínas G. Al igual que la subunidad α, las proteínas Ras unen los nucleótidos de guanina. Las proteínas Ras normales poseen actividad GTPasa, como las proteínas G_α, mientras que la mayor parte de las proteínas del oncogén *ras* carecen de esta actividad. La actividad GTPasa sugirió que las proteínas Ras normales actúan como proteínas G en la regulación del metabolismo. Este modelo se vio respaldado por la determinación en 1988 de la estructura tridimensional de una proteína Ras, cristalizada en forma de su complejo con GDP (Figura 23.20). Los residuos de aminoácidos que se sabe que están cambiados en las mutaciones que generan los oncogenes *ras* están situados cerca del nucleótido de guanina unido. Esta posición respalda la idea de que las interacciones entre la proteína Ras del protooncogén y los nucleótidos de guanina son importantes para el control metabólico y que este control se pierde cuando una célula normal se transforma en una célula cancerosa.



FIGURA **23.20**

Estructura de un complejo GDP-proteína Ras. Se produjo mediante clonación génica y se cristalizó un polipéptido que contenía los 171 residuos N-terminales de una proteína Ras de 188 residuos. La cinta indica la cadena polipeptídica, y la estructura verde corresponde al GDP unido.

Tomado de A. M. DeVos et al., *Science* (1988) 239:888-895. © 1988 AAAS. Con permiso de AAAS y Sung-Hou Kim, Universidad de California, Berkeley.

Una diferencia importante entre las proteínas de tipo Ras y las proteínas G_α relacionadas es la actividad GTPasa muy superior de las proteínas G_α. Como veremos en breve, es necesario un conjunto de proteínas de activación Ras para estimular la actividad GTPasa de Ras. El fundamento de esta diferencia se descubrió en 1994, con la primera determinación estructural de una proteína G_α (Figura 23.21). Las proteínas G_α, y no en cambio las Ras, contienen un residuo de arginina conservado (R178), que interactúa con los fosfatos del GTP unido para estabilizar el estado de transición de la hidrólisis del GTP.

La investigación sobre los oncogenes ha conducido a la unificación de las teorías de la carcinogénesis. El trabajo de Bruce Ames y otros investigadores estableció que la inmensa mayoría de los cancerígenos químicos son también mutágenos. Este hallazgo sugirió que la carcinogénesis química comporta la mutagénesis de los protooncogenes celulares, produciéndose estos fenómenos en ausencia de virus exógenos (mecanismo 2 de la Figura 23.19). De hecho, se han detectado genes *ras* alterados en los codones 12, 13 o 61 en alrededor del

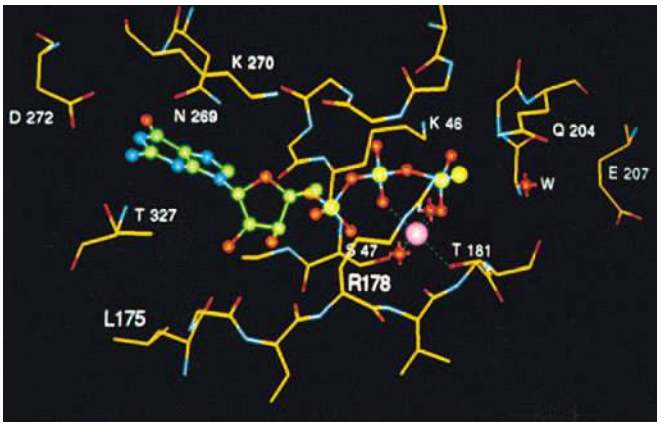


FIGURA **23.21**

Lugar de unión del GTP en una proteína G_{α}, la $G_{i\alpha 1}$. Esta figura muestra el GTPγS unido, un análogo del GTP no hidrolizable. Los carbonos del ligando unido se indican en verde, el carbono de la proteína en naranja, el nitrógeno en azul, el oxígeno en rojo, el azufre y el fósforo en amarillo y el magnesio en magenta. La estabilización de la carga negativa del fosfato mediante una arginina conservada (R178) facilita la hidrólisis del nucleótido unido.

Cortesía de D. E. Coleman et al., *Science* (1994) 265:1405-1412. © 1994 AAAS, proporcionado amablemente por S. R. Sprang.

30% de los tumores espontáneos o inducidos por sustancias químicas, tanto en animales como en el ser humano.

Se han identificado otras alteraciones genéticas en el tejido tumoral. Algunas de ellas corresponden a **antioncogenes** o **genes supresores de tumores.** A diferencia de los protooncogenes, éstos son genes que en su forma normal suprimen la tumorogénesis. La pérdida de la función normal del gen, como en el caso de una pérdida, conduce a la formación del tumor debido a una supresión tumoral deficiente. Uno de estos genes es el denominado **gen del retinoblastoma.** Las mutaciones en los dos alelos de este gen producen un tipo de tumor ocular, que presenta una asociación familiar. El otro gen supresor de tumor más importante codifica una proteína denominada p53 (una proteína de 53 kilodalton). La pérdida de la función de la p53 conduce a la tumorogénesis, y al menos la mitad de todos los tumores humanos examinados presentan mutaciones del gen p53. Aunque sus acciones bioquímicas no están aún claras, sabemos que la p53 es una proteína de unión al DNA que desempeña su función en la regulación del ciclo celular, impidiendo el paso inadecuado de las células en fase G1 a la fase S. La pérdida de un punto de control como éste podría dar lugar a la pérdida del control del crecimiento celular que conocemos como cáncer. La unión a secuencias específicas del DNA es esencial para el funcionamiento adecuado de la p53. Esto se demostró en 1994, mediante la determinación con cristalografía de rayos X de la estructura del dominio de unión al DNA en contacto con un oligonucleótido que contenía la secuencia de unión (Figura 23.22). No se muestra en la figura el hecho de que la unión de la proteína p53 tetramérica produce el doblado y enrollado del DNA, dando lugar probablemente a cambios de la expresión de los genes. Tiene gran interés el hecho de que los residuos de aminoácidos en contacto más próximo con el DNA son los que se ha demostrado que con más frecuencia se modifican en los genes mutantes de p53 aislados de tumores humanos.

Hasta 1994, se han identificado alrededor de una docena de antioncogenes. Las mutaciones que afectan a la mayoría de estos genes se han detectado en la línea germinal de células humanas y se han correlacionado con una predisposición a sufrir ciertas formas de cáncer. Un antioncogén de interés especial es el *nm-23*, cuya acción impide de alguna manera la metástasis, o la diseminación del cáncer de mama a nuevos lugares. Cuando se secuenció la forma humana de este gen, su producto se identificó como la nucleósido difosfato quinasa. Como se señaló en el Capítulo 22, esta enzima "ama de casa" desempeña una función indispensable en la síntesis de nucleósidos trifosfato a partir de los correspondientes difosfatos. Actualmente, es objeto de una investigación intensa la forma en que esta proteína impide la diseminación del tumor de mama.

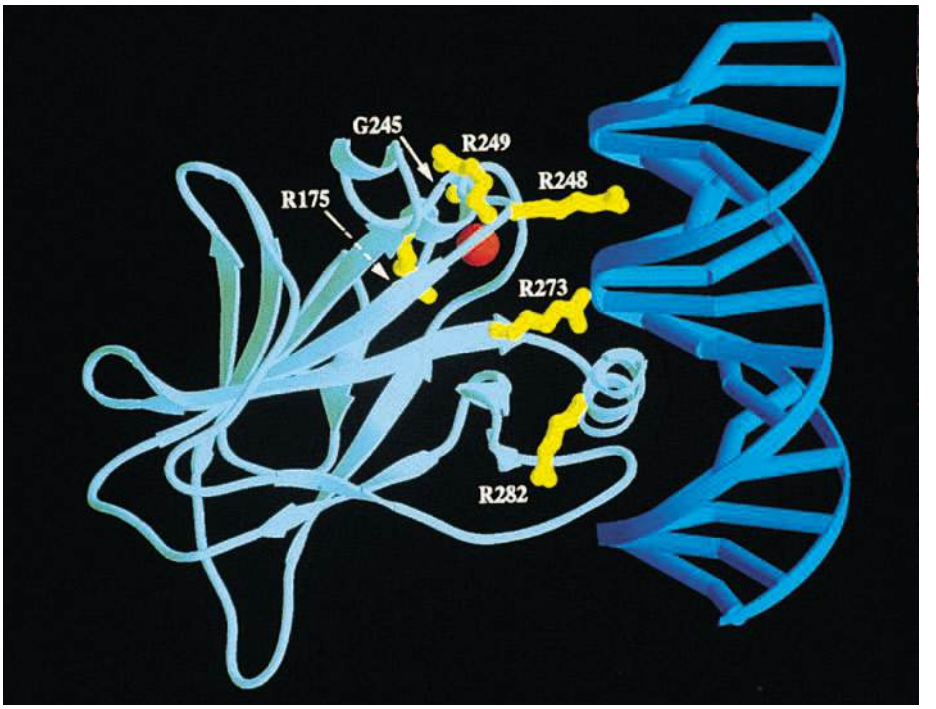


FIGURA **23.22**

Estructura del complejo p53-DNA. Este dibujo de cinta muestra el dominio de unión al DNA de la p53 (en verde) formando un complejo con una pareja de oligonucleótidos que contiene el lugar de unión de la p53 (en azul). Se muestra un ion zinc ligado en rojo. En amarillo se indican los seis residuos de aminoácidos que se modifican con más frecuencia en las proteínas p53 mutantes.

Cortesía de Y. Cho et al., *Science* (1994) 265:346-355. © 1994 AAAS, proporcionado amablemente por N. P. Pavletich.

Los tumores humanos contienen una serie de mutaciones que afectan a los componentes de transducción de señal y a los genes supresores de tumores y productos génicos.

El análisis de una serie de tumores humanos, de diversos grados de virulencia e invasividad, ha sugerido una secuencia de alteraciones genéticas que van desde la lesión precancerosa hasta el tumor metastásico florido. Nuestro conocimiento es más completo en el cáncer colorrectal. Muchas personas presentan pólipos benignos de colon. En una enfermedad denominada poliposis adenomatosa familiar (FAP; familial adenomatous polyposis) un defecto hereditario de un gen supresor de tumores denominado *APC* produce la formación de un número tan grande de pólipos benignos que unos pocos de ellos progresan de forma inevitable hacia el cáncer; más del 95% de las personas con esta mutación presentará un cáncer colorrectal. Otra enfermedad denominada cáncer colorrectal sin pólipos hereditario (HNPCC; hereditary nonpolyposis colorectal cancer) implica un riesgo menor, aunque aún elevado (70%) de presentar cáncer colorrectal. Las personas afectadas de HNPCC tienen un mecanismo de reparación de mal apareamiento del DNA defectuoso (Capítulo 25), un proceso que corrige los errores de replicación y otras formas de daño del DNA. Debido a que esta actividad disminuye la tasa de mutación espontánea, su ausencia incrementa la probabilidad de mutación de protooncogenes en oncogenes, como las mutaciones de *ras* o de p53. No está claro por qué las mutaciones de estos genes particulares conducen al cáncer en órganos específicos como el colon o la vejiga. Como ilustran estos ejemplos, el cáncer se contempla como una enfermedad genética, de tal manera que la transformación última de las células normales en células tumorales metastásicas constituye una acumulación de alteraciones genéticas individuales, muchas de las cuales afectan a elementos de la maquinaria de transducción de señal.

ONCOGENES Y SEÑALIZACIÓN CELULAR

A comienzos de los años 1990 la convergencia de varias líneas de investigación puso de relieve que la proteína Ras desempeña un papel central en una ruta conservada a lo largo de la evolución que dirige las señales extracelulares hacia el núcleo, en donde se activan genes específicos para la proliferación, la división y

la diferenciación celulares. A medida que se van conociendo detalles de esta ruta, se van ajustando a un marco general unificado que interrelaciona las propiedades bioquímicas de los productos de los protooncogenes, subraya la dominancia de la fosforilación proteica como mecanismo de control, y explica racionalmente los tipos de mutaciones que conducen al cáncer.

Se han descubierto proteínas relacionadas con el Ras en organismos tan diversos como las levaduras, los gusanos nematodos y *Drosophila*, en los que controlan aspectos del crecimiento mitótico y meiótico y del desarrollo embrionario. La investigación realizada en estos organismos ha permitido aclarar una ruta de control central en las células de los mamíferos (Figura 23.23), lo cual ha justificado ampliamente el empleo de modelos biológicos simples para la investigación del cáncer.

Actualmente sabemos que muchos de los receptores de factores de proliferación con actividad tirosina quinasa se fosforilan a sí mismos (pasos 1 y 2 de la Figura 23.23). En el estado fosforilado, cada receptor interacciona con uno o más factores de intercambio proteico que activan a su vez el Ras mediante la estimulación del intercambio GDP-GTP (paso 3). También interactúan con el Ras y limitan su actividad las proteínas activadoras de GTPasa, (GAP, véase la página 955). Tras el Ras hay una cascada de fosforilaciones proteicas posteriores (paso 4), que finalmente activan factores de transcripción (paso 5). Estos factores de transcripción son proteínas que, como los receptores nucleares, estimulan la transcripción de genes concretos (véase el Capítulo 28). Estas proteínas interactúan con el genoma y estimulan la expresión de genes concretos.

Como se indica en la Figura 23.23, una clase de quinasas de esta cascada es la de las denominadas **MAP quinasas (MAPK).** El acrónimo *MAP* corresponde a *mitogen-activated protein* (proteína activada por mitógenos). (Un mitógeno es un factor que estimula la mitosis.) Por encima de las MAP quinasas se encuentra otra familia de proteínas, las MAPKK (MAP quinasa quinasa) y más arriba aún las proteínas MAPKKK (MAP quinasa quinasa quinasa). Uno de los miembros de esta última clase es el producto del protooncogén *raf* (véase la Tabla 23.7).

Así pues, podemos interpretar la respuesta de los factores de proliferación como una cascada de fosforilaciones proteicas, análoga a la cascada bien conocida que controla la degradación del glucógeno (Figura 13.18). Observamos cómo el bloqueo de la actividad Ras GTPasa puede conducir a una proliferación celular incontrolada y al cáncer, al mantener activada la ruta de señalización e inundar la célula con señales estimuladoras de la proliferación. Lo que no es obvio de manera inmediata es la forma en que esta ruta puede explicar las distintas respuestas de las células a diferentes factores de proliferación. El análisis de las proteínas que interaccionan con receptores de factores de proliferación autofosforilados ha identificado las secuencias denominadas **dominios SH2,** que intervienen en estas interacciones (SH representa homología src, con relación a una secuencia en la proteína Src). Una proteína que se une a una molécula receptora fosforilada reconoce no sólo el residuo de fosfotirosina, sino también una secuencia de aminoácidos crítica en el lado carboxilo de esa tirosina. Así pues, la fosforilación-desfosforilación del receptor funciona como un interruptor general, y las interacciones proteicas más sutiles están gobernadas por el dominio SH2. Otros participantes son reclutados mediante otra serie de secuencias denominadas dominios SH3. Estos dominios identifican las proteínas específicas que serán reclutadas para el proceso de señalización en respuesta a un estímulo de proliferación concreto. Como ejemplo, la Figura 23.24 muestra los lugares de fosforilación y los lugares de unión de proteínas de señalización a un RTK específico, la clase β del receptor PDGF.

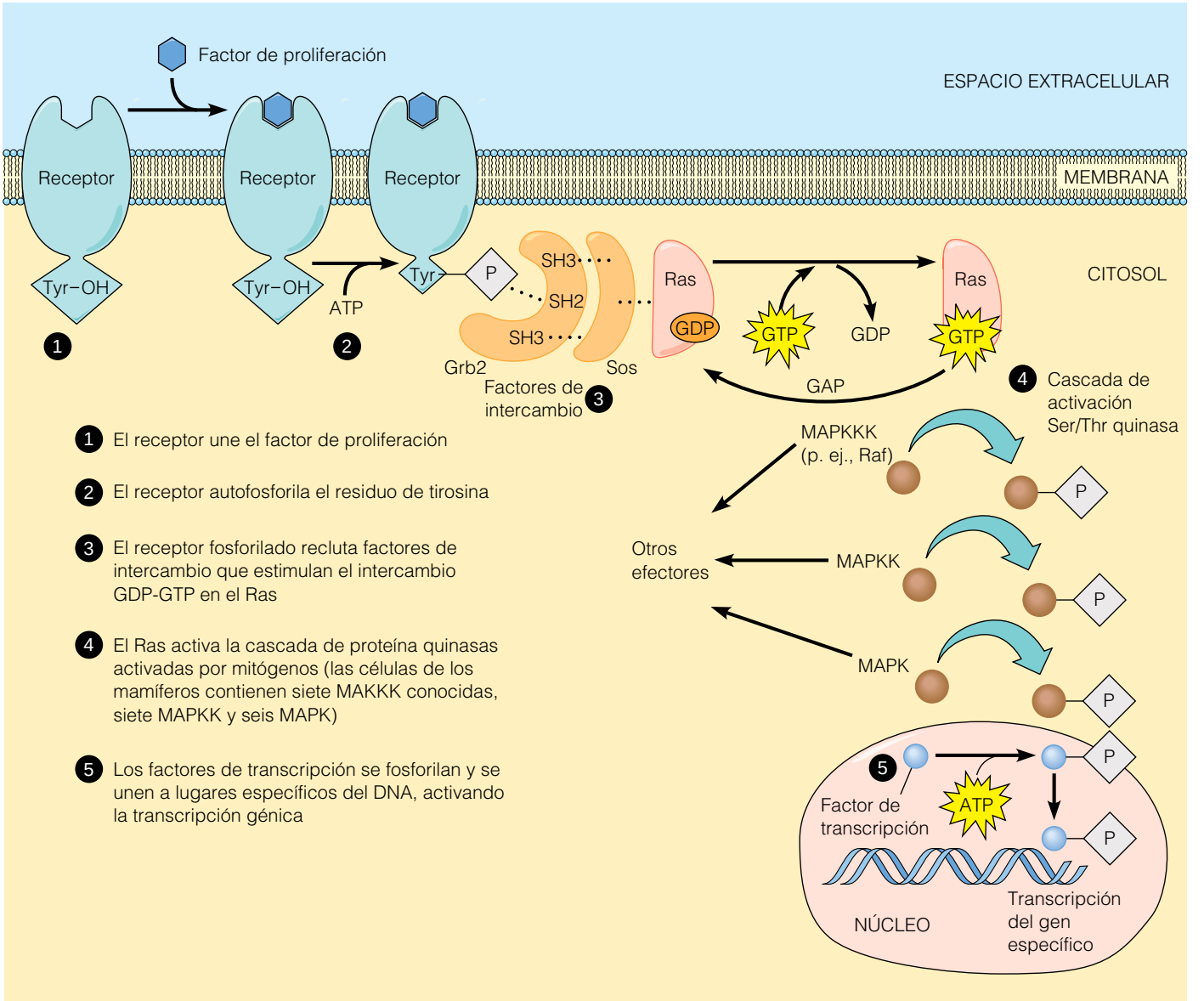


FIGURA **23.23**

Papel de la proteína Ras en la ruta de activación de un factor de proliferación central. La unión de un mitógeno o factor de crecimiento a un aceptor estimula el receptor de tirosina quinasa (RTK), normalmente con la dimerización del receptor. La autofosforilación del RTK da lugar a un reclutamiento de una serie de proteínas (factores de intercambio) que estimulan el intercambio GDP-GTP en la Ras y de ese modo la activan. En el esquema que se presenta, una proteína denominada Grb2 interactúa por medio de los dominios SH2 con RTK y por medio de los dominios SH3 con el factor de intercambio Sos. La Ras activa luego las proteínas de una familia denominada MAPKKK (proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógenos), que a su vez da lugar a la activación de proteínas MAPKK y luego de proteínas MAPK. Finalmente, los factores de transcripción específicos del núcleo sufren una fosforilación, que les activa para unirse a lugares específicos del DNA y activar la transcripción de determinados genes concretos. La actividad de la Ras se limita por una serie de proteínas activadoras de la GTPasa (GAP) que impulsan la hidrólisis del GTP unido.

Adaptado de S. E. Egan y R. A. Weinberg, *Nature* (1993) 365:782. © 1993 Macmillan Magazines, Ltd.

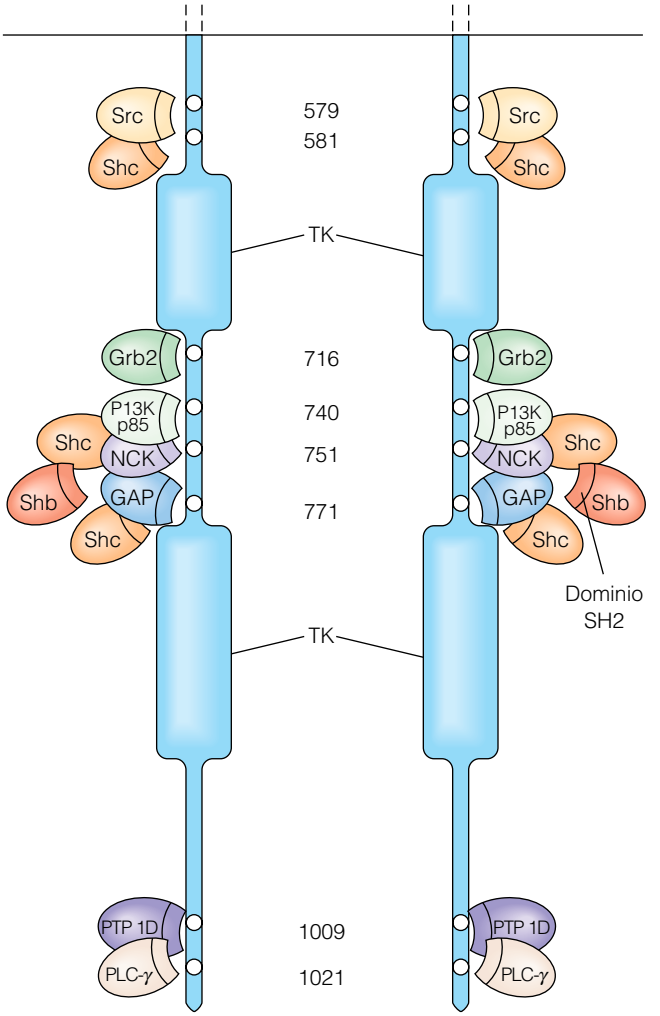


FIGURA **23.24**

Porción intracelular del receptor β de PDGF dimérico (activado). La figura muestra los lugares de fosforilación (número de residuo), dos dominios tirosina quinasa (TK) en cada cadena polipeptídica y lugares para diversas proteínas que participan en el proceso de transducción de señal (no están todas identificadas). Las regiones recuadradas pequeñas en cada una de estas proteínas representan dominios SH2. PI3K es una fosfatidilinositol 3-quinasa. PLC-γ es una fosfolipasa C y PTP 1D es una tirosina fosfatasa proteica, que regula el proceso de transducción de señal eliminando fosfatos de residuos específicos de fosfotirosina.

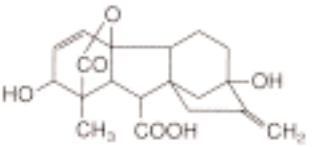
Tomado de L. Claesson-Welch, *J. Biol. Chem.* (1994) 269:32023-32026. Reproducido con permiso de The American Society for Biochemistry & Molecular Biology.

Hormonas vegetales

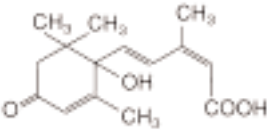
Nuestro conocimiento de las acciones moleculares de las hormonas vegetales está mucho menos avanzado que el de las hormonas de los animales vertebrados. Ello se debe en parte a que algunas de las hormonas vegetales son factores de proliferación, por lo que la proliferación es el único parámetro fácil de medir. Además, las membranas de las plantas son más difíciles de aislar y estudiar que las membranas de los animales.

Hemos encontrado ya las cinco clases principales de hormonas vegetales en capítulos anteriores sobre el metabolismo. Recapitulando, estas cinco clases, que se ilustran en la Figura 23.25, son las siguientes: (1) los diterpenos **giberelinas,** derivados del isopentenil pirofosfato, (2) el sesquiterpeno **ácido abscísico,** derivado también del isopentenil pirofosfato, (3) las **citoquininas,** que son bases púricas con una cadena lateral terpenoide, (4) las **auxinas,** con el metabolito del triptófano, el *ácido indol-3-acético*, como sustancia más activa, y (5) el **etileno,** que procede del grupo metionilo de la *S*-adenosilmetionina. Así pues, estos compuestos son químicamente muy distintos de las hormonas de los animales.

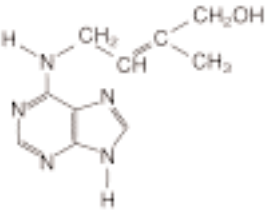
Otras diferencias respecto a las hormonas de los animales radican en (1) la diversidad de efectos de una determinada hormona vegetal, y (2) en la actividad



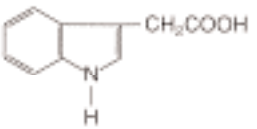
Ácido giberélico (GA3) [una gliberelina]



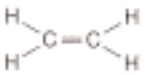
Ácido abscísico (ABA)



Zeatina [una citoquinina]



Ácido indol-3-acético (IAA) [una auxina]



Etileno

FIGURA **23.25**

Representantes de las cinco clases principales de hormonas vegetales.

hormonal de un gran número de especies relacionadas estructuralmente. Así por ejemplo, se han caracterizado estructuralmente al menos una docena de citoquininas diferentes. Aunque todas contienen adenina con una cadena lateral en N-6, existe una gran variabilidad en la estructura de dicha cadena lateral.

Las auxinas se sintetizan en las gemaciones apicales de los brotes en crecimiento. Estimulan la proliferación del brote principal e inhiben la proliferación de los brotes laterales. Una clase de proteínas de membrana que unen auxinas pueden constituir los receptores de éstas. La acción de las auxinas implica gradientes protónicos quimiosmóticos, que a su vez establecen gradientes de concentración de auxina, lo cual conduce a diferentes respuestas en diferentes partes de la planta: la degradación parcial de la pared celular que es necesaria para que se produzca la proliferación, y el aumento de la síntesis de RNA y de proteínas, necesario para la diferenciación. Las pruebas más recientes sugieren que se forma AMP cíclico en las plantas y que éste media los efectos de la auxina.

Las otras clases de hormonas vegetales son más difíciles de describir en términos bioquímicos. Las citoquininas se producen en las raíces e impulsan la proliferación y la diferenciación en muchos tejidos. Las citoquininas y las auxinas actúan de manera conjunta y la proporción de las citoquininas con respecto a las auxinas es un elemento que con frecuencia resulta crucial para determinar el que una planta crezca o se diferencie. En muchos casos, las células vegetales aisladas en un cultivo tisular son capaces de regenerar las plantas enteras. En estos casos, el investigador debe experimentar con distintas proporciones de citoquininas y auxinas para buscar empíricamente las proporciones que permiten el mejor crecimiento de las plantas normales.

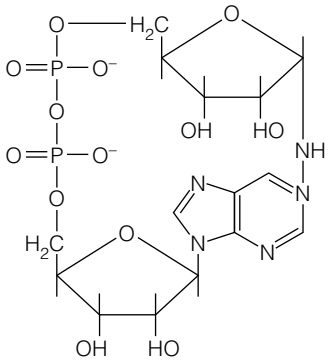
Se conocen más de 100 formas de giberelinas. Algunas actúan como hormonas promotoras del crecimiento y pueden estimular la expresión de determinados genes. RNA mensajeros concretos están presentes en cantidades elevadas como resultado de la administración de giberelinas, lo cual respalda la idea de que estas sustancias actúan a nivel génico.

El etileno se considera una hormona de envejecimiento. Estimula la maduración de las frutas y el envejecimiento de las flores, e inhibe el crecimiento en los semilleros. También redirige el transporte de auxinas para impulsar el crecimiento transversal, en vez de longitudinal de las plantas.

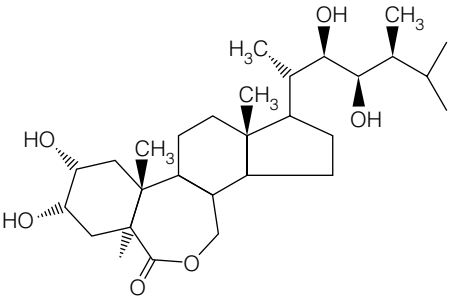
El ácido abscísico (ABA) contrarresta el efecto de la mayor parte de las otras hormonas vegetales. Inhibe la germinación, el crecimiento, el desarrollo de los brotes y el envejecimiento de las hojas y ayuda a las plantas a ajustarse a las tensiones como el frío y la sequía. La síntesis de ácido abscísico en las hojas se estimula al marchitarse. Existen datos fisiológicos que sugieren la intervención del ácido abscísico en el equilibrio de los iones y el agua.

Los últimos estudios han sugerido que el control hormonal en las plantas es más parecido al de los animales de lo que previamente se había sospechado. El etileno y el ácido abscísico actúan ambos a través de rutas de señalización que utilizan la fosforilación de proteínas. Una de estas proteínas en la ruta del etileno es análoga con la clase de histidina quinasas proteicas conocidas como "reguladores de respuesta" en las bacterias y en los eucariotas inferiores. La ruta del ABA utiliza un componente de señalización denominado ADP-ribosa cíclico (cADPR), que regula la liberación de calcio en las células animales. En el sistema animal, la liberación de calcio por el cADPR activa de manera clara una proteína quinasa posterior. Aún más inesperado ha sido el descubrimiento reciente de una proteína vegetal con gran homología con las esteroide 5α reductasas de mamíferos, que participan en la síntesis de andrógenos (Capítulo 19). Las plantas que carecen de esta proteína pueden revertir su defecto de crecimiento cuando se tratan con un esteroide denominado brasinolida. Estas observaciones

sugieren que la brasinolida o una molécula parecida es una hormona de proliferación vegetal y que participa en su síntesis la proteína semejante a la reductasa.



ADP-ribosa cíclica



Brasinolida

RESUMEN

Cada órgano o tejido de un organismo multicelular tiene un perfil de actividades metabólicas propio que le permite realizar sus funciones especializadas. Los tejidos distantes han de mantenerse en constante comunicación para conservar la homeostasis. En los vertebrados, el elemento más esencial de esta homeostasis es el mantenimiento de unas concentraciones constantes de glucosa en sangre, fundamentalmente para el funcionamiento adecuado del cerebro. Las acciones de tres hormonas, insulina, glucagón y adrenalina, desempeñan las funciones dominantes en la contribución a la homeostasis de la glucosa. La insulina señala el estado de ingesta y estimula la utilización de la glucosa y la síntesis de compuestos de almacenamiento de energía. El glucagón actúa fundamentalmente sobre las células hepáticas, aumentando la glucosa sanguínea por medio de varios mecanismos en los que interviene el AMP cíclico. La adrenalina tiene unos efectos semejantes sobre las células musculares.

La acción hormonal es uno de los elementos de los mecanismos de transducción de señal, procesos mediante los cuales se transmiten señales de una célula a otra. Algunas hormonas interactúan con receptores intracelulares; en estos casos, actúan a nivel génico de tal manera que el complejo hormona-receptor influye en la transcripción de genes específicos en el tejido diana. Otras hormonas interactúan con receptores unidos a la membrana plasmática. Existen tres tipos de estos receptores transmembrana: (1) receptores que son canales iónicos, en los que la unión de la hormona afecta directamente la permeabilidad de la membrana para un ion, (2) receptores como el de la insulina, que tienen un lugar de unión hormonal en el exterior y una actividad enzimática en el lado citosólico, de tal manera que la unión del ligando estimula esa actividad, y (3) receptores que actúan a través de proteínas G influyendo en las concentraciones de segundos mensajeros, como el AMP cíclico, el GMP cíclico, los iones calcio, el inositol trisfosfato y el diacilglicerol. Los segundos mensajeros interactúan con diversos procesos metabólicos intracelulares. La acción de las proteínas G se controla mediante la unión de nucleótidos de guanina. La estimulación mediante la interacción con el receptor provoca el cambio de GDP por GTP, y la acción de la hormona se ve limitada por la conversión lenta del GTP unido en GDP.

Los protooncogenes son genes celulares (la mayoría de los cuales codifican proteínas de transducción de señal) que se han transferido a genomas víricos y que posteriormente sufren mutaciones que les convierten en oncogenes. La ac-

ción de un oncogén, tanto si ha sido generado en una célula por una infección vírica como si se debe a la mutación de un protooncogén, causa la pérdida del control metabólico y de crecimiento que se asocia con la transformación de una célula normal en una célula cancerosa.

Las hormonas vegetales comprenden las giberelinas, las citoquininas, las auxinas, el etileno y el ácido abscísico. Los últimos datos indican paralelismos entre la acción de las hormonas animales y vegetales, aunque se conoce mucho menos sobre las hormonas vegetales.

BIBLIOGRAFÍA

General

Czech, M. P. y S. Corvera (1999) Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J. Biol. Chem.* 274:1865-1868. Una de las diversas mini-revisiones del JBC sobre la estimulación del transporte de la glucosa por la insulina.

Ember, L. R. (1998) Surviving stress. *Chem. Eng. News*, número del 25 de Mayo. Un artículo de tipo noticias que describe las respuestas bioquímicas al estrés en el contexto del síndrome de la Guerra del Golfo y el estrés retardado que han sufrido algunos combatientes.

Newgard, C. B. y J. D. McGarry (1995) Metabolic coupling factors in pancreatic β-cell signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 64:689-719. Esta revisión considera la forma en la que el páncreas detecta la concentración sanguínea de glucosa y ajusta su liberación de insulina.

Fosforilación y desfosforilación proteica

Elion, E. A. (1998) Routing MAP kinase cascades. *Science* 281:1625-1626. Un artículo de noticias que proporciona una perspectiva sobre dos artículos de investigación publicados en el mismo número que describen las funciones de las proteínas adaptadoras en el ensamblaje de las autopistas de la información en las células.

Fantl, W. J., D. E. Johnson y L. T. Williams (1993). Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 62:453-482. Una revisión de las acciones del receptor de insulina y las proteínas transmembrana relacionadas.

Hafen, E. (1998) Kinases and phosphatases—A marriage is consummated. *Science* 280:1212-1213. Los complejos físicos entre las proteína quinasas y las fosfatasas facilitan la regulación de las rutas de transducción de señal que implican la fosforilación y desfosforilación proteicas.

Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 8D:225-238. El número del 27 de enero contiene nueve revisiones importantes sobre la transducción de señal.

Mochly-Rosen, D. (1995) Localization of protein kinases by anchoring proteins: A theme in signal transduction. *Science* 268:247-251. Uno de los seis artículos oportunos en un número especial dedicado a la transducción de señal.

Síntesis de las hormonas peptídicas

Fisher, J. M. y R. H. Scheller (1988) Prohormone processing and the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 263:16515-16518. Una revisión que describe la forma en que se forman las hormonas peptídicas mediante ruptura a partir de precursores de alto peso molecular.

Receptores

Black, J. (1989) Drugs from emasculated hormones: The principle of syntopic antagonism. *Science* 245:486-493. Presentación de Black con motivo de la concesión del Premio Nobel, en la que describe el desarrollo de fármacos antagonistas de los receptores adrenérgicos.

Lin, Y.-J., L. Seroude y S. Benzer (1998) Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant *methusaleh. Science* 282:943-946. Pruebas de que el receptor serpentina participa en la determinación de la duración de la vida.

Marshall, C. J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-related kinase activities. *Cell* 8D:179-185. Otra revisión actual publicada en el número del 27 de enero.

Pitcher, J. A., N. J. Freedman y R. J. Lefkowitz (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67:653-692. Una revisión reciente que describe este mecanismo de contra-regulación.

Strader, C. D., T. M. Fong, M. R. Tota, D. Underwood y R. A. F. Dixon (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 63:101-132. Una revisión exhaustiva reciente.

Vaughan, M. (1998) G protein-coupled receptors minireview series, and Signaling by heterotrimeric G proteins minireview series. *J. Biol. Chem.* 273:17297-17298 y 667-668. Las mini-revisiones del JBC se recopilan al final de cada año en un "compendio de mini-revisiones". El compendio de 1998 contiene 11 mini-revisiones sobre los sistemas de transducción de señal acoplados a las proteínas G. Los artículos del Dr. Vaughan son prólogos breves a una serie de estas revisiones.

Proteínas G

Scheffzek, K., M. R. Ahmadian y A. Wittinghofer (1998) GTPase-activating proteins: Helping hands to complement an active site. *Trends Biochem. Sci.* 23:257-262. Estructuras cristalinas de varias GAP muestran cómo interactúan y activan la GTPasa de las proteínas relacionadas con Ras.

Snyder, S. H., P. B. Sklar y J. Pevsner (1988) Molecular mechanisms of olfaction. *J. Biol. Chem.* 263:13971-13975. Esta mini-revisión describe las pruebas que indican la intervención de las proteínas G en el sentido del olfato.

Sprang, S. R. y D. E. Coleman (1998) Invasion of the nucleotide snatchers: Structural insights into the mechanism of G protein GEFs. *Cell* 95:155-158. Cómo estimulan las proteínas el intercambio GDP-GTP en la activación de la proteína G.

Tesmer, J. J. G., R. K. Sunahara, A. G. Gilman y S. R. Sprang (1997) Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with $G_{s\alpha}$-GTPγS. *Science* 278:1907-1916. El análisis estructural de las proteínas G revela el mecanismo de la activación de la adenilil ciclasa.

Wedegaertner, P. B., P. T. Wilson y H. R. Bourne (1995) Lipid modifications of trimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* 270:503-506. Esta característica estructural desaparece de las proteínas G recombinantes que se utilizan en los análisis cristalográficos.

Sistemas de segundos mensajeros

Berridge, M. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315-325. Papel del calcio como segundo y/o tercer mensajero.

Hodgkin, M. N., T. R. Pettit, A. Martin, R. H. Michell, A. J. Pemberton y M. J. O. Wakelam (1998) Diacylglycerols and phosphatidates: Which molecular species are intracellular messengers? *Trends Biochem. Sci.* 23:200-204. Una revisión corta reciente de los segundos mensajeros que derivan de lípidos.

Hurley, J. H. (1999) Structure, mechanism, and regulation of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 274:7599-7602. Esta revisión está especialmente actualizada de acuerdo con los datos estructurales recientes sobre la adenilato ciclasa.

Lohmann, S. M., A. B. Vaandrager, A. Smolenski, U. Walter y H. R. De Jonge (1997) Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem. Sci.* 22:307-312. Análisis de estructura-función de esta familia de enzimas.

Majerus, P. W., M. V. Kisseleva y F. A. Norris (1999) The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *J. Biol. Chem.* 274:10669-10672. Información reciente sobre el control de la síntesis y recambio de los fosfoinosítidos.

Singer, W. D., H. A. Brown y P. C. Sternweis (1997) Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu. Rev. Biochem.* 66:475-509. Revisión de la síntesis de segundos mensajeros a partir de los fosfoinosítidos.

Receptores nucleares

Auwerx, J. y 39 coautores (1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97:161-163. Cuarenta líderes en este campo proponen un esquema de clasificación unificado para esta familia de receptores que está siempre creciendo, con referencias a otros trabajos de revisión.

Schwabe, J. W. R. y D. Rhodes (1991) Beyond zinc fingers: Steroid hormone receptors have a novel structural motif for DNA recognition. *Trends Biochem. Sci.* 16:291-297. Esta revisión resume los estudios de RMN sobre el mecanismo de unión del DNA de esta familia de receptores.

Tsai, M. J. y B. W. O'Malley (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63:451-486. La revisión exhaustiva más reciente de los receptores de esteroides.

Receptores tirosina quinasa

Claesson-Welsh, L. (1994) Platelet-derived growth factor receptor signals. *J. Biol. Chem.* 269:32023-32036. Descripción de todas las proteínas conocidas que interaccionan con los receptores PDGF.

Oncogenes y factores de crecimiento

Birge, R. B. y H. Hanafusa (1993) Closing in on SH2 specificity. *Science* 262:1522-1524. Una minirrevisión en la que se describe cómo explican los dominios SH2 la especificidad de las respuestas celulares a los factores de crecimiento.

Burley, S. K. (1994) p53: A cellular Achilles' heel revealed. *Structure* 2:789-792. Una minirrevisión de fácil lectura en la que se describe la excitación creada por la determinación estructural del dominio de fijación al DNA de la p53.

Kinzler, K. W. y B. Vogelstein (1998) Landscaping the cancer terrain. *Science* 280:1036-1037. Los científicos que describieron los cambios genéticos en la progresión de los tumores colorrectales clasifican los genes involucrados.

Knudson, A. G. (1993) Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10914-10921. Una revisión de los genes supresores de tumores.

Massagué, J. (1998) TGF-β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67:753-791. Una revisión que describe las rutas de señalización que utilizan serina/treonina quinasas del receptor.

Pawson, T. y T. M. Saxton (1999) Signaling networks—Do all roads lead to the same genes? *Cell* 97:675-678. La profusión de moléculas y rutas de señalización reclama un orden que los autores de esta mini-revisión tratan de encontrar.

Temin, H. M. (1988) Evolution of cancer genes as a mutation-driven process. *Cancer Res.* 48:1697-1701. Un investigador laureado con el premio Nobel revisa la relación entre los protooncogenes y los oncogenes y las acciones de estos últimos.

Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller (1992) *Recombinant DNA*, 2.ª ed., Scientific American Books, Nueva York. El Capítulo 18 es una excelente revisión de los experimentos utilizados para identificar y caracterizar los oncogenes y los genes supresores de tumores.

Wittinghofer, A. y N. Nassar (1996) How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem. Sci.* 21:488-491. Planteamiento de los efectos posteriores en las rutas de señalización de Ras.

Xu, W., S. C. Harrison y M. J. Eck (1997) Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385:595-602. La estructura revela cómo la interacción con otras proteínas podría activar la actividad proteína quinasa de la proteína Src.

Hormonas vegetales

Heldt, H.-W. (1997) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 394-414. Oxford University Press, Nueva York. El Capítulo 19 de este libro contiene un tratamiento completo de las hormonas de crecimiento de las plantas y sus acciones.

Johnson, P. R. y J. R. Ecker (1998) The ethylene gas signal transduction pathway. *Annu. Rev. Genet.* 32:227-254. Pruebas de que el etileno actúa a través de una proteína quinasa.

Jones, A. M. (1998) Auxin transport: Down and out and up again. *Science* 282:2201-2202. Una mini-revisión que resume las pruebas del modelo quimiosmótico de acción de la auxina.

Pennisi, E. (1997) Plants decode a universal signal. *Science* 278:2054-2055. Un artículo de tipo noticias, que acompaña a un trabajo de investigación en el mismo número, que describe el uso de la ADP-ribosa cíclica como segundo mensajero en las plantas.

Russell, D. W. (1996) Green light for steroid hormones. *Science* 172:370-371. Un artículo de tipo noticias, que acompaña a un trabajo de investigación en el mismo número, que describe el probable uso de las hormonas esteroideas por las plantas.

PROBLEMAS

1. Los corredores de maratón que se preparan para una carrera, realizan una "carga de hidratos de carbono" para aumentar al máximo sus reservas de los mismos. Para ello ingieren una gran cantidad de alimentos con abundante almidón. ¿Por qué es preferible el almidón a los dulces o los alimentos con azúcar?
2. Suponiendo que una persona humana promedio consume energía a una tasa de 1500 kcal/día en reposo y que un corredor de larga distancia consume energía a una tasa 10 veces superior, ¿cuánto tiempo durarían las reservas de glucógeno durante una carrera de maratón? Recuerde que 1 kcal equivale a 4.183 kJ.
3. ¿Qué proporción del consumo de energía total mantiene la función cerebral en una persona promedio en reposo? ¿Cuál es esta proporción en una persona que corre un maratón?
4. La proteólisis aumenta durante las fases iniciales del ayuno, pero luego disminuye cuando el cuerpo se adapta al empleo de otras fuentes de energía alternativas. Teniendo en cuenta que no se han descrito mecanismos de control por retroacción para las proteasas intracelulares, ¿cómo podría explicar estos cambios aparentes de la actividad proteasa?
5. Se ha observado que la glucosa reacciona de forma no enzimática con la hemoglobina, a través de la formación de una base de Schiff entre el C-1 de la glucosa y las terminaciones amino de las cadenas β. ¿Cómo podría aplicarse esta observación para el control de los pacientes diabéticos?
6. Los cuerpos cetónicos se exportan del hígado para su uso por otros tejidos. Debido a que muchos tejidos son capaces de sintetizar cuerpos cetónicos, ¿qué propiedad enzimática del hígado podría contribuir a su especial capacidad de exportación de estos compuestos?

*7. Las proteínas G presentan una cierta homología de secuencia de aminoácidos con determinadas proteínas bacterianas que participan en la síntesis proteica. Estas proteínas, denominadas factores de elongación, unen también e hidrolizan el GTP. ¿Cómo podría determinarse si los tejidos de las plantas contienen proteínas G u otras entidades similares?

8. Indique dos o tres factores que hagan que sea ventajoso el que las hormonas peptídicas se sinteticen en forma de prohormonas inactivas que se activan mediante ruptura proteolítica.

*9. Indique una hormona cuya concentración probablemente no pueda determinarse por radioinmunoanálisis y explique su respuesta. (Pista: Deberá poder generar un anticuerpo frente a la hormona para diseñar un análisis de este tipo.)

10. Describa un mecanismo a través del cual una hormona esteroidea pudiera actuar aumentando las concentraciones intracelulares de AMP cíclico.
11. Las moléculas pequeñas interactúan con las células a través de receptores macromoleculares específicos. Para cada uno de los cuatro receptores que se identifican a continuación, indique todas las características numeradas que describen con exactitud al receptor.
    (a) Un receptor adrenérgico_____
    (b) Un receptor esteroideo_____
    (c) El receptor de LDL_____
    (d) El receptor de insulina_____
    1. Localizado en la superficie celular
    2. Asociado con la proteína clatrina
    3. La unión del ligando estimula la actividad de la fosfolipasa C
    4. Proteína transmembrana
    5. Proteína de unión al DNA
    6. Localizado en el interior celular
    7. El complejo receptor-ligando se desplaza al lisosoma
    8. El complejo receptor-ligando se concentra en el núcleo
    9. La activación del receptor puede inhibir la síntesis de glucógeno
    10. El complejo hormona-receptor activa la transcripción de genes específicos
    11. La internalización reduce la síntesis de ésteres de colesterol
    12. La acción de este receptor reduce la síntesis y la actividad de la β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA reductasa (HGM-CoA reductasa)
    13. Este receptor activa su propia síntesis
    14. La actividad biológica de este receptor comporta una interacción con proteínas que unen nucleótidos de guanina
    15. Este receptor posee una actividad proteína quinasa
    16. No se conoce que actúe a través de un segundo mensajero.

*12. Tras la activación por un receptor, una proteína G intercambia el GDP unido por GTP, en vez de fosforilar el GDP que ya está unido. De forma análoga, el complejo subunidad α-GTP tiene una actividad GTPasa lenta que hidroliza el GTP unido, en vez de intercambiarlo por GDP. Describa los datos experimentales que concordarían con estas conclusiones.

13. El tejido adiposo no es capaz de volver a sintetizar triacilgliceroles a partir del glicerol liberado durante la lipólisis (degradación de grasas). ¿Por qué no? Describa la ruta metabólica que se utiliza para generar un compuesto de glicerol para la síntesis de triacilgliceroles.
14. (a) Describa brevemente la relación entre las concentraciones intracelulares de malonil-CoA en el hígado y el control de la cetogénesis. (b) Describa de qué forma la acción de la glucoquinasa facilita el que el hígado amortigüe la concentración sanguínea de glucosa.
15. La acción del glucagón sobre las células hepáticas da lugar a una inhibición de la piruvato quinasa. ¿Cuál es el mecanismo más probable de este efecto?
16. El ion litio inhibe la síntesis de inositol trisfosfato mediante la inhibición de una reacción de la degradación del inositol trisfosfato. Explique esta aparente paradoja.
17. Describa dos características químicas generales que diferencian a las hormonas vegetales de las hormonas de los animales.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 23A

Radioinmunoanálisis

Dado que la mayoría de las hormonas se encuentran a concentraciones extraordinariamente bajas en los productos biológicos (aproximadamente 10^{-10} M), no pueden cuantificarse mediante métodos estándar, como las medidas de fluorescencia o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Además, una hormona suele estar rodeada de cantidades excesivas de sustancias químicamente relacionadas, lo cual puede interferir con las técnicas analíticas estándar.

El **radioinmunoanálisis** (**RIA**) es una técnica potente desarrollada en los años 1960 por Solomon Berson y Rosalyn Yalow, que combina la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo con la sensibilidad de la detección radioisotópica. Esta técnica permite detectar cualquier sustancia para la que pueda prepararse un anticuerpo mediante la inyección de un antígeno a un animal de experimentación. (La mayor parte de las hormonas de bajo peso molecular deben conjugarse con un polipéptido para que sean antigénicas.) El antígeno inyectado puede detectarse luego en cantidades mínimas en presencia de una enorme cantidad de sustancias químicamente semejantes, siempre que estas sustancias no interfieran con la reacción antígeno-anticuerpo.

El principio del radioinmunoanálisis es muy sencillo, como se muestra en la Figura 23A.1. Se determina en primer lugar la radiactividad unida a una pequeña cantidad del anticuerpo después de haber incubado ese anticuerpo con un gran exceso del antígeno marcado radiactivamente con una actividad específica conocida. En este caso, el antígeno es la hormona que se va a determinar. Para generar una curva estándar, que relacione la reducción de la radiactividad unida con la cantidad de hormona no radiactiva u otro antígeno, se incuban entonces las mismas cantidades del anticuerpo y del antígeno marcado radiactivamente con una cantidad conocida de la hormona no radiactiva. La hormona no marcada compite con la hormona marcada por los lugares de unión en las moléculas de anticuerpo. En consecuencia, la radiactividad unida disminuye. Esta operación se realiza con cantidades crecientes de la hormona no radiactiva. Los datos se muestran en la Figura 23A.2. Para determinar el porcentaje de hormona unida, se incuba el anticuerpo y el antígeno marcado radiactivamente en las mismas proporciones, junto con una alícuota del material biológico que contiene una cantidad desconocida de la hormona. El antígeno sin marcar de esta alícuota diluye la radiactividad unida en una cantidad proporcional al antí-

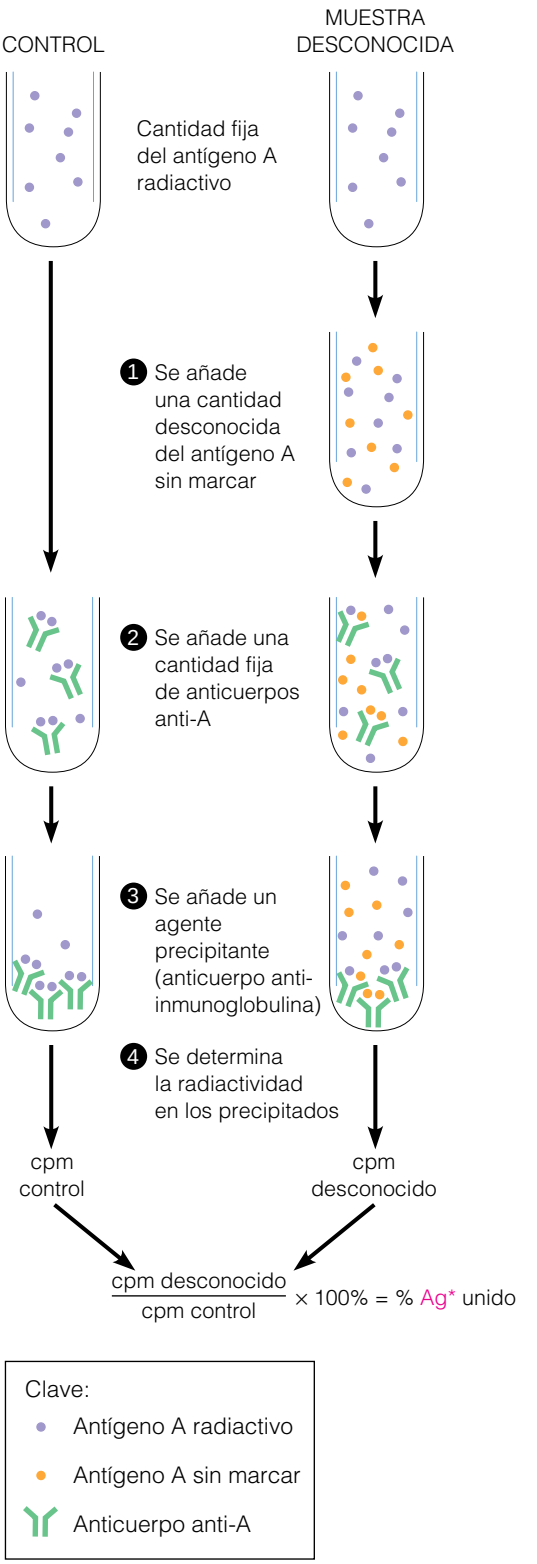


FIGURA **23A.1**

Principio del radioinmunoanálisis. En el ejemplo que se muestra, las cantidades de antígeno A marcado y sin marcar son iguales, lo que produce una reducción del 50% de la hormona radiactiva unida. Cuando el radioinmunoanálisis se utiliza para medir las concentraciones de hormonas, el antígeno A será la hormona. Ag = antígeno.

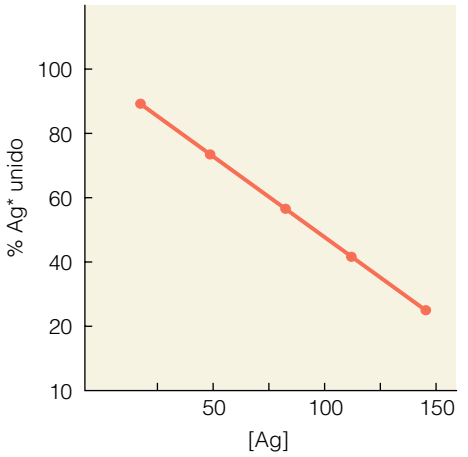


FIGURA **23A.2**

Curva estándar de RIA. La curva se determina variando la cantidad de hormona no marcada en presencia de cantidades constantes de hormona marcada radiactivamente y anticuerpo. Ag = antígeno.

geno no radiactivo presente. Se utiliza la curva estándar para determinar esa cantidad cuantitativamente.

Es necesario separar el antígeno unido del no unido, con objeto de que la radiactividad contada proceda tan sólo del antígeno unido. Esta separación puede hacerse precipitando los complejos antígeno-anticuerpo, ya sea con un antisuero generado contra el anticuerpo utilizado, ya sea con la proteína staph A (una proteína de la superficie celular de la bacteria *Staphylococcus aureus* que une de manera eficiente los complejos antígeno-anticuerpo).

El radioinmunoanálisis se utiliza para analizar muchas sustancias biológicas que están presentes en cantidades mínimas, como los esteroides, los nucleótidos cíclicos, las hormonas peptídicas, las prostaglandinas y los fármacos. En algunas aplicaciones, el RIA ha sido sustituido por el análisis inmunosorbente con la enzima ligada (ELISA, véase Herramientas de la Bioquímica 7A).

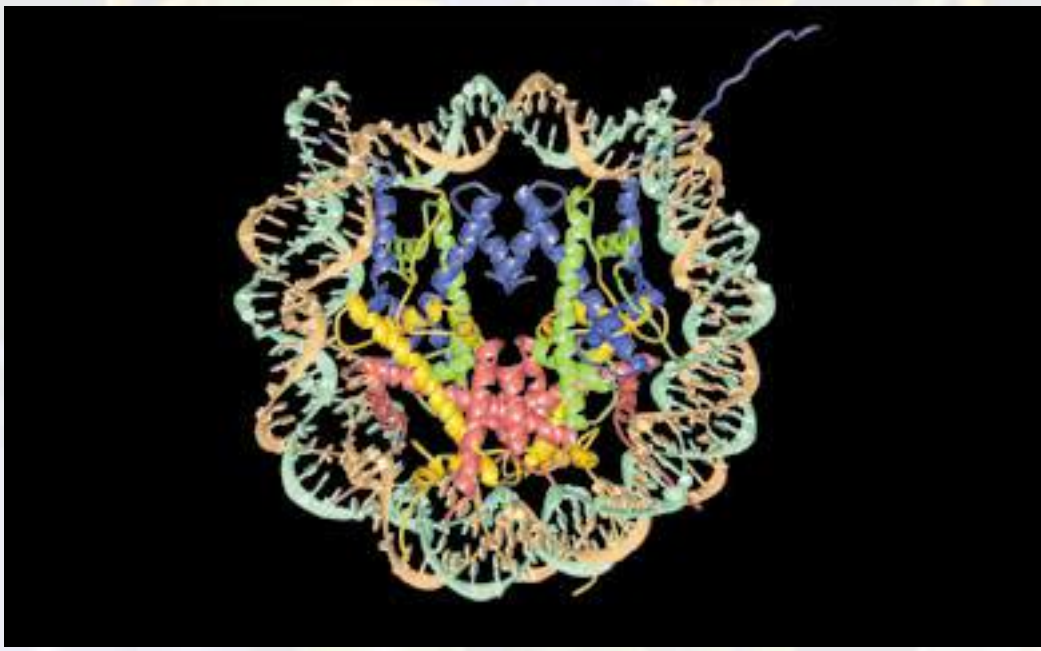
Bibliografía

Van Vunakis, H. y J. J. Langone, eds. (1980) Immunological methods. *Methods in Enzymology*, vol. 70. Academic Press, Nueva York. Un manual de varios autores con artículos dedicados a todas las técnicas inmunológicas importantes.

Yalow, R. S. (1978) Radioimmunoassay: A probe for the fine structure of biological systems. *Science* 200:1236-1240. Una descripción de la técnica, redactada por uno de sus inventores.

PARTE V

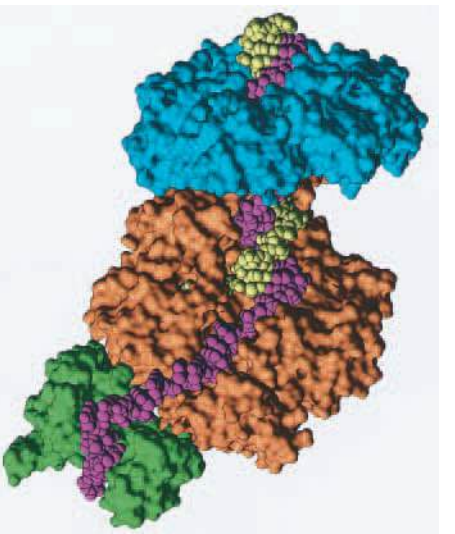
Información



CAPÍTULO 24

Copiado de la información: replicación

La última parte principal de nuestro estudio de la bioquímica se refiere al almacenamiento, recuperación, procesamiento y transmisión de la información biológica. Los procesos que intervienen, a los que denominamos **metabolismo de la información,** se diferencian del metabolismo intermediario en lo siguiente. En el metabolismo intermediario, toda la información que determina la naturaleza de una reacción se encuentra en la estructura tridimensional de la enzima que interviene en ella. Esa estructura determina los sustratos que se unen y las reacciones que se catalizan. Naturalmente, todas las reacciones metabólicas están controladas en última instancia por la información genética que especifica la estructura y las propiedades de las enzimas. Sin embargo, las reacciones que encontramos aquí se diferencian por la intervención directa de la información genética, y concretamente por la necesidad de un *molde* que actúa, junto con la enzima, para especificar la reacción catalizada. Los moldes biológicos son los ácidos nucleicos (DNA o RNA). En general, el molde tiene un papel pasivo y determina los sustratos concretos que se unirán, mientras que la enzima continúa especificando la naturaleza de la reacción, una vez unidos los sustratos. Una excepción a esta generalización es la intervención de las moléculas de RNA como catalizadores, en los procesos que van desde la rotura y empalme de los intrones hasta la síntesis de proteínas (Capítulos 11 y 27). En los cinco capítulos que siguen consideraremos las acciones de las proteínas sobre los ácidos nucleicos molde para almacenar, copiar, modificar y expresar la información biológica.



Un complejo de replicación del DNA, con la DNA polimerasa (naranja), una pinza de procesividad (turquesa) y una proteína de unión al DNA de cadena única (verde). Las cadenas de DNA son rosa oscuro y oro. Véase la Figura 24.17 para una mayor información.

Cortesía de J. Wang y T. A. Steitz, modificado de J. Wang et al., *Cell* (1997) 89:1087-1099. © Cell Press.

Metabolismo de la información: procesos principales

Recuérdese del Capítulo 4 que los principales procesos del metabolismo de la información son la *replicación*, en la que el DNA (o el RNA en los virus de RNA) actúa como molde para su propia síntesis; la *transcripción*, en la que la información codificada en el DNA determina la estructura de un RNA producto; y la *traducción*, en la que el RNA actúa como molde para la síntesis de una cadena polipeptídica concreta (véase la Figura 4.23 en la página 121). Podemos

comparar estos procesos con la expresión de la información verbal codificada en una lengua. La replicación y la transcripción utilizan sólo el lenguaje de nucleótidos de 4 letras de los ácidos nucleicos, mientras que la traducción convierte un mensaje de un lenguaje de nucleótidos al lenguaje de aminoácidos de 20 letras de las proteínas.

La biosíntesis de los ácidos nucleicos y las proteínas se regula fundamentalmente a nivel de la iniciación.

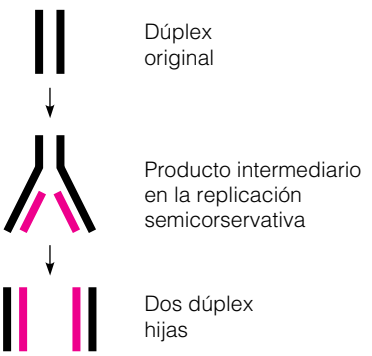
La replicación, la transcripción y la traducción son semejantes tanto por la necesidad de un molde como por estar compuestas por tres subprocesos distintos: iniciación, elongación de la cadena y terminación. En principio, la fase de iniciación es el lugar más adecuado para la regulación de cada uno de los procesos y, de hecho, la mayor parte de los procesos de regulación se producen en este punto.

En este capítulo nos centraremos en la replicación, tanto de genomas de DNA como de RNA. El Capítulo 25 está dedicado a diversos procesos en los que el DNA es un sustrato a la vez que un molde (recombinación genética, reparación, modificación y restricción, transposición y amplificación génica). Los Capítulos 26 y 27 se centrarán en la transcripción y la traducción, respectivamente. Estos cuatro capítulos (24-27) describen a los sistemas eucariotas y a las bacterias y los virus que proporcionaron los primeros conocimientos, mientras que en el Capítulo 28 se considerarán algunas características propias de la replicación y la expresión génica en los eucariotas.

Visión general de la replicación del DNA

Nuestra presentación de la replicación del DNA se inicia con una visión previa y un resumen. En la Figura 24.1 se muestra una versión simplificada de una horquilla de replicación y se presentan de manera preliminar algunos de los temas principales. Continuaremos nuestra visión general con una exposición más detallada de las pruebas experimentales que han establecido esta visión, junto con una consideración de las proteínas individuales y los subprocesos en que participan.

La replicación del DNA es conceptualmente sencilla, pero compleja en su mecánica. La sencillez era inherente en la propuesta de Watson y Crick: la transferencia de la información implica simplemente desenrollar las cadenas de una doble hélice de DNA original, acompañada de la síntesis de dos cadenas hijas complementarias. En otras palabras, la replicación es **semiconservativa** y da lugar a moléculas de DNA hijas que contienen una cadena original y un mate-



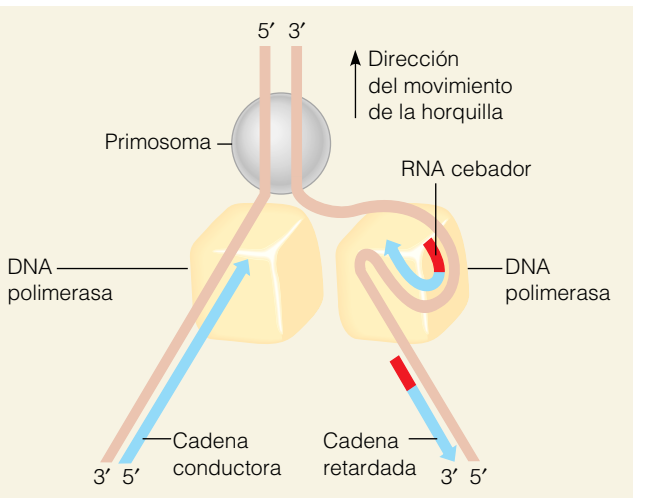


FIGURA **24.1**

Vista simplificada de una horquilla de replicación. Esta figura presenta varias de las características de la replicación del DNA que se presentarán en este capítulo. La síntesis de las dos nuevas cadenas del DNA (en azul) se produce simultáneamente con el desenrollamiento de la doble cadena de DNA original (tostado) para crear la horquilla de replicación. La elongación de la cadena de DNA está catalizada por la DNA polimerasa. Hay dos moléculas de esta enzima en la horquilla, una para cada cadena. Como muestran las puntas de flecha, las dos cadenas se replican en direcciones contrarias, debido a la naturaleza antiparalela de las cadenas en la doble hélice. Una cadena se va formando de manera continua en la dirección del movimiento de la horquilla, mientras que la otra (la de la derecha) se sintetiza en segmentos discontinuos, con un pequeño fragmento de RNA (en rojo) en el extremo 5′ de cada segmento. Este fragmento de RNA se sustituye luego por DNA, y los segmentos se juntan. El desenrollamiento de la doble cadena inicial y la síntesis de los fragmentos de RNA están catalizados por un ensamblaje multiproteico que se denomina primosoma.

rial de nueva síntesis (véase el margen de la página anterior). El experimento de marcaje de densidad de Meselson y Stahl demostró esta característica central de la replicación del DNA (véanse las Figuras 4.12-4.14, páginas 108, 110).

Aunque el experimento de Meselson-Stahl aportó una perspectiva esencial, quedaban pendientes algunas preguntas importantes. En primer lugar, la replicación del DNA está coordinada con el ciclo de crecimiento y división celular, de tal manera que las dos células procedentes de la división reciben cada una un complemento completo del DNA recién replicado. ¿Cómo se produce esta coordinación? En segundo lugar, la replicación del DNA se inicia en unos puntos fijos del cromosoma. ¿Cómo se reconocen estos **orígenes de replicación** por las enzimas adecuadas? En tercer lugar, la replicación del DNA es un proceso ordenado, que comporta el desenrollamiento de las cadenas progenitoras, la incorporación de los precursores de los nucleótidos y la renaturalización de las moléculas replicadas; todos estos procesos se producen dentro del mismo micromedio, denominado **horquilla de replicación.** ¿Cuál es la fuente de energía para el desenrollamiento de la doble hélice? ¿De qué forma han de actuar las proteínas para llevar a cabo estos pasos y cómo se coordinan sus actividades? En cuarto lugar, las frecuencias de mutación espontánea en la naturaleza son mucho más bajas que las que serían de esperar si el apareamiento de bases de Watson-Crick fuera el único factor que especificase la secuencia de bases de la cadena hija. ¿Qué mecanismos adicionales de incremento de la fidelidad intervienen en el proceso? Y finalmente, los cromosomas bacterianos y víricos, cuya replicación se estudió en primer lugar, son moléculas de DNA circulares. ¿Se produce la replicación en una o en ambas direcciones? ¿Cómo se desenredan las dos dobles cadenas hijas circulares una de otra al final de cada proceso de replicación?

Los intentos de responder a estas preguntas han revelado varias características generales de la replicación del DNA. En primer lugar, la replicación es *semiconservativa*, como ya se ha indicado. En segundo lugar, la replicación es *ordenada* y *secuencial*. Se inicia en unos puntos fijos del cromosoma, y el crecimiento de la cadena de DNA se produce de manera simultánea al desenrollamiento de la doble hélice original. En tercer lugar, como otros procesos de biosíntesis, la replicación del DNA utiliza *sustratos activados*, los desoxirribonucleósido 5′-trifosfatos (dNTP). En cuarto lugar, la replicación del DNA es *discontinua*. Como se considerará más adelante, la necesidad de extender cadenas de DNA de polaridad opuesta dentro de una horquilla hace que una cadena crezca en la dirección del movimiento de la horquilla y la otra en dirección contraria. Por último, la replicación es mucho más *exacta* que cualquier otro proceso catalizado por enzimas.

La replicación del DNA se inicia a partir de puntos de origen fijos y comporta la síntesis simultánea de dos cadenas hijas, cada una de las cuales tiene una secuencia complementaria y es antiparalela a una de las cadenas originales.

De los tres procesos de la replicación, iniciación, elongación y terminación de la cadena, el que conocemos mejor es el de elongación, y es este el que se trata con mayor profundidad en este capítulo. La Figura 24.1 presenta una imagen idealizada de una horquilla de replicación. Se presentan en ella los nombres y funciones de las principales proteínas que participan en el proceso y que se describirán con mayor detalle más adelante. Esta imagen se generó inicialmente a partir de los estudios realizados en *Escherichia coli* y varios virus de DNA que infectan a esta bacteria, en particular los bacteriófagos T4 y varios fagos pequeños con un DNA circular de una sola cadena (ϕX174 y M13). Aunque en esta presentación general utilizamos los nombres de algunas enzimas de *E. coli*, en esta sección se presentan las características de la replicación que son comunes a los sistemas procariotas y eucariotas.

Los componentes proteicos que se sabe que actúan en la horquilla de replicación o cerca de ella son los siguientes: *DNA polimerasas*, *proteínas de unión al*

DNA de cadena única, *helicasas*, *primasa*, *topoisomerasas* y *DNA ligasa*. Todas ellas se presentan a continuación y se describirán con mayor detalle más adelante. Algunas de estas enzimas son de por sí conjuntos proteicos de múltiples subunidades. Así, por ejemplo, la principal DNA polimerasa de la replicación en *E. coli* (DNA polimerasa III) contiene al menos 10 subunidades polipeptídicas diferentes.

La DNA polimerasa cataliza la reacción entre el hidroxilo 3′ de un residuo de desoxirribonucleótido del DNA de la cadena cebadora y el fosfato α de un dNTP que forma un apareamiento de bases con una cadena de DNA molde.

La **DNA polimerasa** cataliza la reacción química de la síntesis de DNA, la creación de los enlaces fosfodiéster entre los desoxirribonucleótidos en una cadena de DNA. El grupo hidroxilo 3′ del final de una cadena de DNA realiza un ataque nucleófilo sobre el fosfato α (el más interno) de un dNTP que llega, como se representa en la Figura 24.2. Ese dNTP ha sido posicionado previamente para la incorporación en la cadena en crecimiento o **cebador,** mediante enlaces de hidrógeno con el nucleótido apropiado en la cadena **molde.** La reacción comporta la salida de pirofosfato cuya hidrólisis consiguiente impulsa la reacción desde el punto de vista energético.

La cadena de DNA hija conductora se alarga de manera continua en la misma dirección 5′→3′ en que se desplaza la horquilla. La cadena retardada se sintetiza de manera discontinua; cada fragmento se sintetiza en la dirección 5′→3′, en sentido contrario al movimiento de la horquilla, pero el crecimiento global de la cadena se realiza en la dirección 3′→5′, hacia la horquilla.

Dada la necesidad de los grupos hidroxilo 3′ y de sustratos 5′ dNTP, la DNA polimerasa puede catalizar el crecimiento de la cadena de DNA tan sólo en una dirección: 5′→3′, lo cual significa que va del extremo 5′ hacia el extremo 3′. Sin embargo, recuérdese que las dos cadenas del DNA están en una disposición *antiparalela*, es decir, tienen polaridades opuestas. Debido a que se replican las dos cadenas en la misma horquilla, debe existir un mecanismo para la replicación de cada cadena en la dirección 3′→5′. Este mecanismo comporta la acción de una DNA polimerasa *dimérica* (DNA polimerasa III en *E. coli*), es decir, una molécula enzimática que replica en la misma dirección del movimiento de la horquilla y otra que efectúa la replicación *retrograda* en la

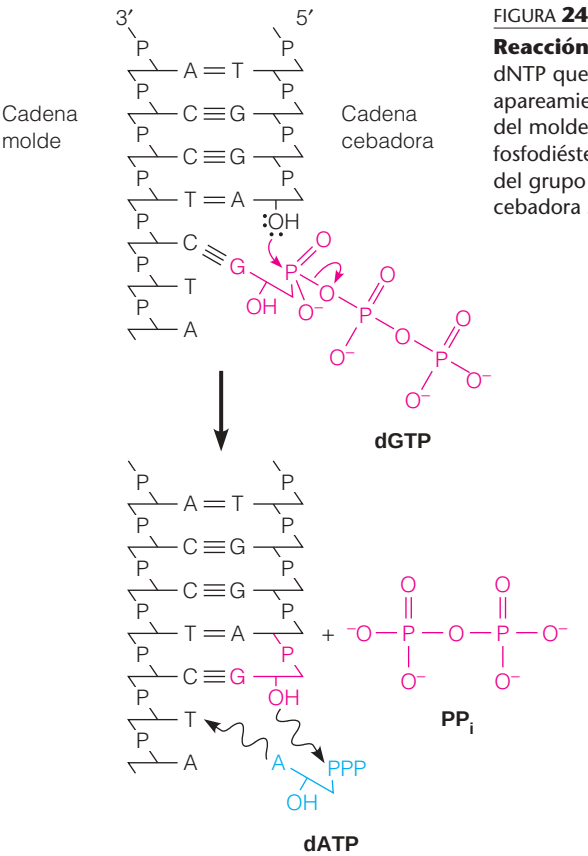


FIGURA **24.2**

Reacción de la DNA polimerasa. Cada dNTP que entra se coloca mediante el apareamiento de bases con el nucleótido del molde apropiado, y se forma un enlace fosfodiéster mediante el ataque nucleófilo del grupo hidroxilo 3′ de la cadena cebadora sobre el fosfato α del dNTP.

horquilla. El término **cadena conductora** identifica la cadena hija que se extiende en la misma dirección que la horquilla y la cadena que se sintetiza hacia atrás se denomina **cadena retardada.** Obsérvese en la Figura 24.1 que la síntesis de la cadena conductora (lado izquierdo) se produce simultáneamente con el desenrollamiento de la doble cadena original. Sin embargo, la síntesis de la cadena retardada (lado derecho) sólo puede tener lugar después de que se haya desenrollado una parte de la doble cadena original, dejando al descubierto una región del molde de DNA de una sola cadena. Debido a que la síntesis de ambas cadenas conductora y retardada se produce en la horquilla (véase la página 986), la polimerasa de la cadena retardada debe permanecer en la horquilla. En consecuencia, como se muestra en la Figura 24.3, la cadena retardada se sintetiza de manera discontinua, mediante una serie de segmentos cortos, mientras que la síntesis de la cadena conductora puede producirse sin interrupción. Los fragmentos de la cadena retardada se denominan **fragmentos de Okazaki,** por Reiji Okazaki que aportó las primeras pruebas de la replicación discontinua del DNA.

La DNA polimerasa sólo puede actuar extendiendo las cadenas a partir de un grupo hidroxilo 3′. Sin embargo, en la horquilla no existe un grupo funcional así, opuesto al molde de la cadena retardada. En consecuencia, para iniciar la síntesis de un fragmento de Okazaki debe intervenir otra enzima, la **primasa.** Como la DNA polimerasa, la primasa copia una cadena molde de DNA para formar un producto polinucleótido. Sin embargo, ese producto es RNA, no DNA. A diferencia de la DNA polimerasa, la primasa puede iniciar la síntesis de una cadena de polinucleótido, posicionando primero un ribonucleósido 5′-trifosfato (rNTP) opuesto a su base de DNA complementaria, y luego extenderlo a partir del grupo hidroxilo 3′ de este rNTP, como se muestra en la Figura 24.4. Una vez polimerizados varios ribonucleótidos para formar un **RNA cebador,** la primasa se aparta de alguna manera del camino y la DNA polimerasa añade un 5′ desoxirribonucleótido al extremo 3′ del cebador de RNA y continúa añadiendo luego dNTP en su dirección habitual 5′→3′. Las pruebas más recientes han identificado una subunidad específica de la DNA polimerasa responsable del desplazamiento de la primasa.

Cuando el extremo 3′ del fragmento de Okazaki en crecimiento alcanza el extremo 5′ del fragmento de Okazaki sintetizado previamente, pueden ocurrir tres cosas: (1) eliminación del RNA cebador, (2) sustitución de los ribonucleótidos por desoxirribonucleótidos y (3) unión covalente del extremo 3′ del fragmento de Okazaki recién sintetizado con el extremo 5′ del fragmento sintetizado previamente. Intervienen entonces otras dos enzimas, la **DNA polimerasa I** y la *DNA ligasa* (que se muestran también en la Figura 24.4). En las bacterias, la polimerasa I es una forma de DNA polimerasa que tiene una actividad 5′ exonucleasa además de su actividad DNA polimerasa. (Una exonucleasa cataliza la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster en los extremos de las moléculas de los ácidos nucleicos; véase la página 891). Estas actividades permiten a la enzima realizar una reacción denominada **traslación de mella,** la eliminación de ribonucleótidos del extremo 5′ del RNA cebador, acoplada con la extensión simultánea del extremo 3′ del fragmento de Okazaki, mediante la incorporación de desoxirribonucleótidos. En la Figura 24.5a se muestra a la enzima que se desplaza hacia la izquierda una posición, con la eliminación simultánea de UMP, el nucleótido 5′ terminal del fragmento de RNA (actividad 5′ exonucleasa) y la sustitución del mismo por dTMP (procedente de dTTP) en el extremo 3′ del DNA (actividad polimerasa). A medida que se repite este proceso, el resultado neto consiste en *desplazar* una **mella,** sin una síntesis o pérdida *neta* de ácido nucleico (Figura 24.5b); de ahí el término *traslación de mella.* La mella es una interrup-

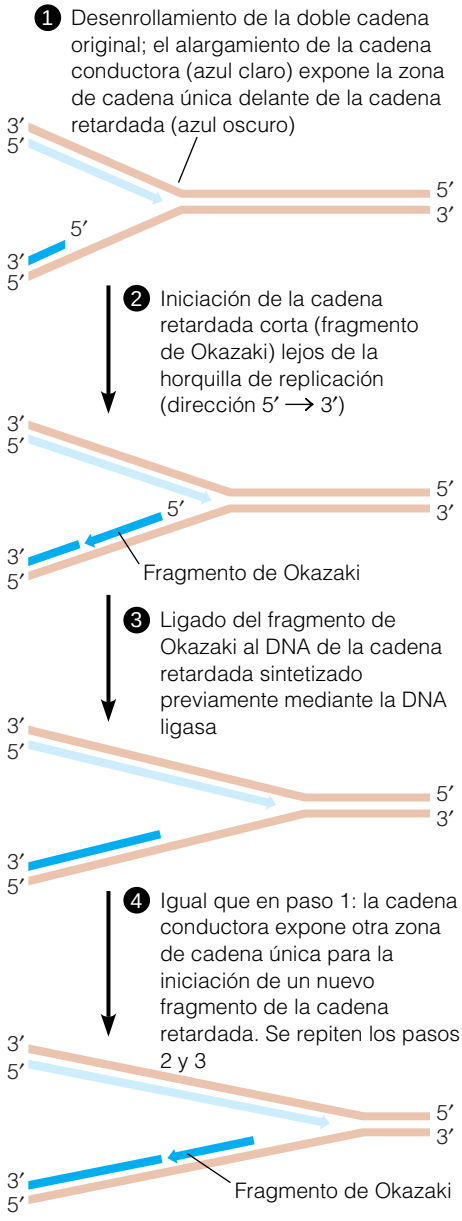


FIGURA **24.3**

Modelo de Okazaki. Mecanismo mediante el cual puede sintetizarse la cadena retardada de la doble hélice en fragmentos discontinuos.

La síntesis de cada fragmento de Okazaki de la cadena retardada se inicia con la síntesis de un corto RNA cebador, que se extiende luego por la DNA polimerasa.

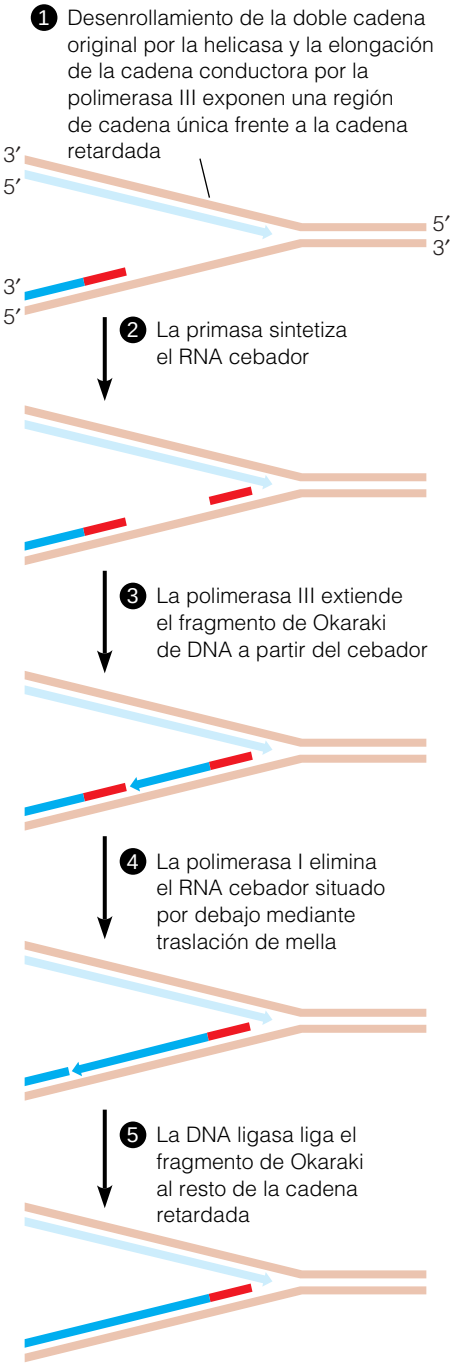


FIGURA **24.4**

Características de la síntesis de la cadena retardada. Se utiliza un RNA cebador (rojo) para iniciar la síntesis de cada fragmento de Okazaki (azul oscuro); las enzimas DNA polimerasa I y DNA ligasa eliminan posteriormente estos cebadores y unen los fragmentos de Okazaki al resto de la cadena retardada. Cada punta de flecha sobre una cadena de ácido nucleico indica la localización de un grupo hidroxilo 3′ que puede sufrir una extensión de la cadena catalizada por la polimerasa. La horquilla se desplaza hacia la derecha.

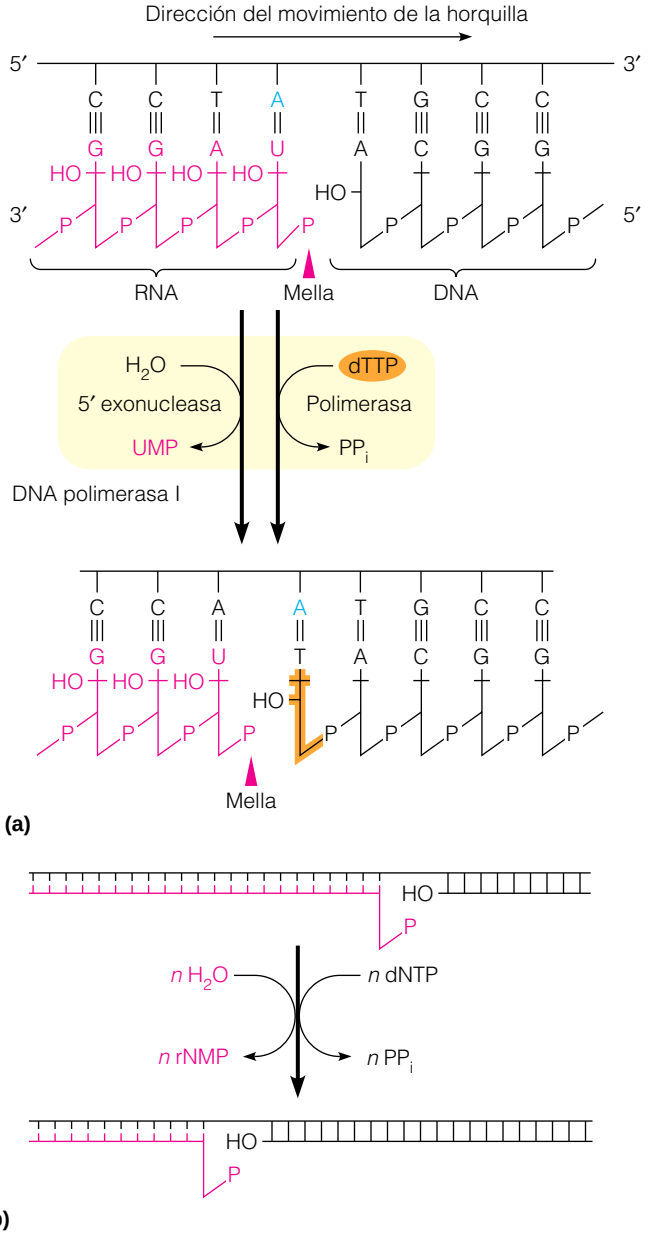


FIGURA **24.5**

Traslación de mella. Las actividades polimerasa y 5′ exonucleasa de la DNA polimerasa I están coordinadas para la sustitución del RNA cebador por DNA mediante el proceso de traslación de mella. **(a)** Movimiento de la mella en una posición hacia la izquierda, cuando un residuo UMP del RNA se sustituye por un residuo dTMP del DNA. **(b)** Fundamento del término *traslación de mella*: la mella se desplaza hacia la izquierda *n* nucleótidos, sin que se modifique el número total de nucleótidos polimerizados. rNMP = ribonucleósido monofosfato.

ción de cadena única en un DNA dúplex, en el que no falta ningún nucleótido. Una mella es diferente de un **hueco,** que es una interrupción semejante en la que se han perdido uno o varios nucleótidos.

Una vez eliminados todos los ribonucleótidos, la DNA polimerasa llega a una estructura que no puede cerrar, es decir, una mella. La mella creada en la replicación del DNA tiene un extremo 3′ hidroxilo y un extremo 5′ fosfato. La **DNA ligasa** cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre estos extremos; describimos la acción de esta enzima en la página 1010.

La primasa se asocia con otras proteínas en la horquilla de replicación, como se indica en la Figura 24.6. Al menos dos de estas otras proteínas son **helicasas,** es decir, enzimas que catalizan el desenrollamiento de los ácidos nucleicos de doble cadena. Cada cadena del DNA original tiene su propia helicasa; la que se asocia con la cadena retardada forma complejos con la primasa como parte de una unidad denominada **primosoma.** El desenrollamiento catalizado por la helicasa de las cadenas del DNA original requiere la hidrólisis simultánea de ATP, que proporciona la energía necesaria para abrir la doble cadena de DNA estable. El proceso de desenrollamiento deja al descubierto el DNA original de una sola cadena. Si este DNA no se estabilizara de alguna forma, podría producirse un apareamiento de bases dentro de la cadena entre secuencias de bases complementarias de la misma cadena. Sin embargo, estas bases deben permanecer en una conformación de cadena única, de forma que puedan aparearse con los nucleótidos que llegan y que formarán las cadenas hijas. La **proteína de unión al DNA de cadena única (SSB),** también denominada **proteína desestabilizadora de la hélice,** se une al DNA para estabilizar una estructura en la que las superficies de enlaces de hidrógeno de las bases del DNA tienen una orientación espacial dirigida hacia los nucleótidos que llegan.

En la Figura 24.6 también se muestra una proteína circular unida a cada molécula de DNA polimerasa: es la **abrazadera deslizante,** que asegura que la polimerasa permanece unida a su DNA molde, rodeando al DNA. No se muestra un dispositivo multiproteico, el **cargador de la abrazadera** que, de alguna forma, abre la abrazadera para que pueda envolverse alrededor del DNA; este dispositivo también separa la abrazadera de forma que pueda disociarse la polimerasa en el momento adecuado. Obsérvese también que la polimerasa replicativa es dimérica; las dos proteínas catalíticas están ligadas de forma física, de modo que sus acciones están coordinadas en los moldes replicativos de las cadenas conductora y retardada.

El DNA original está forzado topológicamente, ya sea por la naturaleza circular del cromosoma, como ocurre en la mayor parte de los procariotas, ya sea por su unión a las proteínas cromosómicas como ocurre en los eucariotas. En consecuencia, la doble cadena del DNA original está sobreenrollada por encima de la horquilla como consecuencia de su desenrollamiento en la horquilla. Esta tensión de torsión debe aliviarse con algún tipo de mecanismo "giratorio", o de

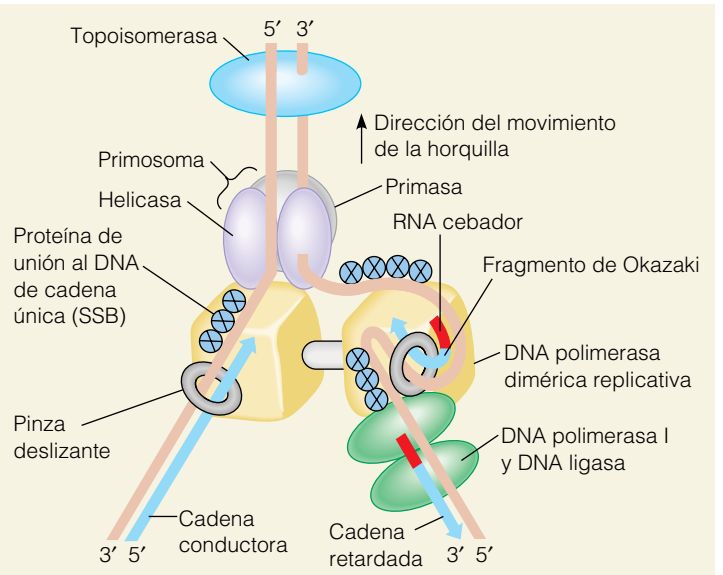


FIGURA **24.6**

Representación esquemática de una horquilla de replicación. Se incluyen las características siguientes, que no se muestran en el esquema simplificado de la Figura 24.1: (1) la topoisomerasa, que alivia el estrés de torsión creado por el desenrollamiento del DNA dúplex; (2) las helicasa y primasa como componentes diferenciados del primosoma, que desenrollan el DNA original y sintetizan los cebadores de RNA; (3) la DNA polimerasa replicativa en forma de dímero, con la elongación simultánea en las cadenas conductora y retardada; (4) una abrazadera deslizante que sujeta cada unidad polimerasa a su molde, rodeando físicamente la cadena de DNA molde; (5) la proteína de unión al DNA de cadena única, que estabiliza el DNA molde para facilitar un apareamiento de bases con los desoxirribonucleótidos que llegan; y (6) la DNA polimerasa I y la DNA ligasa, posicionadas para cortar los cebadores de RNA unidos a la cadena retardada del DNA, sustituir el RNA con DNA y pegar los fragmentos de Okazaki al DNA de peso molecular elevado. La RNasa H, una enzima que degrada RNA en los híbridos DNA-RNA, también puede participar en el corte de los RNA cebadores.

lo contrario el desenrollamiento de la cadena resultaría imposible energéticamente. Este dispositivo giratorio lo proporcionan las **topoisomerasas,** que son enzimas que modifican el número de ligazón del DNA sin modificar su estructura en otros aspectos (recuérdese del Capítulo 4 que el número de ligazón es el número de vueltas que dan las dos cadenas de un dúplex, una respecto a la otra). Las topoisomerasas alivian la tensión por encima de la horquilla rompiendo transitoriamente las cadenas de DNA, lo que permite la relajación de la estructura tensionada mediante la rotación libre de las cadenas de DNA, y permite que se vuelvan a formar los enlaces fosfodiéster en las rupturas de las cadenas.

La imagen más detallada de la horquilla de replicación de la Figura 24.6 se basa en la información que se acaba de presentar. En el instante que se representa en la figura, una subunidad de la DNA polimerasa II dimérica está elongando la cadena conductora y la otra está elongando la cadena retardada. Si las dos moléculas de polimerasa no estuvieran asociadas, la terminación de cada fragmento de Okazaki haría que se disociara la polimerasa y el retardo en la unión de una nueva polimerasa haría imposible que la cadena retardada se mantuviera con la cadena conductora. La DNA polimerasa I y la DNA ligasa están inactivas, y no se activarán hasta que el extremo 3′ del nuevo fragmento de Okazaki alcance al RNA cebador (en rojo) todavía unido al extremo 5′ del fragmento de Okazaki sintetizado previamente. En este punto, la traslación de mella de la DNA polimerasa I degradará simultáneamente el RNA cebador y extenderá el nuevo fragmento de Okazaki. Finalmente, la DNA ligasa sellará la mella. Al mismo tiempo, la acción continuada del primosoma va exponiendo más DNA de cadena única sobre el molde de la cadena retardada y sintetizando otro RNA cebador, para la síntesis del siguiente fragmento de Okazaki.

Obsérvese también que la Figura 24.6, como la mayor parte de las figuras de este capítulo, no está dibujada a escala. A la anchura de la doble hélice de DNA que se muestra en la figura, las proteínas tendrían diámetros de varios centímetros cada una si las figuras se dibujaran a escala. Una característica fascinante de la replicación del DNA es la coordinación de la función de las diversas proteínas de este complejo grande de forma que, por ejemplo, las cadenas de DNA se sintetizan a la misma velocidad a la que se desenrollan del dúplex de DNA original, la síntesis de las cadenas conductora y retardada se produce a la misma velocidad, y las secuencias molde de DNA se copian con una exactitud que no tiene paralelismo con ningún otro proceso bioquímico.

Revisión de la terminología genética

En mayor medida que en el metabolismo intermediario, nuestro conocimiento actual del metabolismo de la información procede del campo de la genética. Así pues, resulta útil revisar algunos términos genéticos clave antes de entrar con mayor detalle en el análisis de los mecanismos y el control de la replicación. La totalidad de la información genética de un organismo, el **genoma,** puede considerarse constituido por las secuencias de bases de todas las moléculas de DNA de una célula. Estas secuencias están formadas por genes individuales, cada uno en un cromosoma o en un pequeño fragmento de DNA extracromosómico. Un **mapa genético** identifica las posiciones relativas de los genes en los cromosomas. Como se comentará en el Capítulo 25, se puede generar un **mapa de ligamiento** midiendo las frecuencias de recombinación o un **mapa físico** que identifica las localizaciones físicas de los genes en un cromosoma.

Cualquier característica de un organismo que pueda detectarse en términos de aspecto, estructura u otra propiedad que pueda medirse, se denomina **feno-**

tipo. La composición genética de una persona, que especifica sus propiedades fenotípicas, es el **genotipo.** Las personas con genotipos diferentes pueden tener el mismo fenotipo. Así, por ejemplo, en el Capítulo 18, vimos que personas con mutaciones diferentes que afectan al receptor de LDL pueden tener un fenotipo común: las concentraciones elevadas de colesterol en suero que se asocian con la hipercolesterolemia familiar.

Un **alelo** es una forma determinada de un gen. Así, por ejemplo, los enfermos con fenilcetonuria tienen dos alelos defectuosos del gen de la fenilalanina hidroxilasa que codifican formas inactivas de la enzima. Un **marcador** es cualquier alelo cuya frecuencia pueda determinarse cuantitativamente. El **número de copias** indica la cantidad de copias de un determinado gen u otra secuencia de DNA por célula. La mayor parte de las células eucariotas son **diploides,** es decir, que el número de copias de la mayoría de los genes cromosómicos es dos, mientras que la mayor parte de las células procariotas tienen un genotipo **haploide,** y un número de copias para la mayoría de los genes de uno. Los genes extracromosómicos pueden tener un número de copias mucho más alto, tanto si se encuentran en el DNA de los orgánulos en las células eucariotas o en un elemento de DNA extracromosómico, como un **plásmido** bacteriano. Un plásmido es generalmente una pequeña molécula de DNA circular cuyo número de copias se controla de manera independiente de los mecanismos reguladores que afectan la replicación del DNA cromosómico.

Un individuo diploide en un medio natural tiene generalmente al menos una copia funcional o alelo de cada gen, y presenta, por tanto, un fenotipo **natural** (normal). Un gen de un organismo así puede sufrir una mutación, que genera un genotipo mutante, que puede detectarse como un fenotipo mutante. Por ejemplo, el albinismo constituye un fenotipo fácilmente observable, que se debe a mutaciones que inactivan la tirosinasa (véase el Capítulo 21). Un lugar mutante dentro de un gen puede sufrir una segunda mutación que restablezca el genotipo natural. Este tipo de mutación se denomina **reversión.** Otra posibilidad es que un fenotipo natural pueda restablecerse por una mutación en un lugar diferente; este hecho se denomina **reversión de segundo lugar** o **supresión.** La supresión puede producirse por mutación dentro del gen que sufrió la mutación original (supresión intragénica) o dentro de un gen diferente (supresión intergénica). Téngase en cuenta que muchas mutaciones son **silentes;** si una proteína mutante conserva cierta actividad biológica, es posible que no tenga un efecto fenotípico observable.

Dado que gran parte de nuestro tratamiento se centrará en la replicación en *E. coli* y sus fagos, deberá conocer algunos convenios en cuanto a la denominación de los genes y productos génicos procariotas. Revisemos estos convenios en el contexto del mapa genético de *E. coli.* El cartografiado de los genes de *E. coli* fue posible tras el descubrimiento, por Joshua Lederberg, de la reproducción sexual en las bacterias. Este proceso, denominado **conjugación,** comporta la transferencia de DNA de una célula donadora (el "macho") a una célula receptora (la "hembra"), como se esquematiza en la Figura 24.7. Son necesarios unos 100 minutos para una transferencia cromosómica completa. El cartografiado se realiza mediante experimentos de "apareamiento interrumpido". Se interrumpe mecánicamente un cultivo en conjugación a diversos intervalos, para separar las células donadoras de las receptoras. El investigador analiza entonces las células receptoras, y correlaciona la transferencia de genes marcadores del donador con el momento en el que se ha interrumpido el apareamiento. Así pues, las posiciones de los genes en el mapa se indicaron inicialmente en "minutos", que identificaban el momento en el que el marcador de interés se transfería mediante conjugación. El cartografiado a escala más fina pudo realizarse median-

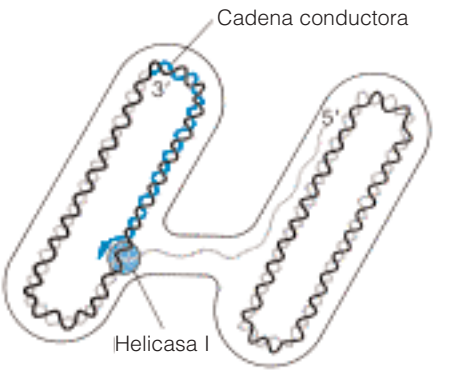


FIGURA **24.7**

Conjugación bacteriana. Después de formarse una mella en el cromosoma "macho", una helicasa desenrolla las dos cadenas. La cadena mellada (gris) se alarga (azul) en el extremo 3′, desplazando el extremo 5′ y transfiriéndolo a la célula hembra. Posteriormente, la cadena de DNA transferida puede sufrir una recombinación con el cromosoma receptor, con lo que se transfieren los marcadores genéticos a la hembra.

te transducción, un proceso que se describirá en el Capítulo 25. Con la secuencia completa del genoma de *E. coli* presentada en 1997, conocemos las localizaciones físicas de todos los genes de *E. coli*.

En la Figura 24.8 se muestra parte del mapa genético de *E. coli*, y se identifican los genes que se sabe participan, de manera directa o indirecta, en la replicación del DNA. El gran número de genes de este tipo subraya la complejidad de la replicación del DNA, y nos referiremos con frecuencia a los genes que se indican en este mapa. Nuestro objetivo aquí es describir los convenios. Cada gen tiene una designación de tres letras minúsculas en cursiva, que hacen referencia al producto génico o al fenotipo de los mutantes con un déficit de ese gen, seguidas por una letra mayúscula que indica el orden de descubrimiento del gen o del producto génico. Así, por ejemplo, *E. coli* contiene tres DNA polimerasas denominadas I, II y III. Los genes estructurales que codifican estas enzimas son *polA*, *polB* y *polC*, respectivamente. Otros genes se denominan en función del fenotipo defectuoso. Así, por ejemplo, todos los genes designados como *dna* se identificaron inicialmente como mutaciones sensibles a la temperatura (*ts*) en las que la replicación del DNA se producía normalmente cuando las células se cultivaban a 30°C pero quedaba bloqueada a 42°C. Se han identificado algunos de los productos génicos. Así, por ejemplo, el producto génico *dnaG* resultó ser la primasa. Por convenio, a los *productos* génicos, que suelen ser proteínas, se les designa con las correspondientes letras normales y la primera de ellas con mayúscula. Así, por ejemplo, DnaG es idéntico a primasa, y ambos términos hacen referencia al producto del gen *dnaG*.

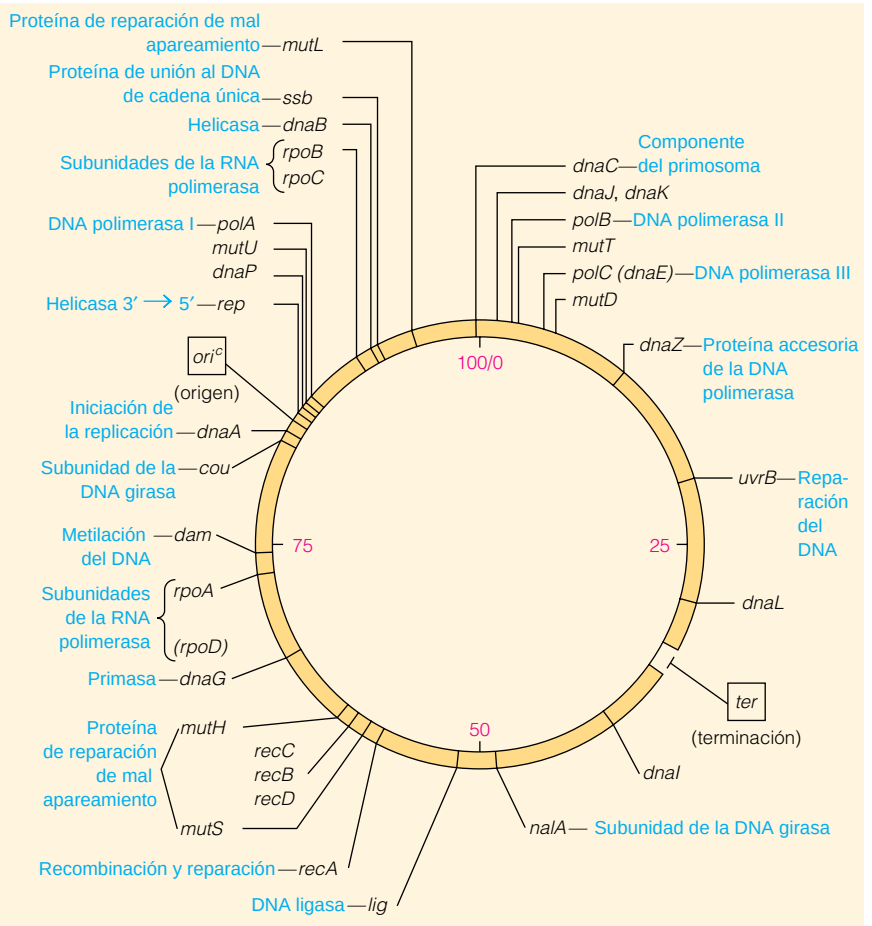


FIGURA **24.8**

Mapa genético parcial de *E. coli*. Se muestran los genes cuyos productos intervienen en la replicación o la reparación del DNA. Los nombres de los productos génicos se indican en azul. Los genes *dna* desempeñan funciones esenciales en la replicación del DNA. Los genes *mut* especifican proteínas que, cuando sufren una mutación, pueden causar unas tasas elevadas de mutación espontánea. *ori* y *ter* son lugares de iniciación y terminación de la replicación del genoma, respectivamente.

Primeros datos sobre la replicación del DNA

¿Cómo se copia a sí misma una molécula? Al igual que en la mayor parte de los procesos metabólicos, nuestros conceptos iniciales sobre el mecanismo de la replicación del DNA se basaron en gran parte en experimentos realizados in vivo en células intactas. El enfoque complementario, basado en el aislamiento de las enzimas y las proteínas que intervienen en la replicación del DNA, se inició posteriormente, con el descubrimiento de la DNA polimerasa. Iniciamos ahora la presentación detallada de la replicación con los experimentos iniciales que revelaron la naturaleza general del proceso.

NATURALEZA SEMICONSERVATIVA DE LA REPLICACIÓN DEL DNA

En 1953, cuando Watson y Crick propusieron el modelo de doble hélice de bases apareadas para la estructura del DNA, gran parte de la excitación que se produjo no se debió simplemente a la belleza estética de su modelo, sino a que el modelo explica cómo se copia a sí mismo el DNA durante la división celular. Las dos cadenas de un DNA original dúplex se desenrollan, y cada cadena sirve como molde para la síntesis de una nueva cadena que se enrolla sobre la cadena original. Como se ha indicado en el Capítulo 4, el experimento de marcado de densidad de Meselson-Stahl demostró que el DNA recién replicado es una molécula híbrida, formada por una cadena del DNA original y una cadena de material de nueva síntesis.

Recuérdese que en el experimento de Meselson-Stahl se utilizaron isótopos estables (^{13}C y ^{15}N) para producir un DNA de densidad superior a la normal. Como se comentará en el Capítulo 25, el análisis de los DNA con marcado de densidad se ha utilizado mucho para los estudios de la reparación y la recombinación del DNA, así como para la replicación. Sin embargo, los isótopos estables se utilizan poco para estos tipos de experimentos, debido en parte a que las pequeñas diferencias de densidad que pueden alcanzarse limitan la resolución de esta técnica. Lo que se suele emplear como marcador de densidad alternativo es la 5-bromodesoxiuridina que se incorpora de manera eficaz al DNA en lugar de la timidina (Capítulo 22). Este análogo proporciona un incremento de densidad mucho mayor en el DNA marcado.

NATURALEZA SECUENCIAL DE LA REPLICACIÓN

El experimento de Meselson-Stahl demostró que la replicación del DNA produce dos copias, cada una de las cuales contiene una cadena antigua y una nueva. Sin embargo, el experimento no abordó la cuestión de si el desenrollamiento de las cadenas se produce de manera simultánea a la síntesis de la cadena hija, es decir, si la replicación es *secuencial* y *ordenada*. Esto significaría que la replicación se inicia en uno o unos pocos puntos fijos en un cromosoma, con horquillas de replicación que parten de estos orígenes fijos. Cada horquilla estaría formada por dos cadenas hijas que se extenderían sobre los moldes originales de manera simultánea al desenrollamiento del dúplex original.

La naturaleza secuencial de la replicación se demostró inicialmente mediante experimentos genéticos y mediante la visualización directa de las moléculas en replicación. Los experimentos genéticos se basaron en la premisa de que un cromosoma atrapado en mitad del proceso de replicación tiene dos copias de cada gen que se ha replicado y una copia de cada gen no replicado. Así pues, en una población celular, un gen situado en un lugar próximo a un origen de replicación en un cromosoma tiene un número de copias relativamente elevado. El análisis genético puede determinar el número de copias de los marcadores en

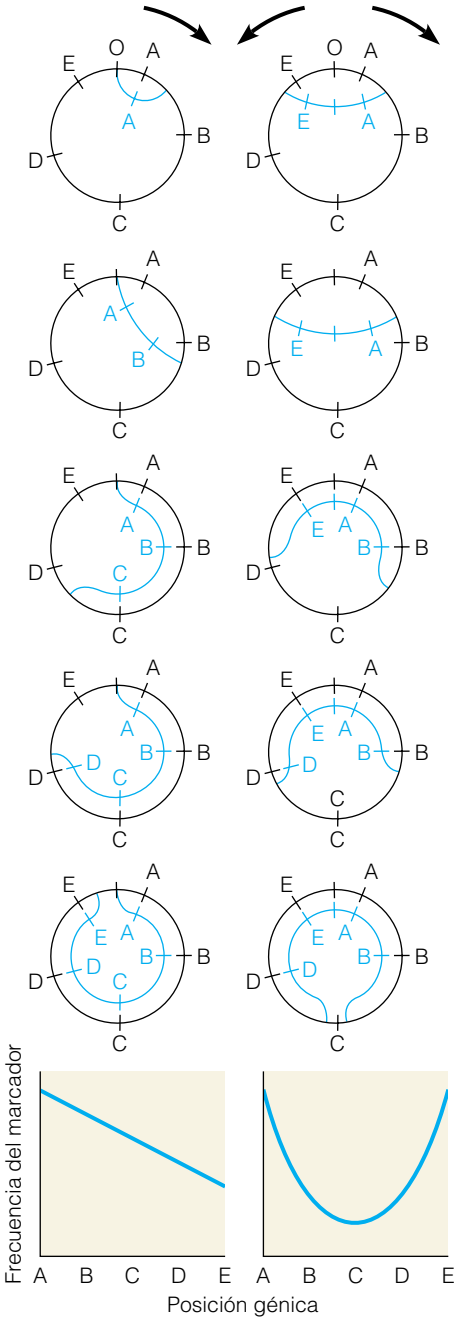


FIGURA **24.9**

Diferenciación entre la replicación bidireccional y la unidireccional mediante gradientes de marcadores de frecuencia. Cuando se deja que una población de moléculas de DNA circular portadoras de genes marcadores se replique de manera aleatoria a partir de un origen fijo, O, y se cuenta el número de copias de cada gen marcador, las curvas resultantes pueden utilizarse para diferenciar la replicación unidireccional (lado izquierdo) de la bidireccional (lado derecho).

una población de células que se están dividiendo, por ejemplo, mediante la frecuencia de transducción. Representando la frecuencia del marcador en función de la posición en el mapa genético puede establecerse, pues, la localización aproximada de un origen de replicación y puede predecirse la dirección de la misma (Figura 24.9).

Este enfoque genético se aplicó por primera vez a la replicación del DNA de *E. coli*. Los experimentos iniciales sugirieron que el cromosoma bacteriano contiene un único origen de replicación, de tal manera que la horquilla se desplaza en una dirección a partir de este origen. Se hizo una interpretación similar de la primera visualización del DNA de *E. coli* en replicación. John Cairns consiguió realizar la difícil tarea de lisar células de *E. coli* en unas condiciones en que parte de las frágiles moléculas de DNA se desenredaban a sí mismas sin romperse por las fuerzas de cizalla. Cuando hizo a estas moléculas radiactivas, mediante el cultivo previo de las bacterias en un medio que contenía [^{3}H]timidina, el DNA desenredado pudo visualizarse mediante autorradiografía. El examen de las moléculas individuales, como el que se muestra en la Figura 24.10, reveló que cada célula bacteriana contiene una molécula de DNA circular gigante, de más de 1 milímetro de circunferencia. Recuérdese del Capítulo 4 que estas moléculas deben estar plegadas y superenrolladas para caber dentro de las células bacterianas, que tienen tan sólo unos micrómetros de longitud.

ORIGEN Y DIRECCIÓN DE LA REPLICACIÓN

Algunas de las moléculas, como la que se muestra en la Figura 24.10, contenían dos puntos de ramificación y se identificaron como moléculas atrapadas en medio de un ciclo de replicación. En este experimento, el DNA se había marcado con dos generaciones de crecimiento bacteriano en un medio que contenía [^{3}H]timidina. La determinación de la **densidad de grano,** es decir, el número de puntos negros en la película por unidad de distancia, permitió a Cairns identificar las regiones del DNA que se habían replicado una o dos veces; las últimas tenían una densidad de grano el doble que las primeras. Cairns sugirió que uno de los dos puntos de ramificación constituía un origen de replicación y el otro correspondía a una horquilla de replicación, que se desplazaba en una dirección alejándose de este origen. Sin embargo, los datos eran compatibles también con el concepto de una **replicación bidireccional,** con un origen fijo y dos horquillas de replicación, cada una de las cuales se alejaría del origen hasta llegar a unirse a mitad de camino alrededor del molde circular.

A comienzos de los años 1970, fue posible aislar el DNA en replicación en una cantidad suficiente para poder realizar su análisis con mayor resolución. Estos experimentos demostraron que la mayoría de las moléculas de DNA (aunque no todas) se replican de manera bidireccional. Los primeros experimentos definitivos en este sentido se realizaron con un análisis de microscopia electrónica del DNA en replicación del bacteriófago λ (Figura 24.11). El DNA aislado de la partícula vírica es una doble hélice lineal, de 17.5 μm de longitud, con un contenido de 48 502 pares de bases. Tiene, además, otra característica interesante: cada uno de los dos extremos 5′ del DNA se extiende en 12 nucleótidos, para producir una cola corta de una sola cadena en cada extremo. Las dos colas son complementarias en su secuencia de bases, por lo que en condiciones de alineación, que impulsan la renaturalización del DNA, el DNA lineal forma espontáneamente un círculo mediante el apareamiento de bases de estas cortas colas, denominadas **extremos cohesivos.** Estas moléculas circulares pueden cerrarse de manera covalente mediante la acción de la DNA ligasa. Esta formación de un círculo se produce in vivo, como puede demostrarse mediante el aisla-

miento a partir de las células infectadas de moléculas de DNA circulares del fago, que pueden verse con el microscopio electrónico.

Cuando se aíslan moléculas de DNA λ parcialmente replicadas, se observa una población de círculos, cada uno de ellos con dos puntos de ramificación, comparables a las estructuras que observó Cairns en el DNA de *E. coli* en replicación, aunque mucho más pequeños. Los investigadores les dieron el nombre de **estructuras theta** debido a su semejanza con la letra griega θ. El análisis físico de estas estructuras mediante una técnica denominada cartografiado de desnaturalización estableció que la replicación se produce en ambas direcciones a partir de un origen fijo.

Poco después de esos experimentos, otros estudios genéticos con mayor resolución indicaron que el cromosoma de *E. coli* se replica también de manera bidireccional a partir de un único origen fijo. Esta conclusión se vio reforzada por una variación del experimento de autorradiografía de Cairns, que llevó a una conclusión sin ambigüedad. En este experimento se efectuó un marcado específico del DNA sintetizado durante la terminación de un ciclo de replicación y la iniciación del siguiente. Si la replicación es *bidireccional*, el DNA marcado durante la terminación de un ciclo y la iniciación del ciclo siguiente estaría marcado en lugares opuestos del cromosoma. En cambio, si la replicación es *unidireccional*, la terminación y la reiniciación deberán producirse en regiones adyacentes del cromosoma. El cromosoma se marcó mediante el cultivo de *E. coli* en un medio que contenía [^{3}H]timidina. En el momento en el que la replicación debía ser casi completa, se aumentó varias veces la actividad específica,

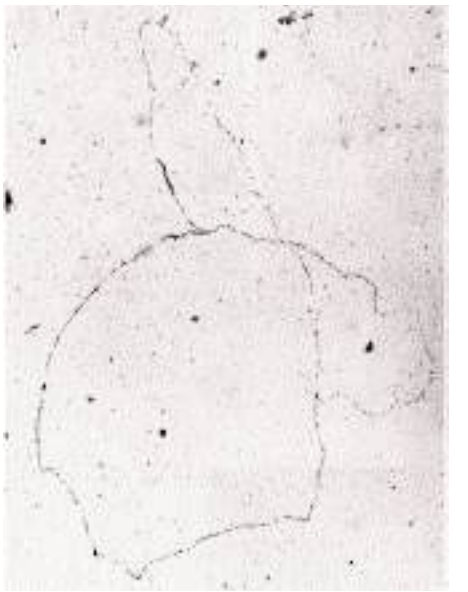


FIGURA **24.10**

Autorradiografía de un cromosoma de *E. coli* que se replica tras dos generaciones de crecimiento en [^{3}H]timidina.

Cortesía de J. Cairns, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* (1963) 28:44.

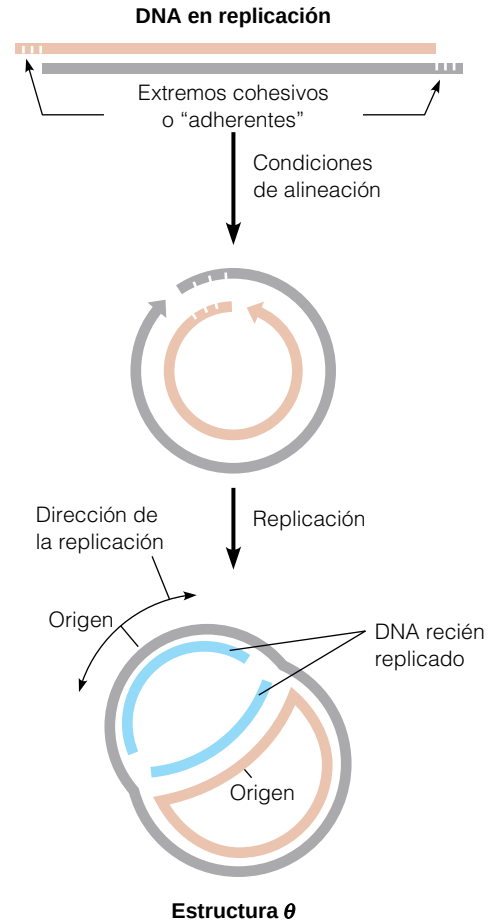
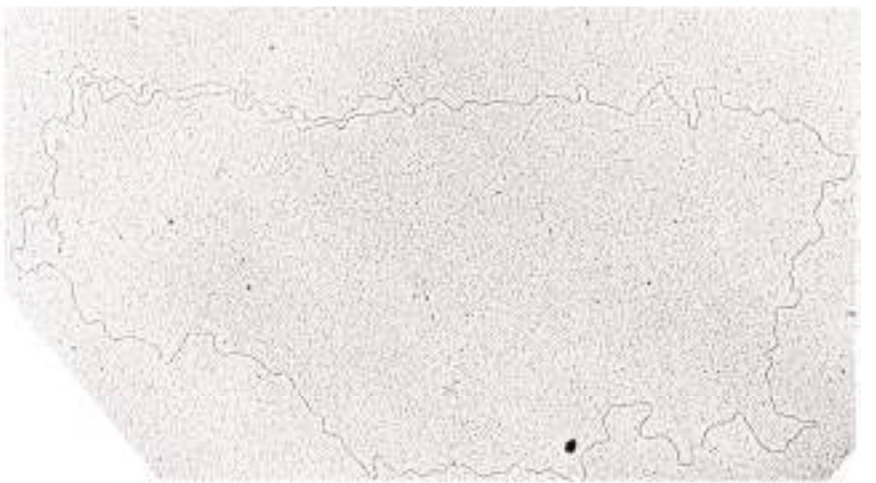


FIGURA **24.11**

Replicación bidireccional del DNA del fago lambda. (a) Mecanismo de replicación. El DNA lineal original forma una estructura circular mediante el apareamiento de bases de los extremos cohesivos. Tras el cierre covalente, puede iniciarse la replicación. Una replicación parcial produce una estructura theta característica. **(b)** Fotografía de microscopia electrónica de una estructura theta. Cuando moléculas como ésta, parcialmente replicadas, se desnaturalizaron parcialmente y se observaron en el microscopio electrónico, los datos establecieron que la replicación era bidireccional desde un origen fijo.

(b) Cortesía de M. Schnös y R. B. Inman, *J. Mol. Biol.* (1970) 51:61-73.



(b)



FIGURA **24.12**

Demostración de la replicación bidireccional mediante autorradiografía. Este cromosoma de *E. coli* se marcó mediante un cultivo prolongado en [^{3}H]timidina, y la actividad específica aumentó 4 veces cuando el cultivo sincronizado completaba un ciclo de replicación e iniciaba otro. Los diagramas muestran los patrones de marcaje que cabría prever con una replicación unidireccional, en la que la terminación (t) y el origen (o) son adyacentes, y con una replicación bidireccional, en la que están en lados opuestos del cromosoma.

Cortesía de R. L. Rodriguez, M. S. Dalbey y C. I. Davern, *J. Mol. Biol.* (1973) 74:599-604. © 1973 Academic Press.

de manera que el DNA sintetizado durante la terminación y la posterior reiniciación pudiera identificarse por su mayor densidad de grano en un autorradiograma. El experimento demostró claramente que la terminación y la reiniciación se producen en lados opuestos del cromosoma (Figura 24.12). Así pues, la replicación es bidireccional.

Los experimentos de autorradiografía con un cuidadoso control del tiempo permitieron calcular también la velocidad del movimiento de la horquilla de replicación. El número de pares de bases del DNA replicado en un período de tiempo dado se mide simplemente a partir de la longitud de un segmento marcado en μm y del número de pares de bases en 1 μm (unas 3000 si el DNA se encuentra en la forma B, con 0.34 nm por par de bases). En *E. coli* con una nutrición óptima y a 37°C, la velocidad de desplazamiento de la horquilla es de unos 850 pares de bases por segundo.

¿Significan estos experimentos que todas las moléculas de DNA son circulares, con una replicación bidireccional y un origen fijo? Para los procariotas, generalmente es así, aunque no siempre. Encontraremos ejemplos de cromosomas lineales, de replicación unidireccional y de más de un origen por cromosoma. Existen diversas variaciones sobre el tema que hemos desarrollado hasta aquí.

Los cromosomas de los procariotas suelen ser moléculas de DNA circulares, y la replicación suele producirse de manera bidireccional a partir de un origen.

UNIDADES DE REPLICACIÓN: EL REPLICÓN

Nuestro conocimiento inicial del control de la replicación del DNA llegó de los estudios sobre la replicación de **elementos genéticos extracromosómicos.** En las bacterias, estos elementos son moléculas de DNA de plásmidos circulares. Algunos plásmidos, denominados **factores sexuales,** especifican productos génicos que permiten a las bacterias aparearse unas con otras y realizar una reproducción sexual. Otros, denominados **factores bacteriocinogénicos,** proporcionan un mecanismo de defensa. Codifican proteínas denominadas **bacteriocinas,** que se liberan por la célula y que destruyen a otras bacterias. De gran importancia médica son los **factores de resistencia a los fármacos,** que son plásmidos portadores de genes que especifican resistencia a los antibióticos. Así, por ejemplo, las cepas de bacterias resistentes a la penicilina contienen a menudo un plásmido que especifica ***β*-lactamasa,** una enzima que destruye los antibióticos β-lactámicos como la penicilina (véase la página 655). Dado que los plásmidos se transfieren con facilidad de una célula a otra, las poblaciones bacterianas resistentes a los fármacos surgen con una frecuencia alarmante como resultado del empleo indiscriminado de antibióticos para combatir las enfermedades infecciosas.

Los plásmidos son pequeñas moléculas de DNA circular que se replican de manera independiente del DNA cromosómico.

La mayor parte de los plásmidos son realmente extracromosómicos, como se muestra en la Figura 24.13a. Unos pocos plásmidos, denominados **episomas,** pueden sufrir una **integración,** o inserción del DNA del plásmido en la secuencia de DNA cromosómico. Cuando sucede esto, el DNA episómico integrado deja de replicarse de manera autónoma y se replica en sincronía con el cromosoma en el que se ha insertado (Figura 24.13b). Así pues, mientras que un plásmido no integrado puede estar presente en docenas de copias por cromosoma y replicarse de manera independiente del cromosoma, el episoma inte-

grado se encuentra en una sola copia por cromosoma y sólo puede replicarse cuando éste lo hace.

Consideremos ahora la relación entre un episoma y una bacteria portadora de una mutación sensible a la temperatura (*ts*) en un gen cromosómico cuyo producto es esencial para iniciar la replicación del DNA. Tal bacteria no puede iniciar un ciclo de replicación del DNA a una temperatura moderadamente elevada (42°C). La integración de un episoma revierte el fenotipo sensible a la temperatura, permitiendo la iniciación de la replicación del DNA a temperatura más alta. Sin embargo, la replicación no se inicia en la región habitual del cromosoma sino en un lugar situado dentro del episoma (Figura 24.13c).

Estas observaciones llevaron al concepto de que la iniciación de la replicación del DNA está controlada por un pequeño grupo de elementos genéticos, consistentes en: (1) una secuencia de nucleótidos en los que se inicia la replicación (el origen), y (2) genes estructurales para las proteínas cuya acción sobre la secuencia de origen inicia la replicación en ese punto. Esta agrupación y todo el DNA que se replica bajo su control se denominan en conjunto **replicón.** El cromosoma bacteriano constituye un único replicón, puesto que toda la replicación se inicia en un origen fijo. Lo mismo ocurre en un plásmido extracromosómico. Sin embargo, cuando un plásmido se integra en forma de episoma, el cromosoma que contiene ese episoma constituye un replicón, y la replicación se inicia generalmente en el origen cromosómico.

Aunque un cromosoma es una molécula grande de DNA, un solo cromosoma no siempre constituye un solo replicón, con la replicación del cromosoma iniciada en un solo origen. El análisis autorradiográfico de la replicación del DNA de los eucariotas indica que las células de los mamíferos poseen entre 10^3 y 10^4 orígenes de replicación en el genoma completo. La replicación es bidireccional a partir de estos orígenes, y cada horquilla progresa hasta que se fusiona con la horquilla que comenzó en el inicio del replicón adyacente (véase el margen, página 1000). Dado que el genoma humano contiene 46 cromosomas, esto significa que un cromosoma característico está formado por varias docenas de replicones.

Los orígenes múltiples de replicación son importantes para la replicación del DNA de los eucariotas, ya que las células eucariotas contienen una gran cantidad de DNA que debe replicarse en un período de tiempo limitado de cada ciclo de división celular. El análisis autorradiográfico indica que las velocidades de replicación del DNA eucariota son unas 10 veces menores que las velocidades de los procariotas. A partir de los datos de la Tabla 24.1 puede calcularse que se tardarían semanas para que una célula humana replicara todo su DNA una vez, si

Un replicón está formado por todo el DNA replicado a partir de un origen, bajo el control de proteínas que actúan en ese origen.

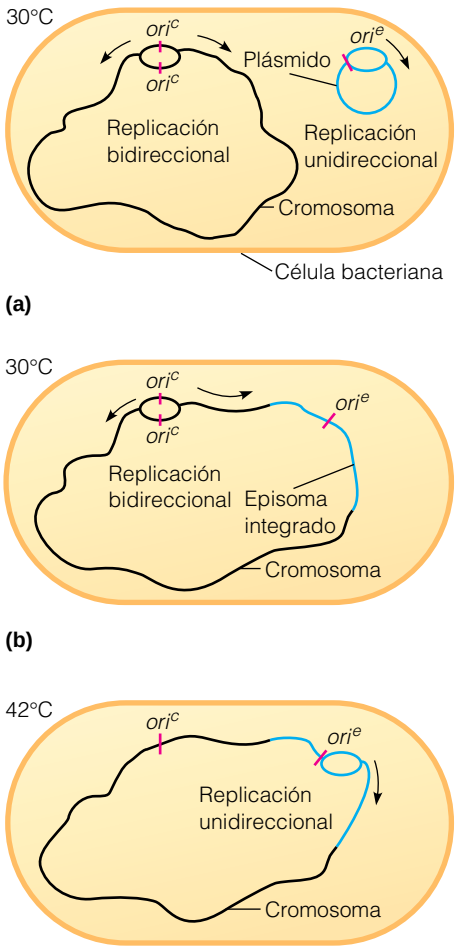


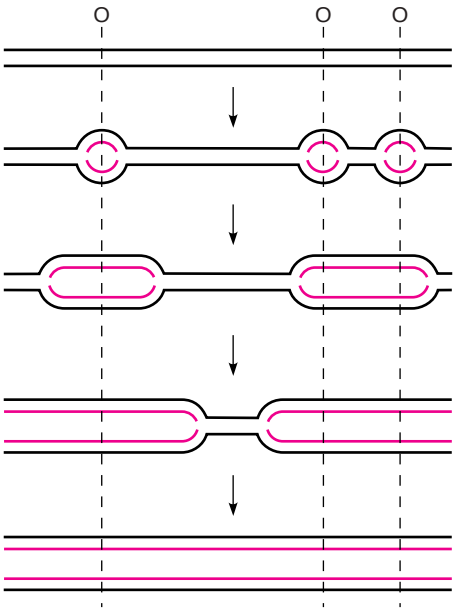
FIGURA **24.13**

Replicación impulsada por un episoma integrado. **(a)** Una célula de *E. coli* con un defecto de *ts* (sensible a la temperatura) en la iniciación de la replicación, que lleva un plásmido no integrado con un origen unidireccional (ori^e). La replicación del cromosoma se inicia bidireccionalmente a partir de ori^c. **(b)** Cuando el plásmido se integra como un episoma, se replica únicamente cuando se replica el cromosoma (bidireccionalmente a partir de ori^c). **(c)** Cuando la replicación cromosómica se inhibe por el desplazamiento a una temperatura no permisiva (42°C), la replicación de todo el cromosoma puede impulsarse a partir del origen unidireccional (ori^e) situado en el episoma integrado.

TABLA **24.1** **Parámetros cuantitativos de la replicación del DNA en distintas células**

	Proceso de replicación	
	E. coli	Ser humano
Contenido de DNA, número de pares de nucleótidos por célula	3.9×10^6	ca. 10^9
Velocidad de progresión de la horquilla de replicación, μm/minuto	30	3
Velocidad de replicación del DNA, nucleótidos/segundo por horquilla de replicación	850	60–90
Número de orígenes de replicación por célula	1	10^3–10^4
Horas necesarias para la replicación del genoma completo	0.67	8
Horas necesarias para una división celular completa	0.33	24

Nota: Los datos corresponden a una célula de *E. coli* con una nutrición óptima y cultivada a 37°C. Los valores indicados para una célula humana corresponden a datos de células HeLa, que se obtuvieron inicialmente de un tumor y se han mantenido en cultivo durante muchos años.



cada cromosoma contuviera un solo origen y dos horquillas de replicación. Tal como es, la replicación del DNA ocupa sólo una parte del ciclo de división celular, habitualmente de 6 a 8 horas en las células con ciclos de división de entre 12 y 36 horas (Capítulo 28).

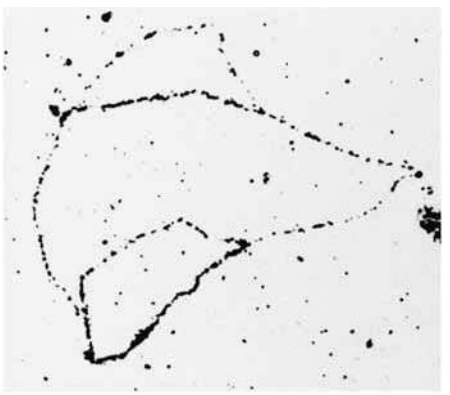
En las bacterias se produce una situación aparentemente anómala: es necesario más tiempo para la replicación del único cromosoma del que se precisa para el ciclo completo de división celular. Un cultivo bacteriano puede duplicar el número de células cada 20 minutos, pero son necesarios 40 minutos para cada ciclo de replicación cromosómica. ¿Cómo pueden dividirse las células en *menos* tiempo del que es necesario para la replicación del cromosoma? La respuesta es que, en las células que se dividen rápidamente, una molécula de DNA en replicación puede reiniciar un nuevo ciclo de replicación desde el origen antes de que se haya completado el ciclo que se está produciendo. En otras palabras, la *iniciación* de la replicación se produce con una frecuencia superior a una vez cada 40 minutos. Esto puede demostrarse mediante autorradiografía, como se muestra en la Figura 24.14. Cuando una célula se divide, cada célula hija recibe un cromosoma que ha avanzado ya considerablemente en el siguiente ciclo de replicación. Así pues, la célula se adapta al crecimiento rápido mediante un ajuste del momento del inicio de su replicación ("disparo del replicón") en una fase anterior del ciclo celular. Esto aporta una prueba clara de que la replicación del DNA se controla fundamentalmente a nivel de la iniciación de la misma.

DNA polimerasas: enzimas que catalizan la elongación de la cadena de polinucleótidos

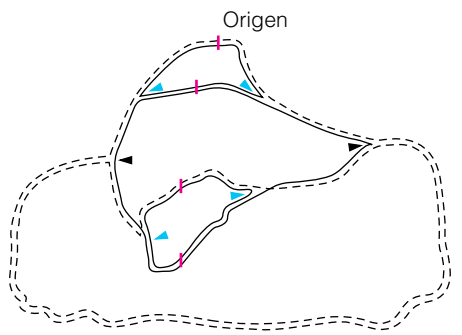
En el apartado anterior se describen las características de la replicación del DNA determinadas fundamentalmente mediante las manipulaciones experimentales de las células vivas. Al mismo tiempo que se realizaba este trabajo, los bioquímicos aislaban y caracterizaban las múltiples proteínas que intervienen en el proceso para lograr comprender en última instancia el mecanismo de la replicación. Estas proteínas y sus propiedades nos ocuparán durante gran parte del resto de este capítulo.

DESCUBRIMIENTO DE LA DNA POLIMERASA

La elucidación bioquímica de la replicación del DNA se inició a mediados de los años 1950, con el descubrimiento por Arthur Kornberg de la DNA polimerasa. Kornberg dedujo de su experiencia en bioenergética, que los sustratos para la replicación del DNA debían ser derivados activados de los residuos de nucleótidos del DNA. En consecuencia, la síntesis endergónica de enlaces fosfodiéster entre residuos de nucleótidos podía acoplarse con la degradación exergónica de sustratos activados, como ocurre en la síntesis de otras macromoléculas, como



(a)



(b)

FIGURA **24.14**

Iniciación de un nuevo ciclo de replicación antes de que se haya completado el ciclo previo. **(a)** El marcado con [^{3}H]timidina se inició cuando empezaba el primer ciclo de replicación. El patrón de densidad de grano indica que una de las ramas reiniciadas contiene dos cadenas marcadas, mientras que la otra contiene sólo una. **(b)** Las líneas continuas indican el DNA marcado radiactivamente y las líneas discontinuas corresponden a DNA sin marcar. Puntas de flecha negras = horquillas de replicación de primera generación; puntas de flecha azules = horquillas de replicación de segunda generación. El DNA sin replicar no es radiactivo, por lo que no se observa en la autorradiografía.

Fotografía cortesía de E. B. Gyurasits y R. G. Wake, *J. Mol. Biol.* (1973) 68:501-509.

el glucógeno. Kornberg predijo correctamente que estos nucleótidos activados serían los 2′-desoxirribonucleósidos 5′-trifosfato. Al incubar dNTP marcados radiactivamente con un extracto de proteínas solubles de *E. coli*, una pequeña cantidad de la radiactividad se incorporaba a sustancias de alto peso molecular que podían cuantificarse mediante precipitación ácida y contaje radiactivo del DNA. La enzima requería la adición de DNA y de Mg^{2+}. Como vimos en la Figura 24.2, son necesarias dos moléculas de DNA para la reacción: el molde y el cebador. Este último se extiende de manera covalente a partir de su grupo hidroxilo 3′. Además, la polaridad de la cadena de DNA producida (es decir, el cebador extendido) es contraria a la de la cadena molde.

Como se ha indicado en la página 989, la reacción de la DNA polimerasa comporta un ataque nucleófilo por el grupo hidroxilo 3′ del extremo del cebador, sobre el fosfato α del desoxirribonucleótido sustrato, que da lugar a la formación de un enlace covalente. El hidroxilo 3′ es un nucleófilo débil, y el pirofosfato constituye un buen grupo de salida. La reacción es fácilmente reversible. Por tanto, en las células y en los preparados brutos la reacción se desplaza hacia la derecha por la acción del pirofosfato sobre el otro producto de la reacción ($PP_i + H_2O \longrightarrow 2P_i$). Así pues, se gastan dos fosfatos de energía elevada por nucleótido incorporado.

ESTRUCTURA Y ACTIVIDADES DE LA DNA POLIMERASA I

Posteriormente se demostró que la DNA polimerasa descubierta por Kornberg era una de las tres DNA polimerasas diferentes de las células bacterianas (aunque en 1999, el número aumentó a cinco). La enzima de Kornberg se denomina actualmente DNA polimerasa I. Utilizaremos esta denominación a partir de ahora y describiremos las otras dos polimerasas más adelante en este mismo capítulo.

Sustratos de DNA para la reacción de la polimerasa

Como se ha indicado antes, la DNA polimerasa requiere un DNA molde y un cebador, bien sea DNA o RNA. In vitro, estas funciones pueden desempeñarlas o bien dos ácidos nucleicos distintos o bien una sola molécula (Figura 24.15). Como se muestra en la Figura 24.15c, un DNA de una sola cadena, con secuencias autocomplementarias, puede plegarse sobre sí mismo para formar una estructura de **horquilla** o de **lazo con tallo** cuyo extremo 3′ puede extenderse por la polimerasa, utilizando el extremo 5′ como molde. La figura muestra otras actividades polimerasa que pueden demostrarse in vitro. La enzima puede copiar alrededor de un molde de una sola cadena circular, como el DNA extraído de pequeños bacteriófagos como el ϕX174 o el M13, siempre que exista un cebador, pero no es capaz de unir los extremos (Figura 24.15a). Cuando el molde es lineal, la polimerasa copia tan sólo hacia el extremo 5′ del molde y luego se disocia (Figura 24.15b y c). De manera similar, la enzima puede llenar un hueco (Figura 24.15d), disociándose cuando el hueco se reduce a una mella. En ciertas condiciones, la enzima puede también extender desde un grupo hidroxilo 3′ en una mella. Es característico, cuando ocurre esto, que el extremo 5′ del DNA preexistente se desplace por delante de la mella. Esto se denomina síntesis con **desplazamiento de cadena** (Figura 24.15e).

Actividades múltiples en una única cadena polipeptídica

Cuando se purificó la DNA polimerasa I de *E. coli* se observó que estaba formada por una sola cadena polipeptídica (M_r = 103 000). Además de su actividad polimerasa, la enzima purificada posee dos actividades nucleasa: la **3′ exonucleasa** degrada el DNA de cadena única a partir del extremo 3′ y la **5′ exonucleasa** degrada el DNA con apareamiento de bases a partir del extremo 5′.

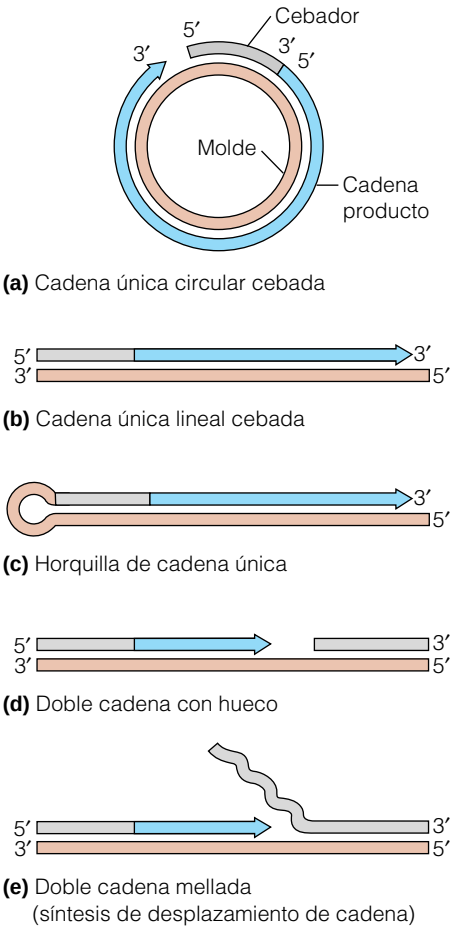


FIGURA **24.15**

DNA sustratos sobre los que puede actuar la DNA polimerasa purificada. Cada punta de flecha azul marca un extremo hidroxilo 3′ en el que se está produciendo la extensión de la cadena.

La molécula de DNA polimerasa I contiene tres lugares activos: una polimerasa y dos exonucleasas.

La 3′ exonucleasa separa los nucleótidos mal apareados del extremo 3′ en crecimiento, y mejora la exactitud de la síntesis de DNA. La 5′ exonucleasa separa ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos del extremo 5′ y actúa en la reparación del DNA y la eliminación del RNA cebador en la replicación.

Como se indicó anteriormente, la enzima rompe también el RNA de doble cadena que contenga una cadena de DNA y otra de RNA. La 3′ exonucleasa realiza una función de "corrección de pruebas" para mejorar la exactitud con la que se copia el molde de DNA. La actividad eliminará los nucleótidos con un apareamiento de bases inadecuados desde el extremo 3′ en crecimiento de una cadena polidesoxinucleotídica, proporcionando a la actividad polimerasa una segunda posibilidad de insertar el nucleótido correcto especificado por el molde. Comentamos con mayor detalle la 3′ exonucleasa más adelante, al considerar la fidelidad de la replicación del DNA.

La actividad 5′ exonucleasa desempeña dos funciones conocidas. La primera de ellas es la de la escisión de los RNA cebadores en la replicación de la cadena retardada, como se ha mostrado en las Figuras 24.4 y 24.5. En este proceso la enzima cataliza una traslación de mella, de manera que la 5′ exonucleasa elimina los ribonucleótidos en la misma medida en que la polimerasa los va sustituyendo por desoxirribonucleótidos. Otra enzima, denominada **ribonucleasa H,** puede eliminar también los RNA cebadores. La RNasa H (H indica híbrido) degrada específicamente RNA de doble cadena híbrida que contenga una cadena de DNA y otra de RNA. A diferencia de la DNA polimerasa I, la RNasa H no es capaz de sintetizar una nueva cadena de DNA para sustituir al RNA degradado, ni puede eliminar el ribonucleótido en la unión DNA-RNA. De esta forma, la DNA polimerasa I desempeña una función esencial.

En segundo lugar, la actividad 5′ exonucleasa da a la DNA polimerasa I un papel importante en la reparación del DNA. La exonucleasa puede separar desoxirribonucleótidos, al igual que ribonucleótidos, del DNA. Cuando el DNA ha sido dañado por la radiación o los productos químicos, la actividad de traslación de mella de la DNA polimerasa I puede eliminar simultáneamente los desoxirribonucleótidos dañados y sustituirlos con desoxirribonucleótidos indemnes. Comentaremos con mayor detalle esta actividad más adelante en este capítulo y en el Capítulo 25.

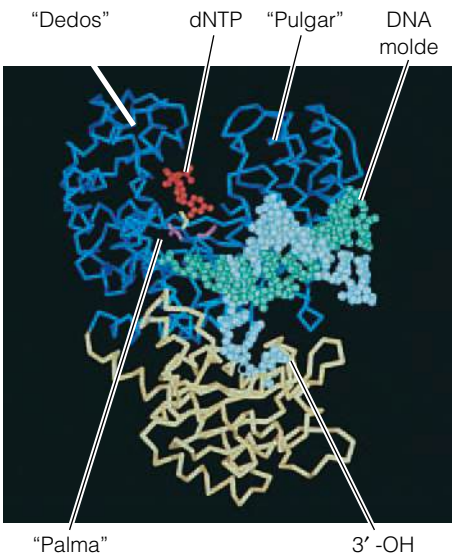


FIGURA **24.16**

Fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Representación del esqueleto de carbonos α de un fragmento de Klenow formando un complejo con el DNA, en una configuración de revisión. Esto es, el extremo 3′ de la cadena en crecimiento (azul claro) está unido al lugar activo de la 3′ exonucleasa de la enzima (amarillo). Las localizaciones de los lugares activos polimerasa y 3′ exonucleasa se han identificado mediante mutagénesis de lugar dirigida. La cadena molde se muestra en verde, y el dCTP unido se indica en rojo.

(a) Cortesía de L. Beese et al., *Science* (1993) 260:352.

Estructura de la DNA polimerasa I

Las tres actividades catalíticas de la DNA polimerasa I se han localizado en regiones de la larga cadena polipeptídica, en parte mediante proteólisis limitada de la enzima con subtilisina o tripsina. Como ha demostrado Hans Klenow, esta proteólisis rompe el polipéptido de 103 kilodalton en un fragmento N-terminal pequeño (M_r = 35 000) y un fragmento C-terminal grande (M_r = 68 000). El fragmento grande (también denominado **fragmento de Klenow**) contiene los dominios polimerasa y 3′ exonucleasa, mientras que el fragmento pequeño contiene el dominio 5′ exonucleasa. La forma en que se disponen los tres lugares catalíticos en el espacio es importante para comprender cómo actúa cada una de las dos actividades nucleasas en coordinación con la polimerasa.

El estudio cristalográfico del fragmento grande ha revelado una característica llamativa de la estructura, una hendidura profunda, lo suficientemente grande para acomodar el DNA en forma B, con un subdominio flexible que puede permitir rodear completamente al DNA unido (Figura 24.16). La molécula proteica se ha comparado con una mano, con palma, pulgar y dedos. La cristalización conjunta del fragmento de Klenow con un corto dúplex de DNA muestra que éste es realmente el lugar de unión del DNA, y que el DNA unido está casi totalmente rodeado de proteína, con sujeciones alrededor del DNA como una mano que sujeta a un cilindro. Una característica interesante de la estructura, que ha mostrado el estudio de formas mutantes de la enzima, es que el lugar activo 3′ exonucleasa está bastante lejos, alrededor de 3 nm, del lugar activo de la polimerasa. Esto sugiere que alrededor de 8 pares de bases del DNA

deben desenrollarse para mover el nucleótido 3′ terminal desde el lugar activo de la polimerasa al de la 3′ exonucleasa. En breve, indicaremos más sobre la estructura de la DNA polimerasa.

Debido a que está ausente la actividad 5′ exonucleasa en el fragmento de Klenow, esta enzima no natural es un reactivo de laboratorio útil para la síntesis in vitro de DNA cuando el investigador desea específicamente evitar la degradación del DNA.

DNA POLIMERASAS II Y III

El descubrimiento de la DNA polimerasa le valió a Arthur Kornberg la concesión del Premio Nobel en 1959. Aunque este descubrimiento tuvo una enorme trascendencia, varias propiedades de la enzima aislada de *E. coli* no correspondían a las que se esperaban para la enzima que cataliza las principales reacciones de incorporación de nucleótidos en la replicación biológica del DNA. En primer lugar, la enzima in vitro es demasiado lenta, con una $V_{máx}$ de aproximadamente 20 nucleótidos por segundo; ello contrasta con el crecimiento replicativo de la cadena in vivo, que es de aproximadamente 800 nucleótidos por segundo. En segundo lugar, con alrededor de 400 moléculas de la enzima por célula, la enzima está presente en una cantidad muy superior al pequeño número de horquillas de replicación por célula (menos de 10), lo cual sugiere que esta función, o funciones, se realiza en otro lugar. En tercer lugar, como se ha indicado antes, la DNA polimerasa puede extender las cadenas tan sólo en la dirección 5′→3′. Para comprender plenamente cómo se produce la replicación es necesario conocer cómo se replican las dos cadenas antiparalelas del DNA en la misma horquilla. En cuarto lugar, la polimerasa no es capaz de iniciar la síntesis de nuevas cadenas de DNA y sólo puede extenderlas a partir de terminaciones 3′ hidroxilo preexistentes. Por último, los datos genéticos sugerían la existencia de otras polimerasas, así como de otras enzimas y proteínas adicionales esenciales para la replicación del DNA.

En 1969, John Cairns aisló un mutante de *E. coli* que presentaba un déficit de actividad DNA polimerasa I. Con la ausencia de esta enzima tan abundante en la célula fue posible detectar otras dos actividades adicionales DNA polimerasa en células de *E. coli*. Se les dio el nombre de DNA polimerasas II y III, y a la polimerasa original de Kornberg se la llamó DNA polimerasa I. Las propiedades de estas tres DNA polimerasas se resumen en la Tabla 24.2.

TABLA 24.2 DNA polimerasas de *E. coli*

Característica	Polimerasa I	Polimerasa II	Polimerasa III
Gen estructural	*polA*	*polB*	*polC*
Peso molecular	103 000	90 000	130 000
Número de moléculas/célula	400	100	10
V_{max}, nucleótidos/segundo	16-20	2-5	250-1000
3′ exonucleasa	Sí	Sí	No[a]
5′ exonucleasa	Sí	No	No
Procesividad[b]	3-200	10 000	500 000
Fenotipo mutante	[c]UV^sMMS^s	Ninguno	dna^{ts}
Función biológica	Reparación del DNA, escisión del RNA cebador	¿Reparación del DNA SOS?	Elongación de la cadena replicativa

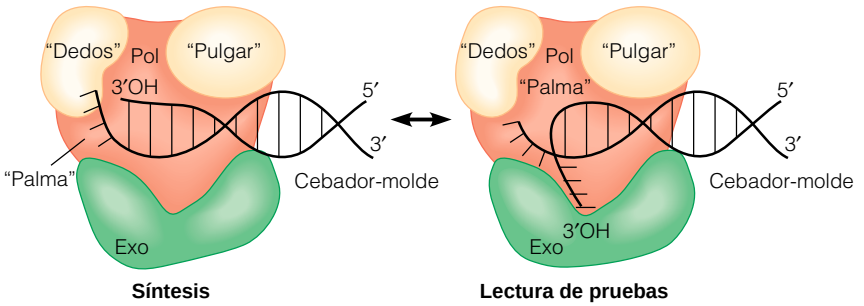
[a] La 3′ exonucleasa se encuentra en una cadena polipeptídica separada, la proteína DnaQ.
[b] Número de nucleótidos incorporados por encuentro entre la polimerasa y el DNA (véase la página 1006).
[c] El MMS (metilmetano sulfonato) es un agente de alquilación del DNA.

A la DNA polimerasa III se le atribuyó el papel principal en la incorporación de nucleótidos durante la replicación, basándose en su elevada $V_{máx}$. Obsérvese también que hay pocas moléculas de la enzima en cada célula, como es de prever si actúa únicamente en las horquillas de replicación. La prueba más importante de esta función es la existencia de células mutantes sensibles a la temperatura que contienen una forma termolábil de DNA polimerasa III, y en las que la replicación del DNA in vivo se bloquea a temperatura elevada. Estos dos fenotipos pueden atribuirse a una única mutación, lo cual constituye una prueba clara de que la polimerasa III desempeña un papel esencial en la replicación del DNA. Al gen que codifica la subunidad catalítica de la polimerasa III se le llamó *polC*.

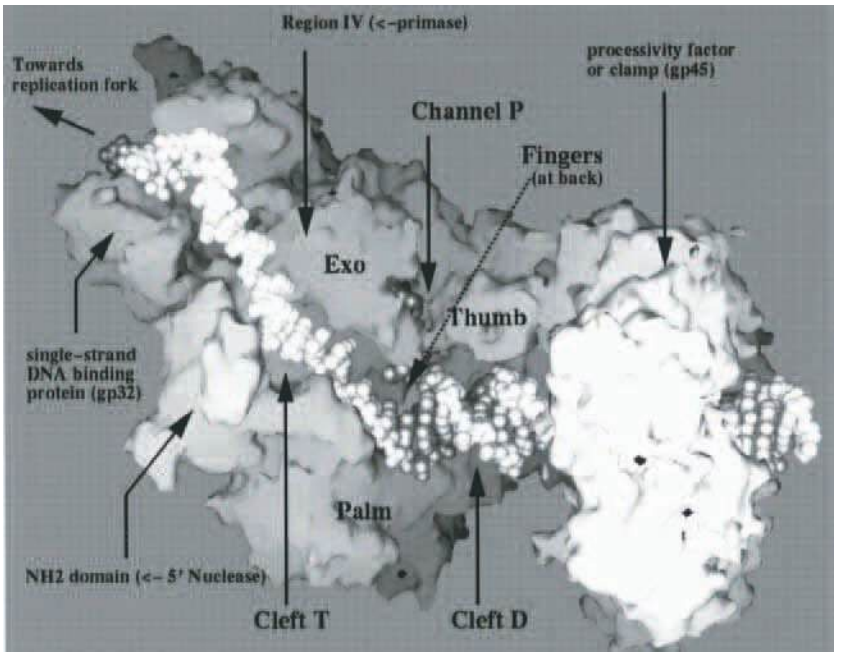
También existen mutantes de *polB*, que carecen de polimerasa II. Aunque estos mutantes no presentaban inicialmente ningún otro fenotipo, los datos recientes sugieren que la enzima interviene en una forma de síntesis reparadora del DNA (véase el Capítulo 25). Pero, ¿qué ocurre con la polimerasa I? En el mutante *polA* original descrito por Cairns, la replicación del DNA se producía normalmente. Sin embargo, las bacterias mostraban una sensibilidad anormal a la radiación ultravioleta y a los agentes alquilantes que reaccionan con el DNA, lo cual sugiere un papel de la polimerasa I en la reparación del DNA. Otros estudios realizados con el mutante de Cairns revelaron una función en la replicación. Aunque carecía de la actividad *polimerasa* de la DNA polimerasa I, la bacteria mutante elaboraba el pequeño fragmento N-terminal de la proteína que contiene la actividad 5′ exonucleasa. Más tarde se comprobó que los mutantes que carecen de esta actividad 5′ exonucleasa presentan también un defecto en la replicación del DNA. Así pues, se estableció que dos polimerasas, la I y la III, desempeñan una función esencial en la replicación del DNA.

ESTRUCTURA Y MECANISMO DE LAS DNA POLIMERASAS

Los análisis de la secuencia de muchas DNA polimerasas y el análisis cristalográfico de alrededor de media docena de ellas ha revelado relaciones estructurales que indican un origen evolutivo y un mecanismo común para esta familia de proteínas, que también comprende algunas RNA polimerasas con DNA molde y DNA polimerasas con RNA molde (transcriptasas inversas, página 1031). Todas las estructuras de las polimerasas descritas hasta ahora tienen una estructura como de una mano derecha parcialmente cerrada con dominios identificados como “palma”, “pulgar” y “dedos” que se sugiere en la Figura 24.16 y también se muestra en la Figura 24.17. La Figura 24.17 muestra la estructura de la DNA polimerasa codificada por el bacteriófago RB69, un derivado cercano del fago T4, y la primera estructura que se describió de una enzima que lleva a cabo la replicación semiconservativa del DNA. Los análisis de los complejos DNA-enzima de los residuos de aminoácidos conservados y de las mutaciones dirigidas han indicado que el lugar activo de la polimerasa se encuentra en el dominio de la palma, y el lugar 3′ exonucleasa se encuentra en la base de la palma. En 1998, se describieron estructuras a elevada resolución de dos polimerasas más (del fago T7 y de una bacteria termófila), cada una de ellas uniendo un DNA molde-cebador y un sustrato dNTP (realmente un 2′,3′-didesoxirribonucleósido trifosfato o ddNTP, que puede incorporarse pero que no puede proporcionar un extremo 3′ hidroxilo para la posterior elongación de la cadena). La estructura de la polimerasa de T7 muestra dos iones magnesio unidos a nucleótidos fosfato y a residuos de aspartato conservados que son esenciales para la catálisis. Esta estructura apoya un mecanismo general para las polimerasas propuesto por Thomas Steitz, de acuerdo con la estructura del fragmento Klenow (Figura 24.18). En este mecanismo, un ion metálico polariza el gru-



(a)



(b)

FIGURA **24.17**

Estructura de la DNA polimerasa del fago RB69. **(a)** Modelo general de las DNA polimerasas, basado en la estructura de la DNA polimerasa de RB69, que muestra los dominios dedos, palma y pulgar comunes a todas las polimerasas y el DNA molde-cebador unido en los modos de síntesis y de lectura de pruebas. **(b)** Modelo de un complejo de replicación, basado en la estructura de la DNA polimerasa de RB69 (centro, con varios dominios estructurales identificados); la estructura prevista para la proteína pinza, producto del gen 45 (a la derecha, basado en la homología con la proteína β de la holoenzima DNA polimerasa III de *E. coli*); y la proteína SSB (a la izquierda, basada en la estructura cristalina del centro de unión al DNA de T4 gp32). El complejo se mueve de derecha a izquierda, con el DNA de cadena única visible en la parte superior izquierda y el DNA dúplex visible debajo del lugar activo de la polimerasa. En la página 986 se muestra una versión en color de este modelo.

(a) Cortesía de T. A. Baker y S. P. Bell, *Cell* (1998) 92:295-305; **(b)** cortesía de J. Wang y T. A. Steitz, modificado de J. Wang et al., *Cell* (1997) 89:1087-1099. © Cell Press.

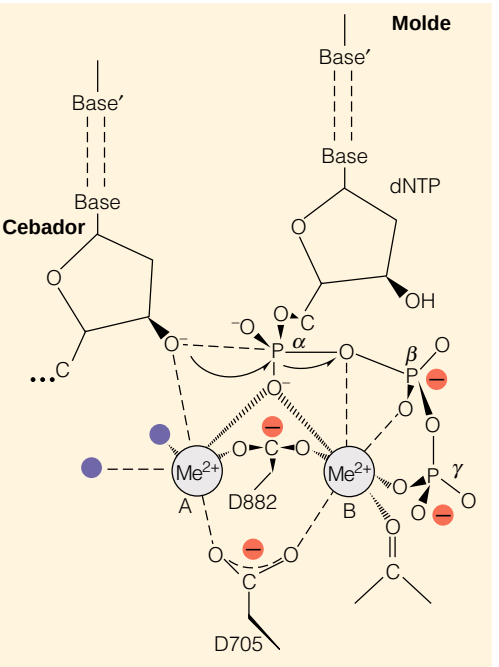


FIGURA **24.18**

Mecanismo de los dos metales de la reacción de la DNA polimerasa, según sugiere la estructura del complejo del fago T7 DNA polimerasa-sustrato. D705 y D882 son residuos conservados de aspartato, y los puntos negros son moléculas de agua unidas al ion metálico A.

Cortesía de T. A. Steitz, *Nature* (1998) 391:231-232. © 1998 Macmillan Magazines, Ltd.

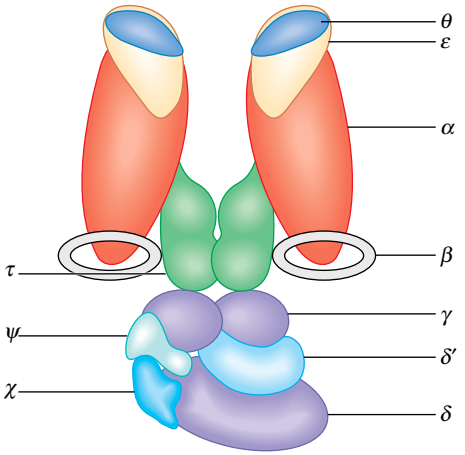


FIGURA **24.19**

Estructura de subunidades de la holoenzima DNA polimerasa III de *E. coli*. Las designaciones con letras griegas de las subunidades se identifican en el texto.

Modificado de D. R. Herendeen y T. J. Kelly, *Cell* (1996) 84:5-8.

La holoenzima DNA polimerasa III es una enzima bacteriana compleja que contiene como mínimo 10 subunidades y desempeña una función predominante en la elongación replicativa de la cadena.

po hidroxilo en el extremo 3′ del cebador, facilitando el ataque nucleófilo de ese grupo sobre el fosfato α del sustrato dNTP. Ambos metales estabilizan un estado de transición pentacovalente, en el que el fósforo α está unido a cinco oxígenos, y el segundo metal facilita la salida del pirofosfato. Ambas estructuras muestran contactos amplios entre la enzima y el surco secundario del DNA, contactos que sólo pueden producirse con un dúplex de apareamientos de bases adecuados. Asimismo, ambas estructuras muestran que el DNA cerca del extremo del cebador adopta una conformación más parecida a la forma A que a la forma B y que este cambio conformacional facilita las interacciones del surco secundario. Además, el dNTP que entra ajusta perfectamente en un bolsillo que favorece el apareamiento de bases correcto con el molde. De esta forma, estas estructuras descubren cómo se cataliza la reacción y cómo copia la enzima su DNA molde con una precisión elevada.

HOLOENZIMA DNA POLIMERASA III

El gen *polC* codifica una única cadena polipeptídica, con un M_r de aproximadamente 130 000. Esta proteína tiene una actividad polimerasa intrínseca, pero es bastante baja. Dentro de las células, la proteína PolC actúa como parte de un agregado multiproteico denominado **holoenzima DNA polimerasa III.** Como se muestra en la Figura 24.19, la holoenzima contiene diez cadenas polipeptídicas diferentes, cada una de ellas identificada con una letra griega. Las subunidades α, ε, y θ constituyen la "polimerasa central", siendo α el producto del gen *polC*, la proteína con actividad polimerasa, y ε con actividad 3′ exonucleasa comparable al dominio 3′ exonucleasa de la cadena polipeptídica DNA polimerasa I. Se desconoce la función de θ. La proteína τ dimérica dimeriza la holoenzima, manteniendo juntas las polimerasas de las cadenas conductora y retardada, de forma que se alargan en la horquilla de replicación ambas cadenas de DNA, a pesar de que la polimerasa de la cadena retardada se mueve en dirección opuesta al movimiento de la horquilla. χ cambia de los RNA cebadores al DNA.

La subunidad β se identificó al principio como una proteína esencial para la *procesividad* de la DNA polimerasa; en otras palabras, esencial para su capacidad de permanecer unida al molde durante muchos ciclos de adición del nucleótido. La polimerasa central, una vez unida al DNA molde, permanece unida sólo para alargar una cadena cebadora unos 10-20 nucleótidos. Sin embargo, β adhiere la enzima al DNA, permitiéndola incorporar varios miles de nucleótidos por episodio de unión. Decimos que β convierte a la DNA polimerasa III de una enzima muy *distributiva*, que incorpora unos pocos nucleótidos por episodio de unión, en una enzima muy *procesativa*, que permanece unida durante miles de reacciones de incorporación. Los estudios cristalográficos muestran que β es una molécula circular con una apertura de 3.5 nm, capaz de rodear completamente al DNA de doble cadena. Como se muestra en la Figura 24.20, seis dominios de hélice α (tres por subunidad) encaran el interior del círculo, con los residuos hidrófobos de estas hélices con poca atracción por el DNA. De este modo, la molécula actúa como una pinza deslizante que permite a la polimerasa deslizarse fácilmente a lo largo del DNA, pero no disociarse.

¿Cómo se enrolla a sí misma una molécula circular alrededor del DNA para comenzar la síntesis procesativa? Ésa es la función de las cinco proteínas restantes que forman el complejo γ, un ensamblaje que Mike O'Donnell ha llamado el cargador de la pinza. Este complejo contiene una copia de cada una de las proteínas δ, δ', χ y φ y dos o tres subunidades γ. Como han mostrado O'Donnell y sus colaboradores, la proteína γ es la que realmente se une a β y lleva a cabo la apertura del anillo que conduce al enganche de la pinza. Se requiere ATP, pero sorprendentemente, no debe hidrolizarse para que se abra el anillo β

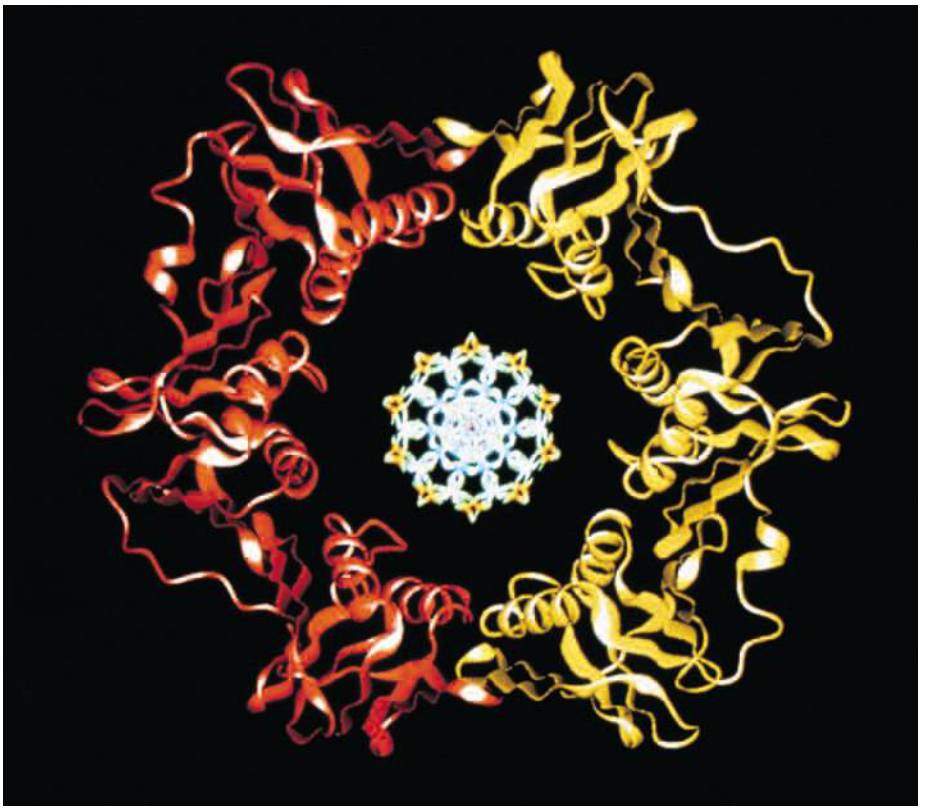


FIGURA **24.20**

Estructura de la subunidad β de la holoenzima DNA polimerasa III de *E. coli*. La proteína forma una estructura del tipo de una rosquilla que puede rodear por completo al DNA de doble cadena (modelado como se muestra en el interior) y puede mantener, por tanto, la polimerasa asociada a sus DNA molde. Las hélices α en la superficie interna de la subunidad están en contacto con el DNA pero no se unen con la fuerza suficiente como para retardar el movimiento de la proteína.

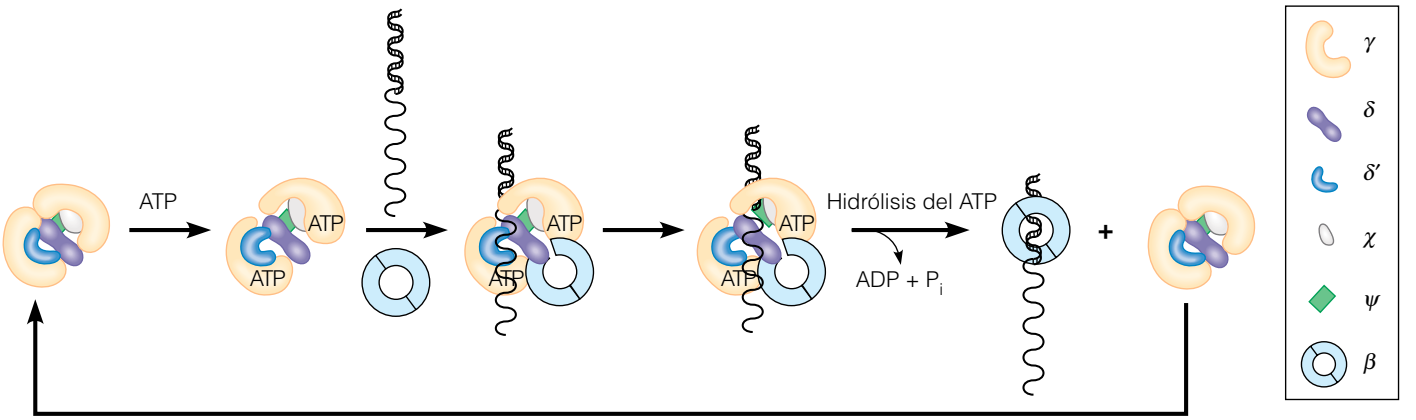
Cortesía de X-P. Kong, R. Onrust, M. O'Donnell y J. Kuriyan, *Cell* (1992) 69:425-437. © Cell Press, Inc.

o su posicionamiento alrededor del DNA. En su lugar, como se esquematiza en la Figura 24.21, un cambio conformacional impulsado por la unión del ATP hace que el complejo se una al DNA y que la proteína γ lleve a cabo la apertura del anillo. Una vez que el DNA se ha cerrado en círculo, se hidroliza el ATP unido y se cierra el anillo β. Este hecho se produce sólo una vez por turno de replicación sobre la cadena conductora. Sin embargo, en la cadena retardada, la polimerasa debe unirse de nuevo en la iniciación de la síntesis de cada fragmento de Okazaki y debe disociarse cuando se alcance el extremo 5′ de la cadena hija de DNA ya existente. De este modo, debe producirse de forma continua y rápida la carga de la pinza y el complejo γ sirve también como un cargador de pinza. Este proceso notable debe producirse todo con la unidad polimerasa central de la cadena retardada unida a su pareja de la cadena conductora en la horquilla.

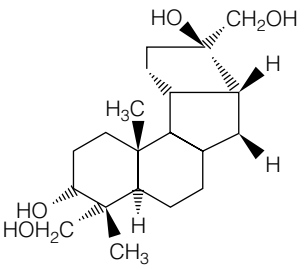
FIGURA **24.21**

Esquema de la acción del cargador de la pinza. La unión de ATP desencadena un cambio conformacional que expone δ, la subunidad que une β. Una vez que se han unido β y el DNA, γ separa las subunidades de β, de forma que pueda rodear al DNA. La hidrólisis del ATP cierra el anillo β y también pone en movimiento los acontecimientos que conducen a la disociación del complejo γ, de forma que pueda comenzar el proceso otra vez.

Cortesía de M. M. Hingorani y M. O'Donnell, *J. Biol. Chem.* (1998) 273:24550-24563. Reproducido con permiso de The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.



Las células eucariotas contienen cinco DNA polimerasas. Las polimerasas α, δ y ε participan en la replicación del DNA cromosómico, la β en la reparación del DNA, y la γ en la replicación del DNA mitocondrial.



Afidicolina

DNA POLIMERASAS EUCARIOTAS

Las células eucariotas contienen cinco DNA polimerasas diferentes, α, β, γ, δ, y ε. Las enzimas eucariotas se diferencias entre sí en gran parte por sus localizaciones intracelulares, sus propiedades cinéticas y sus respuestas a los inhibidores. A pesar de que los análisis genéticos no están tan avanzados como los de las bacterias, se han establecido algunas de las funciones biológicas de estas polimerasas. En la Tabla 24.3 se resumen las propiedades conocidas de estas enzimas. La DNA polimerasa γ está situada en las mitocondrias. Se trata de una enzima con una procesividad elevada, que tiene una alta afinidad por sus sustratos dNTP. Participa en la replicación del DNA mitocondrial y parece replicar también el DNA de algunos virus pequeños que no codifican su propia DNA polimerasa. La polimerasa β, que se encuentra en el núcleo, tiene una procesividad baja; se disocia del molde tras cada paso de incorporación del nucleótido. Esta enzima, con un pH óptimo alcalino, interviene en la reparación del DNA.

La otras tres polimerasas, α, δ, y ε, intervienen de manera esencial en la replicación del DNA. Esta función se estableció en parte mediante el empleo de un inhibidor denominado **afidicolina.** Se trata de un producto fúngico con una estructura similar a los esteroides, que inhibe la síntesis replicativa del DNA de manera específica en las células eucariotas. Las polimerasas α, δ, y ε se diferencian de las polimerasas β y γ por ser sensibles a la inhibición por la afidicolina. Algunas células eucariotas mutantes, resistentes a la afidicolina, contienen una forma de DNA polimerasa α resistente a esta sustancia y presentan una replicación del DNA resistente a la afidicolina in vivo. Ello constituye una prueba clara de que la polimerasa α participa en la replicación del DNA, puesto que un solo fenómeno de mutación modifica los efectos del inhibidor tanto sobre la enzima como sobre el proceso de replicación del DNA.

Las polimerasas α y δ contienen cuatro y dos subunidades, respectivamente, pero la estructura de subunidades de la polimerasa ε no está clara todavía. La polimerasa α se caracteriza porque una de sus subunidades tiene actividad primasa, lo cual sugiere que esta enzima es la responsable de la replicación del DNA de la cadena retardada. La polimerasa δ se caracteriza porque requiere una proteína adicional, denominada **antígeno nuclear de células en proliferación**

TABLA 24.3 Propiedades de las DNA polimerasas de los eucariotas

	α	β	γ	δ	ε
Compartimiento celular	Núcleo	Núcleo	Mitocondria	Núcleo	Núcleo
Primasa asociada	Sí	No	No	No	No
Función biológica	Replicación de cadena retardada	Reparación del DNA	Replicación del DNA mitocondrial	Replicación de la cadena conductora	Replicación
Número de subunidades	4	1	4 (idénticas)	2	?
M_r de la subunidad catalítica, kilodalton	160-185	40	125	125	210-230 or 125-140
K_M para los dNTPs, μM	2-5	10[a]	0.5	2-4	?
Procesividad (intrínseca)	Moderada	Baja	Alta	Baja	Alta
Procesividad (con PCNA)	Moderada	Baja	Alta	Alta	Alta
3′ exonucleasa	No[b]	No	Sí	Sí	Sí
Sensibilidad a 2′,3′-didesoxi-NTPs	Baja	Alta	Alta	Baja	Moderada
Sensibilidad a arabinosil-CTP	Alta	Baja	Baja	Alta	?
Sensibilidad a afidicolina	Alta	Baja	Baja	Alta	Alta

[a] Los valores de K_M para la síntesis de reparación en células permeabilizadas son muy inferiores.

[b] Una actividad 3′ exonucleasa críptica o enmascarada se asocia con la polimerasa α de *Drosophila*.

(**PCNA**), para llevar a cabo una síntesis de DNA con una procesividad alta in vitro. El PCNA desempeña un papel comparable al de la subunidad β de la DNA polimerasa III de *E. coli*, y las dos proteínas accesorias están relacionadas estructuralmente. Se ha sugerido que la polimerasa δ es la polimerasa principal de la cadena conductora. Sin embargo, el descubrimiento más reciente en hongos de la polimerasa ε, una tercera polimerasa replicativa, ha planteado dudas respecto a las funciones específicas de las polimerasas α, δ, y ε. Es decir, ¿por qué son necesarias tres polimerasas para replicar tan sólo dos cadenas de DNA? En el momento actual no lo sabemos.

Otras proteínas de la replicación

Las investigaciones sobre las DNA polimerasas pusieron de manifiesto el mecanismo químico mediante el cual se extienden las cadenas de DNA durante la replicación. Pero las propiedades de las polimerasas por sí solas no explican (1) de qué manera se inicia la replicación del DNA, (2) cómo se extienden las cadenas hijas antiparalelas en una sola horquilla de replicación, (3) cómo se desenrolla la doble hélice original para exportar los moldes de una sola cadena para que se sintetice el nuevo DNA o (4) cómo el DNA recién replicado adopta su estructura superenrollada final. Es evidente que deben actuar otras enzimas y proteínas, además de las DNA polimerasas, para que se produzca la replicación total de una molécula de DNA biológicamente completa.

La identificación de estas proteínas de la replicación adicionales en *E. coli* se ha basado en una amplia investigación sobre la replicación de pequeños bacteriófagos de DNA que poseen genomas circulares de una sola cadena (ϕX174, G4, M13 y fd). Estos pequeños virus replican su DNA en las células infectadas, fundamentalmente mediante el empleo de las enzimas codificadas por el genoma de la célula hospedadora. Dado que las moléculas de DNA del virus son pequeñas (5700 a 6400 nucleótidos), es fácil aislarlas intactas, mientras que resulta extraordinariamente difícil aislar moléculas de DNA de *E. coli* sin degradar. Así pues, podemos identificar proteínas bacterianas que desempeñan funciones esenciales en la replicación del DNA cromosómico, gracias a su capacidad para catalizar la replicación completa de estos DNA de bacteriófagos fácilmente manejables in vitro. Las rutas de la replicación de estos genomas se presentarán más adelante en este capítulo.

Otro sistema biológico indispensable ha sido el del bacteriófago T4 (Figura 24.22). Este virus contiene un genoma de DNA de doble cadena de unos 169 000 pares de bases (es decir, 169 kilopares de bases, o kbp) de longitud. Aunque es un genoma grande para un virus, su tamaño es menor del 5% del genoma de *E. coli*. El fago T4 codifica casi todas sus proteínas y enzimas de replicación. Los mutantes de T4 pueden aislarse con facilidad y cartografiarse. De hecho, el T4 fue el primer sistema biológico en el que se describieron mutantes con déficit de la replicación. Esto ocurrió por primera vez en 1965, cuando se identificó el gen 43 del mapa de T4 (Figura 24.23) como el gen estructural de una DNA polimerasa codificada por el virus. Tres años después se comprobó que el gen 32 codifica la primera proteína específica de unión al DNA de una sola cadena (SSB) conocida. En la Figura 24.23 se muestran las localizaciones en el genoma de T4 de 15 genes cuyos productos desempeñan funciones esenciales en la replicación del DNA del fago. Tres de estos productos génicos intervienen en la síntesis de la base modificada del DNA 5-hidroximetilcitosina (véase la Figura 22.23). Sin embargo, el resto participan en la replicación del genoma de T4, mediante mecanismos semejantes a los de la replicación del DNA celular.

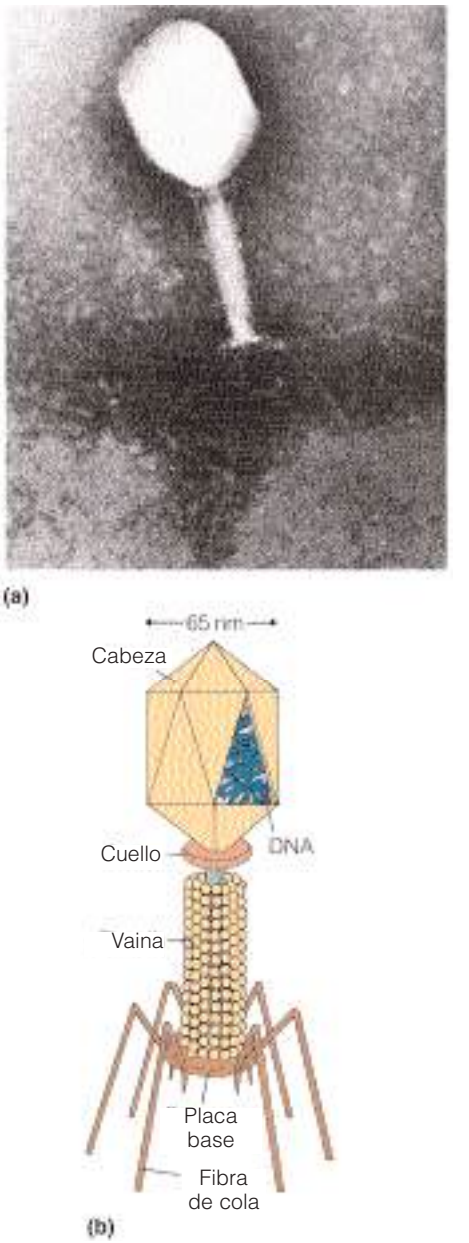


FIGURA **24.22**

Bacteriófago T4. **(a)** Fotografía de microscopia electrónica. **(b)** Representación esquemática.

(a) Cortesía de L. Simon y T. F. Anderson, *Virology* (1967) 32:290. Academic Press, Orlando.

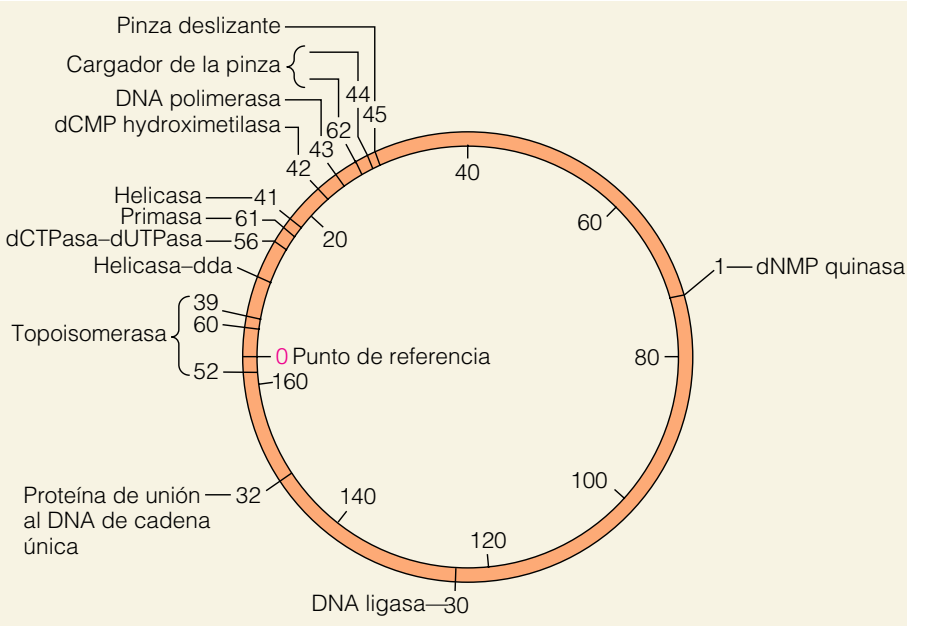


FIGURA **24.23**

Mapa parcial del genoma de T4. Se muestran los genes cuyos productos participan en el metabolismo del DNA en la parte exterior del círculo. Los números de la parte interna corresponden a distancias en kilopares de bases. El punto de referencia (0) corresponde a la separación entre dos genes determinados, *rIIA* y *rIIB* (no mostrado).

Tras esta breve descripción de los principales protagonistas (los pequeños fagos de DNA circular y el fago grande T4, así como el hospedador común, *E. coli*), pasaremos a tratar las proteínas adicionales de la replicación y sus funciones.

DNA LIGASA: REPLICACIÓN DISCONTINUA DEL DNA

El descubrimiento en 1967 de la DNA ligasa aportó la primera pista para comprender cómo podían extenderse dos cadenas de DNA de polaridad opuesta dentro de la misma horquilla de replicación. Como se esquematiza en la Figura 24.3, Reiji Okazaki propuso que la ligasa proporcionaba una vía por la cual el DNA se sintetizaba retrógradamente desde la horquilla en pequeños fragmentos que podían unirse de manera covalente al DNA de alto peso molecular. Se obtuvo un claro apoyo para este modelo con el descubrimiento de que el gen 30 del genoma de T4 codifica una DNA ligasa. Cuando se infectaba a *E. coli* con mutantes *ts* del gen 30 a 42°C, todo el DNA sintetizado estaba en forma de fragmentos cortos (para más información véase el Problema 2 al final de este capítulo). Tan sólo cuando se enfrió el cultivo a 30°C, de manera que la ligasa pudiera actuar, fue posible demostrar la conversión de estos fragmentos en un DNA de peso molecular elevado.

La DNA ligasa sella las mellas que finalizan en 3′ hidroxilo y 5′ fosfato en el DNA de doble hélice, con lo que fija los fragmentos de Okazaki a la cadena retardada de DNA de alto peso molecular.

La DNA ligasa cierra de manera covalente las mellas del DNA de doble cadena. La mella debe contener extremos 3′ hidroxilo y 5′ fosforilo, y los nucleótidos que se unen deben estar situados juntos en una estructura de doble cadena con las bases apareadas de forma adecuada. La DNA ligasa se activa por la adenililación de un residuo de lisina en el lugar activo (Figura 24.24). La enzima adenilila a su vez el fosfato 5′ terminal del DNA sustrato, con lo que lo activa para el ataque nucleófilo por el grupo 3′ hidroxilo, con formación de un enlace fosfodiéster y desplazamiento del AMP. La enzima del fago T4 utiliza el ATP para adenililar la enzima, igual que hacen las DNA ligasas de los eucariotas. Sin embargo, la enzima de *E. coli* y de otras bacterias utiliza en su lugar NAD^+. En vez de actuar como un cofactor redox, el dinucleótido en esta enzima se fragmenta, para dar la enzima adenililada y el mononucleótido de nicotinamida (NMN).

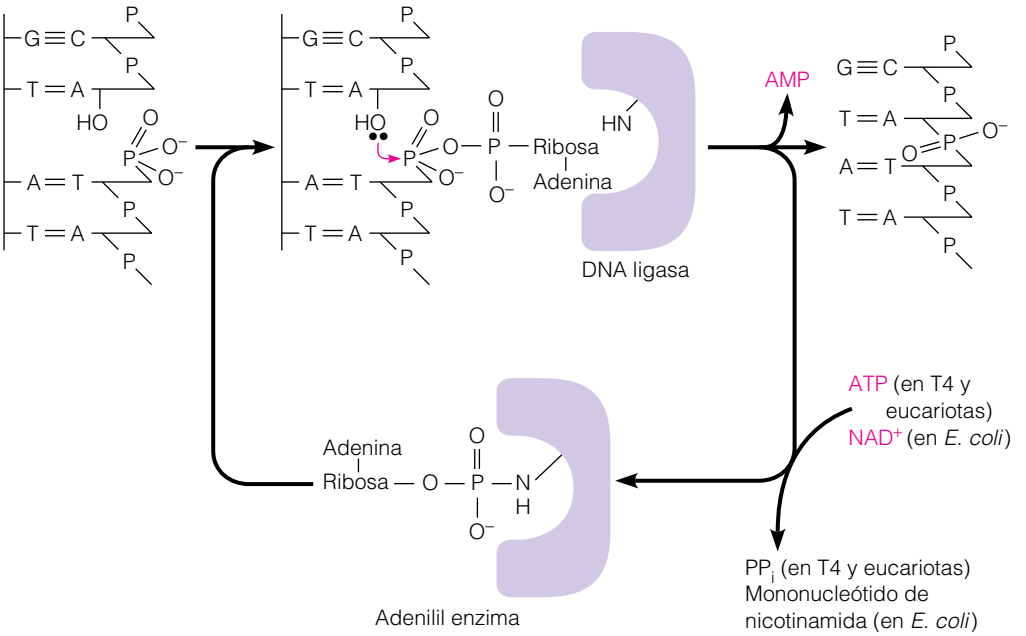


FIGURA **24.24**
Reacción catalizada por la DNA ligasa.

PRIMASA: SÍNTESIS DE LAS SECUENCIAS LÍDERES DE RNA

El descubrimiento de la replicación discontinua del DNA respondió a una pregunta, pero centró la atención en otra. Teniendo en cuenta que las DNA polimerasas no pueden iniciar la síntesis de nuevas cadenas de DNA, sino tan sólo extender las cadenas a partir de terminaciones 3′ hidroxilo preexistentes, ¿qué proporcionan esas terminaciones para la iniciación de la replicación cromosómica y la iniciación de cada fragmento de Okazaki? Cuando se descubrió que la replicación del DNA del fago M13 era sensible a un inhibidor de la síntesis de RNA, y que la DNA polimerasa podía extender la síntesis a partir de terminaciones 3′ hidroxilo de un RNA con bases apareadas al DNA, se hizo evidente que los oligorribonucleótidos podrían proporcionar cebadores para la replicación biológica del DNA.

Los primeros datos sobre la acción del RNA como cebador en la replicación del DNA se obtuvieron en un importante experimento llevado a cabo por Reiji y Tuneko Okazaki. Se utilizaron células de *E. coli*, que se hicieron permeables a los nucleótidos exógenos mediante un tratamiento breve con un amortiguador que contenía tolueno. Se producía la síntesis de DNA cuando estas bacterias tratadas se incubaban con una mezcla de α-[^{32}P]dNTP y ribonucleósidos trifosfato no marcados (Figura 24.25). A continuación, se aislaba el DNA y se trataba con álcalis débiles para hidrolizar todo el RNA. En este momento, si la síntesis de DNA se inicia a partir de terminaciones 3′ del RNA, para cada fragmento de Okazaki deberá existir una unión RNA-DNA, o un residuo desoxirribonucleótido unido de manera covalente a través de un grupo fosfato radiactivo a un residuo ribonucleótido. La hidrólisis alcalina *transferiría* entonces ese fosfato desde la posición 5′ del desoxirribonucleótido sustrato original a la posición 3′ del ribonucleótido en la unión. Ciertamente, para cada fragmento de Okazaki formado en este sistema, se transfería un fosfato marcado radiactivamente a un ribonucleótido.

La enzima que sintetiza los RNA cebadores se denomina primasa. En *E. coli*, esta enzima es el producto del gen *dnaG*, mientras que la reacción equivalente en el fago T4 la realiza el producto del gen 61. En ambos casos, la enzima es activa únicamente en presencia de otras proteínas (incluyendo una helicasa),

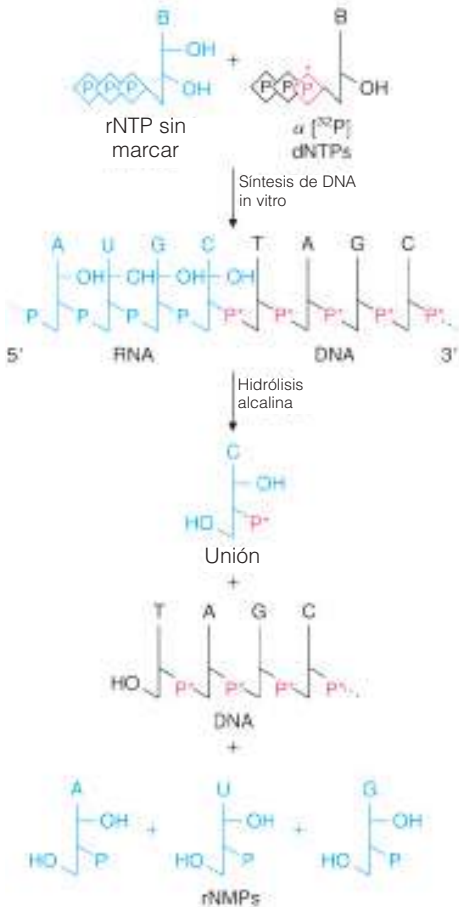


FIGURA **24.25**

Experimento de transferencia que demostró la existencia de RNA cebadores en la replicación del DNA. Cada fragmento de Okazaki generaba un ribonucleótido marcado radiactivamente como consecuencia de su unión RNA-DNA tras la hidrólisis alcalina.

La primasa, una clase especial de RNA polimerasa, sintetiza moléculas cortas de RNA que actúan como cebadores para la replicación de la cadena retardada del DNA.

que crean un complejo denominado primosoma (véase la Figura 24.6). Como se ha indicado en la página 991, el primosoma participa también en el desenrollamiento de las cadenas del DNA original por encima de la horquilla de replicación. El cebado comporta la inserción de un ribonucleósido 5′-trifosfato opuesto a un residuo desoxirribonucleótido en el DNA molde, seguido por las adiciones secuenciales de ribonucleótidos al extremo hidroxilo 3′, de la misma forma que ocurre con las DNA polimerasas. En algún punto, la síntesis de RNA se detiene, el primosoma se disocia y la DNA polimerasa continúa extendiéndose a partir del extremo hidroxilo 3′ del RNA cebador, pero ahora con la incorporación de desoxirribonucleótidos. La estructura del RNA cebador se ha descrito con cierto detalle. Así por ejemplo, en T4 y en *E. coli*, la replicación del DNA se produce con cebadores de una longitud de 5 y 11 nucleótidos, respectivamente, y la mayor parte de los cebadores tienen ATP como nucleótido 5′ terminal. Sin embargo, todavía no conocemos todos los factores que controlan el paso de la síntesis de RNA cebador a la síntesis de la cadena retardada del DNA. En las células eucariotas, la primasa está estrechamente asociada con la DNA polimerasa α. Ésta es una prueba contundente de que la pol α participa en la síntesis de la cadena retardada, mientras que la pol δ y/o la pol ε realizan la síntesis de la cadena conductora.

Para que los fragmentos de Okazaki se liguen a DNA de alto peso molecular, es preciso que los RNA cebadores se corten y se sustituyan por los correspondientes desoxirribonucleótidos. Como se ha indicado antes, en *E. coli*, la DNA polimerasa I interviene en este proceso, mediante su actividad de traslación de mella. La eliminación de los ribonucleótidos desde el extremo 5′ del cebador está coordinada con su sustitución por desoxirribonucleótidos (véase la Figura 24.5). En consonancia con esta idea, el mutante *polA* aislado por Cairns (véase la página 1003) muestra un deterioro de la conversión de los fragmentos de Okazaki en DNA de alto peso molecular. El hecho de que se produzca esa conversión se debe probablemente a la actividad 5′ exonucleasa que queda en este mutante, y posiblemente a la actividad RNasa H, junto con la actividad de otra polimerasa. Los mutantes *polA* carecen de 5′ exonucleasa y la polimerasa presenta un defecto en el sellado de los fragmentos, con un fenotipo letal condicional, lo cual significa que las células no pueden crecer cuando el gen mutante no se expresa.

PINZAS Y CARGADORES DE PINZA: PROCESIVIDAD

La replicación del DNA es un proceso muy eficaz. Como se ha indicado antes, *E. coli* replica la totalidad de su cromosoma en 40 minutos, con sólo dos horquillas de replicación, cada una de las cuales implica la acción de dos moléculas de DNA polimerasa III. Es evidente que resulta ventajoso para la célula completar cada ciclo de replicación, una vez iniciado. Para que se complete, la DNA polimerasa debe permanecer unida a su molde, es decir, debe actuar con procesividad. Hemos identificado ya la pinza β como la proteína accesoria de la polimerasa que se encuentra en la holoenzima de DNA polimerasa III más directamente responsable de potenciar la procesividad y el complejo γ como el cargador de la pinza (véase la Figura 24.21). En el fago T4, el producto del gen 45 (gp45), que está relacionado estructuralmente con la proteína β de *E. coli*, es la pinza deslizante para la replicación procesiva del DNA, y el cargador de la pinza comprende dos proteínas, la gp44 y la gp62, siendo la gp44 la proteína que fracciona el ATP. En las células eucariotas, una proteína con varias subunidades, denominada factor C de replicación o RF-C, es el cargador de la pinza, y la PCNA, o antígeno nuclear de proliferación celular, es la pinza deslizante. Como

se muestra en la Tabla 24.3, la adición de PCNA a la polimerasa δ in vitro aumenta mucho la procesividad de esa enzima.

PROTEÍNAS DE UNIÓN AL DNA DE CADENA ÚNICA: MANTENIMIENTO DE LA CONFORMACIÓN ÓPTIMA DEL MOLDE

Una de las primeras proteínas de la replicación que se identificó, aparte de la propia DNA polimerasa, fue una proteína de T4 denominada *proteína de unión al DNA de cadena única* (SSB) o *proteína desestabilizante de la hélice*. En una de las primeras aplicaciones de la cromatografía de afinidad, Bruce Alberts inmovilizó el DNA mediante su unión a celulosa y analizó las proteínas de T4 que eran retenidas por una columna de este material. Una proteína era el producto del gen 32, ya que la proteína aislada de un mutante *ts* del gen 32 no era capaz de unirse al DNA a una temperatura restrictiva. Dado que se sabía que los mutantes del gen 32 presentan un defecto de la reparación del DNA y la recombinación genética, así como de la replicación del DNA, era claro que la proteína desempeñaba múltiples funciones en el metabolismo del DNA.

Un análisis de la gp32 purificada demostró que ésta se une específicamente al DNA de cadena única. Además, la unión es fuertemente *cooperativa*, es decir, que la proteína tiene muchas más probabilidades de unirse al DNA adyacente a una zona ya ocupada que a un lugar aislado. En otras palabras, la unión de una molécula gp32 impulsa la unión de otras, y la proteína tiende a unirse en agrupaciones. Así pues, la gp32 fomenta la desnaturalización del DNA. Aunque no inicia la desnaturalización, su presencia reduce la temperatura de fusión del DNA hasta en 40°C.

La función de la gp32 consiste en mantener el molde en una conformación de una sola cadena extendida, con las bases púricas y pirimidínicas expuestas, de manera que puedan formarse con facilidad los apareamientos de bases con los nucleótidos que entran. Esta función es esencial para la reparación del DNA y la recombinación genética (véase el Capítulo 25), así como para la replicación. Teniendo en cuenta que los tres procesos comportan también la formación de nuevo de estructuras de doble cadena, con una cadena procedente del DNA original y otra del recién formado, tiene interés el hecho de que la gp32 facilite la renaturalización del DNA de cadena única, así como la desnaturalización de los de doble cadena.

¿Cómo es posible que una misma proteína impulse la formación de dobles cadenas y el desenrollamiento de las dobles cadenas? La respuesta parece estar en las características de diseño especiales de la molécula gp32. Obsérvese que la *gp32 no desenrolla por sí misma las cadenas de DNA*. Lo que hace es más bien estabilizar el DNA de cadena única mediante su unión *después* de que una región del DNA se haya desenrollado. La proteólisis limitada de la gp32 elimina un fragmento C-terminal. Esta modificación hace que la proteína pase a ser un desnaturalizador fuerte del DNA in vitro con un pequeño incremento de su afinidad de unión de equilibrio para el DNA. Como se sugiere en la Figura 24.26, el dominio C-terminal proporciona una "cubierta" que tapa en parte el dominio de unión al DNA de la proteína. Cuando una región corta del DNA de cadena única queda expuesta, mediante el desenrollamiento parcial y reversible de la doble cadena (al que se denomina a veces respiración), la gp32 puede unirse con la cubierta bajada, pero sólo en una zona pequeña (3 ó 4 nucleótidos). La ocupación de un lugar completo (7 a 10 nucleótidos) se inhibe de esa forma, lo que hace que la unión sea débil y no cooperativa. Si se produce un desenrollamiento continuado de la hélice, la cubierta puede levantarse, lo cual permite que se ocupe todo el lugar y se impulse la ulterior desnaturalización.

Las proteínas de unión al DNA de cadena única son esenciales en la replicación, reparación y recombinación del DNA, debido a su capacidad para facilitar la desnaturalización y renaturalización del DNA.

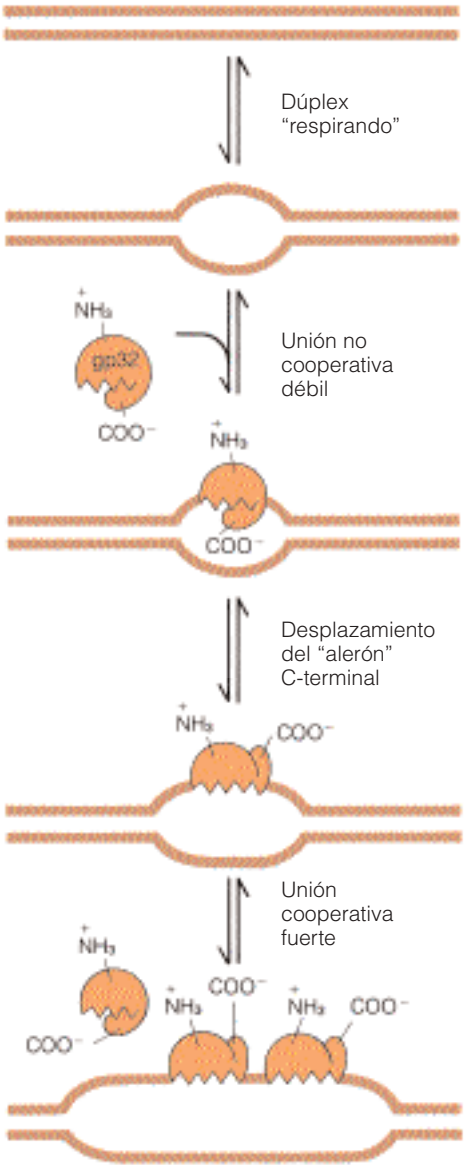


FIGURA **24.26**

Facilitación de la desnaturalización y la renaturalización del DNA por la gp32. Cuando tan sólo se expone una longitud corta de DNA de una cadena, la gp32 se une débilmente. La configuración plegada del dominio C-terminal impide la unión cooperativa de otras moléculas de gp32 y, por tanto, el desenrollamiento de la cadena ("respiración"). Si se expone una región más larga del DNA de una cadena tras la unión de la primera molécula de gp32, el dominio C-terminal puede pasar a su configuración "alta", agrandando el lugar de unión del DNA, lo que permite la unión cooperativa de otras moléculas de gp32 y, por tanto, ampliando más la región desnaturalizada. Para mayor simplicidad, la unión se muestra tan sólo en una de las dos cadenas de DNA desnaturalizadas.

La gp32 parcialmente fragmentada por proteólisis carece de la capacidad de renaturalizar el DNA in vitro y parece probable que la conformación de la gp32 nativa sea un factor determinante crucial de que la proteína actúe fundamentalmente como desnaturalizante (con la cubierta levantada), o renaturalizante, (con la cubierta bajada). La posición de la cubierta viene determinada en parte a través de la interacción con otras proteínas en la horquilla de replicación. Así pues, la proteína puede actuar para estabilizar un molde de cadena única según se van formando apareamientos con los nucleótidos que entran, y para facilitar la nueva formación de una doble cadena tras el paso de la DNA polimerasa. La proteólisis parcial puede también eliminar un dominio N-terminal, que se ha visto es esencial para la auto-asociación de la proteína y, como consecuencia, para la unión cooperativa del DNA.

Las proteínas de unión al DNA de cadena única se han encontrado en muchos organismos. La proteína de *E. coli* (especificada por el gen *ssb*) se une también cooperativamente al DNA de cadena única. Sin embargo, el mecanismo de unión parece ser muy distinto al de T4. En *E. coli*, el DNA está envuelto sobre la superficie externa de la proteína SSB tetramérica. Además, en ciertas condiciones la unión de la proteína SSB presenta una cooperatividad *negativa*. Se ha sugerido que la proteína se une de maneras diferentes, según participe en la replicación, la reparación del DNA, o la recombinación.

En las células eucariotas, una proteína heterotrimérica denominada factor A de replicación (RFA) realiza la función de SSB en la replicación del DNA. Esta proteína se fosforila durante la fase S o tras el daño del DNA, lo cual sugiere una función en la coordinación celular del metabolismo del DNA.

HELICASAS: DESENROLLAMIENTO DEL DNA POR ENCIMA DE LA HORQUILLA

Las helicasas son proteínas multiméricas que se unen preferentemente a una cadena de un DNA de doble hélice y utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para desenrollar activamente la doble cadena.

Las proteínas de unión al DNA de cadena única no desnaturalizan ellas mismas el DNA. Como se ha indicado, estabilizan el DNA de cadena única pero no pueden desenrollar de forma activa las cadenas del DNA de doble cadena. Este desenrollamiento debe producirse si los moldes de cadena única se exponen para la acción de la polimerasa. Las proteínas helicasas tienen esta capacidad. Catalizan el desenrollamiento dependiente de ATP del DNA de doble cadena. Las células de *E. coli* contienen al menos media docena de helicasas diferentes, algunas de las cuales participan en la reparación del DNA y otras en la conjugación bacteriana. La principal helicasa de la replicación del DNA es la DnaB (el producto proteico del gen *dnaB*), que interacciona con la DnaG y otras proteínas para formar el primosoma (véase la Figura 24.6). Las funciones equivalentes en la replicación de DNA de T4 las desempeñan la gp41 (helicasa) y la gp61 (primasa). En el fago T7, una única proteína (gp4) posee las dos actividades helicasa y primasa.

Todas las helicasas conocidas son proteínas multiméricas. La mayor parte de ellas son homodímeros, aunque unas pocas son homohexámeros. In vitro, cada

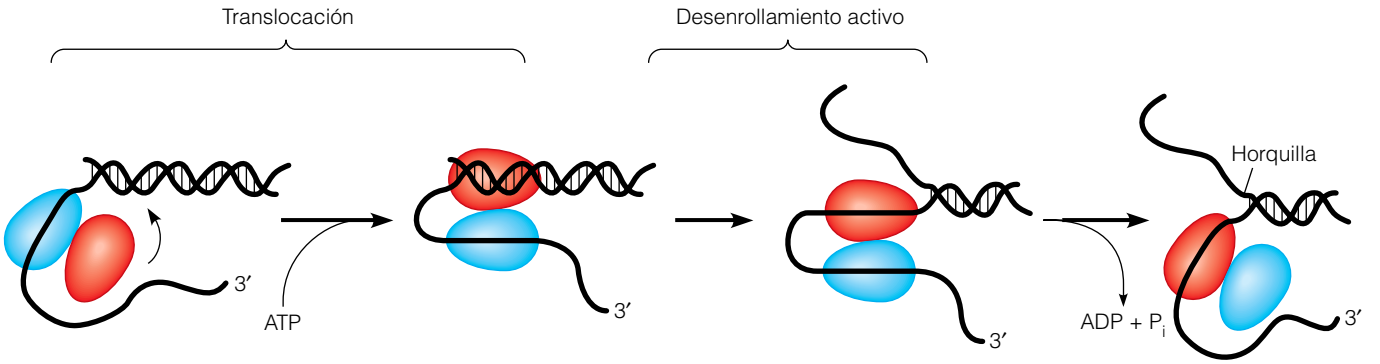


FIGURA **24.27**

Modelo de la acción de la helicasa. En este modelo, una enzima homodimérica, como la helicasa Rep de *E. coli*, muestra su polaridad 3′→5′; viaja desde el extremo 3′ al extremo 5′ del DNA al que se une. En el primer paso, la unión del ATP activa la subunidad roja para que se una al DNA en la unión doble cadena/cadena única y, en el segundo paso, para desenrollar unos cuantos pares de bases. En el tercer paso, la hidrólisis del ATP unido debilita la unión de la subunidad azul al DNA, produciendo su disociación y, de esta forma, posicionándola para comenzar el ciclo otra vez, invadiendo el DNA dúplex más allá de la horquilla que se ha creado, una vez que se ha unido otro ATP. De esta forma, alternando su unión al DNA, las dos subunidades hacen que la enzima se "enrolle" en contra de las agujas del reloj, como muestra este modelo, desenrollando el dúplex al moverse.

Cortesía de G. Waksman de S. Korolev et al., *Cell* (1997) 90:635-647. © Cell Press.

helicasa se une inicialmente a DNA de cadena única, junto a una región dúplex y actúa en una dirección fija (5′→3′ ó 3′→5′) desplazando la cadena del DNA no unida según se va moviendo, acoplado el movimiento a la hidrólisis del ATP. Aunque las helicasas son homo-oligómeros, estructuralmente son asimétricas. Por ejemplo, en la helicasa dimérica Rep de *E. coli* que se ha estudiado mucho, las propiedades de unión al ATP y al DNA de las dos subunidades son bastante diferentes, lo cual sugiere un mecanismo de rodillo o de "mano sobre mano" en el que cada subunidad se alterna en conformaciones de unión prieta y laxa, dependiendo de si está unido el ATP o el ADP en un momento dado (Figura 24.27). Con este modelo está de acuerdo la estructura cristalina de la helicasa Rep complejada con un DNA de cadena única; el ADP muestra una gran diferencia estructural entre las subunidades lo que da lugar a una rotación de 130° de un dominio sobre una región bisagra, lo cual se muestra en la Figura 24.28.

Las helicasas hexaméricas, cuyo ejemplo es el producto del gen 4 del fago T7, se mueven por un mecanismo bastante diferente. Esta proteína con forma de anillo, que utiliza dTTP en lugar de ATP como fuente de energía, se enrolla sobre la cadena única a la que se une y a lo largo de la que se mueve. La cadena que es desplazada por la acción de la helicasa no pasa a través del agujero central. Tres de las seis subunidades unen e hidrolizan dTTP, mientras que las otras tres unen dTTP de una forma no hidrolítica. Los datos sobre la unión e hidrólisis del dTTP sugieren un movimiento rotatorio de la proteína, comparable al que se observa en la ATP sintasa F_0F_1 mitocondrial (véase la Figura 15.14), lo cual sugiere la posibilidad de que la helicasa se mueva a lo largo del DNA mediante rotación.

Los hallazgos recientes de que dos enfermedades humanas hereditarias, el síndrome de Werner y el síndrome de Bloom, se producen por defectos de la he-

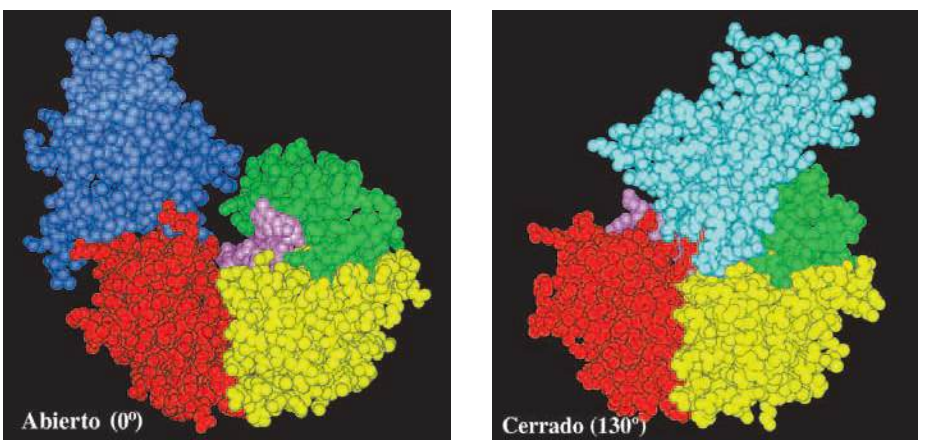


FIGURA **24.28**

Estructura de la helicasa Rep de *E. coli*. En estos modelos de relleno espacial, se muestra un monómero de la proteína dimérica, a la izquierda en la conformación "abierta" y a la derecha en la conformación "cerrada". En rojo, amarillo, verde y azul se muestran los cuatro dominios estructurales de la proteína, y en rosa se muestra el DNA unido. En la transición de abierta a cerrada, el dominio azul (izquierda) y azul-verde (derecha) gira 130° desde la izquierda a la derecha. La estructura de un complejo helicasa-ssDNA muestra uno de los monómeros abierto y otro cerrado, con el DNA unido sólo a la forma abierta, confirmando de esta forma las características esenciales del modelo que se presenta en la Figura 24.27.

Cortesía de G. Waksman de S. Korolev et al., *Cell* (1997) 90:635-647. © Cell Press.

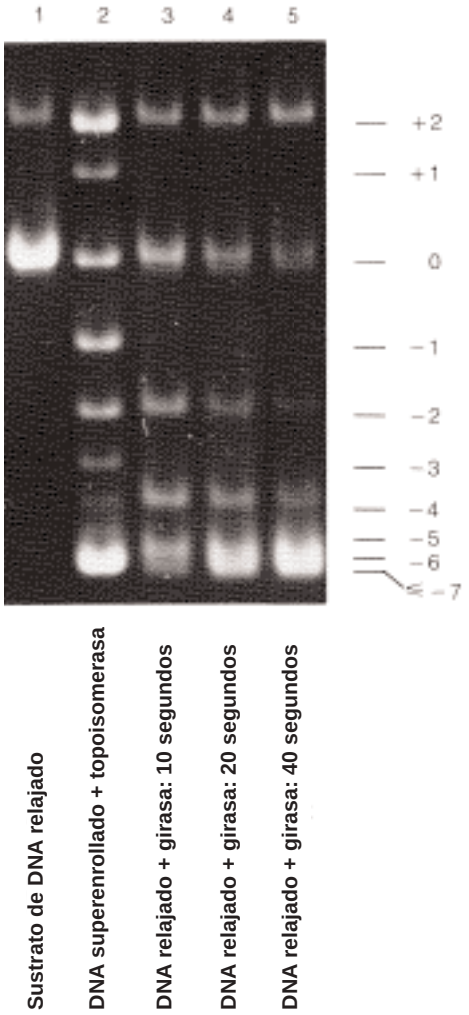


FIGURA **24.29**

Acción de las topoisomerasas de tipo I y tipo II, como se observa en la electroforesis en gel. La calle 1 muestra un DNA circular relajado. La calle 2 muestra el patrón obtenido por el tratamiento del DNA superenrollado con la topoisomerasa de tipo I. Las calles 3-5 muestran círculos relajados tratados con la DNA girasa, una topoisomerasa de tipo II, durante diversos períodos de tiempo. Obsérvese que pueden apreciarse más topoisómeros diferentes en las mezclas de reacción de topoisomerasa I, como es de prever si los cambios del número de ligazón (ΔL) se producen en unidades de 1, mientras que la girasa modifica el valor de L en unidades de 2.

Reproducido con permiso de P. O. Brown y N. R. Cozzarelli, *Science* (1979) 206:1081-1083. © 1979 AAAS.

licasa, han generado una expectación considerable. Ambas enfermedades tienen una mayor susceptibilidad al cáncer, y los pacientes con síndrome de Werner tienen también un envejecimiento prematuro, con el pelo gris a los 20 años, quedando pronto ciegos de cataratas y falleciendo de causas naturales antes de los 50 años. La clonación posicional (Capítulo 25) de los genes defectuosos responsables de estas enfermedades ha revelado, en ambos casos, que los genes codifican proteínas relacionadas con el producto del gen *recQ* de *E. coli*. En *E. coli*, la helicasa participa en una ruta de recombinación homóloga y parece intervenir en la reasunción de la replicación del DNA tras la reparación del daño del DNA inducido por la radiación. Igual que la proteína RecQ, la proteína del síndrome de Werner tiene actividad helicasa 3′→5′. Estos hallazgos proporcionan indicios interesantes para entender las relaciones entre la inestabilidad genómica y el cáncer y el envejecimiento.

TOPOISOMERASAS: ALIVIO DE LAS TENSIONES DE TORSIÓN

La replicación bidireccional del cromosoma circular de *E. coli* desenrolla unos 100 000 pares de bases por minuto. Si no hubiera algún mecanismo para aliviar esta tensión de torsión, el DNA situado por encima de la horquilla se superenrollaría a medida que el DNA de la horquilla se desenrollara, y la replicación no podría mantenerse. Las topoisomerasas, un grupo de enzimas que pueden interconvertir diferentes isómeros topológicos del DNA (véase el Capítulo 4), proporcionan un mecanismo "giratorio" para aliviar esta tensión. La acción de la topoisomerasa se pone de manifiesto de manera muy sencilla in vitro mediante la relajación del DNA superenrollado. Se puede incubar DNA superenrollado con una topoisomerasa purificada y observar, mediante electroforesis en gel, las etapas intermedias de la conversión del sustrato superenrollado en un DNA circular relajado que no contiene vueltas de superhélice (Figura 24.29). Este análisis descubre la existencia de dos clases generales de topoisomerasas: las enzimas de tipo I, que cambian el número de ligazón en unidades de 1, y las enzimas de tipo II que cambian el número de ligazón en unidades de 2.

Acciones de las topoisomerasas de tipo I y de tipo II

Una topoisomerasa de tipo I rompe una sola de las dos cadenas (Figura 24.30). La enzima se mantiene unida covalentemente al extremo 5′ de la cadena rota, formando un enlace fosfodiéster entre el fosfato 5′ y un hidroxilo de tirosina. El extremo 3′ queda libre luego para girar (una vuelta en el ejemplo que se muestra). El grupo hidroxilo del extremo 3′ ataca luego al fosfato 5′ activado unido covalentemente, cerrando la mella. De hecho, la topoisomerasa de tipo I de *E. coli* se denominó inicialmente enzima de cierre de mella. El resultado es que el número de ligazón ha cambiado en 1. La topoisomerasa I eucariota actúa de una forma similar, pero el extremo 3′ se inmoviliza durante la reacción.

En cambio, una topoisomerasa de tipo II cataliza una ruptura de la doble cadena, y la parte no rota de la misma atraviesa el hueco creado (Figura 24.31). La topoisomerasa de tipo II más estudiada es una enzima de *E. coli* denominada también **DNA girasa,** ya que no sólo relaja una molécula superenrollada sino que también introduce giros superenrollados negativos en el DNA. Es necesaria la hidrólisis de ATP para ambas actividades de la mayor parte de las enzimas de tipo II. La DNA girasa es un tetrámero, con dos subunidades A y dos subunidades B. Las subunidades A unen el DNA y lo fragmentan, mientras que las subunidades B realizan la transducción de energía procedente de la hidrólisis del ATP.

Como se muestra en la Figura 24.31, la acción de la girasa se inicia enroscándose el DNA sobre la enzima. La subunidad A rompe las dos cadenas del DNA y las inmoviliza, y ambas cadenas del dúplex pasan a través de la abertu-

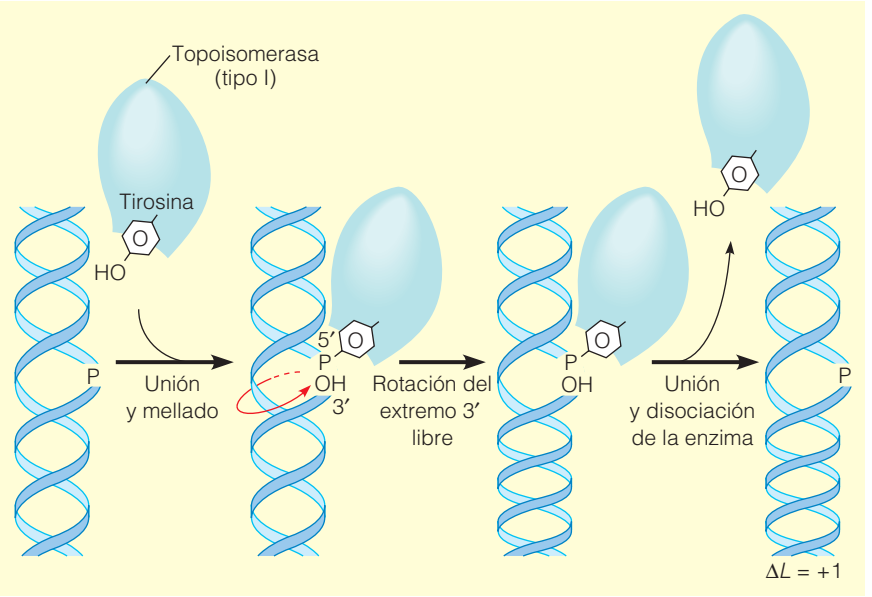


FIGURA **24.30**

Acción de una topoisomerasa de tipo I. La enzima rompe una cadena e inmoviliza el extremo 5′ mediante un enlace covalente entre el DNA fosfato y un residuo de tirosina (en la topoisomerasa I de *E. coli*). La rotación del extremo 3′ va seguida de un nuevo sellado. El número de ligazón aumenta en 1 en el ejemplo mostrado (un DNA relajado). La acción de una topoisomerasa de tipo I sobre el DNA relajado disminuiría el número de ligazón, esencialmente mediante el mismo mecanismo.

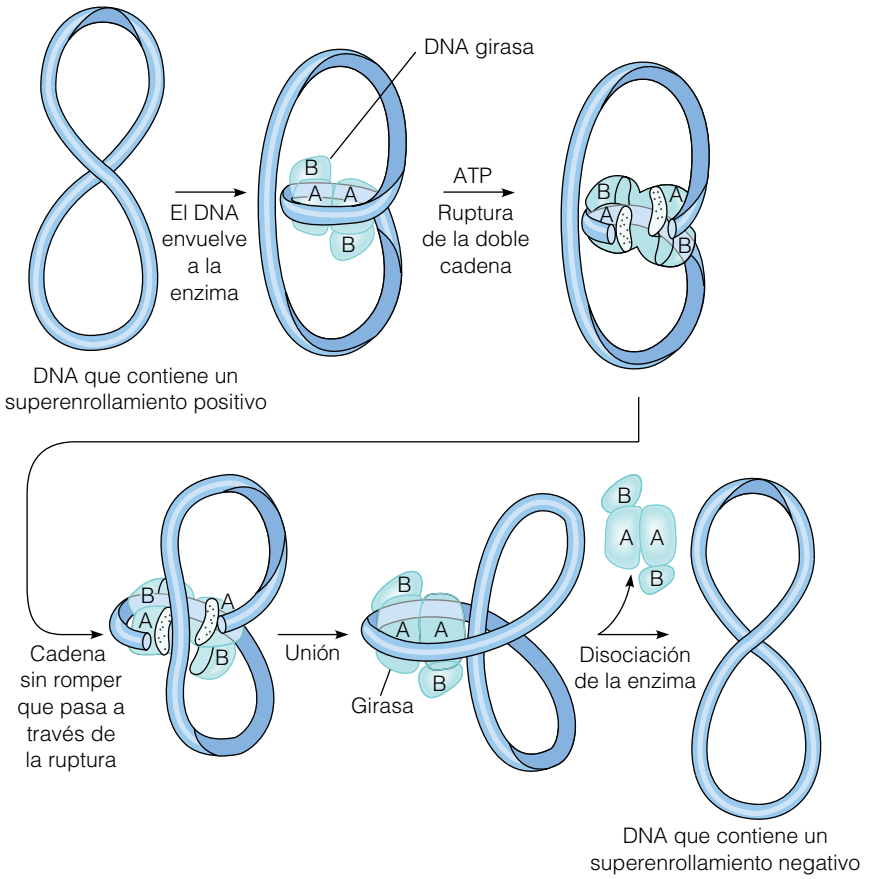


FIGURA **24.31**

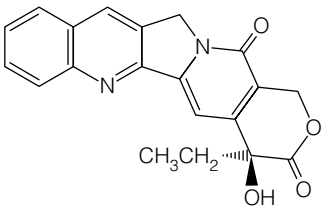
Acción de una topoisomerasa de tipo II. DNA girasa de *E. coli*; el ejemplo que se presenta es una proteína tetramérica con dos subunidades A y dos subunidades B. La enzima introduce dos vueltas negativas y cambia el número de ligazón de +1 a –1. La enzima cataliza la ruptura de una doble cadena y los dos extremos del DNA están unidos por las subunidades A, que separan los dos extremos del DNA, de forma que el dúplex sin romper puede pasar a través del hueco. El resellado convierte el supergiro positivo en negativo, con lo que el conjunto de la molécula tiene un ΔL de -2. Las topoisomerasas de tipo II pueden relajar dobles cadenas infraenrolladas mediante un mecanismo inverso del anterior.

Adaptado de A. Kornberg y T. A. Baker, *DNA Replication*, 2.ª ed. (Nueva York: W. H. Freeman and Co., 1992), p. 390. © 1992 W. H. Freeman and Co. Utilizado con permiso.

ra. A continuación, se vuelven a sellar las dos cadenas del dúplex y se disocian de la enzima. En el ejemplo que se muestra, un DNA circular con un superenrollamiento positivo se convierte en un producto con un superenrollamiento negativo. Así pues, el número de ligazón se modifica en 2, hecho este que diferencia las topoisomerasas de tipo I de las de tipo II. En la Figura 24.29, se observa que

el DNA tratado con una topoisomerasa de tipo I (calle 2) presenta el doble de intermediarios que un DNA idéntico tratado con una enzima de tipo II (calles 3-5), ya que la enzima de tipo I cambia el número de ligazón en unidades de 1.

La acción de las topoisomerasas de tipo I se ha aclarado recientemente con la publicación de la estructura cristalina de la topoisomerasa I del ser humano. Como se muestra en la Figura 24.32, la enzima se enrosca completamente alrededor de su DNA sustrato. En la figura no está claro el hecho de que la mayoría de los contactos DNA-proteína utilizan el esqueleto azúcar-fosfato del DNA y no las bases, lo cual significa que el DNA está unido como una hélice de forma B sin distorsionar. Asimismo, los contactos en el lado "hacia arriba" (5′) del enlace escindible son mucho más numerosos que los del lado "hacia abajo" (3′). Debido a que el nucleótido 5′ de la mella se inmoviliza mediante su unión a un residuo de tirosina, los datos estructurales indican que el extremo 3′ libre puede rotar con relativa libertad, como debe hacerlo si debe relajarse el DNA superenrollado. Una consecuencia útil de esta determinación estructural fue la clarificación del mecanismo de acción de los fármacos antineoplásicos que actúan inhibiendo a las topoisomerasas, ya que la estructura descubre cómo pueden unirse esos inhibidores, y esto deberá conducir al diseño de inhibidores más eficaces. Un inhibidor que se utiliza actualmente en la clínica es la **camptotecina.**



Camptotecina

Las topoisomerasas de tipo I rompen y vuelven a cerrar una cadena de DNA, y las topoisomerasas de tipo II catalizan la ruptura y nueva unión de dobles cadenas; en consecuencia, las enzimas de tipo I y de tipo II modifican el número de ligazón del DNA en unidades de 1 y 2, respectivamente.

Las cuatro topoisomerasas de *E. coli*

Desde el descubrimiento de la topoisomerasa I y la DNA girasa en los años 1970, se ha demostrado que *E. coli* contiene cuatro topoisomerasas diferentes. La terminología al respecto es algo confusa, ya que las enzimas denominadas topoisomerasa I y topoisomerasa III son ambas topoisomerasas de tipo I, y la topoisomerasa II (también denominada DNA girasa) y la topoisomerasa IV son ambas topoisomerasas de tipo II. De estas cuatro enzimas, la DNA girasa desempeña el papel dominante durante el alargamiento replicativo de la cadena, tanto para aliviar la tensión por encima de la horquilla como para introducir superenrollamientos negativos en el DNA que se ha sintetizado de nuevo. Conocemos esta función básicamente por los estudios realizados sobre las propiedades de los inhibidores de la girasa. La subunidad A de la girasa es el obje-

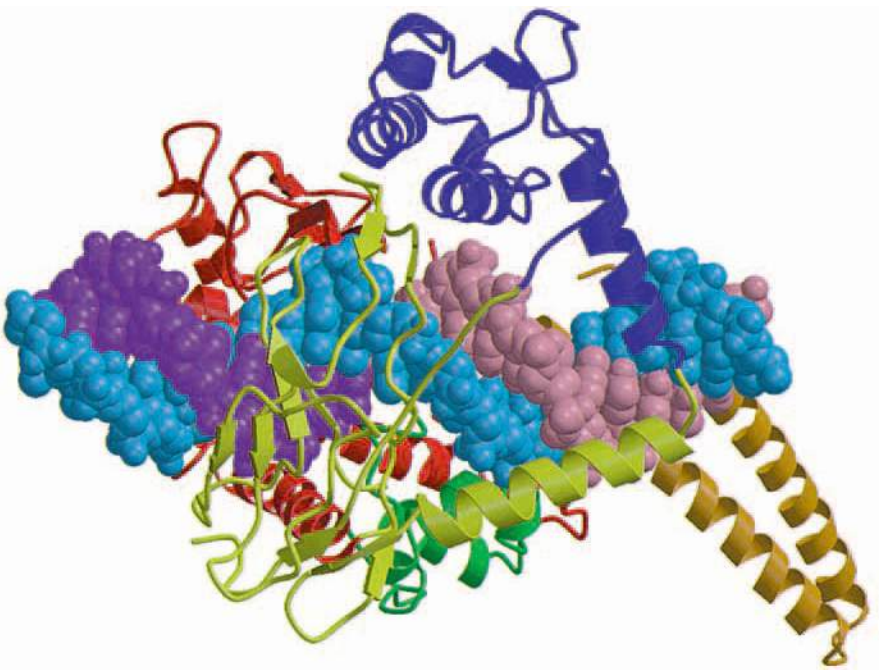


FIGURA **24.32**

Estructura cristalina de la topoisomerasa I del ser humano en un complejo con un dúplex de DNA de 22 pb. La cadena de DNA mellada por la enzima se muestra en púrpura más arriba del lugar de ruptura y en rosa más abajo, y la cadena intacta está en azul. Para la proteína, cada dominio individual aparece en un color diferente.

Cortesía de M. R. Redinbo, L. Stewart, J. J. Champoux y W. G. H. Hol de *Science* (1998) 279:1504-1534, con permiso de *Science*.

tivo de la unión del **ácido nalidíxico,** un compuesto del que se sabe desde hace tiempo que inhibe la replicación del DNA. Otro inhibidor de la replicación, la **novobiocina,** se une a la subunidad B e inhibe la ruptura del ATP. Las bacterias mutantes resistentes al ácido nalidíxico o a la novobiocina presentan alteraciones estructurales de las subunidades A o B, respectivamente. Los inhibidores como éstos son útiles como fármacos contra las bacterias.

La topoisomerasa IV desempeña un papel crucial para completar un ciclo de replicación. Las topoisomerasas de tipo II catalizan diversas interconversiones topológicas, como anudamientos y desanudamientos, la **catenación** (ligazón) y **descatenación** (desligazón) de los DNA circulares, como se muestra en la Figura 24.33. Un DNA circular que se aproxime al final de un ciclo de replicación generará dos círculos interligados, de manera que será necesaria la acción de una topoisomerasa de tipo II para separar las moléculas recién replicadas. Cuando dos horquillas se aproximan la una a la otra al término de la replicación, las barreras estéricas interferirán en última instancia las actividades de desenrollamiento de las topoisomerasas por encima de las dos horquillas (Figura 24.34). En esta fase, los dos cromosomas incompletamente replicados están aún interligados. La topoisomerasa IV desempeña un papel esencial en el proceso de descatenación mostrado en la Figura 24.34. Este hallazgo sugiere un grado de especificidad de la acción de la topoisomerasa que no se tiene de inmediato de la idea de que una conformación de DNA tirante se está relajando. De acuerdo con esta sugerencia, los estudios más recientes de las topoisomerasas de tipo II muestran que no generan mezclas de equilibrio de los topoisómeros. Por ejemplo, una topoisomerasa de tipo IV de digestión limitada (se digiere el DNA hasta que no se produce más reacción) se vio que tenía muchas menos estructuras anudadas y catenadas que una mezcla de equilibrio; de alguna manera, la enzima "desenreda" de forma selectiva las moléculas de DNA. Asimismo, cuando se trata a continuación con la topoisomerasa IV en las mismas condiciones una mezcla de topoisómeros generados por la acción de la topoisomerasa I, el número de ligazón promedio (el número de superenrollamientos) permanece el mismo, pero la distribución de los topoisómeros alrededor de la media es mucho más ajustada. Se requiere la hidrólisis del ATP para alcanzar esta selectividad, pero de forma notable, estas observaciones señalan que una molécula de topoisomerasa, de alguna manera, puede rastrear una molécula de DNA mucho mayor que ella misma y dirigir los tipos específicos de cambios topológicos que se producen.

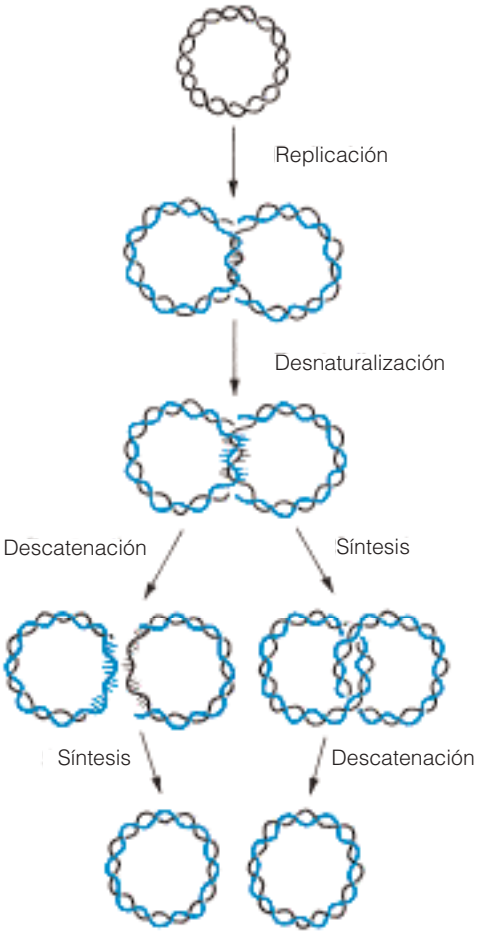


FIGURA **24.34**

Acción de la topoisomerasa en la terminación de la replicación. En ausencia de topoisomerasas, las fuerzas estéricas impedirían que una girasa desenrollara el DNA al aproximarse las horquillas de replicación una a la otra. La topoisomerasa permite el descatenado de los círculos. No se sabe si éste se produce antes o después de que se complete la replicación. Se muestran aquí ambas posibilidades. En la terminación participan otras proteínas (véase la página 1026).

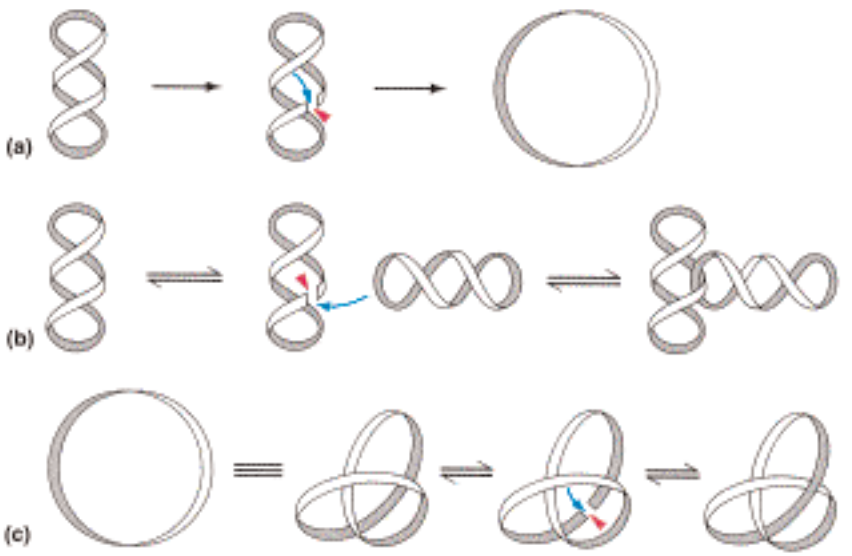
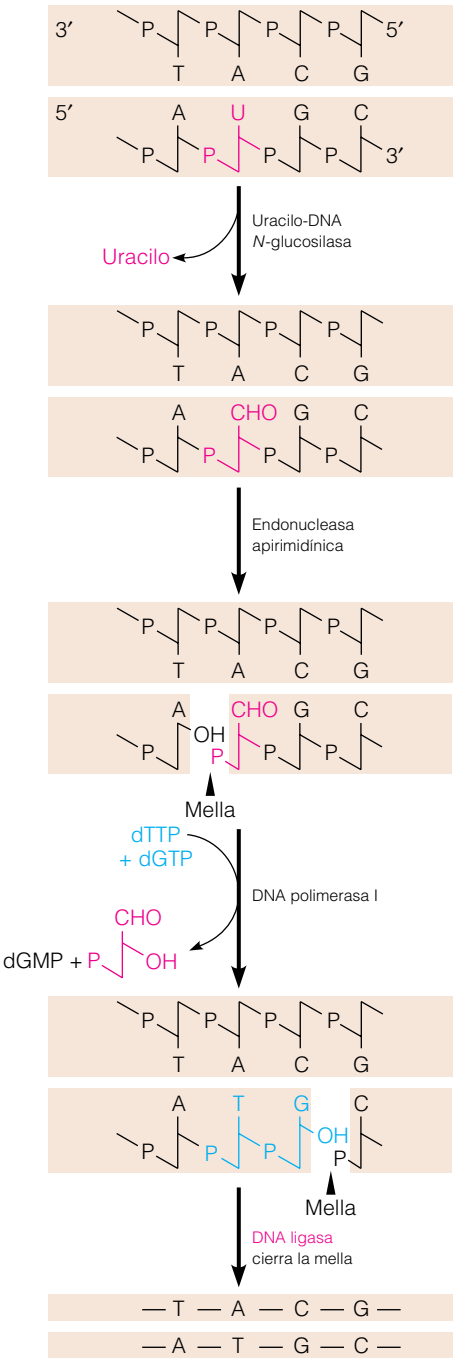


FIGURA **24.33**

Tipos de interconversiones topológicas catalizadas por las topoisomerasas de tipo II. **(a)** Relajación. **(b)** Catenación y descatenación. **(c)** Anudamiento y desanudamiento.

El proceso de reparación del DNA elimina los residuos de uracilo del DNA, tanto si proceden de una desaminación de residuos de citosina como si provienen de la incorporación de nucleótidos de desoxiuridina en vez de nucleótidos de timidina.



URACILO-DNA *N*-GLUCOSILASA: ELIMINACIÓN DEL URACILO INCORPORADO

El uracilo puede aparearse con la adenina en una doble cadena de DNA, y las DNA polimerasas aceptan con facilidad el trifosfato de desoxiuridina como sustrato, en lugar del trifosfato de desoxitimidina. Sin embargo, las células poseen un mecanismo de dos fases, bastante complejo, que impide que se acumulen residuos de desoxiuridilato en el DNA. En la primera fase de este mecanismo, descrito en el Capítulo 22, interviene una desoxiuridina trifosfatasa activa que rompe el dUTP a dUMP y PP_i. La segunda etapa comporta la acción de la **uracilo-DNA *N*-glucosilasa,** una enzima que elimina cualquier residuo de dUMP que pueda haber aparecido por la incorporación de un dUTP que haya escapado a la acción de la dUTPasa.

Como se muestra en la Figura 24.35, la uracilo-DNA *N*-glucosilasa rompe hidrolíticamente el enlace glucosídico entre el N-1 del uracilo y el C-1 de la desoxirribosa. Ello da lugar a uracilo libre y DNA con un **lugar apirimidínico,** es decir, un residuo de azúcar que carece de una pirimidina unida a él. Otra enzima, la **endonucleasa apirimidínica,** reconoce este lugar y rompe el enlace fosfodiéster en el lado 5′ de la porción de desoxirribosa. Ello va seguido en las bacterias por una actividad de traslación de mella de la DNA polimerasa I, que corta el residuo de desoxirribosa fosfato en este lugar, junto con varios otros residuos de nucleótidos situados más adelante (en la figura sólo se muestra uno, el dGMP). Los nucleótidos cortados se sustituyen por nuevos desoxirribonucleótidos, como el dTTP, en el lugar original que ocupaba el dUMP. El proceso se completa con la acción de la DNA ligasa.

¿Por qué todo este trabajo para sustituir un nucleótido que no afecta a la información codificada en el DNA? La respuesta probable es que el uracilo sustituido por timina (es decir, apareado con adenina) no es probablemente el verdadero objetivo de este sistema de reparación del DNA. Los residuos de uracilo del DNA pueden aparecer también por una desaminación espontánea de los residuos de citosina. La última alteración sí modifica el significado genético, puesto que convierte un par de bases G-C en un par G-U, y, en un ciclo posterior de replicación, la cadena que contiene U daría lugar a un par de bases A-T. El sistema de reparación del uracilo impide esta mutación pero no discrimina entre los uracilos apareados con adeninas y los apareados con guaninas. En consonancia con este modelo cabe citar el fenotipo **hipermutable** que presentan los mutantes que carecen de dUTPasa activa. Estas cepas presentan frecuencias elevadas de mutagénesis espontánea, debidas a la acumulación de residuos de dUMP en su DNA.

Reconstrucción de las máquinas de replicación

Está claro que muchas proteínas deben actuar en la horquilla de replicación o cerca de ella, de una forma coordinada, para que se produzca una replicación rápida y exacta de las dos cadenas del DNA de doble hélice. Gran parte de nuestro conocimiento de estos procesos procede de la reconstitución parcial o com-

FIGURA **24.35**

Acción del sistema de reparación del uracilo en el DNA. La uracilo-DNA *N*-glucosilasa elimina el uracilo, dejando un lugar apirimidínico. Una endonucleasa específica reconoce este lugar y rompe sobre el lado 5′. La traslación de mella mediante la acción de la DNA polimerasa I y la DNA ligasa sustituye el nucleótido apirimidínico y varios nucleótidos adyacentes, y sella luego la mella.

pleta de un aparato de replicación multiproteico o *replisoma*, a partir de los componentes purificados. Los sistemas que aportan más información son los que utilizan en su mayor parte proteínas del fago T4 y los que emplean fundamentalmente proteínas de *E. coli* para replicar los genomas de pequeños fagos de DNA de cadena única. En 1994 se describió el primer sistema de replicación eucariota reconstituido, proteínas purificadas del ser humano que replican el pequeño DNA genómico circular del virus SV40. Las funciones específicas desempeñadas por cada proteína tienen sus correspondientes en los sistemas de T4 y *E. coli*, como se muestra en la Tabla 24.4. Las investigaciones paralelas en levaduras han descubierto un cuadro semejante, con la principal excepción de que las levaduras contienen al menos seis DNA polimerasas diferentes.

Las semejanzas que se muestran en la Tabla 24.4 no significan que los procesos de replicación del DNA sean idénticos en procariotas y eucariotas. Por ejemplo, en la replicación del DNA eucariota, la eliminación del RNA cebador requiere dos enzimas RNasa H. La primera, que se denomina RNasa H1, elimina todos los ribonucleótidos excepto el que está en la unión RNA-DNA, que para su eliminación, necesita una enzima multifuncional denominada FEN1/RTH1, que contiene ambas actividades endonucleasa y exonucleasa.

En los estudios de la replicación del DNA en las células del ser humano, es muy adecuado la utilización de un DNA genómico pequeño, como el del SV40, que depende casi por completo de las proteínas de la célula hospedadora para llevar a cabo su propia replicación, ya que el DNA vírico y sus intermediarios de replicación son mucho más fáciles de aislar y caracterizar que las especies de DNA de peso molecular elevado. Obsérvese que el SV40 utiliza sólo una de sus propias proteínas (el antígeno T) mientras que el resto del proceso emplea proteínas codificadas por la célula hospedadora.

La misma lógica guió a Arthur Kornberg, Jerard Hurwitz y otros que previamente purificaron proteínas de *E. coli*, a describir la replicación de los genomas de pequeños fagos con DNA de cadena única, tales como ϕX174, M13 y G4. El conocimiento de los detalles de los ciclos de replicación de estos fagos es importante tanto en un sentido histórico, debido a la utilización muy extendida de estos fagos en los procedimientos de DNA recombinante, como en la mutagénesis de lugar dirigida (Capítulo 25).

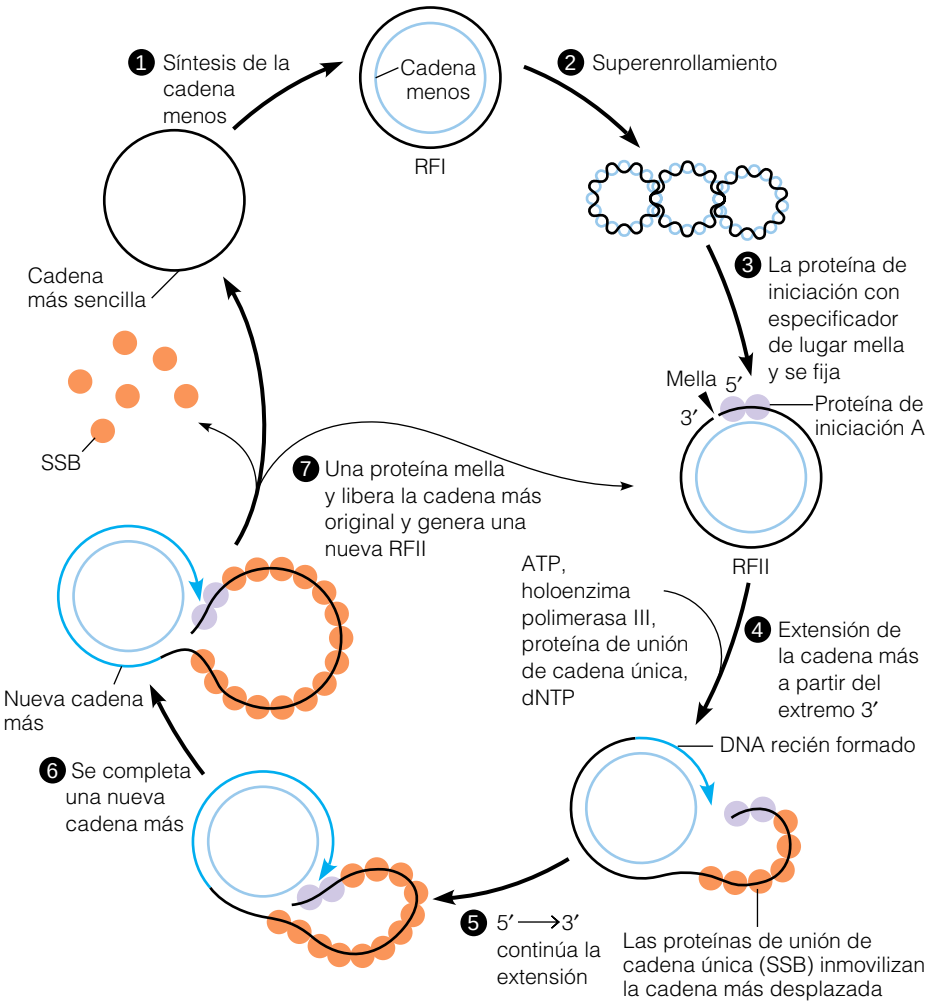
Aunque los detalles moleculares varían, todos estos fagos replican su DNA a través de la ruta que se presenta esquemáticamente en la Figura 24.36. El genoma de cadena única, tras entrar en la célula hospedadora, sirve de molde

TABLA 24.4 Funciones de las proteínas específicas en los sistemas de replicación del DNA reconstituidos

Función	*E. coli*	Fago T4	SV40/humanas
Polimerasa	Subunidad α de la holoenzima pol III	gp43	pol δ, subunidad α de la pol α-primasa
Primasa	DnaG	gp61	Subunidad primasa de la pol α-primasa
Exonucleasa de lectura de pruebas	Subunidad ε de la holoenzima pol III	Dominio 3′-exo de gp43	Dominio 3′-exo de pol δ
Pinza deslizante	Subunidad β de la holoenzima pol III	gp45	PCNA
Cargador de la pinza	Complejo γ	gp44/62	RF-C
Helicasa	DnaB	gp41	Antígeno T de SV40
Proteína de unión al DNA de cadena única	SSB	gp32	RP-A
Eliminación del RNA cebador	RNasa H, pol I	RNasa H de T4, pol I de *E. coli*	RNasa H1, FEN1/RTH1
Transferencia de la cadena retardada desde la primasa a la polimerasa	Subunidad χ de la holoenzima pol III	Desconocida	Desconocida

FIGURA **24.36**

Esquema de la replicación de los DNA de fagos de cadena única. La cadena más es el DNA presente en la partícula vírica y la cadena menos es su complementaria. RFI es el DNA forma replicativa (doble cadena circular) que no contiene interrupciones de cadena única, mientras que RFII es un dúplex circular que contiene al menos una mella o hueco. Los tres fagos estudiados (ϕX174, M13 y G4) se diferencian en los detalles del paso 1 de iniciación, pero son idénticos con respecto a los otros pasos.



(paso 1) para la producción de un DNA de doble cadena circular, denominado **forma replicativa (RF).** (Una doble cadena circular cerrada covalentemente se denomina **RFI**.) En esta estructura, la cadena de DNA derivada de la partícula vírica se denomina **cadena más,** y el complemento nuevo sintetizado se denomina **cadena menos.** La RF de doble cadena se superenrolla por la acción de la DNA girasa (paso 2). A continuación se produce la replicación mediante un mecanismo de **círculo rodante** para dar el DNA de la progenie de cadena única como sigue. En el paso 3, una endonucleasa con especificidad de lugar, codificada por el fago, forma una mella en la cadena más, produciendo **RFII,** una molécula de doble cadena circular con al menos una interrupción de cadena única. La polimerasa realiza una extensión a partir del extremo hidroxilo 3′ de la mella y avanza alrededor del molde de la cadena menos circular (pasos 4-6). El extremo 5′ de la cadena más se desplaza del molde y se empaqueta finalmente en las partículas víricas. Cuando la polimerasa ha pasado una vez alrededor del círculo, la endonucleasa con especificidad de lugar vuelve a actuar (paso 7), liberando la cadena más desplazada y una nueva RFII. Esta doble cadena circular contiene en el interior de su interrupción de cadena única un extremo hidroxilo 3′ al que pueden añadirse nucleótidos en un nuevo ciclo de síntesis de la cadena más.

Las consideraciones anteriores se centran en la fase de elongación de la replicación del DNA. Volvamos ahora al proceso de iniciación.

Iniciación de la replicación del DNA

Cuando nos planteamos cómo se inicia la replicación del DNA desde un origen, estamos haciendo tres preguntas relacionadas entre sí: (1) ¿Cuáles son las interacciones específicas de lugar DNA-proteína que desencadenan esta iniciación? (2) ¿Cómo actúan las proteínas tras la unión a las secuencias de origen? (3) ¿Cómo se controla el proceso? La iniciación parece ser el principal objetivo del control de la replicación; sin embargo, sabemos mucho menos sobre el control de la replicación de lo que conocemos sobre el control de la transcripción o la traducción. Es evidente que los contactos intracelulares, de un tipo todavía no definido, conectan el aparato de replicación con otras estructuras celulares, con lo que la replicación del DNA se coordina con el ciclo celular. En los procariotas, es probable que la replicación se produzca en un lugar conectado con la membrana celular, mientras que la replicación del DNA de los eucariotas puede producirse en una estructura que contiene DNA y proteínas, denominada matriz nuclear (véase el Capítulo 28). La naturaleza y la trascendencia de estas relaciones físicas no se han determinado aún. La mayor parte de los fenómenos de la replicación se han reproducido en sistemas acelulares solubles, sin componentes de la membrana ni de la matriz nuclear. En consecuencia, ha resultado difícil definir la función bioquímica de la membrana o de la matriz en la replicación.

EXIGENCIAS PARA LA INICIACIÓN DE LA REPLICACIÓN

Debido a que la replicación se inicia en unos orígenes fijos, hay dos exigencias para su iniciación: (1) una secuencia de nucleótidos que una específicamente las proteínas de iniciación y (2) un mecanismo que genere un extremo cebador al que puedan añadirse los nucleótidos por la DNA polimerasa. Se han aislado diversos orígenes de replicación de fagos, bacterias, plásmidos y orgánulos mediante clonación génica, y se han determinado sus secuencias de nucleótidos. En general, estos orígenes incluyen secuencias repetidas de una polaridad idéntica o contraria (**repeticiones directas** o **repeticiones invertidas,** respectivamente). Esta observación sugiere que las proteínas de iniciación se unen en múltiples copias.

Las dos formas más sencillas de generar un extremo cebador en el origen son: (1) mellar una cadena del ácido nucleico original de doble cadena, para dejar expuesto un extremo 3′ hidroxilo, y (2) desenrollar el dúplex original y sintetizar un RNA cebador para exponer un extremo *ribonucleótido* 3′ hidroxilo. Los fagos ϕX174 y G4 inician la conversión del DNA de RF en un DNA hijo de cadena única haciendo una mella con una endonucleasa con especificidad de lugar, el producto vírico del gen *cisA*. En cambio, la replicación del DNA de doble cadena, en los casos en que se ha estudiado, se produce sin creación de mellas en la doble cadena original y con la síntesis de RNA cebadores.

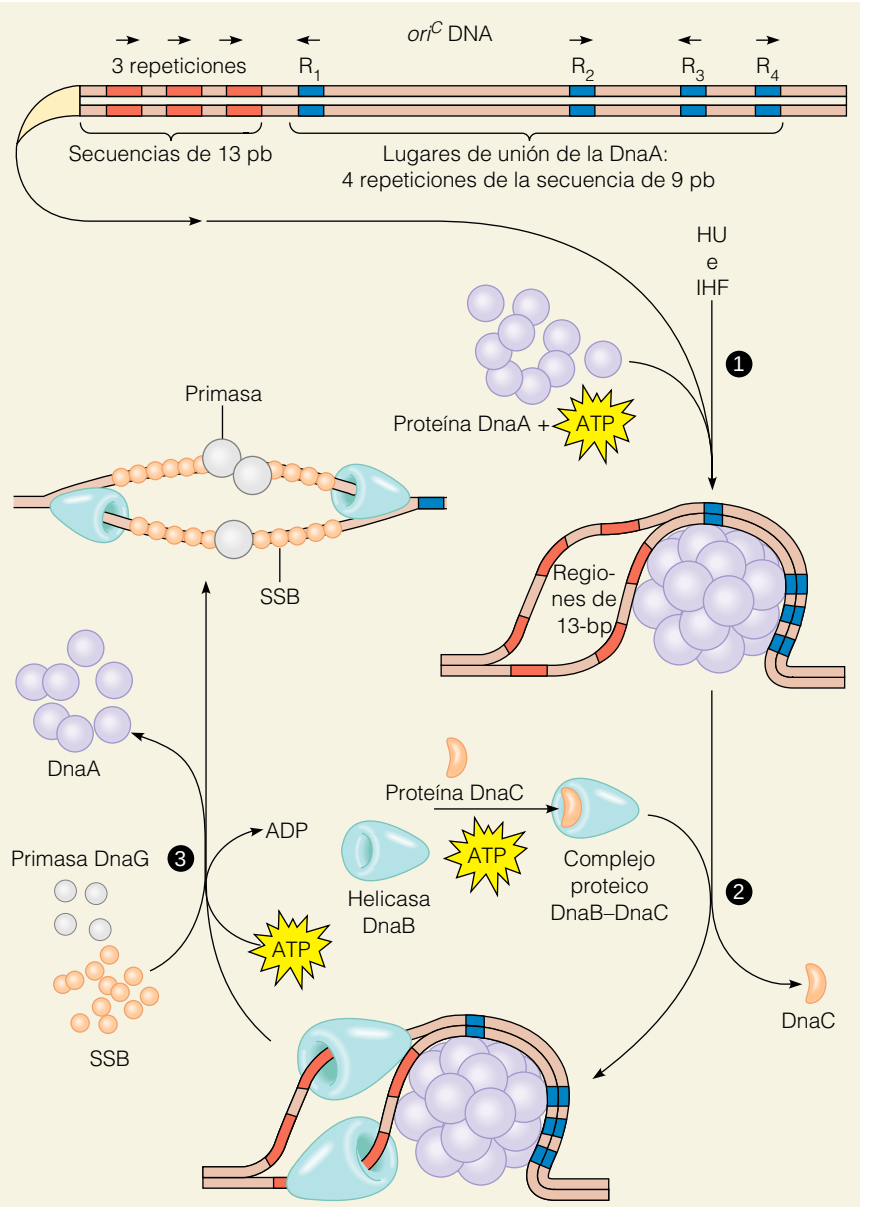
INICIACIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL DNA DE *E. COLI* EN *ORI*^{C}

La iniciación de la replicación del cromosoma de *E. coli* se conoce razonablemente bien, gracias a que la secuencia de origen se ha clonado en plásmidos cuya replicación a partir del origen puede estudiarse entonces in vitro. Esta secuencia de origen, denominada *ori*^{c}, tiene una longitud de 245 pares de bases. Contiene cuatro repeticiones de una secuencia de 9 pares de bases que une la proteína de iniciación, el producto del gen *dnaA*. A la izquierda de estos lugares, como se muestra en la Figura 24.37, hay tres repeticiones directas de una secuencia de 13 pares de bases que contiene una cantidad abundante de A y T, y

FIGURA **24.37**

Modelo de la iniciación de la replicación del DNA de *E coli* en *ori*^{C}. HU e iHF son proteínas de unión al DNA de doble cadena que facilitan que el DNA se doble en el origen.

Reproducido con permiso de T. A. Baker y S. H. Wickner, *Annu. Rev. Genet.* (1992) 26:447-477. © 1992 Annual Reviews.



La unión de proteínas, que hace que el DNA se doble en el origen, inicia la replicación del DNA de doble cadena. La tensión producida al doblarse hace que el DNA próximo se desenrolle, con lo que se forman primosomas en las horquillas y se forman los RNA cebadores que son extendidos por las DNA polimerasas.

que, por tanto, puede desnaturalizarse con facilidad. La secuencia contiene también lugares de unión para varias proteínas básicas (HU e IHF) que facilitan que el DNA se doble, un paso importante de la secuencia que conduce a la iniciación.

El paso 1 consiste en la unión de 10 a 20 moléculas de un complejo de la proteína DnaA y el ATP. La proteína se activa para este paso mediante la reacción con el fosfolípido cardiolipina (véase el Capítulo 19), un proceso que puede representar parte de la coordinación entre la replicación del DNA, el crecimiento de la membrana y el reparto de cromosomas en la división celular. La unión de la DnaA, junto con las proteínas básicas, dobla el DNA de manera bastante brusca y crea una tensión superhelicoidal negativa. Esta tensión causa, a su vez, un desenrollamiento del DNA en las regiones de 13 pares de bases, con la apertura de un bucle corto de cadena única. Con la ayuda de la DnaC, otra proteína de iniciación, la helicasa DnaB, en el paso 2, se une a las dos horquillas de este bucle y la actividad helicasa continúa desenrollando esta estructura. En el

paso 3 y en los pasos posteriores (que no se muestran), se une la primasa DnaG y se forman los RNA cebadores. Algunos de los cebadores primeros pueden sintetizarse también por la RNA polimerasa, la enzima que se encarga fundamentalmente de la transcripción. Una vez formados, los RNA cebadores se extienden por la DNA polimerasa III en ambas cadenas conductora y retardada, y las dos horquillas del complejo de iniciación maduran, con una cadena conductora y retardada en cada horquilla.

Las investigaciones realizadas en varios sistemas de fagos y plásmidos sugieren que la secuencia que acabamos de describir constituye un mecanismo general para la iniciación de la replicación del DNA. Se forma un complejo DNA-proteína, y la tensión que se crea sobre el DNA fuerza el desenrollamiento de una región próxima, el ensamblaje de un primosoma y la síntesis de RNA cebadores en esta estructura desenrollada. Todavía tenemos un conocimiento bastante incompleto de qué controla este proceso y cómo se coordina con el ciclo de crecimiento y división celulares.

REPLICACIÓN DEL DNA DE PLÁSMIDOS: CONTROL DE LA INICIACIÓN POR EL RNA

La replicación de varios DNA circulares pequeños, como el DNA de los plásmidos y los orgánulos, se está investigando en sistemas acelulares. Una característica interesante de la replicación del DNA de los plásmidos es el control de la iniciación que ejerce el "RNA antisentido". En el plásmido ColE1 de *E. coli*, el RNA puede sintetizarse en el origen de replicación a partir de la cadena de DNA opuesta a la utilizada para la síntesis del cebador de iniciación (Figura 24.38). Esto inhibe la iniciación de la replicación, puesto que el RNA cebador queda unido como parte de una doble cadena RNA-RNA. Es posible que un análisis más detallado de este sistema, en especial en cuanto al control de la síntesis de RNA antisentido, permita aclarar cómo se controla la iniciación de la propia replicación del DNA.

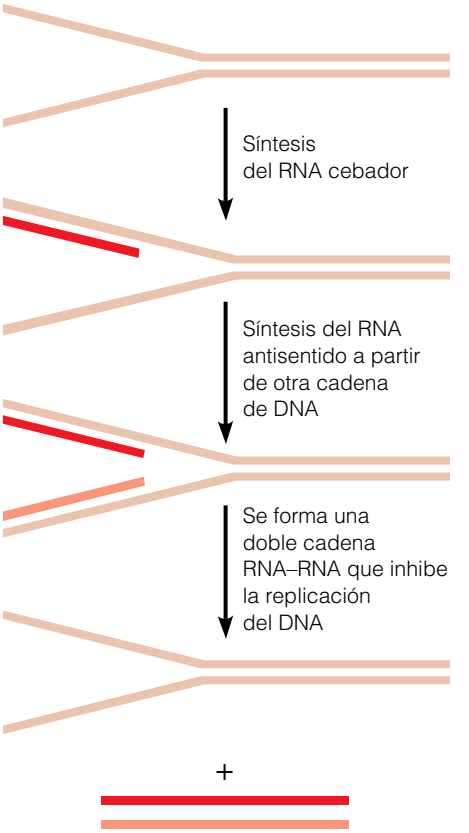
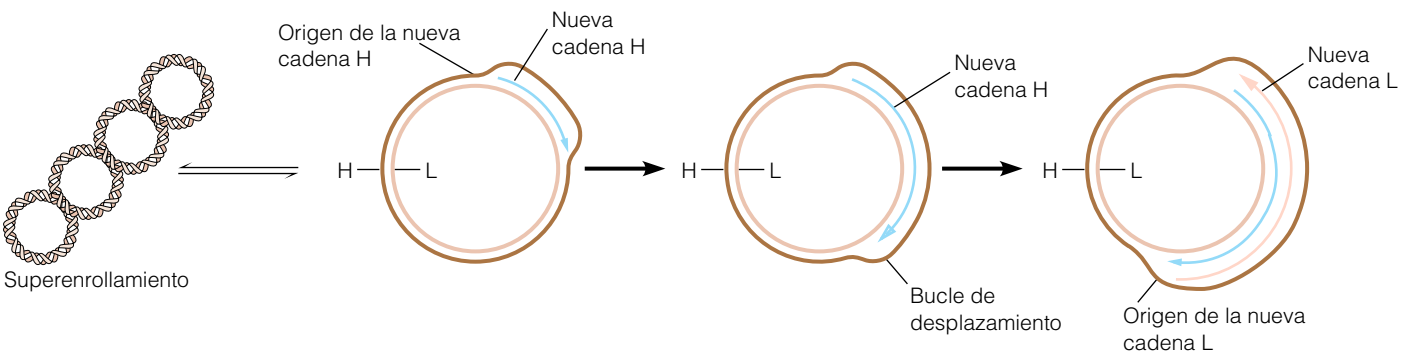


FIGURA **24.38**
Control de la replicación del DNA de un plásmido por el RNA antisentido.

DNA MITOCONDRIAL: DOS HORQUILLAS DE REPLICACIÓN UNIDIRECCIONALES

Una forma poco habitual de iniciarse la replicación es la del DNA mitocondrial de las células animales. Como se observa en la Figura 24.39, la replicación unidireccional de esta doble cadena circular de 16 kilobases comienza en un origen fijo en una cadena (la L o cadena ligera). Al empezar la replicación, la cadena H (pesada) original, es desplazada por la cadena H que está naciendo, formando una estructura denominada bucle de desplazamiento o bucle D, que puede verse con el microscopio electrónico. Cuando este aparato de replicación unidireccional ha avanzado dos terceras partes del trayecto alrededor del círculo, se

FIGURA **24.39**
Replicación del DNA mitocondrial. Se muestran en color marrón las cadenas originales pesada (H) y ligera (L). Las cadenas nuevas se muestran en azul y rosa.



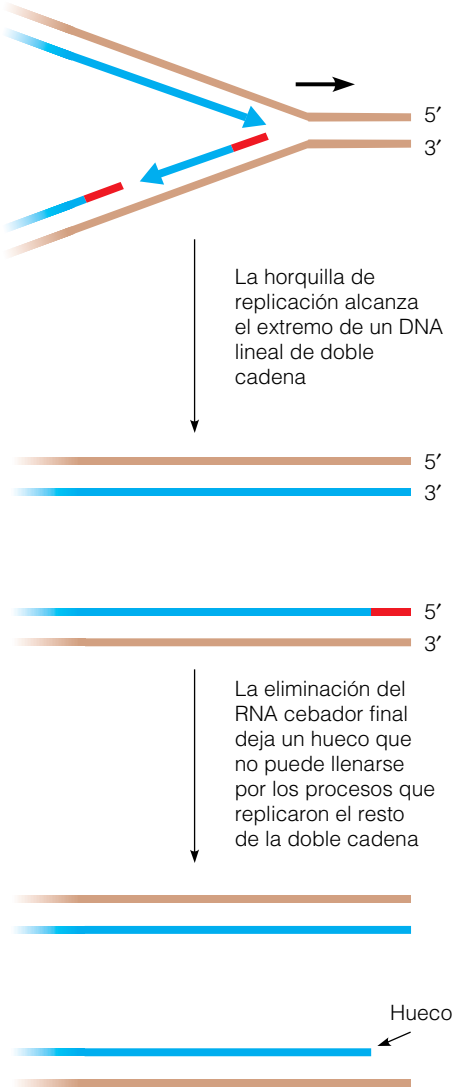


FIGURA **24.40**

Problema de completar el extremo 5′ al copiar una molécula de DNA lineal.

expone un nuevo origen en la cadena H desplazada, y se inicia una síntesis unidireccional de la cadena L desde este origen y en dirección contraria a la de la replicación de la cadena H. Todo este proceso requiere aproximadamente una hora, lo que concuerda con la replicación mucho más lenta de los DNA eucariotas en comparación con los DNA procariotas (véase la Tabla 24.1). Se produce un RNA cebador, como se demostró inicialmente al observar que el DNA mitocondrial maduro contiene unos pocos ribonucleótidos, que al parecer son restos de un sistema poco eficaz de eliminación del cebador.

Replicación de genomas lineales

Hasta ahora hemos considerado detalladamente tan sólo la replicación de los genomas de DNA circulares. Los genomas lineales, que incluyen los de varios virus y los de los cromosomas de las células eucariotas, se enfrentan con un problema especial: cómo completar la replicación de la cadena retardada (Figura 24.40). La eliminación de un RNA cebador del extremo 5′ de una molécula lineal dejaría un hueco que no puede llenar la acción de la DNA polimerasa, debido a la ausencia de un extremo cebador que extender (Figura 24.41a, paso 1). Si este DNA no pudiera replicarse, el cromosoma se acortaría un poco con cada ciclo de replicación. Los virus presentan al menos tres estrategias para resolver este problema. Los fagos T4 y T7 tienen una **redundancia terminal,** o duplicación de una pequeña parte del genoma en cada extremo del cromosoma. De este modo, puede producirse la recombinación en los extremos replicados de forma incompleta de dos moléculas de DNA nacientes, sin una pérdida de información genética (Figura 24.41a, pasos 2 y 3). Este proceso se repite en ciclos posteriores de replicación (paso 4) hasta que el agregado lineal terminoterminal (denominado **concatémero**) tiene una longitud de más de 20 veces la longitud de un único cromosoma del fago. En este momento, una nucleasa especificada por el virus corta este DNA gigante en fragmentos de la longitud del genoma que se empaquetan a continuación en las cabezas del fago (paso 5).

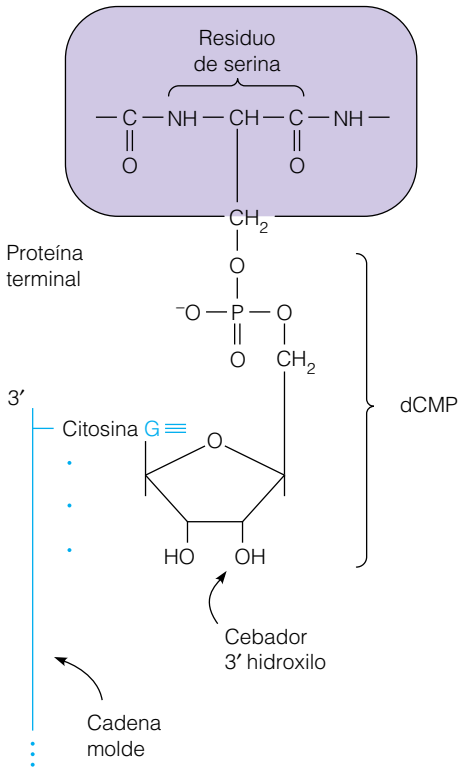
El bacteriófago ϕ29 y los adenovirus emplean una estrategia muy distinta (Figura 24.41b). Los genomas de estos virus contienen secuencias repetidas invertidas en sus extremos. La replicación se inicia en un extremo de la doble cadena lineal, con una proteína denominada **proteína terminal,** que actúa como cebador (paso 1). Esta proteína en el adenovirus reacciona con dCTP para formar un residuo de dCMP ligado covalentemente a través de su fosfato a un residuo de serina (véase el margen, página 1027). El dCMP actúa como cebador para la replicación de la cadena con extremo 3′, y el extremo 5′ es desplazado como una cadena única (paso 2). Cuando esta cadena se ha desplazado por completo (paso 3), puede formar una corta zona de doble cadena mediante apareamiento de bases con la secuencia repetida del otro extremo de la molécula (paso 4), que puede actuar como sustrato para la iniciación de un segundo ciclo de síntesis de desplazamiento (paso 5), con lo que se produce la replicación completa de ambas cadenas. El fago ϕ29 se replica de una forma semejante, excepto que el nucleótido cebador unido a la proteína es dAMP en vez de dCMP.

Otro mecanismo es el que se utiliza en la replicación de los poxvirus, como el de la vacuna (Figura 24.41c). Las dos cadenas de cada extremo de este genoma lineal están unidas de forma covalente. Esta estructura, al ser abordada por una horquilla de replicación, puede facilitar el movimiento de la cadena conductora *alrededor* del enlace entre las cadenas (paso 3), con lo que el cebador final de la cadena retardada puede sustituirse por DNA como en una doble ca-

dena circular. El reordenamiento (pasos 4 y 5) restablece la conformación original.

Los cromosomas de los eucariotas contienen moléculas de DNA lineal. Se utiliza en ellos un mecanismo totalmente diferente, con la participación de una enzima denominada **telomerasa,** para conservar la información de los extremos de sus cromosomas. Consideraremos este mecanismo en el Capítulo 28.

Aunque los cromosomas circulares carecen de extremos que sirvan como lugares naturales de terminación de la replicación, sí tienen mecanismos de terminación especializados. Ya hemos mencionado el papel de la topoisomerasa IV para descatenar los cromosomas que casi han completado un ciclo de replicación. Los cromosomas bacterianos también tienen lugares específicos de terminación. En *E. coli*, la replicación termina en la región *ter*, que está situada a 180° de ori^c en el cromosoma (véase la Figura 24.8). Esta región consta de seis segmentos homólogos de 20 pares de bases, tres de cada uno orientados en direcciones opuestas. Una proteína denominada Tus se une estrechamente a cada uno de estos lugares. La unión de Tus bloquea las horquillas de replicación que trabajan en una sola dirección. Debido a que en cada dirección están orientados tres lugares, esta disposición asegura que cada una de las dos horquillas que se inician en ori^c viajarán hasta el lugar *ter* y no más allá. La estructura cristalina de la proteína Tus unida al DNA sugiere un mecanismo para la terminación polarizada. Como se muestra en la Figura 24.42, dos hélices α del dominio β (en verde) se proyectan en un dúplex de DNA unido. Se sugiere que la helicasa DnaB que se aproxima a la parte superior, como se muestra en la figura, podría generar un DNA de cadena única que quedaría enmarañado en estas regiones helicoidales y, de esta forma, separado de la horquilla.



Fidelidad de la replicación del DNA

La replicación del DNA es, con mucho, el más exacto de los procesos catalizados por enzimas que se conocen. A partir de las frecuencias espontáneas de mutación, que para todas las posiciones de un determinado gen ascienden a aproximadamente 10^{-6} por generación, podemos calcular la probabilidad de que un determinado residuo nucleótido se copie incorrectamente en alrededor de 10^{-9} a 10^{-10} por par de bases por ciclo de replicación. Esta exactitud tan elevada no puede explicarse simplemente por la energética de la estructura del DNA. La energía libre de la formación de un par de bases de Watson-Crick (A-T o G-C) difiere de la formación de un par de bases que no sea de este tipo (por ejemplo, A-C o G-T) en tan sólo de 4 a 13 kJ/mol. Esto corresponde a una diferencia de únicamente 100 a 1000 veces la energía de unión entre los pares de bases correctos y los incorrectos. En consecuencia, si la DNA polimerasa fuera completamente pasiva y sólo incorporara el nucleótido que espontáneamente se asocia con una base del molde, los errores serían de aproximadamente un 0.1 a un 1.0% de las ocasiones, como consecuencia de la abundancia relativa de estructuras de pares de bases correctos o incorrectos. Las tasas de mutación espontánea serían muchos órdenes de magnitud superiores a las observadas.

¿Cómo pueden contribuir otros componentes de la maquinaria de replicación a producir la tasa de errores extremadamente baja de la replicación del DNA? La primera pista al respecto se obtuvo con el fago T4, cuando se observó que las mutaciones que modificaban la DNA polimerasa del virus influían en la exactitud con la que se replicaban otros genes. Algunas mutaciones de la polimerasa tenían un fenotipo **mutador,** que significa que las tasas de mutación en otros loci aumentaban de manera uniforme. Otras mutaciones de la polimera-

Los genomas lineales se replican por medio de varios mecanismos que impiden la pérdida de las secuencias que no pueden replicarse retrógradamente a partir de los extremos 5′.

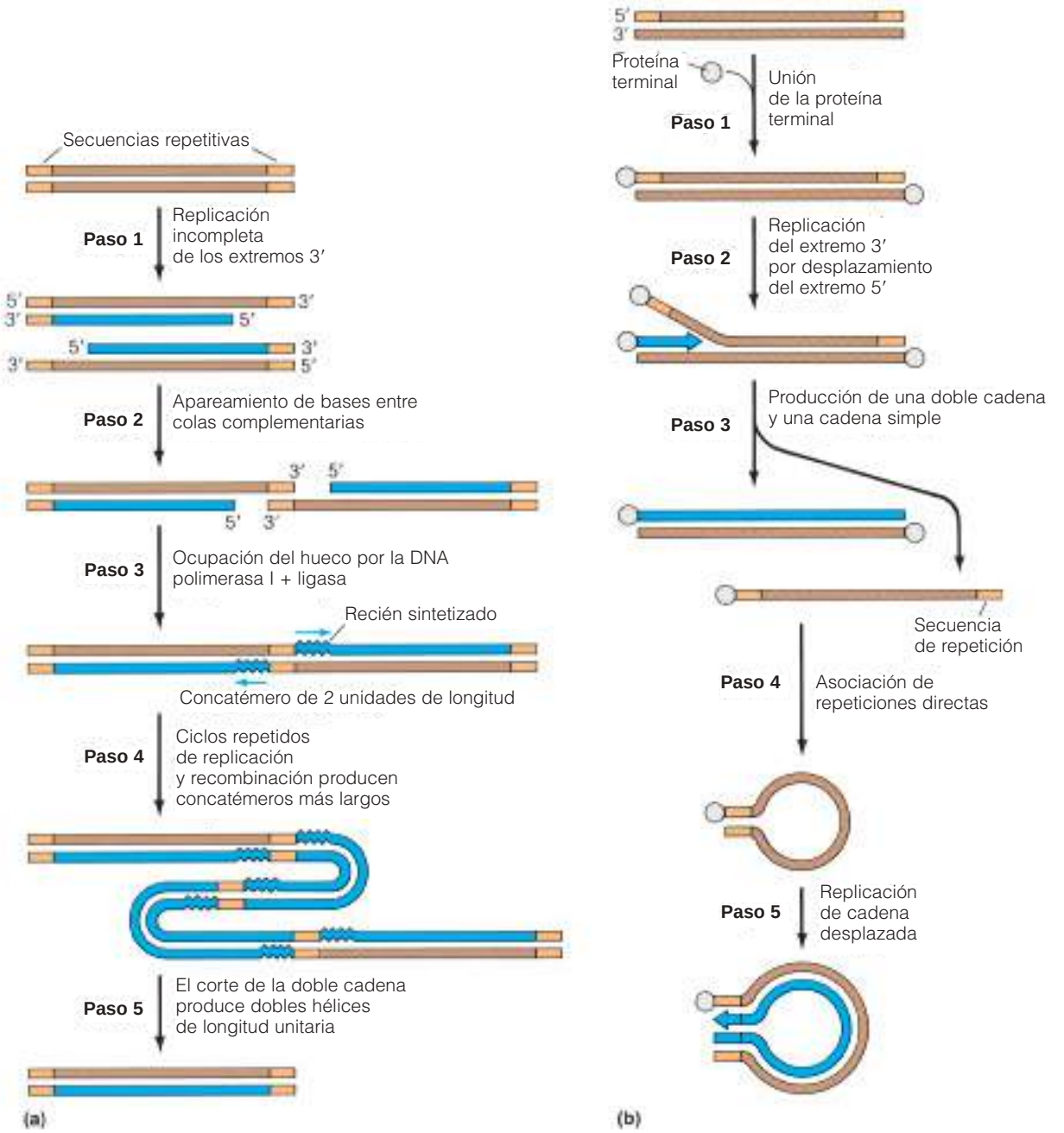
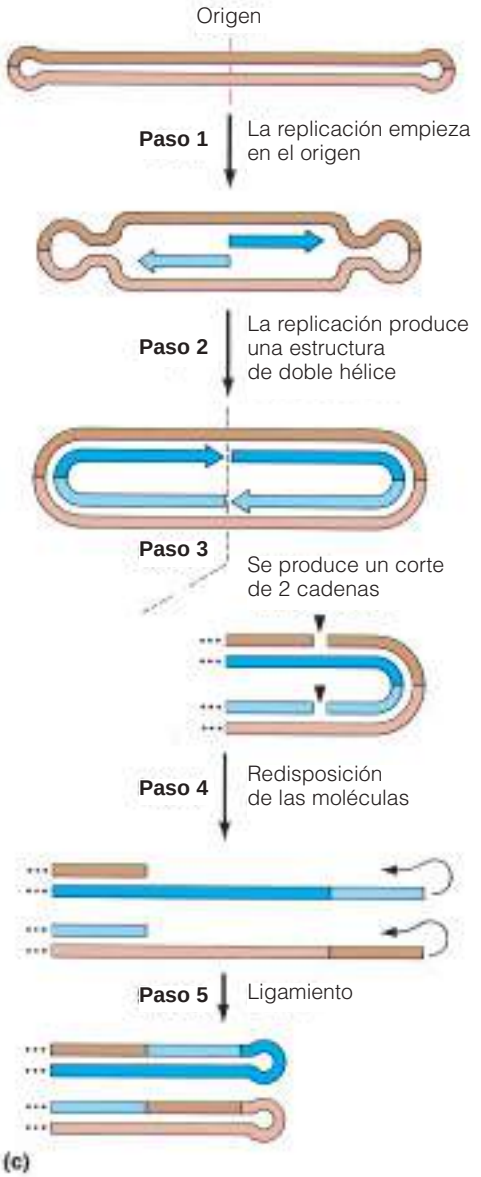


FIGURA **24.41**

Mecanismos de replicación de los DNA lineales. **(a)** Recombinación terminoterminal de redundancias terminales, como ocurre en T4 y T7. (Un esquema alternativo podría ser la formación de mellas en los dos lados 5′ de la región recombinada, seguido de la síntesis de desplazamiento de doble cadena para duplicar este segmento.) **(b)** Uso de la proteína ligada al genoma 5′, como se observa en los adenovirus y en ϕ29. **(c)** Replicación alrededor de los bucles de horquilla en las terminaciones, seguida del corte de las dos cadenas, como ocurre en los poxvirus.

sa eran **antimutadoras,** y parecían mejorar la exactitud de la replicación del DNA. Se observó que la mayor parte de las mutaciones se debían a una disminución de la actividad exonucleasa asociada con la polimerasa. Dado que esta actividad es capaz de separar los pares de bases incorrectos a partir del extremo 3′, una disminución de la actividad exonucleasa reduciría la probabilidad de que un nucleótido incorporado de manera incorrecta fuera eliminado antes de que la polimerasa pudiera añadir el nucleótido siguiente. De igual modo, el aumento de la actividad 3′ exonucleasa respecto a la polimerasa haría aumentar la probabilidad de que un nucleótido mal apareado fuera eliminado, y reduciría, por tanto, la tasa de error. Así pues, la exactitud de la replicación del DNA podría atribuirse en parte a una actividad exonucleasa de "corrección de pruebas", que revisa el DNA recién replicado y corrige la mayor parte de los errores.



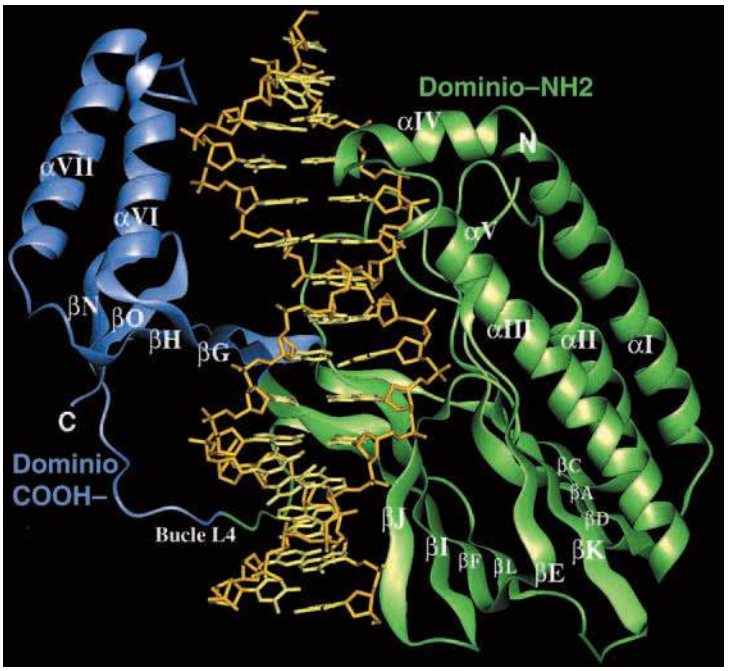


FIGURA **24.42**

Estructura de la proteína Tus de *E. coli*, unida con un DNA de doble cadena. Los dominios amino terminal y carboxilo terminal de la proteína están en verde y azul, respectivamente. Se muestran diversos subdominios de la proteína.

Cortesía de K. Morikawa; reproducido con permiso de K. Kamada et al., *Nature* (1996) 383:598-603. © 1996 Macmillan Magazines, Ltd.

Este mecanismo de corrección de pruebas fue puesto en duda cuando se publicó la estructura del fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I. Recuérdese de la Figura 24.16 que deben desenrollarse ocho pares de bases del DNA para que el cebador del extremo 3′ se desplace del lugar activo de la polimerasa al lugar de la 3′ exonucleasa. ¿Cómo diferencia, pues, la nucleasa los pares de bases correctos e incorrectos de los nucleótidos del extremo 3′? Las respuestas llegaron a partir de los análisis cinéticos con combinaciones definidas molde-cebador analizadas en geles de secuenciación (Figura 24.43). Para un nucleótido 3′ terminal, con un apareamiento de bases correcto, la velocidad a la que se añade el siguiente nucleótido es muy superior a la velocidad de desenrollamiento espontáneo del DNA en el extremo 3′. En consecuencia, la mayor parte de los nucleótidos apareados correctamente no llegan a tener nunca la posibilidad de desplazarse hacia el lugar de la 3′ exonucleasa. Sin embargo, la extensión de un nucleótido mal apareado es bastante lenta, y ello hace aumentar la probabilidad de que la reacción de desenrollamiento desplace el nucleótido mal apareado hacia el lugar de la 3′ exonucleasa para ser eliminado (Figura 24.44).

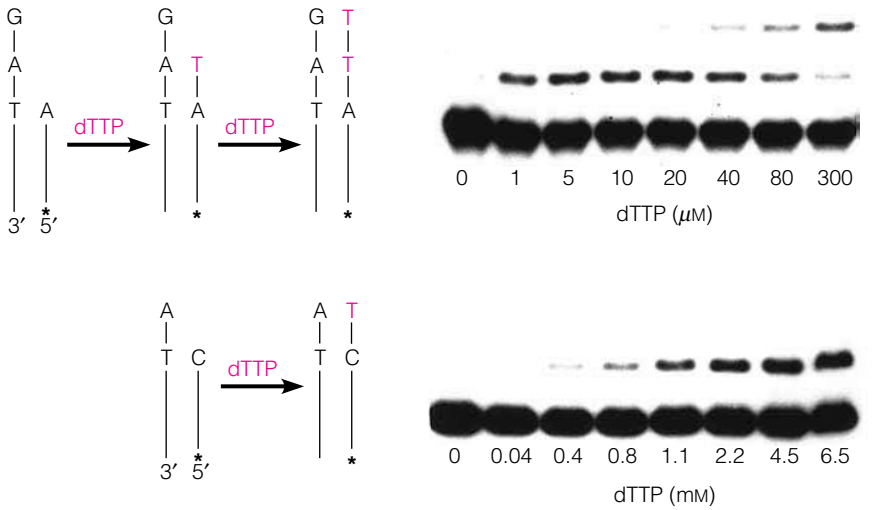


FIGURA **24.43**

Sistema in vitro para el estudio de la fidelidad de la replicación del DNA. La cadena cebadora se marca radiactivamente en el extremo 5′ (indicado con un asterisco) y es la especie de las marcadas radiactivamente que migra más rápidamente. La dependencia de la concentración de dTTP para la extensión a partir de un nucleótido correctamente apareado (A en el par de bases A-T) se muestra en la parte superior, y la correspondiente a la extensión a partir de un apareamiento erróneo C-T se muestra en la parte inferior. El dTTP era el único dNTP presente durante las incubaciones. En cada caso, los productos obtenidos tras la incubación y desnaturalización se analizaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y autorradiografía. En el cuadro superior se muestra que la velocidad de la extensión fue máxima con dTTP 1 μM y que podía detectarse una nueva extensión a concentraciones de dTTP más elevadas. Sin embargo, como se muestra en el cuadro inferior, eran necesarias concentraciones de dTTP del orden milimolar para observar alguna extensión de cadena a partir del error de apareamiento. Este método de gel de secuenciación puede utilizarse para el estudio de los pasos de inserción y escisión, así como de la extensión de la cadena.

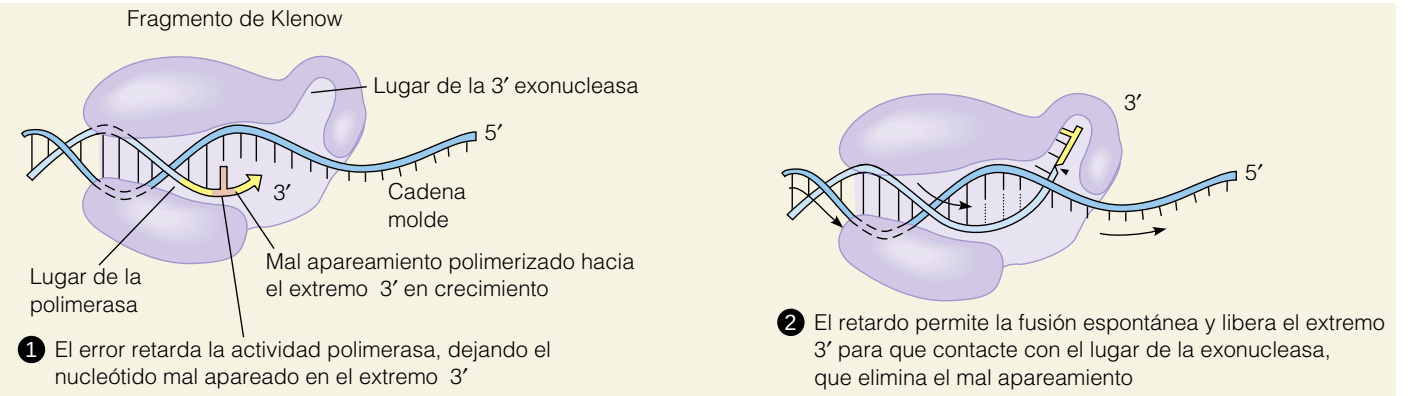
Fotografía cortesía de J. Petruska, M. F. Goodman, M. S. Boosalis, L. C. Sowers, C. Cheong y I. Tinoco, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85:6252-6256. © 1988 AAAS.

En la actualidad no está claro si el esquema presentado representa un mecanismo general de corrección de pruebas por las DNA polimerasas. En otras palabras, ¿es la corrección de pruebas un proceso puramente cinético o discrimina la 3′ exonucleasa entre los nucleótidos correcta e incorrectamente apareados? Se ha observado que la subunidad ε de la DNA polimerasa III de *E. coli* tiene una 3′ exonucleasa específica para los errores de mal apareamiento. La relación estructural entre esta nucleasa y la actividad polimerasa de la subunidad α no se conoce.

La DNA polimerasa tiene otra función adicional en la determinación de la exactitud, en el paso de inserción del nucleótido. Los estudios cinéticos del tipo que se ilustra en la Figura 24.43 indican que hay una discriminación contraria a la *inserción errónea*, de la misma manera que en la extensión a partir de un nucleótido mal apareado. Los análisis cinéticos muestran que la enzima desempeña un papel activo en la selección del dNTP correcto. Se produce un cambio conformacional principal tras la unión del dNTP, lo cual facilita el paso de formación del enlace. De forma inesperada, la mayor parte de la capacidad de las polimerasas para discriminar el paso de inserción se ha visto que procede de las formas geométricas de los nucleótidos sustratos, al menos casi tanto como su capacidad para formar enlaces de hidrógeno con las bases molde. Los químicos sintetizaron un desoxirribonucleósido trifosfato análogo cuya base era un derivado de tolueno. Este análogo es bastante semejante geométricamente a la timidina trifosfato, pero es incapaz de formar enlaces de hidrógeno con cualquier otro nucleótido. No obstante, se observó que este nucleótido totalmente

FIGURA **24.44**

Base cinética de la escisión preferente de los nucleótidos mal apareados por un lugar de la 3′ exonucleasa distante del lugar de la polimerasa.



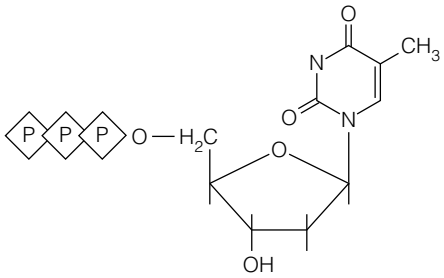
artificial se incorporaba por el fragmento de Klenow con una elevada selectividad frente a los residuos de dAMP en el DNA molde. Este hallazgo sorprendente, más las estructuras de alta resolución que se han obtenido recientemente de los lugares de unión de los dNTP en las DNA polimerasas, han centrado de nuevo la atención en el papel de la inserción del nucleótido por las polimerasas como un determinante importante de la fidelidad de la replicación.

Otro mecanismo de corrección de errores, la **reparación de mal apareamiento,** contribuye también a aumentar en unas 100 veces la exactitud ya de por sí elevada del copiado de la información genética. Como se describirá en el capítulo siguiente, el sistema de reparación de mal apareamiento examina todo el DNA recién replicado, y elimina los residuos que no presentan un apareamiento de bases adecuado sustituyéndolos con los nucleótidos correctos.

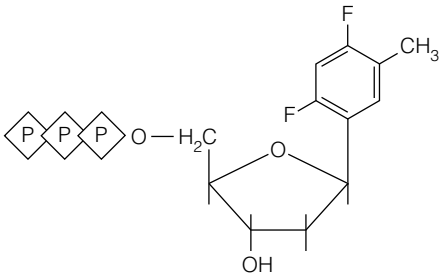
Se está descubriendo lentamente el grado en que contribuyen estos procesos diversos de potenciación de la fidelidad a aumentar la exactitud de la replicación del DNA eucariota. La DNA polimerasa α no tiene una actividad 3′ exonucleasa asociada, pero es posible que otra proteína proporcione una actividad nucleasa de corrección de pruebas como ocurre con la DNA polimerasa III de *E. coli.* Además, la investigación ha revelado en la polimerasa α de *Drosophila* una actividad 3′ exonucleasa "críptica" (una actividad que generalmente es indetectable). Además, como se ha indicado antes, las polimerasas δ y ε contienen una actividad 3′ exonucleasa asociada.

Las frecuencias de mutaciones espontáneas están determinadas por varios factores distintos a las especificidades de unión de los dNTP y a las actividades exonucleasas de corrección de pruebas de las DNA polimerasas. Por ejemplo, como se ha señalado en el Capítulo 22, el control defectuoso de la síntesis de desoxirribonucleótidos puede crear unas concentraciones intracelulares desequilibradas, y estos defectos pueden generar fenotipos mutadores al forzar errores de replicación en los pasos de inserción o de corrección de pruebas. Además, los fenotipos mutadores también se generan por defectos de los sistemas de reparación de mal apareamiento, donde los errores de replicación generados por la acción de la polimerasa no se corrigen de forma eficaz. El conocimiento de los factores que controlan las tasas de mutación tiene más que un interés académico. Como se señala en los Capítulos 23 y 25, el cáncer se produce como consecuencia de la acumulación en las células de alteraciones del DNA que son demasiado grandes para poder repararse. Existen buenas razones para creer que los fenotipos mutadores se establecen en las células precancerosas y que estos cambios son esenciales para sostener el número de mutaciones que deben producirse para cambiar una célula normal en una célula totalmente tumoral.

La fidelidad de la replicación del DNA se incrementa mediante la ruptura 3′ exonucleolítica de los nucleótidos mal apareados y mediante la discriminación cinética contraria a la incorporación de nucleótidos sin apareamiento de base y en contra de la extensión de la cadena a partir de un nucleótido mal apareado.



dTTP



Análogo geométrico de dTTP

Virus de RNA: la replicación de genomas de RNA

Concluimos este capítulo con una breve referencia a la replicación de los genomas víricos formados por RNA. Prácticamente todos los virus vegetales que se conocen contienen RNA en vez de DNA; al igual que ocurre con varios bacteriófagos y muchos virus animales importantes, como el virus de la polio y los virus de la gripe. Los **retrovirus,** que son los causantes de muchos tumores y del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) contienen también genomas de RNA.

REPLICASAS DE RNA DEPENDIENTES DE RNA

La mayoría de los virus de RNA contienen un genoma formado por una única molécula de RNA de una sola cadena. Generalmente, este RNA es la cadena "con sentido" para la expresión de la información genética a nivel de la traducción.

Las tasas de mutación rápidas de los virus de RNA se deben en gran parte a que los mecanismos de replicación del RNA no incluyen corrección de pruebas para detectar nucleótidos mal apareados.

En otras palabras, la molécula de RNA que pasa de la partícula vírica a la célula infectada puede actuar directamente como RNA mensajero, sin tener que dirigir antes la síntesis de una cadena de RNA complementaria. Uno de los primeros productos de la traducción de este genoma es la enzima **replicasa** o RNA polimerasa dependiente de RNA. Tras formar complejos con las subunidades polipeptídicas necesarias de la célula hospedadora, esta enzima replica el RNA introducido (cadena más) empezando por el extremo 3′. Así pues, la nueva cadena (cadena menos) se forma desde su extremo 5′ hacia su extremo 3′, en la misma dirección en que actúan las DNA polimerasas. Las cadenas menos recién replicadas sirven entonces de molde para la síntesis de las cadenas más, que se empaquetan en los **viriones** o partículas víricas de nueva formación. Intervienen otros mecanismos más complejos cuando el genoma de RNA es de doble cadena o está segmentado (tres o cuatro moléculas de RNA separadas) o cuando el RNA del virión es él mismo la cadena menos (en este caso, se habla de **virus de cadena negativa**).

Las replicasas de RNA conocidas carecen de actividad de corrección de pruebas, por lo que no resulta extraño que la replicación del RNA vírico tenga una tendencia a los errores muy superior a la de la replicación del DNA, y que los virus de RNA sufran mutaciones y evolucionen de manera mucho más rápida que los organismos a los que infectan. Estas características están claramente relacionadas con la patogenia vírica, en parte porque una población de virus que infecta a una planta o a un animal puede sufrir cambios con tanta rapidez que puede evadir o contrarrestar los mecanismos de defensa del hospedador.

REPLICACIÓN DE LOS GENOMAS DE LOS RETROVIRUS

Se utilizan estrategias diferentes para la replicación del genoma en la acción de los retrovirus, que reciben este nombre debido a la presencia de una enzima especial, la **transcriptasa inversa.** En esta clase de virus, el genoma de RNA de una sola cadena consigue latencia (capacidad de permanecer en una célula hospedadora durante un período de tiempo prolongado sin causar efectos patológicos) mediante la creación de una copia de DNA de sí mismo y la inserción de dicha copia en el genoma de la célula hospedadora. La copia de DNA la realiza mediante la transcriptasa inversa, una enzima multifuncional que se empaqueta en los viriones y que entra en la célula infectada junto con el genoma del virus. Como se muestra en la Figura 24.45, la transcriptasa inversa utiliza el RNA del virus como molde para la síntesis de una cadena de DNA complementaria, actuando como cebador una molécula de RNA de transferencia específica (paso 1). Una actividad RNasa H de la enzima digiere entonces parcialmente el RNA (paso 2), y la estructura forma un círculo mediante apareamiento de bases DNA-RNA (paso 3). La cadena de DNA naciente se extiende alrededor del círculo, y el tRNA cebador se elimina por la actividad RNasa H (paso 4). Se produce entonces una síntesis de desplazamiento de cadena, y se desplaza la cadena de RNA (paso 5). El círculo de DNA de doble cadena resultante se recombina entonces con un lugar en un DNA cromosómico y se inserta linealmente en ese DNA durante el proceso. En estas condiciones, el genoma provírico integrado puede persistir en un estado no infeccioso durante muchos años, con la mayoría de sus genes desactivados. Determinados factores de tensión ambientales, todavía no determinados, pueden desencadenar la escisión del genoma vírico integrado, y la vuelta del virus a un estado infeccioso.

Como se señaló en el Capítulo 22, cuando se presentó la azidotimidina (AZT), la transcriptasa inversa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus que causa el SIDA, constituye un posible objetivo evidente del tratamiento antivírico. En consecuencia, se ha dedicado una intensa investiga-

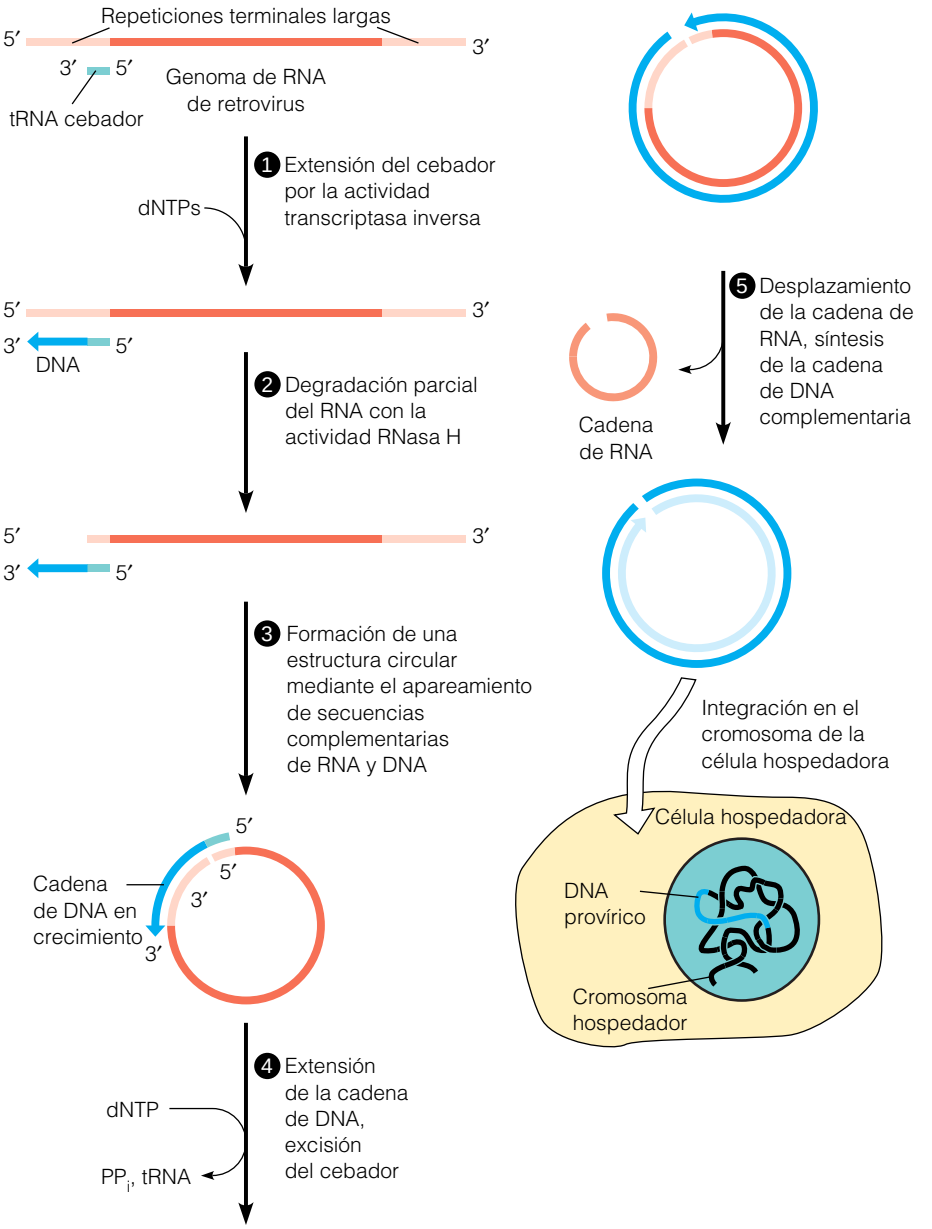


FIGURA **24.45**

Esquema simplificado del ciclo de vida de un retrovirus. El genoma de RNA contiene repeticiones terminales largas, a una de las cuales se une una molécula de tRNA. La extensión del cebador, la digestión parcial del RNA y la formación de una estructura circular generan un sustrato para una síntesis amplia de DNA. Finalmente, se forma una molécula de DNA de doble cadena circular, y éste es el sustrato probable para la integración en un cromosoma del hospedador. Algunos datos recientes sugieren que deben interactuar dos moléculas de RNA de virus en los pasos 2 ó 3.

ción a la estructura de esta enzima, con objeto de diseñar inhibidores basados en la estructura del lugar activo. La enzima es un dímero, con una subunidad de 51 kilodalton y otra de 66 kilodalton. Ambas subunidades las produce el mismo gen. La de menor tamaño, que procede de la degradación proteolítica de la subunidad mayor, se colapsa alrededor de la subunidad grande, protegiéndola de la degradación. Como se ve con las DNA polimerasas dependientes de DNA, la subunidad grande forma una "mano" que sujeta al DNA. El análisis de la estructura del dímero muestra que los lugares de la polimerasa y de la RNasa H están separados por unos 20 nucleótidos (Figura 24.46). Esta relación estructural coordina las dos actividades, produciéndose una inserción de un nuevo nucleótido simultáneamente con la escisión de un ribonucleótido de la cadena de RNA del híbrido. Una de las grandes dificultades que comporta el diseño de vacunas contra el VIH deriva de la ausencia de una exonucleasa de corrección de pruebas en la transcriptasa inversa del VIH. Ello hace que se produzcan errores

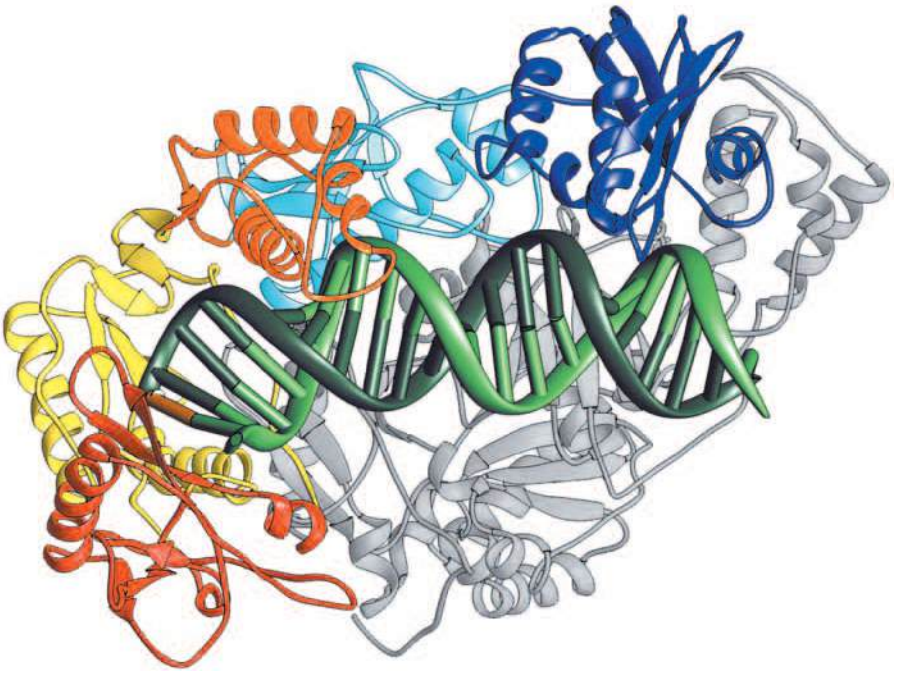


FIGURA **24.46**

Estructura de la transcriptasa inversa del VIH. La enzima se cristalizó en presencia de un complejo cebador-molde y un análogo del sustrato (un didesoxirribonucleósido trifosfato) posicionado en el extremo 3′ del cebador. La subunidad p66 se muestra en color, con los dedos en rojo, la palma en amarillo, el pulgar en naranja, un dominio de conexión en azul y el dominio RNasa H en morado. La subunidad p51 está en gris y el nucleótido sustrato (parte inferior izquierda) en marrón.

Cortesía de G. L. Verdine de H. Huang, *Science* (1998) 282:1669-1675, con permiso de *Science*.

de replicación frecuentes y una elevada tasa de mutagénesis espontánea, que permite al virus generar variantes que son resistentes a los anticuerpos contra el virus producidos mediante la vacunación.

RESUMEN

La replicación del DNA comienza en puntos fijos de los cromosomas. En la mayor parte de los casos, se forman dos horquillas de replicación, como consecuencia de la iniciación. En cada horquilla se desenrollan las cadenas del DNA original y cada una de ellas actúa como molde para la síntesis de una cadena hija, catalizada por la DNA polimerasa. Ambas cadenas conductora y retardada de una horquilla crecen en una dirección 5′→3′, lo cual implica que una de ellas debe crecer hacia atrás en segmentos cortos (fragmentos de Okazaki) a partir de la horquilla. Esa cadena, la cadena retardada, se alarga de manera discontinua, y cada segmento se inicia mediante un RNA cebador corto. Las enzimas y las proteínas que propagan una horquilla de replicación son: la DNA polimerasa, que incorpora unidades de desoxirribonucleósido 5′-monofosfato procedentes de los sustratos dNTP; las pinzas deslizantes, que potencian la procesividad de la polimerasa; los cargadores de las pinzas, que enroscan las pinzas circulares sobre el DNA y también realizan la descarga de las pinzas; las helicasas, que desenrollan las cadenas del DNA original, utilizando la energía que proporciona la hidrólisis del ATP; la primasa, que sintetiza los RNA cebadores; la proteína de unión al DNA de cadena única, que estabiliza el DNA en la conformación de una sola cadena para que actúe como molde y facilita luego la renaturalización con las cadenas nacientes a medida que se incorporan los desoxirribonucleótidos; y las topoisomerasas, que alivian las tensiones de torsión por encima de la horquilla y, en los procariotas, introducen un superenrollamiento negativo en el DNA producto. Las topoisomerasas descatenan también las moléculas de DNA hijas al final de un ciclo de replicación, lo cual permite la segregación de los cromosomas. La iniciación de la replicación del DNA de doble cadena requiere la unión de proteínas a secuencias de origen específicas, que hace que el DNA se

doble y facilite la desnaturalización local del DNA adyacente a los lugares de unión de las proteínas. Tras ello, se produce la unión y la actividad de una helicasa que desenrolla más las cadenas del DNA original y luego de una primasa, que sintetiza los RNA cebadores cortos, que son extendidos por la DNA polimerasa. La gran exactitud de la replicación del DNA se mantiene en gran parte por una actividad 3′ exonucleasa que revisa el DNA recién replicado y elimina los nucleótidos 3′ terminales mal apareados. La replicación del RNA de los virus es mucho menos exacta, debido a la falta de actividad de revisión de las replicasas de RNA.

BIBLIOGRAFÍA

General

Baker, T. A. y S. P. Bell (1998) Polymerases and the replisome: Machines within machines. *Cell* 92:295-305. Una revisión de lectura fácil de los mecanismos de elongación de la replicación, en un número especial de *Cell* dedicado a las máquinas macromoleculares en biología.

Kornberg, A. y T. A. Baker (1992) *DNA Replication*, 2.ª ed. W. H. Freeman and Co., San Francisco. Un trabajo definitivo sobre este tema.

DNA polimerasas

Kelman, Z. y M. O'Donnell (1995) DNA polymerase III holoenzyme: Structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu. Rev. Biochem.* 64:171-200. Se han realizado grandes avances desde 1995 de esta enzima con diez subunidades, pero esta revisión es completa y útil.

Patel, S. S., I. Wong, M. J. Donlin y K. A. Johnson (1991) *Biochemistry* 30:511-546. Tres artículos que describen un enfoque cinético para comprender el mecanismo de la polimerasa y su fidelidad.

Singh, K. y M. J. Modak (1998) A unified DNA- and dNTP-binding mode for DNA polymerases. *Trends Biochem. Sci.* 23:277-281. Un intento de reconciliar los estudios estructurales que señalan que las polimerasas difieren en la orientación del cebador-DNA molde, con respecto a los dedos, pulgar y palma de la enzima.

Steitz, T. A. (1999) DNA polymerases: Structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274:17395-17398. Resume las pruebas de que las cinco familias de polimerasas estructuralmente diferentes utilizan todas un mecanismo común, tal como se resume en la Figura 24.18.

Otras proteínas de la replicación

Adams, D. E., E. M. Shekhtman, E. L. Zechiedrich, M. B. Schmid y N. R. Cozzarelli (1992) The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates during replication. *Cell* 71:277-288. Pruebas definitivas del papel que desempeña una topoisomerasa de tipo II.

Bussiere, D. E. y D. Bastia (1999) Termination of DNA replication of bacterial and plasmid chromosomes. *Molec. Microbiol.* 31:1611-1618. Una revisión que resume las pruebas de que la terminación implica un antagonismo específico de la acción de la helicasa.

Froelich-Ammon, S. J. y N. Osheroff (1995) Topoisomerase poisons: Harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J. Biol. Chem.* 270:21429-21432. Una revisión de las topoisomerasas como fármacos antibacterianos y antineoplásicos.

Karpel, R. L. (1990) T4 bacteriophage gene 32 protein. En: *The Biology of Non-Specific DNA-Protein Interactions*, editado por A. Rezvin, pp. 103-130. CRC Press, Boca Raton, Fla. Una revisión detallada de esta importante proteína.

Lohman, T. M. y K. P. Bjornson (1996) Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu. Rev. Biochem.* 65:169-204. Aspectos cinéticos y del mecanismo de acción de la helicasa.

Lohman, T. M. y M. E. Ferrari (1994) *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein: Multiple DNA-binding modes and cooperativities. *Annu. Rev. Biochem.* 63:527-570. La SSB de *E. coli* es sorprendentemente diferente de la existente en T4, la proteína del gen 32.

Lohman, T. M., K. Thorn y R. D. Vale (1998) Staying on track: Common features of DNA helicases and molecular motors. *Cell* 93:9-12. Las proteínas que se mueven a lo largo del DNA se parecen mecánicamente a otras proteínas que producen movimientos físicos dentro de las células.

Nash, H. A. (1998) Topological nuts and bolts. *Science* 279:1490-1491. Comentario a dos artículos en el mismo número de *Science* que describen la estructura cristalina y el mecanismo de la topoisomerasa I del ser humano.

Pennisi, E. (1996) Premature aging gene discovered. *Science* 272:193-194. Un artículo de noticias que describe el descubrimiento de que el síndrome de Werner es consecuencia de un gen de la helicasa defectuoso.

Pulleyblank, D. E. (1997) Of topo and Maxwell's dream. *Science* 277:648-649. Comentario de los hallazgos sorprendentes que se exponen en el mismo número de *Science*, de que las topoisomerasas de tipo II tienen una capacidad misteriosa para desenmarañar las moléculas de DNA, en lugar de alcanzar un equilibrio de las distribuciones de topoisomerasas.

Sancar, A. y J. E. Hearst (1993) Molecular matchmakers. *Science* 259:1415-1420. Esta revisión describe una clase de proteínas que utilizan la energía del ATP para producir la unión de proteínas específicas. La DNA polimerasa replicativa y su proteína asociada de pinza de deslizamiento se asocian por la acción de igualadores.

Turner, J., M. M. Hingorami, Z. Kelman y M. O'Donnell (1999) The internal workings of a DNA polymerase clamp-loading machine. *EMBO J.* 18:771-783. Una revisión actualizada de los mecanismos de carga de la pinza.

Wang, J. C. (1996) DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 65:635-692. Una revisión completa y bastante reciente.

Iniciación de la replicación del DNA

Baker, T. A. y S. H. Wickner (1992) Genetics and enzymology of DNA replication in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 26:447-477. Una revisión general, pero que incide principalmente en la fase de iniciación.

Replicación del DNA eucariota

Bambara, R. A., R. S. Murante y L. A. Henricksen (1997) Enzymes and reactions at the eukaryotic DNA replication fork. *J. Biol. Chem.* 272:4647-4650. Semejanzas y diferencias entre los mecanismos de elongación de procariotas y eucariotas.

Cook, P. R. (1999) The organization of replication and transcription. *Science* 284:1790-1795. Un argumento convincente de que las DNA y RNA polimerasas están organizadas dentro de las células en "fábricas" multiproteicas a partir de las cuales se delinean los DNA moldes.

Waga, S. y B. Stillman (1998) The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 67:721-752. Una comparación actual de la elongación de la cadena en la replicación procariota y eucariota.

Wold, M. S. (1997) Replication protein A: A heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 66:61-92. Las SSB eucariotas son bastante diferentes de la gp32 de T4, prototipo que se describe en este capítulo.

Fidelidad de la síntesis de los ácidos nucleicos

Goodman, M. F. (1997) Hydrogen bonding revisited: Geometric selection as a principal determinant of replication fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10493-10495. Comentario sobre el artículo de investigación en el mismo número de la revista, que describe la síntesis de DNA realizada con un análogo de dNTP que no forma enlaces de hidrógeno.

Goodman, M. F. y D. K. Fygenson (1998) The biochemical basis of mutation. *Genetics* 48:1475-1488. Una revisión reciente con buenas referencias.

Jackson, A. L. y L. A. Loeb (1998) The mutation rate and cancer. *Genetics* 148:1483-1490. Pruebas de que se genera un fenotipo mutador en las células destinadas a convertirse en células cancerosas.

Kunkel, T. A. (1992) DNA replication fidelity. *J. Biol. Chem.* 267:18251-18254. Una revisión breve a cargo de otra autoridad en el tema.

Transcriptasa inversa

Kohlstaedt, L. J., J. Wang, J. M. Friedman, P. A. Rice y T. A. Steitz (1992) Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256:1783-1790. La primera determinación estructural de una DNA polimerasa distinta de la polimerasa I de *E. coli*.

Peliska, J. A. y S. J. Benkovic (1992) Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 258:1112-1118. Un análisis del mecanismo de esta importante enzima.

Temin, H. A. (1993) Retrovirus variation and reverse transcription: Abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Science* 259:6900-6903. Uno de los codescubridores de la transcriptasa inversa argumenta que la variabilidad genética del VIH se debe a algo más que a la simple falta de una exonucleasa de corrección de pruebas.

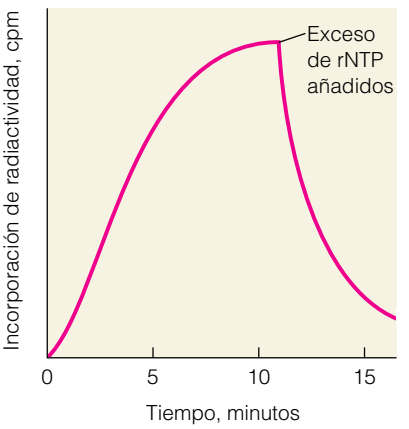
PROBLEMAS

1. Describa un enfoque experimental para determinar la *procesividad* de una DNA polimerasa, es decir, el número de nucleótidos incorporados por cadena por episodios de unión de la polimerasa.

*2. Tras la propuesta de Okazaki del crecimiento discontinuo de la cadena de DNA, hubo una gran controversia respecto a si las dos cadenas del DNA se sintetizan de manera discontinua o ello sólo ocurre en la cadena retardada. Evidentemente, no es necesario que la cadena conductora se sintetice en fragmentos, pero muchos investigadores observaron que los fragmentos de DNA con marcaje de pulso hibridaban con ambas cadenas del DNA original. Esta observación indicaba que las dos cadenas originales actuaban como molde para la síntesis de fragmentos cortos de DNA. Proponga un mecanismo alternativo mediante el cual la replicación de la cadena conductora genere fragmentos cortos y proponga una prueba experimental para su sugerencia.

3. La densidad de flotación del DNA puede aumentarse mediante la incorporación de isótopos pesados estables, como ^{15}N, o de análogos de bases, como el 5-bromouracilo. En este problema se le pide que calcule el incremento de densidad generado con cada técnica. En todos los cálculos la densidad del DNA de *E. coli* "ligero" es 1.710 g/mL. El contenido de G + C es 51 mol % (es decir, 51 moles de G + C por 100 moles de nucleótidos del DNA). Los pesos moleculares de las sales de cesio de los nucleótidos son los siguientes: dAMP, 445; dTMP, 436; dGMP, 461; dCMP, 421; 5-bromo-dUMP, 501.
   (a) Calcule la densidad de flotación del DNA de *E. coli* cuando todos los átomos de ^{14}N se sustituyen por átomos de ^{15}N.
   (b) Calcule la densidad de flotación del DNA de *E. coli* cuando todos los residuos de timina se sustituyen por 5-bromouracilo.

4. Se añadió una mezcla de cuatro ribonucleósidos trifosfato marcados en α con [^{32}P] a células bacterianas permeabilizadas, que estaban replicando el DNA, y se efectuó un seguimiento de la incorporación en sustancias de alto peso molecular a lo largo del tiempo, con los resultados que se muestran en el gráfico. A los 10 minutos de incubación se añadió un exceso de 1000 veces, de ribonucleósidos trifosfato sin marcar, con los resultados que se presentan en el gráfico.



   (a) ¿Por qué se añadió el exceso de rNTP sin marcar?
   (b) ¿Cómo podría determinarse que la radiactividad se incorpora en forma de ribonucleótidos en vez de proceder de

una reducción a desoxirribonucleótidos seguida de la incorporación?
(c) ¿Qué información aporta el experimento respecto al proceso de replicación del DNA?

5. Los residuos de desoxiadenilato en el DNA sufren una desaminación con bastante facilidad, al igual que ocurre con los residuos de desoxicitidilato.
(a) ¿Cuál es el producto de la desaminación del dAMP?
(b) Se sabe que el producto de desaminación forma apareamiento de bases con A, C o T. ¿Cuáles serían las consecuencias genéticas de que este lugar desaminado del DNA no fuera reparado y de que se apareara con C en el siguiente ciclo de replicación?

6. El cromosoma de *E. coli* mide 1.28 mm. En condiciones óptimas, el cromosoma se replica en 40 minutos.
(a) ¿Qué distancia recorre una horquilla de replicación en 1 minuto?
(b) Si el DNA que se replica está en la forma B (10.4 pares de bases por vuelta), ¿cuántos nucleótidos se incorporan en 1 minuto en una horquilla de replicación?
(c) Si las células humanas en cultivo (como las células HeLa) replican 1.2 m de DNA durante una fase S de 5 horas y a una velocidad de la horquilla de una décima parte de la observada en *E. coli*, ¿cuántos orígenes de replicación deben contener las células?
(d) ¿Cuál es la distancia promedio, en kilopares de bases, entre estos orígenes?

7. La DNA ligasa es capaz de relajar el DNA circular superenrollado en presencia de AMP pero no en su ausencia.
(a) ¿Cuál es el mecanismo de esta reacción y por qué depende del AMP?
(b) ¿Cómo podría determinarse que el DNA superenrollado se ha relajado realmente?

*8. Un artículo reciente indica que, en las células de los mamíferos, los genes que se expresan en una determinada célula se replican durante la primera mitad de la fase S, y los genes que no se expresan en esa célula se replican en la segunda mitad de la fase S. Describa brevemente un experimento que pudiera conducir a esta conclusión.

9. Aunque las DNA polimerasas requieren un molde y un cebador, se observó que el siguiente polinucleótido de cadena única actuaba como sustrato de la DNA polimerasa en ausencia de otro DNA adicional.

3′ HO-ATGGGCTCATAGCCGGAGCCCTAACC-
GTAGACCACGAATAGCATTAGG-p 5′

Indique la estructura del producto de esta reacción.

10. Recientemente se ha observado que la actividad 3′ exonucleasa de la DNA polimerasa I de *E. coli* no discrimina entre los nucleótidos con un apareamiento de bases correcto o incorrecto en el extremo 3′, y los nucleótidos con apareamientos de bases correctos e incorrectos se reparan a tasas iguales. ¿Cómo puede reconciliarse esta observación con el hecho de que la actividad 3′ exonucleasa aumente la exactitud con la que se copia el molde de DNA?

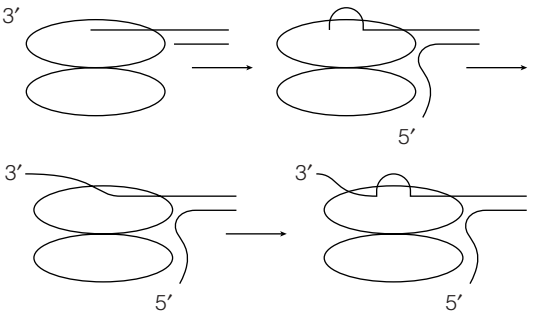
11. La 2′,3′-didesoxiinosina ha sido autorizada como fármaco contra el VIH. Proponga un mecanismo mediante el cual esta sustancia pudiera bloquear la proliferación del virus del SIDA.

12. Los mutantes de células de mamíferos resistentes a la afidicolina presentan con frecuencia alteraciones de la estructura de la DNA polimerasa α que hacen que esta enzima no sea sensible a la inhibición. Sin embargo, algunas células mutantes presentan alteraciones, no en la DNA polimerasa sino en la ribonucleótido reductasa. ¿Cómo podría un cambio de esta última enzima causar un fenotipo resistente a la afidicolina?

13. El cromosoma de *E. coli* tarda 40 minutos para su replicación completa, incluso en una célula con una nutrición óptima. Sin embargo, las células bacterianas pueden dividirse con una frecuencia de hasta una vez cada 20 minutos. ¿Cómo pueden dividirse las células, aparentemente, con mayor rapidez con la que se copia su DNA?

*14. El DNA superenrollado es más compacto que el DNA relajado para el mismo peso molecular, y ello hace que el DNA superenrollado tenga una mayor movilidad electroforética. ¿Cómo se explica, pues, que el DNA superenrollado positivamente migre con mayor lentitud que el DNA relajado en el experimento que se muestra en la Figura 24.29? (Nota: Lea Herramientas de la Bioquímica 24B antes de intentar responder a esta pregunta.)

15. Una alternativa al modelo que se presenta en la Figura 24.27 para la acción de las helicasas homodímeras es un modelo de "avance de gusano". En este modelo, la subunidad unida al DNA se mueve hacia delante unos pocos pares de bases, desenrollándolo al avanzar, y con el extremo 3′ unido a esa subunidad según se mueve hacia el extremo 5′ de la cadena unida. A continuación, la hidrólisis del ATP desencadena un cambio conformacional que conduce a la liberación del extremo 3′ del DNA sin desenrollar, de forma que el proceso puede repetirse como se muestra.



Identifique una diferencia entre este modelo y el de mano sobre mano de la Figura 24.27 que pueda utilizarse experimentalmente para distinguir los dos modelos.

16. Proponga un mecanismo mediante el cual una topoisomerasa de tipo II pueda utilizar la energía de la hidrólisis del ATP para rastrear una molécula grande de DNA y, de esta forma, deducir que la enzima catalizará en gran medida reacciones de "desenmarañamiento" (descatenación y desanudación).

17. La naturaleza exponencial de la PCR permite incrementos espectaculares de la abundancia de una secuencia de DNA que se amplifica. Considere una secuencia de DNA de 10 kpb en un genoma de 10^{10} pares de bases. ¿Qué fracción del genoma representa esta secuencia, es decir, cuál es la abundancia fraccionaria de esta secuencia en el genoma? Calcule la abundancia fraccionaria de esta secuencia diana tras 10, 15 y 20 ciclos de PCR, comenzando con DNA que representa el genoma completo y suponiendo que en el proceso no se amplifican otras secuencias del genoma.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 24A

Reacción en cadena de la polimerasa

Tal como comentaremos en el Capítulo 25, la clonación génica mediante técnicas de DNA recombinante revolucionó la biología a mediados de los años 1970, al permitir a los investigadores aislar y amplificar genes individuales para el análisis de su secuencia, expresión y regulación. La clonación requiere células vivas, en las que han de introducirse las moléculas de DNA para la amplificación. Una técnica igualmente revolucionaria fue la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR),** presentada en 1987. La PCR permite realizar la amplificación in vitro de muestras de DNA extraordinariamente pequeñas, sin necesidad de una transferencia previa a células vivas. Esta técnica ha facilitado el análisis de los genes eucariotas, ya que evita parte de los problemas que comporta la clonación de DNA procedente de genomas muy grandes. Además, esta técnica tiene docenas de aplicaciones prácticas.

La PCR requiere el conocimiento de las secuencias que flanquean la región a amplificar. Se producen oligonucleótidos complementarios de estas secuencias mediante síntesis química automatizada y se utilizan como cebadores en una serie especial de reacciones catalizadas por la DNA polimerasa (Figura 24A.1). En primer lugar, el DNA que contiene las secuencias a amplificar se desnaturaliza mediante calor y luego se alinea con los cebadores, que se encuentran presentes en exceso (pasos 1 y 2). A continuación, se realiza la extensión de la cadena por la polimerasa a partir de los extremos del cebador (paso 3). Luego, se aplica un segundo ciclo de desnaturalización por calor, alineado, y extensión del cebador. Con el empleo de una forma termoestable de DNA polimerasa, la ***Taq* polimerasa,** procedente de una bacteria que vive a temperaturas altas (en aguas termales), se evita la necesidad de añadir más polimerasa en cada ciclo, puesto que la enzima no se inactiva a la temperatura de desnaturalización del DNA. Este ciclo se repite 30 veces o más en un dispositivo de regulación automática de la temperatura, de manera que en cada ciclo aumenta la abundancia de las dobles cadenas de DNA unidas por los cebadores oligonucleótidos. Al final del ciclo III se han formado dos moléculas de este tipo, y su número se duplica con cada ciclo sucesivo. Después de 32 ciclos hay alrededor de 1000 millones de copias (para ser exactos 2^{n-1}, en donde n es el número de ciclos).

Se han desarrollado innumerables aplicaciones de esta técnica, entre ellas los análisis forenses, en los que puede amplificarse el DNA a partir de muestras extraordinariamente pe-

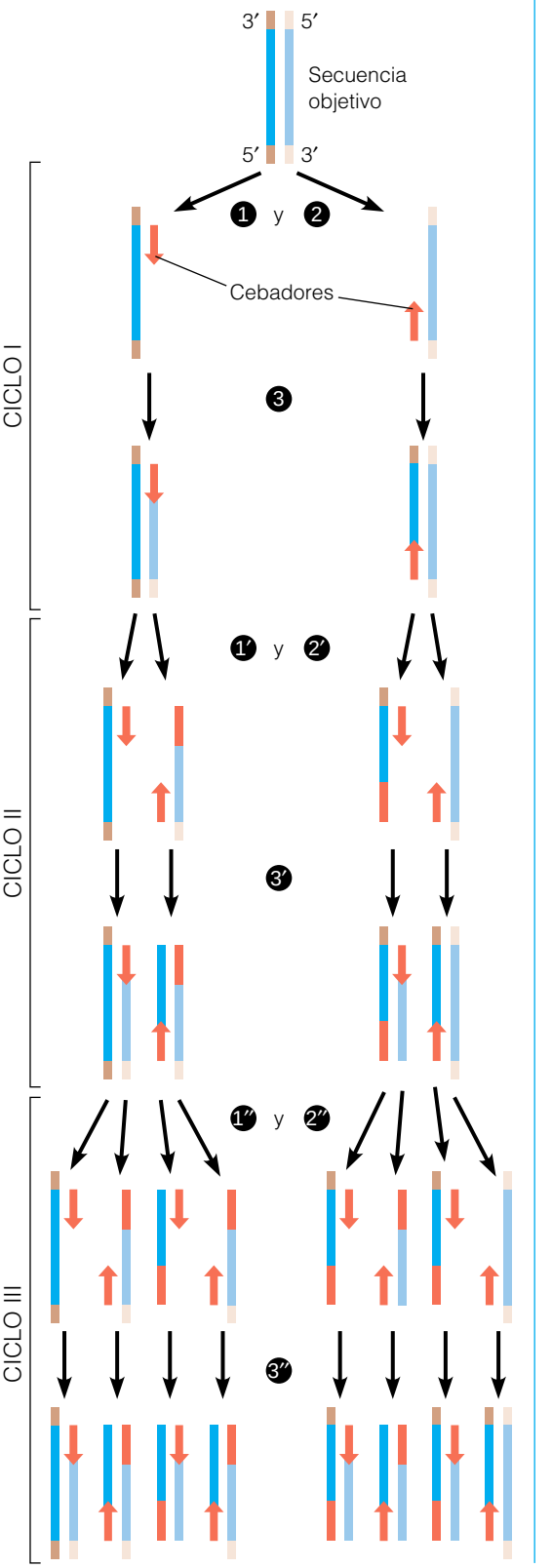


FIGURA **24A.1**

Tres ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa. Un segmento de la región que se indica en azul se amplifica, mediante el empleo de cebadores (rojo) que son complementarios a los extremos del segmento azul. Obsérvese el carácter exponencial del proceso de amplificación.

queñas de material biológico (por ejemplo, sangre, semen o pelo) para la identificación de los sospechosos de haber cometido delitos o de los padres en los litigios de paternidad). El campo de la "antropología molecular" se ha desarrollado a partir de la PCR y el análisis de secuencias del DNA mitocondrial humano, y sus resultados se utilizan para formular modelos de la evolución humana. Existe un campo comparable de "arqueología molecular", en el que se extraen cantidades mínimas de DNA de muestras biológicas que se han conservado durante mucho tiempo como organismos congelados en el hielo o insectos atrapados en ámbar. En 1998 se presentó una comunicación de gran interés histórico que describía el análisis por PCR de los descendientes de Thomas Jefferson y que mostraba que nuestro tercer presidente o un pariente cercano era el padre de, al menos, un hijo de Sally Hemings, una de sus esclavas. El DNA procedía de personas vivas, pero los resultados condujeron a conclusiones históricas importantes. La PCR se utiliza en microbiología ambiental para detectar poblaciones microbianas mediante la búsqueda de secuencias específicas del organismo que se intenta identificar. De la misma forma, la PCR puede usarse para el diagnóstico de las infecciones microbianas o víricas. La PCR se emplea también en el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas, usando cebadores específicos para la alteración de la secuencia génica responsable de una enfermedad. De forma análoga, las mutaciones de oncogenes que conducen al cáncer pueden detectarse mediante PCR, y ello ha permitido el análisis amplio de la secuencia de alteraciones genéticas que conducen desde las lesiones precancerosas al tumor metastásico.

Sin embargo, la PCR no está exenta de problemas técnicos. Así, por ejemplo, dado que algunas DNA polimerasas termoestables, como la *Taq* polimerasa que se utiliza habitualmente, carecen de 3′ exonucleasa de corrección de pruebas, la síntesis de DNA en la PCR puede ser relativamente inexacta. Ello no suele constituir un problema si lo que se desea es secuenciar el producto de la PCR, puesto que los errores se distribuyen de manera uniforme en toda la longitud del DNA que se amplifica, y la abundancia de mutaciones en cada lugar es demasiado baja para poder influir en las operaciones de secuenciado. También se dispone en la actualidad de polimerasas con corrección de pruebas procedentes de organismos termófilos. Sin embargo, deben tomarse precauciones (como por ejemplo, limitar el número de ciclos) si se desean clonar los productos de la PCR, con la intención de clonar una secuencia natural. Otro problema es el de la gran sensibilidad de la técnica, que puede llevar a la amplificación de cantidades minúsculas de DNA contaminantes existentes en la muestra. De nuevo, pueden utilizarse diversos controles y modificaciones de la técnica para reducir al mínimo este problema. Finalmente, señalamos que la velocidad y sensibilidad de la PCR ha aumentado mucho al realizar el proceso en forma de flujo continuo en un chip (Figura 24A.2).

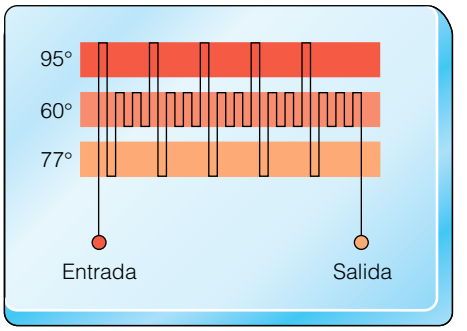


FIGURA **24A.2**

PCR de flujo continuo en un chip. Se graba un canal en un chip de vidrio. El fluido que pasa a través del canal atraviesa zonas a 95°C (fusión), 77°C (extensión de la cadena) y 60°C (alineación). El paso de una muestra de un pocillo de entrada al chip a través de las tres zonas define un ciclo térmico en la PCR de múltiples ciclos. Con este chip, una muestra de DNA de 10 μL puede someterse a 20 ciclos de PCR en menos de 5 minutos.

Cortesía de M. U. Kopp, A. J. de Mello y A. Manz, *Science* (1998) 280:1046-1048. © 1998 AAAS.

Bibliografía

Erlich, H. A. y N. Arnheim (1992) Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annu. Rev. Genet.* 26:479-506. Una revisión realizada por dos investigadores que desarrollaron la técnica.

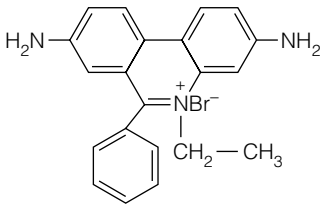
Mullis, K., F. Ferre y R. Gibbs, eds. (1994) *The polymerase chain reaction.* Boston: Birkhäuser. El autor senior de esta serie de revisiones del tamaño de un libro es el inventor de la PCR.

Nowak, R. (1994) Forensic DNA goes to court with O. J. *Science* 265:1352-1354. Un artículo de noticias en que se describe el uso de la PCR y los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (véase Herramientas de la Bioquímica 25D) en su aplicación específica al juicio por asesinato de O. J. Simpson.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 24B

Análisis electroforético en gel bidimensional de topoisómeros del DNA

Cuando se analizan moléculas de DNA mediante electroforesis en gel de agarosa (véase Herramientas de la Bioquímica 2A), el DNA se observa en el gel mediante la inmersión de éste en un colorante fluorescente, como el **bromuro de etidio,** o EtBr.



Bromuro de etidio (EtBr)

Este colorante se une al DNA de doble cadena mediante **intercalación;** la molécula es plana y tiene aproximadamente el tamaño de un par de bases, por lo que puede acoplarse entre dos pares de bases de DNA adyacentes, separándolas. La intercalación aumenta notablemente la fluorescencia de la molécula, y puede verse el DNA mediante la observación de un gel tratado con EtBr bajo luz ultravioleta.

Pero hay otra forma en que se utilizan los intercaladores como el EtBr en la electroforesis. Si están presentes *durante* la electroforesis, pueden facilitar la distinción de los topoisómeros. Al forzar la separación de pares de bases adyacentes, el EtBr tiende a desplegar la doble hélice. En el DNA en forma B, con alrededor de 10 pares de bases por vuelta, dos pares de bases adyacentes presentan una rotación uno respecto al otro de 36° (360° para un giro completo). Una molécula de EtBr crea un desenrollamiento de unos 27°, que influye en las propiedades hidrodinámicas del DNA circular de la siguiente forma. Recuérdese del Capítulo 4 que *L*, el número de ligazón, es la suma de las vueltas creadas por el giro y el retorcimiento. La fijación de EtBr reduce el número de vueltas necesarias para crear una doble cadena sin constricción; reduce *T*, el giro. Dado que *L* no se modifica a no ser que se rompa la molécula, el componente de retorcimiento se ve afectado: el número de vueltas dedicadas al retorcimiento aumenta. En otras palabras, el EtBr hace aumentar la superhelicidad positiva de la molécula. Así pues, una molécula infraenrollada tiende a relajarse, puesto que pierde superhelicidad negativa, mientras que una doble hélice cerrada relajada presenta superenrollamiento, y una molécula superenrollada aumenta aún más su superenrollamiento. La movilidad electroforética a través del gel está en función de lo compacta que sea la molécula que migra, de tal manera que una doble hélice relajada es menos compacta y, por tanto, migra más lentamente.

Puede analizarse la distribución de los topoisómeros en un DNA circular mediante una electroforesis en gel bidimensional, utilizando como primera dimensión el desplazamiento en un gel de agarosa ordinario, y como segunda dimensión el desplazamiento en presencia de EtBr o de un colorante de intercalación semejante. Para el DNA del plásmido que se muestra en la Figura 24B.1a, estos topoisómeros incluyen dobles cadenas con mellas, que están relajadas tanto si hay EtBr como si no lo hay y que migran lentamente en ambas dimensiones. Para las moléculas con un ligero superenrollamiento, hay topoisómeros sobreenrollados e infraenrollados. Así por ejemplo, la especie marcada con 1 estaba inicialmente sobreenrollada y se ha enrollado más, como demuestra su movimiento en la segunda dimensión. La especie 6, en cambio, estaba infraenrollada y se desplaza más lentamente en la segunda dimensión, a pesar de que 1 y 6 tenían únicamente el mismo número de vueltas de superhélice (writhe). Las demás especies estaban presentes inicialmente tan sólo como topoisómeros infraenrollados. En la parte inferior (especies 18 y 22 y próximas) se encuentran los topoisómeros que no pudieron separarse en la primera dimensión, pero que se separan cuando se reduce el writhe negativo en la segunda dimensión.

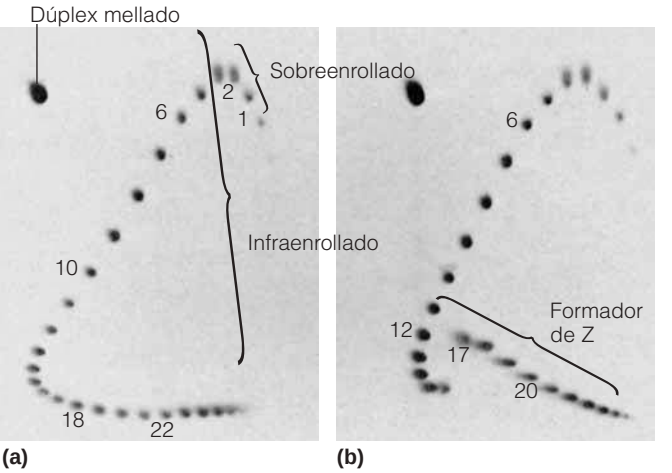


FIGURA **24B.1**

Análisis electroforético en gel de agarosa bidimensional de topoisómeros de DNA circular. Se empleó el mismo plásmido para ambos análisis, excepto que el plásmido en **(b)** tenía un inserto de 16 pares de bases que forma Z-DNA a izquierdas.

Cortesía de J. L. Peck y J. C. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) 80:6206-6210. © 1983 AAAS.

En la Figura 24B.1b el plásmido analizado es idéntico, excepto por la inserción de una secuencia G-C alternada de 16 pares de bases que, en determinadas condiciones, forma el Z-DNA (a izquierdas). La intercalación del colorante hace volver a este DNA a una hélice a derechas y ello afecta al número de vueltas de superhélice. Los topoisómeros marcados con 17 y 20 son especies que contenían el inserto con abundante GC en la conformación Z antes de la administración del colorante de intercalación.

Bibliografía

Peck, L. J. y J. C. Wang (1983) Energetics of B-to-Z transitions in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:6206-6210.

CAPÍTULO 25

Reestructuración de la información: restricción, reparación, recombinación, reordenamiento y amplificación

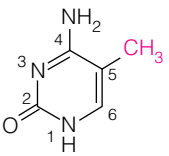
NUESTRA ATENCIÓN SE DESPLAZA AHORA DESDE EL **DNA** COMO *MOLDE* DE SU propia replicación, al DNA como *sustrato* de numerosos procesos que clasificamos como **reestructuración de la información**. Algunos de estos procesos conservan el contenido de la información del DNA mediante la reparación de los daños que éste sufre, otros son mecanismos que utilizan los organismos para su defensa, los hay que intervienen en el redireccionamiento del metabolismo celular por los parásitos, otros controlan la expresión o diferenciación de los genes normales, algunos introducen diversificación genética, y otros constituyen respuestas a las tensiones ambientales. Algunos de los procesos participan en varias de estas funciones. Así, por ejemplo, la recombinación genética introduce diversidad en una especie, pero también constituye una respuesta a la tensión ambiental, una respuesta que promueve la supervivencia de un organismo individual.

Desde el punto del vista del bioquímico, la reestructuración de la información es menos accesible que la replicación del DNA. La replicación es una ruta central que constituye un importante fenómeno metabólico al menos en una parte de la vida de todas las células, y las actividades de las enzimas y las proteínas que intervienen en ella son relativamente elevadas. Como consecuencia de ello, su descubrimiento y caracterización, aunque elegantes, fueron bastante directos. En cambio, la reestructuración de la información se realiza mediante rutas cuantitativamente secundarias, con una cantidad de conversión de masa muy inferior por célula. La detección de las enzimas que participan en este proceso resulta, pues, más difícil. Así, por ejemplo, aunque la metilación del DNA tiene profundos efectos sobre la integridad o la expresión de los genes, la metilación puede afectar tan sólo a uno o unos pocos lugares de cada gen. Dado los bajos niveles de actividades con que se produce, el análisis de la metilación del DNA requiere técnicas experimentales mucho más sensibles que las utilizadas para el análisis de la replicación del DNA.

Los procesos que consideraremos en este capítulo son los siguientes: (1) restricción y modificación, que son mecanismos de protección de las células procariotas, pero que tienen importancia también porque proporcionan reactivos para la tecnología del DNA recombinante; (2) respuestas metabólicas a la lesión

estructural del DNA, principalmente la mutagénesis y la reparación; (3) recombinación, mediante la cual los contenidos de un genoma se redistribuyen, por ejemplo, durante la reproducción sexual; (4) reordenamientos génicos, como las transposiciones de segmentos de DNA de un lugar de integración cromosómico a otro y la unión de segmentos de DNA de partes distantes de un genoma; y (5) amplificación génica, un aumento del número de copias de segmentos concretos de DNA, que se produce como un proceso normal del desarrollo y como una respuesta a las tensiones ambientales (Figura 25.1). En conjunto, estos procesos son esenciales para la supervivencia de las células. En un sentido más amplio, la recombinación y los reordenamientos génicos son el origen de la mayor parte de la variabilidad genética en una población de células u organismos y, junto con la mutación, constituyen la base de los cambios evolutivos. Otros procesos importantes de reestructuración de la información, que no se producen a nivel del DNA, se describen en otras partes de este libro. Entre ellos se encuentran el corte y empalme alternativo y la revisión del RNA (véase el Capítulo 28).

Metilación del DNA

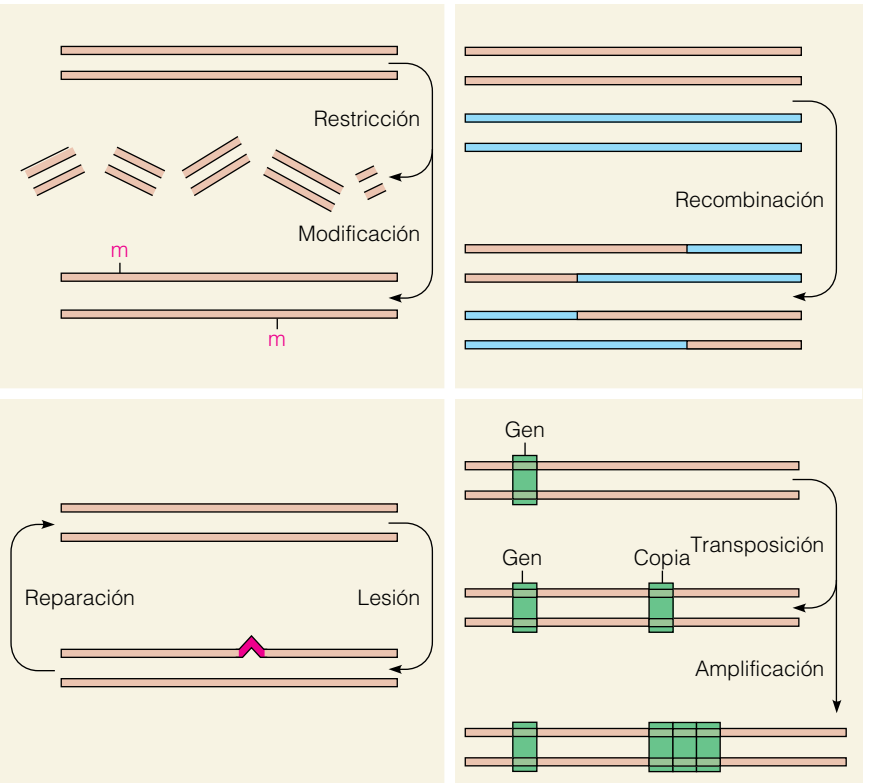


5-Metilcitosina (mC)

Antes de examinar los procesos de reestructuración de la información, revisaremos la existencia y síntesis de las bases metiladas del DNA. La metilación subyace en varios procesos biológicos importantes, como la restricción y la modificación, la corrección de errores de mal apareamiento (un proceso de reparación del DNA), y aspectos del control de la expresión génica en los eucariotas. Recuérdese del Capítulo 21 que la *S*-adenosilmetionina (AdoMet) es el sustrato de la metilación tanto del RNA como del DNA. La metilación se produce a nivel de los polinucleótidos, con la transferencia de un grupo metilo desde la AdoMet a un residuo de nucleótido.

FIGURA **25.1**

Resumen de los principales procesos en la reestructuración de la información.



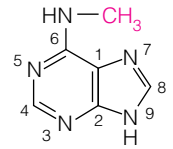
La única base metilada que se encuentra en el DNA de los eucariotas es la 5-metilcitosina (mC), que presenta una abundancia de un 3% a un 5% la de la citosina en el DNA de la mayor parte los animales y mucha mayor abundancia en el DNA de algunas plantas, mientras que está prácticamente ausente de otros DNA, como los de los insectos. Desde el punto de vista del mecanismo, la síntesis de un residuo de mC es semejante a la reacción de la timidilato sintasa (véase el Capítulo 22). Un tiol de cisteína en la enzima ataca al C-6 del anillo de pirimidina de la citosina, que activa a su vez el C-5 para la formación de un enlace carbono-carbono. Sorprendentemente, los estudios estructurales realizados con una DNA metilasa bacteriana han demostrado que las bases que sufren la metilación rotan completamente hacia fuera de la doble cadena de DNA y dentro de un bolsillo catalítico comprendido en la estructura enzimática (Figura 25.2). Desde esa demostración en 1994, se ha visto que otras enzimas que actúan sobre las bases del DNA sacuden la base objetivo, entre ellas otras DNA metilasas y glucosilasas, como la uracilo-DNA glucosilasa (página 1020).

En el DNA de los procariotas, las principales bases metiladas son la N^6-metiladenina (mA) y, en menor grado, la N^4-metilcitosina. Menos del 1% de las adeninas y citosinas están metiladas en los DNA de los procariotas. En las bacterias, la metilación se produce en lugares específicos. En *E. coli*, la metilación de residuos de A en la secuencia 5′—GATC—3′ interviene en la corrección del error de mal apareamiento (véase la página 1062) y participa en el control de la iniciación de la replicación del DNA. La metilación en otros lugares protege al DNA frente a la ruptura por las endonucleasas de restricción (que se describirá en el apartado siguiente). A comienzos de 1999, se publicó un descubrimiento interesante sobre la metilación del DNA bacteriano. La virulencia de *Salmonella typhimurium*, esto es, su capacidad para producir enfermedad, se encontró que dependía absolutamente de la metilación del DNA. Los mutantes *dam*$^-$ no eran virulentos, lo cual sugería que los inhibidores de la metilasa Dam podían ser antibióticos eficaces.

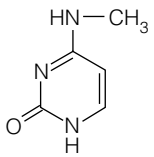
En los animales, la metilación se observa fundamentalmente en los residuos de C que están en una posición inmediatamente contigua al extremo 5′ de residuos de G, es decir, en una secuencia 5′—CpG—3′ (véase la Figura 25.3). Cuando esta C está metilada, ocurre lo mismo en la C correspondiente de la cadena complementaria. En los DNA de las plantas, la secuencia metilada es 5′—CpNpGp—3′, en donde N puede ser cualquier base.

Aunque la trascendencia biológica de la metilación del DNA en los procariotas parece en la actualidad bastante clara, no se ha definido aún su importancia en los eucariotas. Sabemos que la metilación en un lugar concreto es un fenómeno heredable. Cuando el DNA de los eucariotas se replica, una **metilasa de mantenimiento** garantiza que todos los lugares que estaban metilados en el DNA original lo estén también en el DNA hijo. El proceso se muestra en

La única base metilada del DNA de los eucariotas es la 5-metilcitosina. La base metilada predominante del DNA procariota es la N^6-metiladenina.



N^6-Metiladenina (mA)



N^4-Metilcitosina

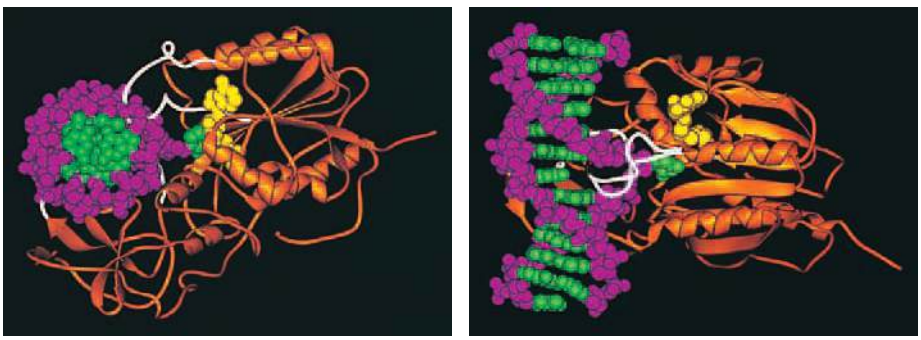


FIGURA **25.2**

Estructura de un complejo de una DNA metilasa con el DNA. La estructura se basa en la cristalografía de rayos X de un complejo ternario (diagrama de cintas) que contiene *Hha* metilasa procedente de *Haemophilus haemolyticus*. Los bucles que contienen el lugar catalítico se indican en blanco, y el resto en naranja. La *S*-adenosilhomocisteína se indica en amarillo, el armazón del DNA en fucsia y las bases en verde. En ambas imágenes se aprecia claramente la citosina base diana girada. **(a)** Imagen de la hélice vista desde arriba. **(b)** Imagen lateral desde el surco secundario.

Cortesía de S. Klimasauskas, S. Kumar, R. J. Roberts y X. Cheng, *Cell* (1994) 76:357-369, reproducido con permiso. Cell Press, Inc.

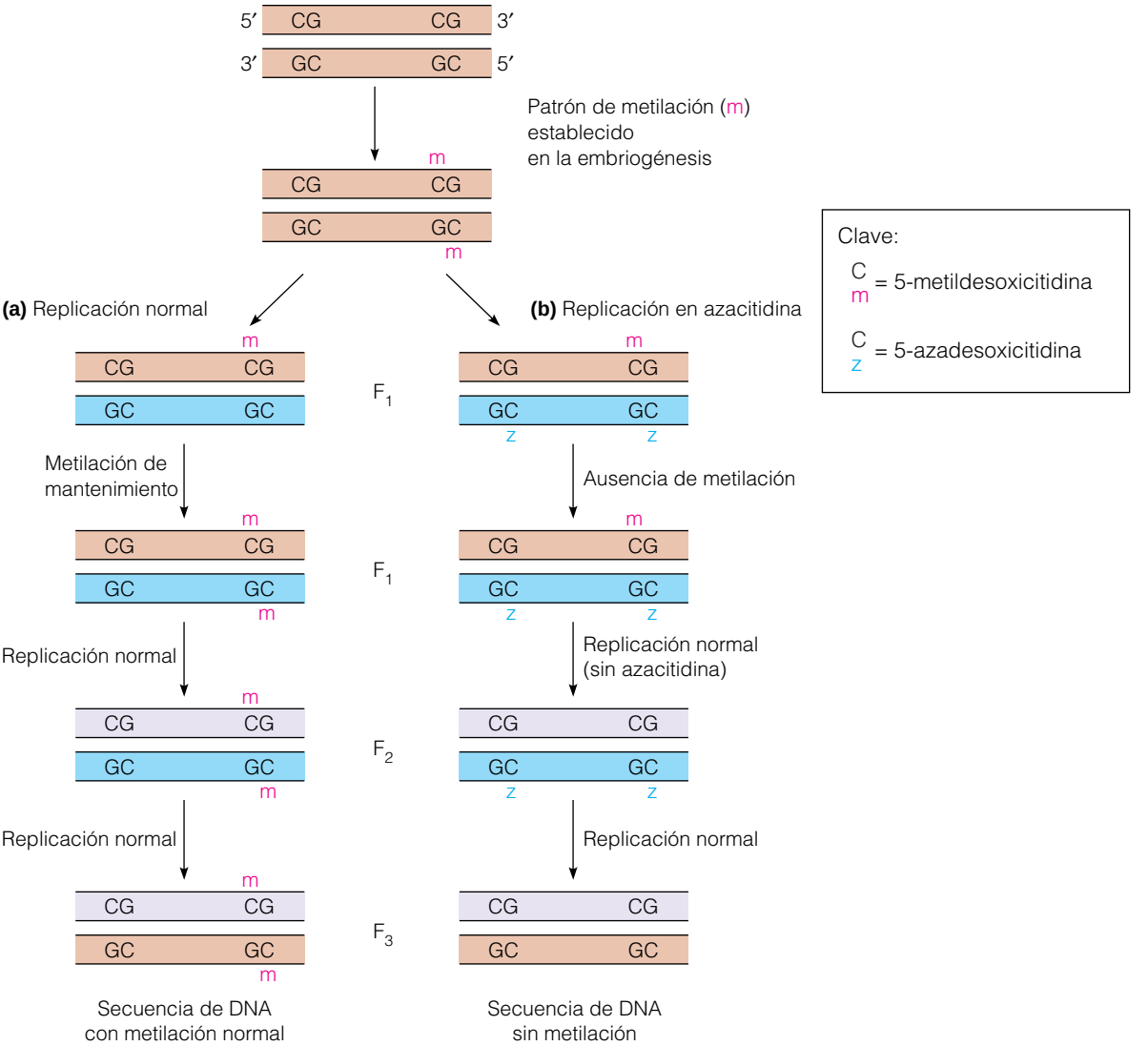
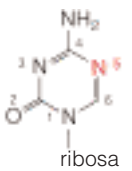


FIGURA **25.3**

Metilación de mantenimiento del DNA eucariota. La 5-azacitidina es un análogo que puede incorporarse al DNA pero no puede metilarse. En consecuencia, el crecimiento con este análogo da lugar a la desmetilación del DNA.

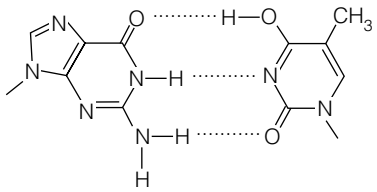


5-Azacitidina

la Figura 25.3a. Obsérvese que la metilación se produce *después* de la replicación y que los lugares no metilados en el DNA original permanecen sin metilar en el DNA hijo. No está claro aún de qué forma se seleccionan los lugares originales para la metilación durante la diferenciación embrionaria. Hay varios tipos de pruebas que sugieren que la metilación es la responsable de la inactivación de genes específicos de diversos tejidos durante el desarrollo. Así, por ejemplo, la inactivación génica puede revertirse mediante un tratamiento con **5-azacitidina**, un análogo de la citidina que se metaboliza como la citidina al análogo del dCTP, que se incorpora entonces en el DNA. Dada la sustitución de N, la posición 5 no puede metilarse y, cuando posteriormente el DNA se replica, la C que se incorpora no está metilada (véase la Figura 25.3b). El tratamiento con azacitidina puede hacer que las células de la médula ósea del adulto reactiven la síntesis de hemoglobina fetal, que normalmente queda desactivada durante el desarrollo. Se está estudiando el empleo de este análogo como tratamiento de la β-talasemia, en la que las cadenas β de globina fetal similares a la cadena γ podrían reemplazar a las cadenas β perdidas (véase el Capítulo 7).

Muchos estudios correlacionan la metilación del DNA con la detención de la expresión de genes relacionados con el desarrollo, alterando evidentemente la

estructura de la cromatina (Capítulo 28), pero continúan existiendo interrogantes al respecto. ¿Es la metilación una causa o consecuencia de la represión génica? ¿Cómo regulan los insectos sus patrones de desarrollo de la expresión génica si su DNA no está metilado? En otros organismos se ha descrito una sustitución amplia de C por mC en segmentos de DNA específicos. Así, por ejemplo, en *Neurospora*, la metilación desempeña una función en la prevención de la recombinación inadecuada entre segmentos génicos duplicados. Por último, la metilación puede estar implicada en la carcinogénesis. La desaminación de un residuo de mC del DNA crea un par de bases G-T, un suceso que puede crear una **mutación de transición GC ⟶ AT**. (Una mutación de transición cambia un par de bases purina-pirimidina (Pu-Py) a un par de bases Pu-Py diferente, mientras que una **transversión** cambia un Pu-Py en un Py-Pu.) Es posible que no sea una coincidencia el que la mayor parte de las alteraciones de la secuencia de los DNA de las células tumorales impliquen transiciones GC ⟶ AT.



Un par de bases G-T
(T en la forma enol poco frecuente)

Restricción y modificación

Uno de los avances más importantes de la historia reciente de la bioquímica es el descubrimiento de las **endonucleasas de restricción**, enzimas que catalizan la ruptura de la doble cadena del DNA en secuencias de bases específicas. El descubrimiento de estas enzimas se produjo gracias a la investigación de un proceso aparentemente oscuro: la **restricción y modificación inducidas por el hospedador**. Las bacterias utilizan la metilación del DNA en lugares específicos para marcar su propio DNA, y la ruptura del DNA en los mismos lugares para inactivar el DNA de los invasores, como los virus, que carecen de este marcado.

Las bacterias utilizan la restricción-modificación, que comporta cambios no heredables de la estructura del DNA, para diferenciar su propio DNA del de los invasores.

BIOLOGÍA DE LA RESTRICCIÓN Y LA MODIFICACIÓN

Aunque la restricción y la modificación se describieron por primera vez en 1952, no fue hasta el trabajo de Werner Arber en Suiza, a mediados de los años 1960, cuando se pudo aclarar la base bioquímica de estos fenómenos. La observación básica fue la siguiente. El bacteriófago λ, cuando crece en la cepa K12 de *E. coli* (a la que denominaremos K), crece bien en infecciones posteriores de la cepa K, y cada partícula de fago da origen a una **placa**. (Una placa es una zona clareada en una placa de Petri sembrada con un exceso de bacterias y un número limitado de fagos. Se debe a la multiplicación de una partícula vírica y la lisis localizada de las bacterias. Véase la Figura 25.4.) Sin embargo, el fago crecía mal en la cepa B de *E. coli*, de tal manera que tan sólo un 0.01% de los fagos infectantes daban lugar a una placa. La mayor parte del DNA del fago infectante se degradaba en estas infecciones no productivas.

Los fagos purificados a partir de las pocas placas que se formaban eran capaces de infectar a la cepa B con una eficacia elevada. Se observó también el mismo fenómeno de forma inversa: los fagos que crecían sobre *E. coli* B infectaban la cepa K con una eficacia baja, pero las pocas placas que se formaban producían fagos que eran capaces de infectar a la cepa K con una eficacia elevada. Estos experimentos sugirieron que, aunque la mayor parte de los fagos expuestos a una nueva cepa de *E. coli* se destruían, algunos de ellos se adaptaban logrando evitar el sistema de defensa de la bacteria y pasando a ser capaces de infectar a esa cepa. Arber acuñó los términos *restricción* y *modificación* para explicar estas observaciones, y demostró que la base bioquímica de estos fenómenos es un par de enzimas específicas de cada cepa bacteriana. Cuando los fagos crecidos en la cepa K infectan la cepa B, su DNA casi siempre se degrada por una enzima de restricción específica de B, y la bacteria sobrevive. Sin embargo, la cepa B tiene

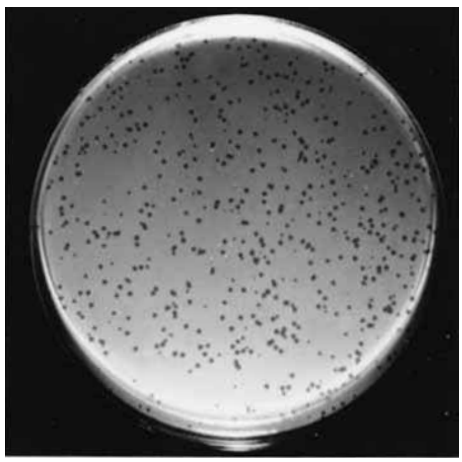


FIGURA **25.4**

Placas de bacteriófago. Se sembró una placa de Petri con muchas bacterias (aproximadamente 10^8) y un pequeño número de partículas de bacteriófago (unos 100). Cada partícula de fago genera una zona clara o placa, al infectar y lisar todas las bacterias que crecen en su proximidad.

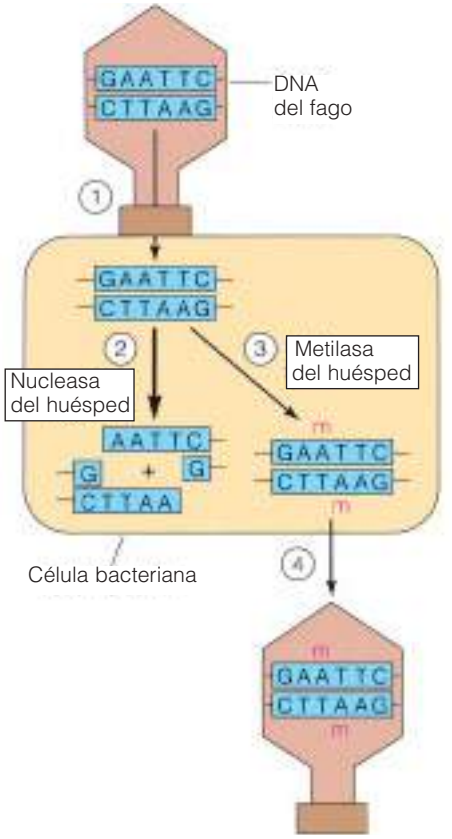


FIGURA **25.5**

Restricción y modificación inducidas por el hospedador. Un fago cuyo DNA no se ha modificado infecta a una bacteria con un sistema de restricción que reconoce la secuencia de DNA 5′—GAATTC—3′ (paso 1). La mayor parte de las moléculas de DNA del fago se fragmentan por la nucleasa de restricción (paso 2), pero las pocas que son metiladas primero en la A más interna quedan protegidas del ataque (paso 3). Los fagos que aparecen contienen DNA modificado (metilado) (paso 4). Dado que no son vulnerables a la restricción producida por la nucleasa del hospedador, no pueden superar el sistema de defensa de la bacteria cuando reinfectan a la misma cepa bacteriana.

otra enzima, que modifica su propio DNA mediante la metilación de residuos de nucleótidos específicos. Este patrón de metilación protege al DNA frente a su propia enzima de restricción específica de B.

A veces, la enzima de modificación de la cepa B metila también el DNA del fago, y en el proceso crea DNA del fago resistente a la degradación por el sistema de restricción de B. Los fagos resistentes corresponden a la pequeña proporción de fagos (0.01%) que producen placas en la cepa B. Dado que el DNA de estos fagos está ahora totalmente protegido de la restricción específica de B, todos los fagos que forman placas en B son capaces de infectar la cepa B en infecciones posteriores. Obsérvese que la restricción y la modificación son fenómenos no genéticos, por cuanto las *secuencias* de DNA del fago no se modifican. La capacidad de un fago para superar la restricción en una bacteria hospedadora concreta depende no de cambios en el genotipo del fago sino de la cepa de hospedador en la que ese fago ha crecido anteriormente. Obsérvese también que todo el DNA de una célula está sujeto a la restricción y modificación, incluyendo los DNA de transformación y de plásmidos, así como los DNA cromosómicos o del fago.

Los sistemas de restricción-modificación están muy extendidos en las bacterias. Algunos de ellos están codificados por genes cromosómicos, y otros por plásmidos. En 1970, Hamilton Smith observó que una nucleasa de restricción que estaba estudiando catalizaba la ruptura de la doble cadena del DNA en una secuencia de nucleótidos corta específica. Poco después se observó que la modificación tiene la misma especificidad de secuencia, como se esquematiza en la Figura 25.5. En este ejemplo, un nucleótido de una secuencia de seis nucleótidos es el sustrato de una DNA metilasa específica. Cuando ese lugar se metila, el DNA es resistente a la ruptura por una nucleasa que reconoce la misma secuencia de hexanucleótidos; cuando el lugar no está metilado, el DNA es vulnerable al ataque en ese lugar. En la actualidad se conocen centenares de endonucleasas de restricción que catalizan rupturas con una especificidad de secuencia de este tipo. La DNA metilasa, cuya estructura se mostró en la Figura 25.2, es parte del sistema de restricción-modificación de *Haemophilus haemolyticus*.

La importancia de estos avances radicó en que, por primera vez, los científicos podían aislar fragmentos de DNA homogéneos de una longitud definida mediante el tratamiento del DNA con una nucleasa de restricción in vitro y la resolución posterior de los fragmentos del producto de la digestión mediante electroforesis en gel. Recuérdese la utilidad de las proteasas como la tripsina, que rompen las proteínas en lugares específicos, y su utilidad en la fragmentación de las moléculas proteicas para su secuenciación. De forma análoga, los fragmentos de restricción separados mediante electroforesis (Figura 25.6) pueden colocarse de manera ordenada, para obtener mapas físicos de las moléculas de DNA; los mapas se denominan mapas de restricción, ya que muestran las localizaciones físicas de los lugares de restricción (véase Herramientas de la Bioquímica 25A). El aislamiento de estos fragmentos homogéneos hace que sea posible su amplificación mediante clonación génica.

PROPIEDADES DE LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y MODIFICACIÓN

En la actualidad diferenciamos tres tipos diferentes de sistemas de restricción-modificación, los tipos I, II y III. Cada sistema incluye dos actividades enzimáticas diferenciadas: una DNA metilasa y una endonucleasa que cataliza una ruptura de doble cadena del DNA. Las endonucleasas con especificidad de secuencia, que son las más utilizadas en biología molecular, son enzimas de tipo II. Sea cual sea su tipo, las enzimas se denominan con las tres primeras letras que

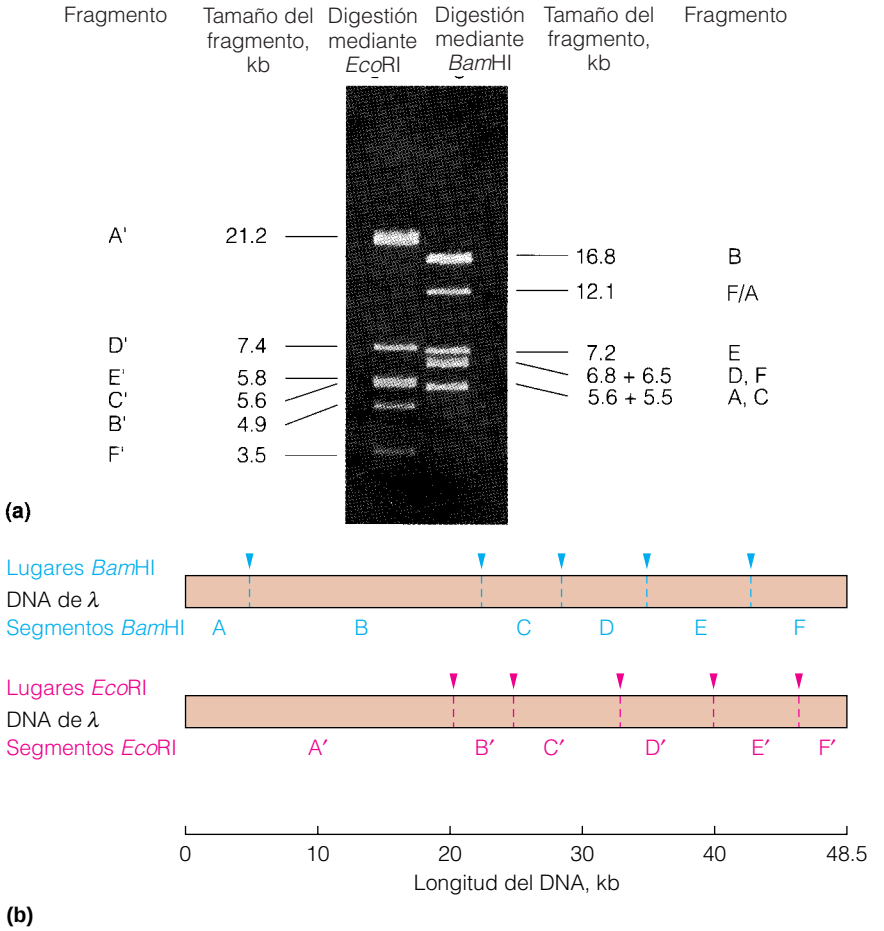


FIGURA **25.6**

Ruptura del DNA del fago λ con *Eco*RI o *Bam*HI. **(a)** Determinación experimental de patrones de ruptura. Los productos de digestión mediante restricción se someten a electroforesis en gel de agarosa, y los fragmentos se hacen visibles mediante la tinción del gel con bromuro de etidio. Obsérvese que los fragmentos de tamaños muy semejantes forman una sola banda en el gel. **(b)** Mapas de los lugares de ruptura de cada enzima en la molécula de DNA de λ de 48.5 kilobases (kb). Por convenio, se asigna a los fragmentos las letras indicadas. En este experimento, el fragmento de 12.1 kb del producto de digestión *Bam*HI procedía del ligamiento de los fragmentos A y F (terminales) mediante apareamiento de bases en sus extremos cohesivos. El cartografiado de los lugares de restricción requiere también los datos de la digestión del DNA con *Eco*RI y *Bam*HI juntas (no se muestra).

(a) Cortesía de Catherine Z. Mathews.

indican la especie bacteriana de origen y una cuarta letra que indica la cepa concreta. Así, por ejemplo, el sistema de restricción de *E. coli* K se denomina ***Eco*K**. Si se encuentra más de un sistema enzimático en una determinada cepa, las diferentes enzimas se designan con números romanos. Así, por ejemplo, ***Eco*RI** es uno de los dos sistemas de restricción conocidos de la cepa R de *E. coli*, y ***Hin*dIII** es una de las tres enzimas procedentes de la cepa d de *Haemophilus influenzae* R.

En la Tabla 25.1 se señalan las propiedades de cada uno de los tres tipos de sistemas de restricción presentados en los apartados siguientes.

Tipo I

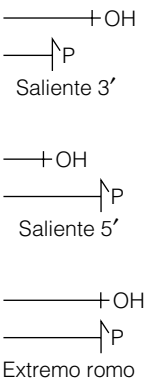
Las enzimas de tipo I tienen ambas actividades metilasa y nucleasa en una molécula proteica, que contiene tres subunidades. Una subunidad contiene la nucleasa, otra la metilasa y otra un determinante de reconocimiento de secuencia. El lugar de reconocimiento no es simétrico, y la ruptura se produce a una cierta distancia (de hasta 10 kpb) del mismo, aunque la metilación se produce en el propio lugar de reconocimiento. Para la ruptura, la enzima se mantiene unida al lugar de reconocimiento, y el DNA forma un bucle hacia fuera a su alrededor, junto con un superenrollamiento. Para cada ruptura se hidrolizan unas 10^5 moléculas de ATP. Es probable que esta energía sea necesaria para la translocación de la enzima y para el superenrollamiento del DNA. Por razones que todavía no están claras, tanto el ATP como la AdoMet son necesarios para la actividad de ruptura. La AdoMet puede ser un activador alostérico, porque no se degrada durante la reacción.

TABLA 25.1 Propiedades de los sistemas de restricción-modificación

	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Ejemplo	*Eco*B	*Eco*RI	*Eco*PI
Lugar de reconocimiento	$TGAN_8TGCT$	GAATTC	AGACC
Lugar de ruptura	Hasta 10 kpb de distancia respecto al lugar de reconocimiento	Entre G y A (ambas cadenas)	24-26 pares de bases hacia el lado 3′ del lugar de reconocimiento
Lugar de metilación	$\overset{m}{T}GAN_8TGCT$ $ACTN_8\overset{m}{A}CGA$	$GA\overset{m}{A}TTC$ $CTTA\overset{m}{A}G$	$A\overset{m}{G}ACC$ (tan sólo se metila una cadena)
¿Nucleasa y metilasa en una enzima?	Sí	No	Sí
Requisitos para la ruptura	ATP, Mg^{2+}, AdoMet	Mg^{2+} o Mn^{2+}	Mg^{2+}, AdoMet
Requisitos para la metilación	ATP, Mg^{2+}, AdoMet	AdoMet	Mg^{2+}, AdoMet

Nota: Cada base metilada se identifica con la letra m. Todas las secuencias se leen 5′ a 3′, de izquierda a derecha.

Las enzimas de restricción que resultan de mayor utilidad para los biólogos rompen las dos cadenas del DNA con una especificidad de lugar, que depende de la metilación de las bases.



Tipo II

Las nucleasas de restricción de tipo II han sido de gran utilidad en la investigación, ya que la mayor parte de ellas cortan dentro de la secuencia de reconocimiento, con lo que hacen que la ruptura sea específica con respecto a la secuencia. La mayor parte de las enzimas de tipo II son homodímeros, con subunidades de 30 a 40 kilodalton. Es necesario un catión divalente para que se realice la ruptura, pero no se necesita ATP. Cada nucleasa de tipo II tiene una metilasa correspondiente, que se une a la misma secuencia de reconocimiento y metila un nucleótido de esa secuencia. Un DNA **semimetilado** (con el grupo metilo en una sola cadena) es un sustrato preferido de la metilasa aunque no de la nucleasa, que generalmente sólo rompe cuando el lugar de reconocimiento está sin metilar en ambas cadenas. La ruptura genera extremos terminales 3′ hidroxilo y 5′ fosfato. Los lugares de ruptura en las dos cadenas pueden estar distanciados en hasta cuatro nucleótidos (como en *Eco*RI), produciendo cortes con extremos de una sola cadena cortos y autocomplementarios. Algunas enzimas rompen para dar un extremo de una sola cadena con una terminación 5′ ("saliente"), mientras que otras generan un saliente 3′. Otras nucleasas de tipo II, como la *Sma*I y la *Hin*dII, generan fragmentos de extremos romos, en los que los lugares de corte no están distanciados. La mayor parte de los lugares de reconocimiento tienen una longitud de cuatro, cinco o seis nucleótidos, aunque algunas enzimas de tipo II reconocen una secuencia de ocho nucleótidos. La mayoría presenta una simetría de secuencia rotatoria doble, lo cual sugiere que las dos subunidades de la enzima están dispuestas también simétricamente. En la Tabla 25.2 se indican los lugares de reconocimiento de varias nucleasas de tipo II muy utilizadas. En la actualidad se han aislado varios centenares de enzimas de este tipo. No todas las nucleasas de tipo II tienen una especificidad de secuencia absoluta. Así, por ejemplo, la *Hin*dII reconoce cuatro secuencias de hexanucleótidos diferentes, y algunas enzimas (como la *Hga*I) rompen en un lugar fuera de la secuencia de reconocimiento.

En el año 1986 se produjo la primera determinación estructural cristalográfica de una nucleasa de restricción (*Eco*RI) en un complejo con un oligonucleótido de doble cadena que contenía su secuencia de reconocimiento de DNA. En la Figura 25.7 se muestra una subunidad polipeptídica de la enzima dimérica en contacto con su secuencia de identificación del DNA. El DNA está unido en una hendidura, y la proteína tiene un "brazo" N-terminal que envuelve al

TABLA 25.2 Especificidades de algunos sistemas de restricción de tipo II

Enzima	Origen bacteriano	Lugar de restricción y modificación[a]
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens* H	G↓GATCC
*Bgl*II	*B. globiggi*	A↓GATCT
*Eco*RI	*Escherichia coli* RY13	G↓A^{m}ATTC
*Eco*RII	*E. coli* R245	C^{m}C↓GG
*Hae*III	*Haemophilus aegyptius*	GG↓C^{m}C
*Hga*I	*H. gallinarum*	GACGCNNNNN↓ CTGCGNNNNNNNNNN↑
*Hha*I	*H. haemolyticus*	G^{m}CG↓C
*Hin*dII	*H. influenzae* Rd	GTPy↓Pu^{m}AC
*Hin*dIII	*H. influenzae* Rd	^{m}A↓AGCTT
*Hin*fI	*H. influenzae* Rf	G↓ANTC
*Hpa*I	*H. parainfluenzae*	GTT↓AAC
*Hpa*II	*H. parainfluenzae*	C↓C^{m}GG
*Msp*I	*Moraxella* sp.	C↓CGG
*Not*I	*Nocardia rubra*	GC↓GGCCGC
*Ple*I	*Pseudomonas lemoignei*	GAGTCNNNN↓CTCAGNNNNN↑
*Pst*I	*Providencia stuartii*	CTGCA↓G
*Sal*I	*Streptomyces albus* G	G↓TCGAC
*Sma*I	*Serratia marcescens* Sb	CC^{m}C↓GGG
*Xba*I	*Xanthomonas badrii*	T↓CTAGA

[a] La base metilada de cada lugar, cuando se conoce, se identifica con la letra m. Todas las secuencias se leen de 5′ a 3′, de izquierda a derecha. La ruptura en la cadena opuesta puede deducirse en cada caso de la simetría del lugar (excepto para *Hga*I y *Ple*I, cada una de las cuales tiene un lugar asimétrico). Pu = purina, Py = pirimidina, N = cualquier base.

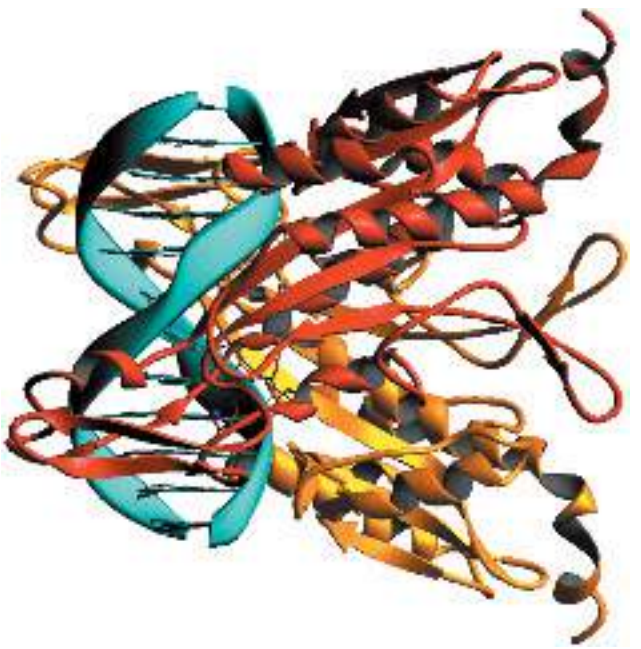


FIGURA **25.7**

Estructura de la nucleasa *Eco*RI en un complejo con su DNA sustrato. La hélice de DNA se presenta en azul, mientras que las dos subunidades de la proteína se presentan en rojo y amarillo, respectivamente. Obsérvese que el "ensortijamiento" de la estructura del DNA es consecuencia del hecho de que las enzimas se unen al lugar de corte central de seis pares de bases en la conformación B, mientras que las secuencias de flanqueo se unen a la forma A del DNA. Obsérvese también el "brazo" N-terminal sobre cada subunidad proteica, que se enrosca alrededor del DNA.

Cortesía de J. Rosenberg.

DNA. La especificidad de secuencia se mantiene mediante 12 enlaces de hidrógeno, que ligan los residuos de purina en el lugar a un residuo de glutamato y dos residuos de arginina (que no se muestran en la figura). La unión del DNA altera su estructura y genera "ensortijamientos"; las secuencias que flanquean de forma inmediata al lugar de corte de seis nucleótidos (GAATTC) adoptan la conformación de doble cadena A y la estructura B se mantiene en la zona de corte. La otra subunidad, que no se muestra en la figura, contacta con el sustrato de manera idéntica, lo cual explica la capacidad de la enzima para catalizar rupturas simétricas en el lugar de corte.

Como contraste, la endonucleasa *Bam*HI no ensortija a su DNA sustrato, que permanece en la forma B. Sin embargo, como se muestra en la Figura 25.8, la propia enzima cambia de conformación tras su unión al DNA. Las hélices α C-terminales de cada subunidad desenrollan y contactan con el DNA, una en el surco secundario y una a lo largo del esqueleto azúcar-fosfato, introduciendo de esta forma un elemento de asimetría inesperado en el complejo DNA-proteína.

Tipo III

Las enzimas de tipo III se parecen más a los sistemas de tipo I que a los sistemas de tipo II. Las enzimas de tipo III contienen ambas actividades nucleasa y metilasa en una enzima de dos subunidades. Difieren de las enzimas de tipo I en que no requieren ATP, modifican tan sólo una cadena del DNA y su lugar de ruptura está muy próximo al lugar de reconocimiento.

La capacidad de romper las moléculas de DNA en secuencias cortas conocidas con exactitud abrió el camino a un gran número de técnicas de investigación muy potentes. Varias de ellas se comentan en Herramientas de la Bioquímica 25A a 25E.

Reparación del DNA

TIPOS Y CONSECUENCIAS DEL DAÑO DEL DNA

Se producen alteraciones químicas sin programar en todas las macromoléculas biológicas, debidas a daños de causa ambiental, o a errores de la síntesis. Para la mayoría de los biopolímeros, como el RNA, las proteínas y los fosfolípidos de membrana, los efectos de estas alteraciones se reducen al mínimo gracias al recambio y la sustitución de las moléculas alteradas. Sin embargo, el DNA es diferente en este aspecto, por cuanto su contenido de información debe transmitirse de manera prácticamente intacta de una célula a otra durante la división celular o la reproducción de un organismo. Así pues, el DNA tiene una especial

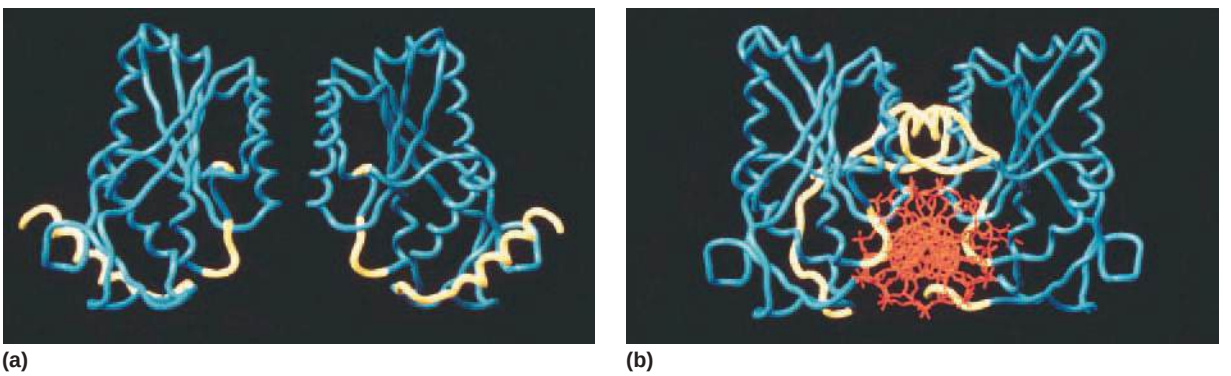


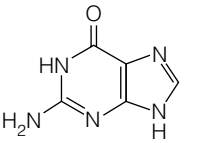
FIGURA **25.8**

Estructuras de las formas de *Bam*HI (a) libre y (b) unida al DNA, con el DNA mostrado en el extremo, en naranja. En amarillo se muestran las regiones de la proteína que sufren un cambio conformacional con la unión del DNA, entre ellas las dos hélices α C-terminales.

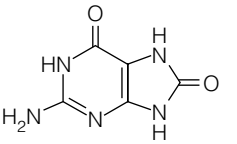
Cortesía de A. Aggarwal y M. Newman, Mount Sinai School of Medicine, de M. Newman, *Science* (1995) 269:656-663, con permiso de *Science*.

necesidad de estabilidad metabólica. Esta estabilidad se mantiene de dos formas: (1) mediante un proceso de replicación con una exactitud muy elevada, y (2) mediante mecanismos que corrigen la información genética cuando el DNA se ha dañado. En el Capítulo 24 hemos descrito los mecanismos utilizados para garantizar la exactitud elevada de la replicación, concretamente, la corrección de pruebas 3′-exonucleolítica, que corrige los errores producidos por las DNA polimerasas y la ruta de la uracilo-DNA *N*-glucosilasa, que impide las mutaciones que podrían producirse por la desaminación de la citosina a uracilo en el DNA. Consideramos aquí varios procesos para reparar el DNA que está alterado por errores de replicación no corregidos o por daños de causa ambiental. Este último tipo de alteración puede deberse a la modificación química de los nucleótidos del DNA o a alteraciones fotoquímicas causadas por la absorción de radiación de energía elevada.

La mayor parte de los estudios sobre la reparación del DNA se han llevado a cabo en muestras alteradas mediante alquilación química o entrecruzamiento de las cadenas de DNA, por la desaminación de las bases del DNA o por la radiación ultravioleta. En la actualidad se está dedicando mucha atención a la lesión oxidativa. La generación intracelular de especies de oxígeno reactivas (véase el Capítulo 15) produce la formación de bases de DNA como la 8-oxoguanina (8-hidroxiguanina) o la timina glicol (véase la página 618). La 8-oxoguanina es uno de los productos más importantes de la lesión oxidativa del DNA ya que su formación contribuye de forma importante a la mutagénesis (véase la página 1059). Es interesante señalar que uno de los mecanismos de protección no es una enzima de reparación del DNA sino una nucleótido hidrolasa. En *E. coli*, se acumula 8-oxo-dGTP en las células sometidas a la presencia de oxígeno, y una enzima codificada por el gen *mutT* rompe este nucleótido alterado antes de que pueda utilizarse como sustrato en la replicación del DNA. En las células de los mamíferos se encuentra una enzima semejante (véase la página 925).



Guanina



8-Oxoguanina

$$\text{8-Oxo-dGTP} + H_2O \longrightarrow \text{8-oxo-dGMP} + PP_i$$

Las consecuencias del daño de la radiación o la alquilación son la mutagénesis, resultado de la replicación errónea de una base del molde dañada, y la muerte celular, consecuencia de la incapacidad del aparato de replicación para copiar un lugar dañado. Dado que en la actualidad está claro que el cáncer se debe a una acumulación de mutaciones de células somáticas, los mecanismos de reparación del DNA se están estudiando intensamente, puesto que se les considera factores determinantes de la susceptibilidad de un animal al cáncer.

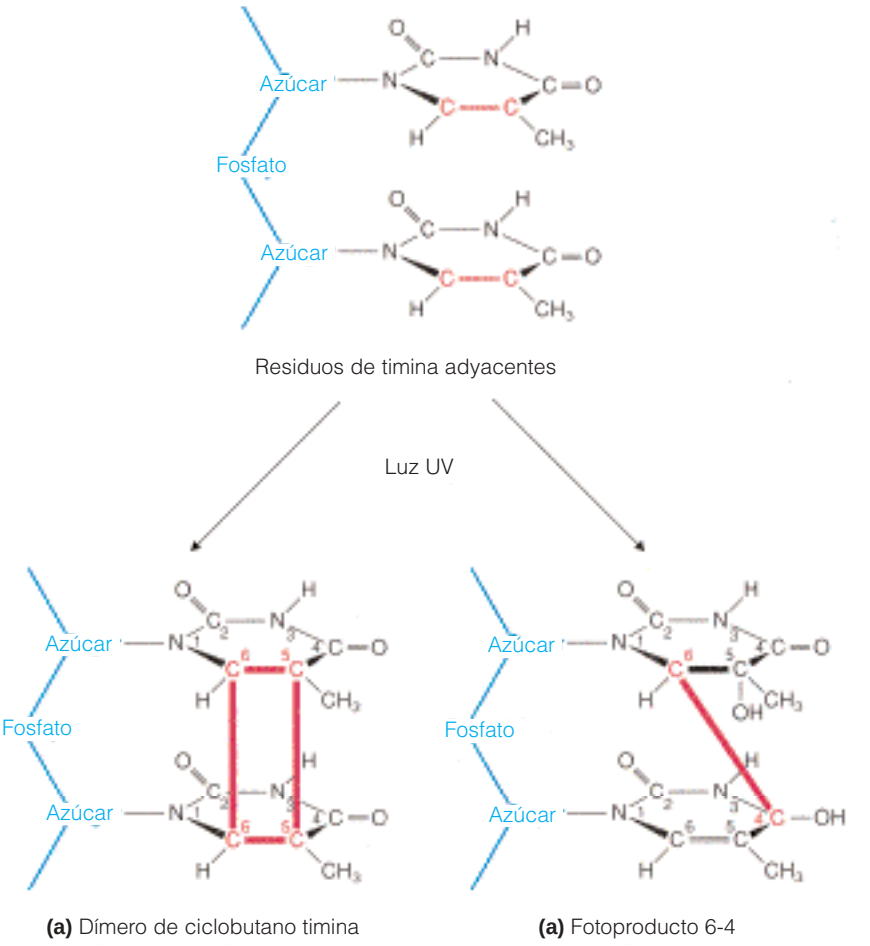
Para recalcar la importancia de la reparación del DNA, cada célula posee varios sistemas de reparación diferentes. Estos sistemas se agrupan de la forma siguiente: (1) **reparación directa**, en la cual una base del DNA dañada sufre una reacción química para restablecer la estructura original; (2) **reparación por escisión de un nucleótido**, en la cual una región del DNA que contiene un lugar dañado se corta y se sustituye con DNA normal; (3) **reparación por escisión de una base**, la cual comienza con la rotura del enlace glucosídico que conecta una base dañada al esqueleto azúcar-fosfato del DNA; (4) **reparación recombinatoria**, en la cual los dúplex de DNA replicados recientemente sufren recombinación genética, que en última instancia elimina el segmento de DNA dañado; y (5) **reparación de mal apareamiento**, un proceso que reconoce los mal apareamientos del DNA que se crean por errores de la replicación, por recombinación no homóloga o por daño de una base del DNA, y corrige el error. Consideraremos estos procesos de reparación uno tras otro.

FOTOPRODUCTOS DEL DNA BIOLÓGICAMENTE IMPORTANTES: DÍMEROS DE PIRIMIDINA

En el estudio de los mecanismos de reparación del DNA, el primer paso necesario es identificar las formas químicas de la alteración del DNA que son objeto de la reparación. La mayor parte de los descubrimientos iniciales acerca de la reparación del DNA se realizaron en estudios con organismos irradiados con luz ultravioleta. Se identificó el DNA como la principal diana biológica de la radiación UV, en parte mediante la determinación de los **espectros de acción**, la irradiación de las bacterias o los fagos con luz UV y la determinación de las longitudes de onda más eficaces en la estimulación de la mutagénesis o la muerte. Esas longitudes de onda se encuentran cerca de los 260 nm, donde es máxima la absorción de luz por el DNA.

Cuando se estudia el DNA irradiado con luz UV o el DNA extraído de un organismo al que se ha irradiado con luz UV, se detectan pequeñas cantidades de muchos componentes del DNA alterados de forma diferente, a los que se denomina **fotoproductos**. Entre ellos destacan los dímeros intracatenarios formados por dos bases pirimidínicas unidas mediante una estructura de anillo de **ciclobutano** en la que participan los carbonos 5 y 6 (Figura 25.9a). Estos **dímeros de timina**, formados por dos residuos de timina adyacentes en el DNA, se identificaron bastante pronto como fotoproductos biológicamente importantes, debido a que la abundancia relativa de dímeros de timina en el DNA irradiado presentaba una correlación muy estrecha con la muerte de los fagos o las bacterias irradiadas. Así pues, la capacidad de un organismo para sobrevivir a la

FIGURA **25.9**
Estructuras de los fotoproductos dímeros de pirimidina.



radiación ultravioleta estaba directamente relacionada con su capacidad de eliminar los dímeros de timina de su DNA. La dimerización junta timinas adyacentes, distorsionando la hélice de tal manera que la polimerización replicativa a partir de este lugar queda bloqueada.

Durante muchos años se pensó que la *mutagénesis* inducida por la luz ultravioleta, al igual que la muerte celular, la causaban principalmente también los dímeros de ciclobutano timina. Sin embargo, algunos datos más recientes sugieren que es otro dímero diferente pirimidina-pirimidina, denominado **fotoproducto 6-4**, el principal causante de las mutaciones inducidas por la luz UV. Como se indica en la Figura 25.9b, estos productos son también dímeros, unidos mediante el C-6 de la pirimidina 5′ (timina o citosina) y el C-4 de la pirimidina 3′ (generalmente citosina pero, en ocasiones, timina como se muestra en la Figura 25.9). La idea de que los fotoproductos 6-4 son los responsables de las mutaciones en el DNA irradiado con luz UV se ha confirmado por experimentos en los que se eliminaron por completo los dímeros de ciclobutano timina del DNA irradiado, mediante **fotorreactivación** (véase el apartado siguiente). Al introducir este DNA en las bacterias, la eliminación del dímero no tenía efecto alguno sobre la frecuencia de las mutaciones. Sin embargo, no se ha resuelto aún la cuestión de si los fotoproductos 6-4 son los responsables principales de la mutagénesis.

Los dímeros de ciclobutano timina son el fotoproducto más letal en el DNA irradiado con luz UV. El fotoproducto 6-4 puede ser el producto mutágeno más fuerte.

REPARACIÓN DIRECTA DE LAS BASES DEL DNA DAÑADAS: FOTORREACTIVACIÓN Y ALQUILTRANSFERASAS

De la media docena de procesos conocidos de reparación del DNA, la mayor parte se basan en la eliminación de los nucleótidos dañados, junto con varios residuos adyacentes, y la sustitución de la zona eliminada mediante el uso de la información codificada en la cadena complementaria (no dañada). Sin embargo, hay al menos dos procesos en los que intervienen reacciones que *cambian directamente* las bases dañadas, en vez de eliminarlas.

El DNA puede repararse directamente, mediante el cambio de una base dañada por una base normal, o indirectamente, mediante la sustitución de un segmento de DNA que contiene el nucleótido dañado.

Fotorreactivación

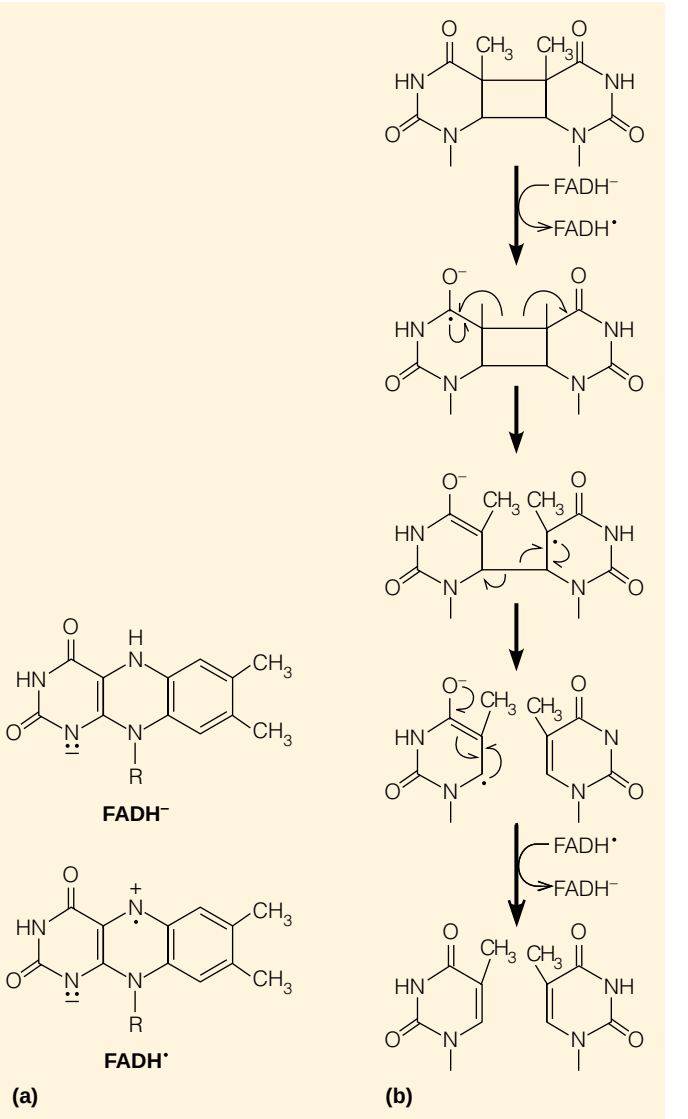
Una enzima muy extendida, denominada **enzima fotorreactivadora**, o **DNA fotoliasa**, repara los dímeros de ciclobutano pirimidina en presencia de luz visible. La longitud de onda de 370 nm es la más eficaz. La enzima se une al DNA en un proceso que es independiente de la luz, específicamente en el lugar de los dímeros de pirimidina. En presencia de luz de longitud de onda visible, se rompen los enlaces que ligan los anillos de pirimidina, tras lo cual la enzima puede disociarse en la oscuridad. Algunas de las claves para aclarar este mecanismo proceden de la observación de que la enzima contiene dos cromóforos. (Recuérdese del Capítulo 17 que un cromóforo es una parte estructural que absorbe luz de longitudes de onda características.) Un cromóforo es el dinucleótido de flavina y adenina unido, desprotonado y en estado reducido ($FADH^-$; véase la Figura 25.10); el segundo, en algunas fotoliasas es el 5,10-meteniltetrahidrofolato y en otras es la 8-hidroxi-5-desazaflavina. Los estudios sobre el mecanismo sugieren un proceso similar a la fotosíntesis, con el segundo cromóforo actuando como factor de captación de la luz y, de alguna manera, trasmitiendo la energía luminosa al $FADH^-$, que actúa como centro de reacción fotoquímica, transfiriendo un electrón al dímero y rompiendo los enlaces pirimidina-pirimidina mediante un mecanismo de radicales libres, como se muestra en la Figura 25.10.

Las enzimas de reparación directa son la fotoliasa, que utiliza la energía luminosa para reparar los dímeros de pirimidina, y las alquiltransferasas, "enzimas" que se inactivan después de cada ciclo catalítico.

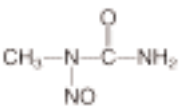
Aunque la fotoliasa se ha detectado en numerosos sistemas eucariotas, los datos recientes indican que las células humanas no contienen una enzima para la fotorreactivación. Se ha culpado al estrechamiento de la capa de ozono de la

FIGURA **25.10**

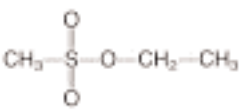
Mecanismo de acción de la fotoliasa. **(a)** Estructuras parciales de $FADH^-$ y $FADH^{\cdot}$. **(b)** Probable ruta de la reacción.



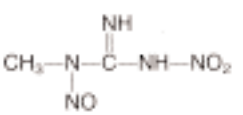
tierra de los descensos de la población de determinadas especies de ranas que carecen de fotoliasa y, por tanto, padecen lesiones por la radiación solar ultravioleta, en especial durante el desarrollo embrionario en los lagos cristalinos, que son transparentes a los rayos UV.



Metilnitrosourea (MNU)



Etilmetanosulfonato (EMS)



***N*-Metil-*N*′-nitro-*N*-nitrosoguanidina (MNNG)**

*O*⁶-Alquilguanina Alquiltransferasa

El tratamiento del DNA con un agente metilante o etilante es comparable a la radiación ultravioleta, por cuanto se forman diversas bases del DNA modificadas, algunas de las cuales resultan letales si no se reparan, mientras que otras son mutágenas. Algunos agentes alquilantes se utilizan en la quimioterapia del cáncer por su capacidad para bloquear la replicación del DNA y, por tanto, la proliferación celular. Los hay que se emplean mucho como mutágenos en el laboratorio. En el margen se muestran tres reactivos metilantes o etilantes.

Las bases alteradas por estos reactivos son fundamentalmente las purinas (también afectan a los oxígenos de los fosfatos) y la gama de productos formados varía en función del reactivo utilizado. El más mutágeno de estos productos, la ***O*⁶-alquilguanina**, es mutágeno a causa de que la base modificada tiene una probabilidad muy elevada de aparearse con la timina cuando se replica la

cadena modificada (Figura 25.11). Así pues, la alquilación de una guanina del DNA estimula una transición GC ⟶ AT (véase el margen, en donde mG es un residuo de metilguanina).

En la reparación de este tipo de lesión interviene una enzima poco común, la **O^6-alquilguanina alquiltransferasa**, que transfiere un grupo metilo o etilo de un residuo de O^6-metilguanina u O^6-etilguanina a un residuo de cisteína en el lugar activo de la proteína. Es de destacar que esta "catálisis", que está muy extendida en procariotas y eucariotas, puede actuar una sola vez. Tras alquilarse, no puede eliminar el grupo alquilo y la molécula proteica se recambia. Así pues, el término *enzima* no se aplica de manera correcta. En las bacterias, la proteína regula tanto su propia síntesis como la de otra enzima de reparación, una DNA-*N*-glucosilasa que consideraremos más adelante. La regulación implica la activación de la transcripción de genes que codifican estas dos proteínas. Existen pruebas de que la forma *alquilada* de la alquiltransferasa es la forma específica del activador de la transcripción. Esto permite a la célula adaptarse al daño causado por la alquilación mediante el empleo de la proteína alquilada como señal específica para la producción de una mayor cantidad de las proteínas necesarias para reparar el daño.

REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDOS: ESCINUCLEASAS

La reparación por escisión de nucleótidos (REN) se descubrió originalmente como un sistema enzimático capaz de reparar los dímeros de timina creados en el DNA por la radiación UV. A diferencia de la fotorreactivación, este proceso puede tener lugar en la oscuridad. El sistema enzimático implicado, que en *E. coli* comprende los productos de los genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrC*, se sabe en la actualidad que actúa sobre diversos lugares del DNA dañado que contienen lesiones que pueden ser muy voluminosas, como las que forman los grupos alquilo grandes, y que distorsionan la doble hélice del DNA. En las células de mamíferos y en las levaduras, hay sistemas muy parecidos, de forma que el proceso probablemente es universal.

Como se muestra en la Figura 25.12 para *E. coli*, la enzima UvrABC con tres subunidades, reconoce una lesión (en el ejemplo que se muestra, un dímero de timina) y, con la ayuda de la hidrólisis del ATP, hace que se doble el DNA, lo que lleva a la ruptura de la cadena dañada en dos lugares, ocho nucleótidos hacia el lado 5′ del lugar dañado y cuatro o cinco nucleótidos hacia el lado 3′, dejando un hueco potencial de una longitud de 12 ó 13 nucleótidos, con un grupo hidroxilo 3′ y un fosfato 5′ en los extremos. La acción de la polimerasa y la ligasa sustituyen a continuación el hueco de 12 ó 13 nucleótidos con DNA sin dañar. También es necesaria la intervención de la helicasa II, el producto del gen *uvrD*, probablemente para desenrollar y eliminar el oligonucleótido escindido, que finalmente se degrada por otras enzimas. La enzima UvrABC no es una endonucleasa clásica, puesto que corta en dos lugares distintos, y se ha propuesto asignarle la denominación de **escinucleasa**, para indicar su función en la reparación por *esci*sión. Este sistema interviene también en la reparación de otro tipo de lesión del DNA, el entrecruzamiento covalente entre las dos cadenas. En este caso, para preservar una cadena molde indemne, se reparan secuencialmente las dos cadenas, una después de la otra.

La reparación por escisión se produce también en las células de los mamíferos, como pone de manifiesto la demostración reciente de una escinucleasa humana que rompe en las posiciones –22 y +6 respecto a un dímero de timina. Una diferencia significativa es la participación de dos endonucleasas diferentes en la reparación por escisión en el ser humano, una para cortar en el lado 5′ y

La reparación por escisión comporta la ruptura por la endonucleasa a ambos lados de un lugar dañado seguido de una síntesis de sustitución.

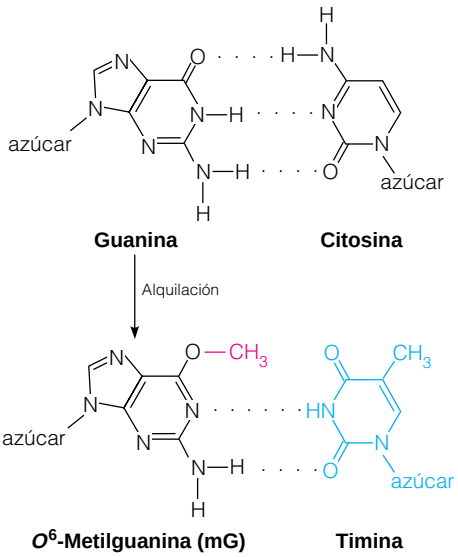
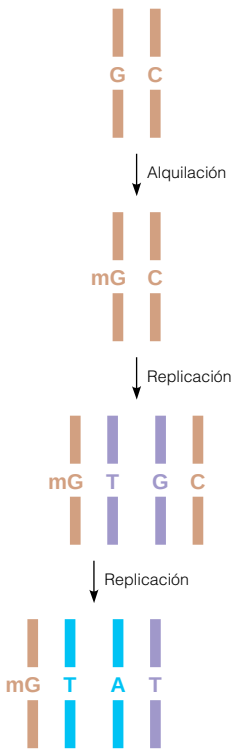


FIGURA **25.11**

Apareamiento erróneo de la O^6-metilguanina con timina en una doble cadena de DNA.



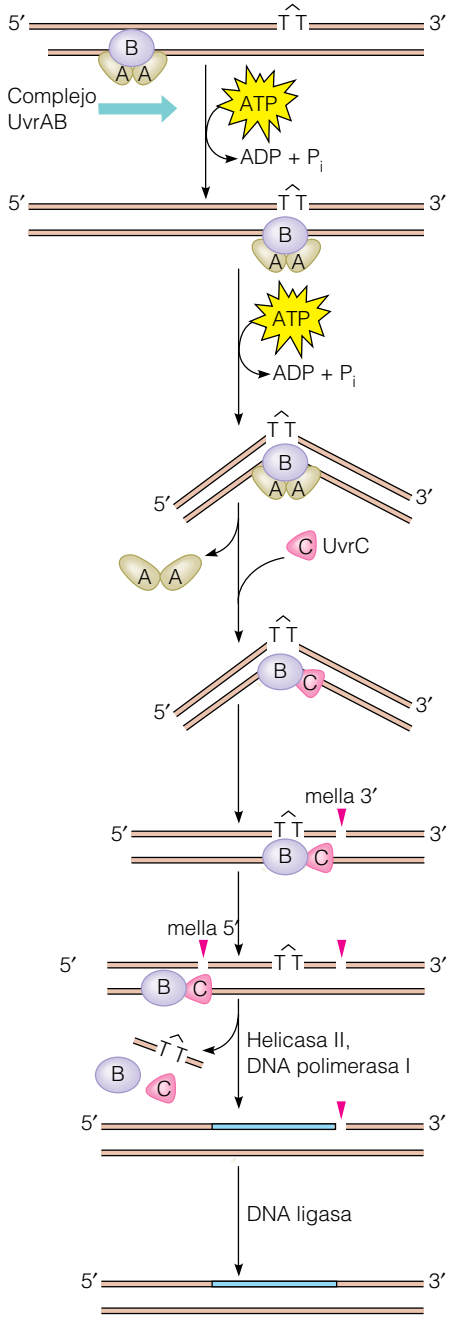


FIGURA **25.12**

Reparación por escisión de dímeros de timina por la escinucleasa UvrABC de *E. coli*. Un complejo de proteínas A y B avanza a lo largo del DNA hasta que llega a un dímero de timina u otra zona dañada, en donde se detiene y obliga al DNA a doblarse. A continuación, se disocia la UvrA (un "igualador molecular"), lo que permite la unión de UvrC a B. El complejo BC corta en ambos lados del dímero. La helicasa, la polimerasa y la ligasa eliminan el dodecámero dañado y lo sustituyen por nuevo DNA. Este sistema puede utilizar DNA polimerasa II así como pol I.

Adaptado de A. Sancar y J. E. Hearst, *Science* (1993) 259:1415-1420. © 1993 AAAS.

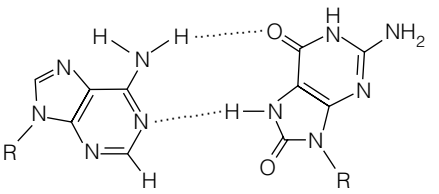
otra en el lado 3′. La reparación por escisión en el ser humano se detectó inicialmente mediante los estudios de una enfermedad genética rara denominada **xeroderma pigmentoso** (**XP**). El XP es realmente una familia de enfermedades, en las que existe un déficit de una o varias de las enzimas de la ruta de escisión. Por el momento no conocemos ninguna forma de tratar el trastorno en las personas afectadas. Las consecuencias biológicas del XP consisten en una sensibilidad extrema a la luz solar y una elevada incidencia de cánceres de piel. Aunque la sobreexposición a los rayos ultravioleta de la luz solar aumenta el riesgo de cáncer cutáneo en las personas normales, el aumento muy importante de la frecuencia del cáncer de piel en los pacientes con XP pone claramente de manifiesto la trascendencia de la ruta de reparación de las lesiones causadas por rayos UV en los mamíferos. Dado que no existe tratamiento para el XP, las personas afectadas deben evitar la luz solar.

Algunos estudios recientes de la reparación por escisión de nucleótidos indican que los genes activos (los que están en proceso de transcripción) son los sustratos preferidos para la reparación por escisión, y dentro de estos genes es la cadena de DNA utilizada como molde la que se repara de manera preferente. Esta **reparación acoplada a la transcripción** puede iniciarse cuando una RNA polimerasa que está transcribiendo queda atascada en el lugar de la lesión del DNA. El acoplamiento de la transcripción con la reparación ayuda a asegurar la integridad de los genes que realmente se utilizan. En las células de mamíferos, la reparación acoplada a la transcripción es una forma especializada de REN que requiere otras proteínas. Los defectos genéticos en una o varias de estas proteínas conducen al **síndrome de Cockayne**, una enfermedad que se caracteriza por fotosensibilidad cutánea, retraso del crecimiento y anomalías neurológicas, pero no incluye, evidentemente, un mayor riesgo de cáncer. Sin embargo, otro gen humano, el *BRCA1*, se ha implicado recientemente en la reparación por escisión acoplada a la transcripción. Las mutaciones de *BRCA1* están asociadas a un aumento del riesgo de cáncer de mama y de ovario.

REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES: DNA-N-GLUCOSILASAS

La otra forma de reparación por escisión, la reparación por escisión de bases, o REB, elimina uno o varios nucleótidos de un lugar de una base dañada. Sin embargo, este proceso se inicia con la fragmentación enzimática del enlace glucosídico entre la base dañada y la desoxirribosa. La sustitución de uracilo por timina en el DNA, que se presentó en el Capítulo 24 (página 1020) es un ejemplo de REB. La Figura 25.13 ilustra una REB de un dímero de timina, tal como la inicia la endonucleasa V del bacteriófago T4 o una enzima semejante de *Micrococcus luteus*. Estas enzimas tienen dos actividades, la primera, una glucosilasa que rompe entre la timina del lado 5′ del dímero y su desoxirribosa asociada, y la segunda, una **AP endonucleasa**, que reconoce el **lugar apirimidínico** (**AP**), que consiste en una desoxirribosa sin una base de pirimidina asociada, y rompe en el lado 5′. Una segunda ruptura, 3′ de ese lugar, por la **desoxirribofosfodiesterasa**, libera la desoxirribosa-5-fosfato. A continuación, la traslación de mella por la DNA polimerasa I, seguida de la acción de la DNA ligasa, sustituye el DNA dañado y cierra la mella resultante. El parche, o DNA sustituido, puede tener un tamaño corto de un nucleótido o dos (como en el ejemplo que se da) o puede tener una longitud de varios nucleótidos. La reparación por escisión de bases suele utilizar enzimas diferentes para la ruptura glucosídica y para la ruptura endonucleolítica del lugar sin base (apirimidínico o apurínico, dependiendo de la naturaleza de la base dañada). La mayoría de las células contienen varias DNA-*N*-glucosilasas, entre ellas unas específicas de las bases alquiladas *N*-metiladenina, 3-metiladenina y 7-metilguanina.

El daño oxidativo del DNA se repara principalmente por la REB. Utilizando como ejemplo de daño oxidativo la 8-oxoguanina, hemos visto que la evitación de error mutagénico opera en parte a través de la acción del producto del gen *mutT*, que rompe el 8-oxo-dGTP, un nucleótido que contiene la base dañada, antes de que pueda incorporarse al DNA. El efecto mutagénico de la 8-oxoguanina se debe a su capacidad para formar un apareamiento de base con la adenina (véase la figura siguiente) y, de esta forma, conducir a una mutación de transversión por las rutas expuestas en la Figura 25.14.



Adenina **8-Oxoguanina**

Otras dos proteínas de *E. coli*, los productos de los genes *mutM* y *mutY*, son DNA-*N*-glucosilasas que actúan en lugares del DNA que contienen 8-oxoguanina. La proteína MutM elimina la 8-oxoguanina (y otras bases oxidadas) del DNA, mientras que la proteína MutY elimina la adenina que está apareada con 8-oxoG. Juntas, estas proteínas pueden iniciar la reparación en lugares donde se ha producido 8-oxoG, bien sea por la incorporación de 8-oxo-dGTP o bien por la oxidación de un residuo de dGMP en el DNA por una especie reactiva de oxígeno (ROS), como se expone en la Figura 25.14. El término "*mut*", que se utiliza para denominar a estos genes, señala el hecho de que el funcionamiento defectuoso de cualquiera de los productos de los genes crea un fenotipo mutador, mediante el aumento de la frecuencia de mutación espontánea.

REPARACIÓN POSREPLICACIÓN: REPARACIÓN POR RECOMBINACIÓN Y RESPUESTA SOS

La fotorreactivación y la reparación por escisión son respuestas metabólicas a corto plazo. Ambos procesos pueden producirse a los pocos minutos de que el DNA sufra una lesión causada por sustancias químicas o luz ultravioleta. Sin embargo, si los sistemas de fotorreactivación y de reparación por escisión son defectuosos, o se saturan como consecuencia de una lesión del DNA demasiado amplia que supera sus capacidades, en las bacterias existen al menos otros dos sistemas de reparación a largo plazo que pueden entrar en funcionamiento. La presentación de estos sistemas se centra en la reparación de los dímeros de timina, pero asimismo pueden repararse otros tipos de lesiones.

Cuando una polimerasa replicativa encuentra un dímero de timina, no es capaz de realizar la replicación a partir de ese lugar. Se incorpora desoxiadenilato frente a la primera base de timina del molde. La doble hélice queda distorsionada debido al dímero de timina, y ello hace que la estructura se identifique como un mal apareamiento, y la actividad 3′ exonucleolítica de la DNA polimerasa III elimina el dAMP que acaba de incorporarse. Así pues, la polimerasa "holgazanea" en el lugar dañado, convirtiendo el dATP en dAMP mediante un proceso continuo de inserción y ruptura exonucleolítica. Puede iniciarse la síntesis de un fragmento de Okazaki frente al lugar dañado, dejando un hueco frente al dímero de timina. Naturalmente, este hueco sería letal si no se reparara, puesto que generaría una ruptura de doble cadena en el siguiente ciclo de replicación.

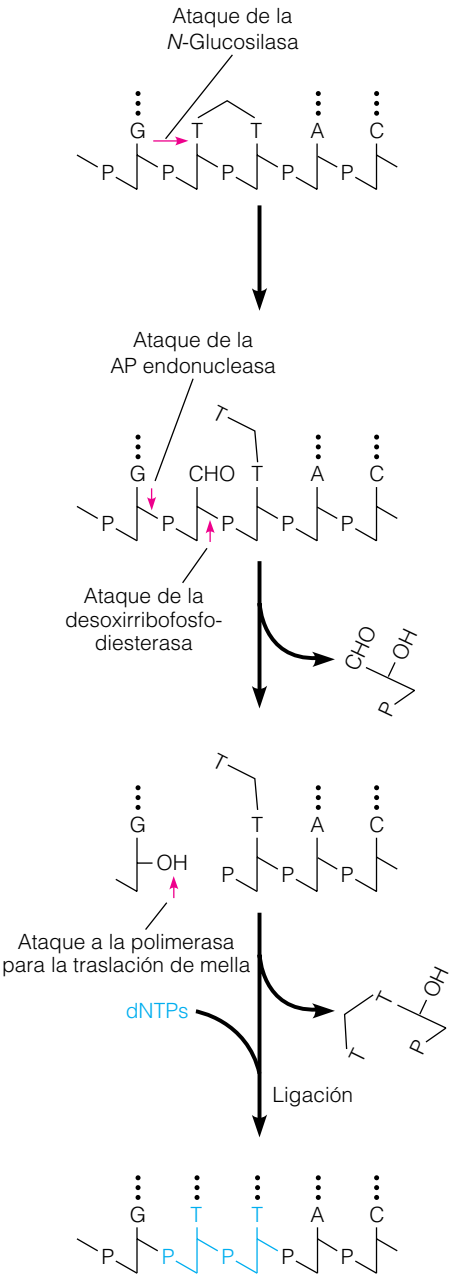
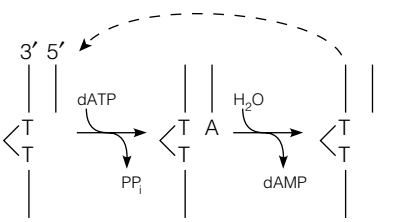


FIGURA **25.13**

Reparación mediante escisión de los dímeros de timina. Éste es el proceso que llevan a cabo las enzimas de reparación bifuncionales del fago T4 y de *Micrococcus luteus*. Tan sólo se muestra la cadena de DNA que contiene el dímero. Las flechas rojas identifican los lugares de ruptura enzimática.



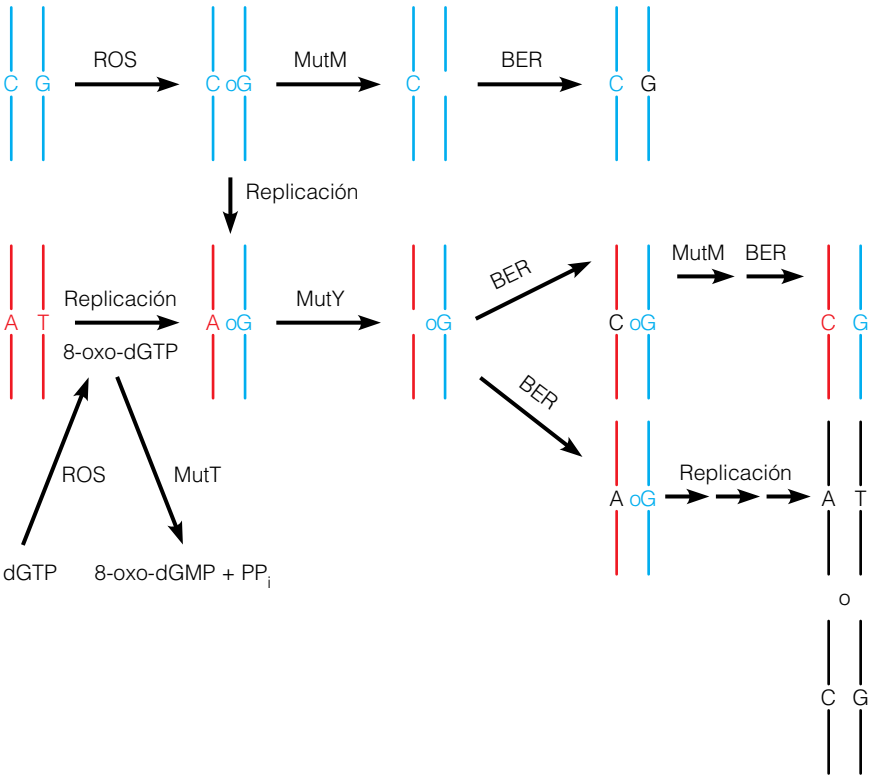


FIGURA **25.14**

Acciones de los productos de los genes *mutM, mutT* y *mutY* para contrarrestar el efecto mutagénico de la 8-oxoguanina (oG). Dependiendo de la ruta de introducción de oG en el DNA, las rutas presentadas pueden producir transversiones GC→AT o AT→GC. MutT hidroliza el 8-oxo-dGTP e impide su incorporación durante la replicación del DNA. MutM escinde oG del par de bases C·oG como parte del proceso de reparación por escisión de bases (REB). MutY escinde A de un par de bases A·oG en otro proceso REB, lo cual permite una posibilidad más de corregir un error en la ronda siguiente de replicación. No se muestran en la figura todos los resultados posibles. Por ejemplo, el 8-oxo-dGTP puede incorporarse frente a C en el molde, así como frente a A. Asimismo, MutY puede escindir A de un par de bases A·G, evitando así la mutagénesis por transversión espontánea. ROS = especies reactivas del oxígeno.

Hay dos procesos diferentes que pueden reparar el hueco: (1) la **reparación por recombinación** o **reparación del hueco de la cadena hija** y (2) la **reparación SOS** o **reparación propensa a errores.** Ambos procesos tienen una dependencia crítica de una proteína denominada RecA. Las bacterias portadoras de mutaciones del gen *recA* se caracterizaron inicialmente observando que presentaban un déficit de recombinación general y de reparación del DNA. Actualmente sabemos que las bacterias *recA*$^-$, que especifican una proteína RecA defectuosa, presentan un fenotipo complejo, que incluye la reparación defectuosa del DNA. Describiremos la proteína más adelante en este mismo capítulo, pero para lo que aquí nos ocupa, hay dos propiedades que son importantes. En primer lugar, la RecA cataliza el **apareamiento de cadenas** o **asimilación de cadenas**, que es la unión de dos DNA diferentes mediante apareamientos de bases homólogos entre sí. En segundo lugar, la RecA es un regulador genético, que activa la síntesis de muchas proteínas, entre ellas las proteínas de reparación del DNA, que ayudan a la bacteria a adaptarse a diversas tensiones metabólicas. Esta adaptación, denominada **respuesta SOS** se describirá con mayor detalle más adelante, y las activaciones transcripcionales que dan lugar a la respuesta SOS se presentarán en el Capítulo 26.

Reparación por recombinación

Dado que el hueco que se genera frente al dímero de timina lo crea una replicación defectuosa, este hueco está próximo a la horquilla de replicación. En consecuencia, está próximo también a la correspondiente región de la otra doble cadena hija (Figura 25.15). Si esa región no ha sufrido daños, la proteína RecA puede iniciar la recombinación entre dos dobles cadenas homólogas. La cadena de origen no afectada, que es complementaria de la cadena de origen dañada, se recombina en el hueco, frente al lugar dañado. Participan otras proteínas como se muestra en la figura y se expone en el apartado sobre recombinación

(véase la página 1068). Existe entonces un hueco en el brazo previamente no dañado, pero como está situado frente a un molde no dañado, puede llenarse por la acción de la DNA polimerasa y la DNA ligasa. El dímero de timina en sí no se repara en este proceso, pero el proceso proporciona el tiempo suficiente para que luego intervenga el sistema de escisión y repare este daño. Es necesaria la intervención de la proteína RecA para la reparación del hueco creado en la cadena hija, en especial en la primera reacción, en la que la cadena original no dañada se aparea con la cadena original situada frente al hueco. RecA es una proteína bacteriana pero, en las células eucariotas, otras proteínas relacionadas permiten que se produzca este proceso.

Reparación propensa a errores y respuesta SOS

La *respuesta SOS* bacteriana es un sistema de alarma metabólico que ayuda a que la célula consiga salvarse en presencia de tensiones que pueden resultar letales. Los inductores de la respuesta SOS son la radiación ultravioleta, la falta de timina, el tratamiento con ciertos reactivos modificadores del DNA, como la mitomicina C creadora de enlaces cruzados, y la inactivación de genes esenciales para la replicación del DNA. Las respuestas incluyen la mutagénesis, la filamentación (en la que las células se alargan mediante crecimiento, pero sin llegar a dividirse), la activación de la reparación por escisión y la activación de los genomas latentes de los bacteriófagos. La mutagénesis se produce porque, en condiciones de SOS, los huecos que se forman frente a los dímeros de timina pueden llenarse mediante la replicación en lugar de mediante la transferencia de la cadena hija, y esta replicación es extremadamente inexacta. De hecho, este proceso constituye la ruta principal a través de la cual la luz ultravioleta estimula la mutagénesis en las bacterias.

Como se señala en la página 1059, las DNA polimerasas son incapaces de replicar más allá de un lugar dañado en la cadena molde, como un dímero de timina. Lo mismo sucede cuando la cadena molde contiene un lugar sin una base ligada a la desoxirribosa. Sin embargo, algunos estudios recientes en *E. coli* han demostrado que la holoenzima DNA polimerasa III puede replicar más allá de ese lugar con la ayuda de otras proteínas, entre ellas SSB, RecA y los productos de dos genes, *umuC* y *umuD*. Umu significa mutagénesis ultravioleta (*u*ltraviolet *mu*tagenesis); la acción de los productos de ambos genes es esencial para la mutagénesis producida por la luz ultravioleta. Por ejemplo, en un mutante *umuC*$^-$, la radiación ultravioleta destruye las bacterias pero no aumenta la frecuencia de mutación entre las bacterias supervivientes, lo cual se debe a que las células no pueden realizar una replicación del DNA propensa a errores. Tras la expresión de estos dos genes, el producto de *umuD* sufre una ruptura proteolítica para dar la proteína UmuD', que se compleja con UmuC para dar un complejo trímero, el UmuD'$_2$C. Este complejo trímero se asocia con la proteína RecA, que se une al DNA de cadena única justo después del lugar dañado. La formación de este complejo permite a la DNA polimerasa copiar a partir de este lugar de una forma muy propensa a los errores. Por ejemplo, cuando el daño está en un lugar sin base, la polimerasa casi siempre inserta A en ese lugar, sea o no sea T la base en el molde original. Los resultados más recientes indican que el propio complejo UmuD'$_2$C es una polimerasa propensa a los errores.

Teniendo en cuenta que probablemente la mayor parte de las mutaciones tienen efectos nocivos, ¿qué ventaja tiene para la célula la acumulación de mutaciones durante la reparación del DNA? Probablemente ninguna, excepto que la alternativa sería la muerte celular. En otras palabras, la mutagénesis amplia ha de contemplarse como un precio que a la célula le vale la pena pagar cuando una dosis masiva de radiación UV ha superado todos los demás mecanismos de

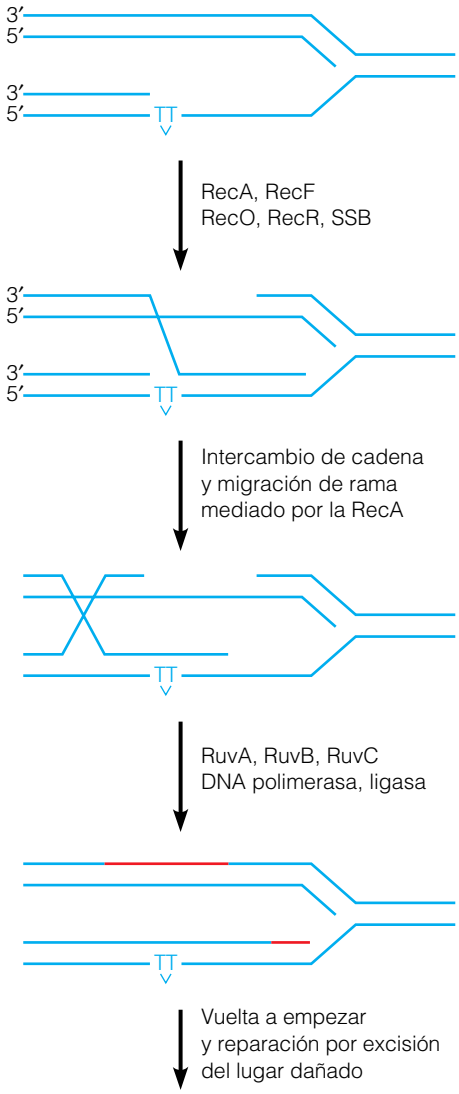


FIGURA **25.15**

Reparación por recombinación. La cadena de DNA original no dañada se transfiere al hueco de la cadena hija, formado por la incapacidad de la DNA polimerasa para replicar más adelante. Los pasos restantes se producen por mecanismos similares o idénticos a los de la recombinación homóloga, que se considerarán más adelante en este capítulo (página 1067).

El DNA puede repararse tras la replicación, ya sea mediante recombinación, ya sea mediante la reparación propensa a errores inducible. Ambos procesos requieren RecA.

reparación y cuando la replicación propensa a errores más allá del dímero es necesaria para que la célula continúe con vida. No está claro aún si en las células eucariotas tiene lugar un proceso comparable.

REPARACIÓN DE MAL APAREAMIENTOS

Los mal apareamientos (o apareamientos erróneos), es decir, pares de bases que no corresponden a los de Watson-Crick en la doble cadena del DNA, pueden producirse por errores de la replicación, por la desaminación de la 5-metilcitosina del DNA para dar timina o por la recombinación entre segmentos de DNA que no son completamente homólogos. Además, se producen mal apareamientos cuando la DNA polimerasa se desliza a lo largo del molde, creando pequeños bucles o protuberancias en el DNA de doble cadena. Lo que conocemos mejor es la corrección de los errores de la replicación, que es lo que describiremos aquí.

Cuando la DNA polimerasa introduce un nucleótido incorrecto, creando un par de bases que no es de Watson-Crick, el error se corrige normalmente por la corrección de pruebas 3′ exonucleolítica. Si el error no se corrige inmediatamente, el DNA totalmente replicado contendrá un mal apareamiento en ese lugar. Este error puede corregirse por otro proceso denominado **reparación de mal apareamiento**. En *E. coli*, las proteínas que participan en este proceso son los productos de los genes *mutH*, *mutL* y *mutS*. Otro producto génico necesario, al que inicialmente se denominó MutU, se ha identificado ahora como la DNA helicasa II (también identificada como el producto del gen *uvrD*).

El sistema de corrección de mal apareamiento examina el DNA recién replicado, buscando tanto las bases mal apareadas como las inserciones y pérdidas de bases aisladas. MutS se une al DNA en el lugar del mal apareamiento, seguido de la unión de MutL y luego MutH. MutS es una "proteína motora", que utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para tirar del DNA en ambas direcciones hasta que alcanza el lugar en el que debe comenzar el proceso de reparación. Cuando encuentra un mal apareamiento, parte de la cadena que contiene la región mal apareada se elimina y se sustituye (Figura 25.16). ¿Cómo reconoce el sistema de reparación de mal apareamiento la cadena que ha de reparar? Si eligiera una de las dos cadenas de manera aleatoria, optaría por la incorrecta en la mitad de las ocasiones, y no se ganaría nada en cuanto a exactitud de la replicación. La respuesta es que las enzimas de reparación de mal apareamiento identifican la cadena recién replicada, ya que durante un corto período de tiempo ese DNA no está metilado. En *E. coli* la secuencia —GATC— es crucial, puesto que es el lugar metilado inmediatamente después de la replicación, por acción del producto del gen *dam* (*D*NA *a*denine *m*ethylase). Las enzimas de reparación de mal apareamientos buscan las secuencias —GATC— que no están metiladas. El reconocimiento de la secuencia GATC no metilada puede marcar esa cadena para la corrección del mal apareamiento en un lugar situado a una distancia de hasta 1 kpb o más del lugar en que se encuentra la secuencia GATC, en ambas direcciones. Una vez que el sistema de metilación ha actuado sobre todos los lugares GATC de la cadena hija, es demasiado tarde para que el sistema de reparación de mal apareamientos reconozca la cadena de DNA sintetizada más recientemente, y se pierde cualquier ventaja en cuanto a fidelidad de replicación del DNA total. Cuando el sistema funciona adecuadamente, tiene el efecto de aumentar la fidelidad global de la replicación unas 100 veces, desde alrededor de 1 error por cada 10^8 pares de bases replicadas a alrededor de 1 por cada 10^{10}.

En las bacterias, el sistema de reparación de mal apareamiento utiliza la metilación del DNA para identificar la cadena que tiene un nucleótido mal apareado.

Como se expone en la Figura 25.16, el complejo MutHLS se mueve a lo largo del DNA en ambas direcciones hasta que se encuentra con la secuencia

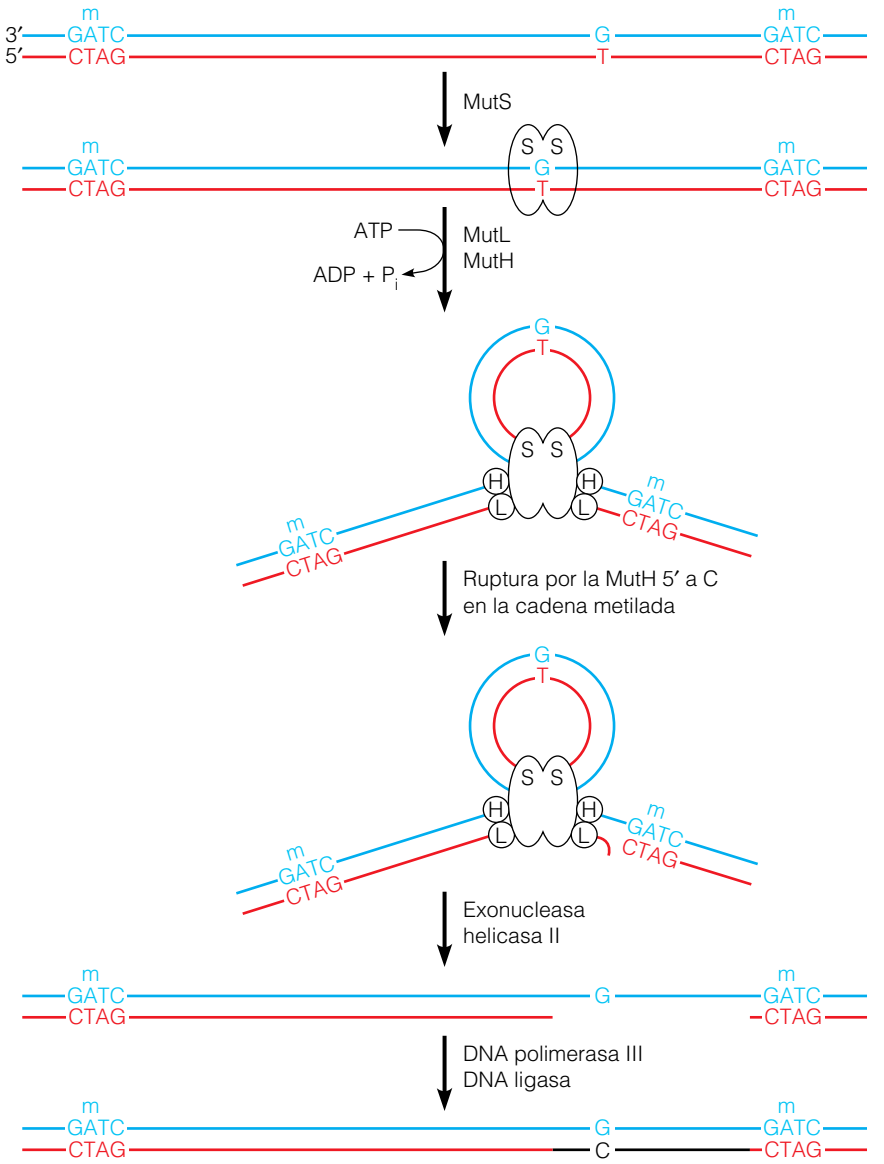
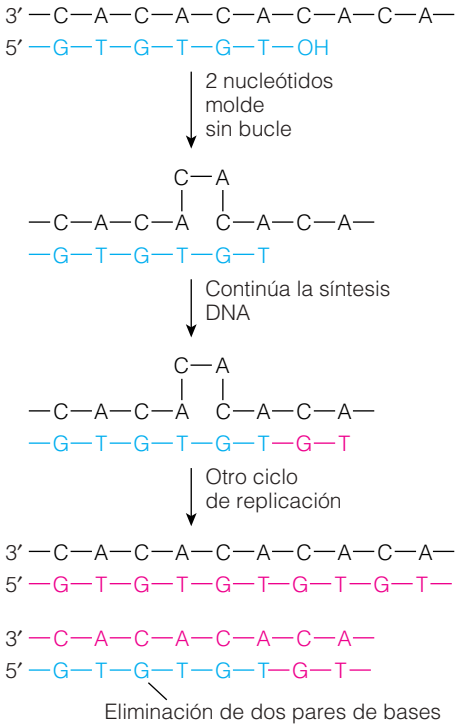


FIGURA **25.16**

Reparación de mal apareamiento dirigida por metilo en *E. coli*. La cadena hija que se ha replicado (rojo) contiene una T mal apareada con una G en la cadena molde (azul). El sistema de reparación de mal apareamiento identifica la cadena hija ya que no está metilada. De esta forma, este sistema debe funcionar antes de que la cadena hija replicada se metile, a través de la acción de la metilasa Dam sobre el residuo A en la secuencia GATC.

5′-GATC más cercana. Entonces, una actividad endonucleasa de MutH rompe en el lado 5′ de la C en la cadena sin metilar. En este punto, la helicasa II desenrolla el DNA retrocediendo hasta pasado el mal apareamiento, seguido por una exonucleasa que digiere la cadena única desplazada. El hueco que se produce lo llena la holoenzima DNA polimerasa III y una DNA ligasa, trabajando concertadamente con SSB.

Las células eucariotas poseen un sistema similar de reparación de mal apareamientos. No obstante, el paso de reconocimiento del mal apareamiento es algo más complejo, ya que participan tres *h*omólogos de *M*ut*S* (proteínas MSH), MSH2, MSH3 y MSH6. Estas tres proteínas forman heterodímeros, con diferentes especificidades de mal apareamiento; esto es, un complejo MSH2-MSH6 reconoce mal apareamientos de una sola base, inserciones y pérdidas, mientras que un complejo MSH2-MSH3 reconoce inserciones y pérdidas de dos a cuatro nucleótidos. Existen también varios homólogos de MutL, aunque no se ha encontrado un homólogo de MutH. Así, una pregunta importante sin respuesta es el mecanismo mediante el cual los sistemas eucariotas reconocen e inician



la reparación en la cadena de DNA recién replicada; es evidente que no interviene la metilación selectiva.

Igual que se ha visto en las bacterias, las mutaciones de los genes eucariotas que controlan la reparación de mal apareamiento confieren un fenotipo mutador, incrementándose las tasas de mutación espontánea en todos los loci. ¿Cómo afectan estas mutaciones la biología de las células del ser humano? En 1974, Lawrence Loeb predijo que la progresión de una célula normal hacia una célula cancerosa podría implicar la creación de un fenotipo mutador, ya que la tasa de mutación natural de las células somáticas parece ser demasiado baja para dar cuenta del número de cambios heredables que se producen durante la progresión de la célula tumoral. Dos décadas después, se ha confirmado esta predicción al encontrarse las mutaciones en las proteínas de reparación de mal apareamientos en las células tumorales de las personas con predisposición a los cánceres hereditarios denominados HNPCC (heritable nonpolyposis colon cancer; cáncer de colon apolipósico hereditario). Hasta la fecha, se ha encontrado en estas personas mutaciones en la línea germinal de los genes de un homólogo de MutS o uno de los tres homólogos de MutL. La predisposición al cáncer se hereda de forma autosómica dominante, lo cual sugiere que la mayoría de las personas afectadas son heterocigotos con un alelo natural y un alelo afuncional. La reparación de mal apareamiento es normal hasta que una mutación en una célula somática inactiva el alelo funcional y la capacidad de reparación de mal apareamiento queda eliminada, con el consiguiente aumento de la mutagénesis espontánea.

Las células tumorales de los afectados por HNPCC presentan un fenómeno que se denomina **inestabilidad de microsatélites**, un gran número de mutaciones en regiones del genoma que contienen repeticiones de secuencias de uno, dos o tres nucleótidos, normalmente con un gran aumento del número de unidades que se repiten en esas secuencias. Estos datos sugieren que las cadenas molde y producto pueden normalmente deslizar en esos lugares, de forma que la DNA polimerasa copia una secuencia corta repetida más de una vez o bien salta un segmento. Esto crea un heterodúplex con un bucle corto, como se muestra en el margen para la mutagénesis por pérdida. Normalmente, un error de la replicación de este tipo se corregiría por la reparación de mal apareamiento, pero en las células que carecen de la reparación de mal apareamiento normal, estos errores persisten y se acumulan. Esta clase de estudios ha proporcionado a los científicos un conocimiento tremendo sobre la naturaleza del cáncer como una enfermedad genética progresiva.

Recombinación

La genética de poblaciones nos enseña que la supervivencia de una especie depende de su capacidad para mantener la diversidad genética, de manera que los individuos pueden presentar diferencias en cuanto a su capacidad de respuesta ante presiones ambientales imprevistas. La diversidad se mantiene a través de la mutación, que altera genes únicos o pequeños grupos de genes en un individuo, y de la *recombinación*, que redistribuye el contenido de un genoma entre varios individuos durante la reproducción. En la biología clásica, la recombinación es el resultado del entrecruzamiento entre cromosomas hermanos apareados durante la meiosis en los eucariotas, y de hecho la información inicial que se obtuvo sobre la recombinación vino de observaciones citológicas y citogenéticas realizadas en *Drosophila*. Sin embargo, la recombinación engloba más procesos y funciones biológicas que las que participan en la reproducción sexual. En sentido estricto, **recombinación** es cualquier proceso que comporte la for-

mación de un nuevo DNA a partir de moléculas de DNA distintas, de manera que la información genética procedente de cada molécula de DNA original está presente en las nuevas moléculas. El proceso de reparación de huecos en la cadena hija que se ha descrito antes es una forma de recombinación. También lo es la integración de ciertos genomas de bacteriófagos o plásmidos en el DNA cromosómico de una bacteria hospedadora; muchos genomas víricos se integran también en las células hospedadoras animales. La recombinación interviene también en la **transposición**, el movimiento del DNA de un lugar de integración cromosómica a otro. En algunos casos, este tipo de recombinación es un mecanismo de regulación génica. El gen que sufre la transposición puede desplazarse de un lugar en el que está inactivo a otro lugar en el que puede activarse su transcripción. Otra posibilidad es que la integración de un elemento que puede sufrir una transposición ponga en marcha la expresión de los genes adyacentes. Consideraremos estos procesos más adelante en el contexto de los reordenamientos génicos.

La recombinación es cualquier proceso que cree uniones extremo con extremo de dos moléculas de DNA diferentes.

CLASIFICACIÓN DE LOS PROCESOS DE RECOMBINACIÓN

Los diferentes procesos de recombinación tienen unas necesidades muy distintas, tanto en lo que se refiere a la homología de secuencia de nucleótidos entre los elementos que se recombinan, como en lo relativo a las proteínas y las enzimas que catalizan el proceso. La recombinación meiótica en los organismos diploides requiere una homología de secuencia amplia entre los elementos que se recombinan y, por consiguiente, se denomina **recombinación homóloga**. Este término se aplica también a determinados fenómenos de recombinación que se producen entre los cromosomas bacterianos. El nuevo DNA puede introducirse en una célula bacteriana por varios procesos: (1) conjugación durante el apareamiento bacteriano, (2) transformación, cuando el DNA es captado por las células, o (3) **transducción**, cuando el DNA bacteriano que se empaquetó en una partícula de un fago se introduce mediante infección. La transducción se produce cuando el ensamblaje de las partículas del fago en una célula afectada se altera, y se incorpora DNA bacteriano en la cabeza del fago. La reinfección de otra célula bacteriana introduce ese DNA bacteriano empaquetado en la nueva célula.

Si el DNA introducido contiene un origen de replicación, como en un plásmido, puede replicarse de manera autónoma, una vez en el interior de una nueva célula bacteriana. Con más frecuencia, el DNA no contiene un origen, y su información puede expresarse y mantenerse tan sólo si el DNA es captado en el cromosoma residente mediante recombinación homóloga. El análisis bioquímico de la recombinación homóloga se ha centrado en los sistemas procariotas, que a su vez han aportado conocimientos sobre la recombinación meiótica. La mayor parte de los procesos de recombinación homóloga bacterianos tienen en común la necesidad de la proteína RecA o de un equivalente de la misma.

En cambio, la **recombinación específica de lugar** comporta tan sólo una homología de secuencia limitada entre los elementos que se recombinan. Los lugares de ruptura y unión los determinan las interacciones específicas DNA-proteína. El proceso se describió por primera vez en el bacteriófago λ. Tras la formación del círculo, el cromosoma de λ puede experimentar múltiples ciclos de replicación que dan lugar a la producción de virus o a la integración del mismo en un lugar específico del cromosoma del hospedador. En este último caso, al que se denomina **lisogenia**, la mayor parte de los genes del virus están inactivados, y el virus puede mantener una relación no letal y de larga duración con su hospedador (Figura 25.17). Los bacteriófagos que son capaces de establecer

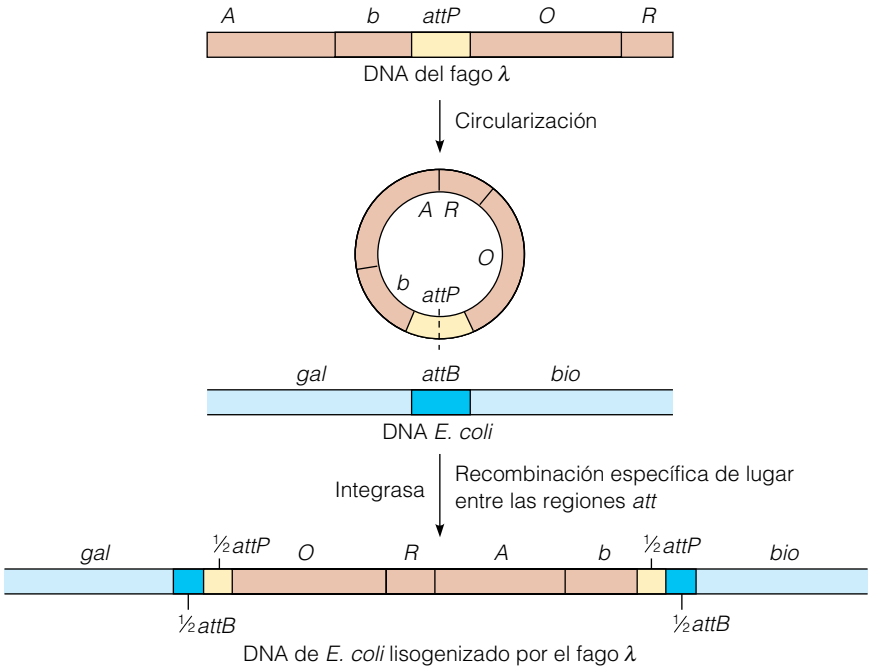


FIGURA **25.17**

Recombinación específica de lugar, que establece la lisogenia en el bacteriófago λ. El cromosoma del fago adopta la configuración circular entre los genes *A* y *R*, y se produce la recombinación entre el lugar *attP* y una región correspondiente, la *attB*, del cromosoma de *E. coli* entre los marcadores *gal* y *bio*. La enzima integrasa realiza el proceso de recombinación específica de lugar con la ayuda de una proteína bacteriana. *O* y *b* son marcadores genéticos adicionales.

lisogenia se denominan **fagos temperados**, por oposición a los fagos **virulentos**, como el fago T4, que siempre lisan las células hospedadoras tras la infección. En la mayor parte de los casos de lisogenia (aunque no en todos), la integración se produce en un lugar específico. La recombinación mediante integración del fago λ está siendo estudiada como modelo para comprender la integración de los genomas de los virus tumorales en el DNA de las células infectadas. Anteriormente se estudió como modelo de recombinación homóloga entre cromosomas, pero los procesos son diferentes, como se demostró al averiguar que las secuencias de DNA del fago y de la bacteria en las regiones que sufren la recombinación tienen tan sólo una homología de 15 pares de bases. Además, la proteína RecA no es necesaria para este proceso. Es el virus el que especifica una enzima con especificidad de lugar, denominada **integrasa**, y son las interacciones específicas DNA-proteína entre la enzima y los elementos de recombinación, y no una homología amplia de secuencia DNA-DNA, lo que determina el lugar de la recombinación.

Distinguimos otras dos formas de recombinación. La *transposición* no se basa en una homología de secuencia ni en la proteína RecA, aunque sí requiere una secuencia especial en el DNA donador. Este proceso se considera en un apartado posterior. La **recombinación ilegítima** es un fenómeno extremadamente raro que es posible que se dé por azar, y en el que no interviene ni la homología de secuencia ni la acción de ninguna proteína conocida. En la Tabla 25.3 se resumen las principales diferencias entre los cuatro tipos principales de recombinación.

RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

Ruptura y unión de cromosomas

La forma más sencilla de producirse una recombinación es romper y volver a unir moléculas de DNA. Sin embargo, si la recombinación se produce de esta forma, los lugares de ruptura deben ser exactamente los mismos en los dos cromosomas que se recombinan para que puedan regenerarse genes intactos. Algunos investigadores se decantaban por otros mecanismos alternativos, pero

TABLA 25.3 Características de distintos tipos de recombinación genética

Tipo	Requisito: Homología de secuencia	Requisito: Proteína RecA o equivalente	Requisito: Enzima específica de secuencia
Homóloga	Sí	Sí	No[a]
Específica de lugar	Sí (unas 15 bases)	No	Sí
Transposición	No	No	Sí
Ilegítima	No	No	Desconocido

[a] El lugar Chi o su equivalente determina los lugares de corte (véase la página 1071), pero el reconocimiento inicial de los lugares de apareamiento se produce por homología de secuencia.

en 1961 Matthew Meselson y Jean Weigle demostraron que la recombinación se produce de hecho a través de una ruptura y nueva unión de los cromosomas. La demostración, que se esquematiza en la Figura 25.18, se basa en un tipo de experimento de Meselson-Stahl (véase la Figura 4.14, página 110). Se infectó *E. coli* con dos poblaciones de fagos λ marcados genéticamente, una de las cuales se había sometido a un marcaje radiactivo de densidad mediante su cultivo en un medio con ^{13}C—^{15}N. Las partículas de fago resultantes de este cruce se centrifugaron hasta el equilibrio en un gradiente de cloruro de cesio. Se recuperaron fagos con genotipos recombinantes en todas las partes del gradiente, mientras que los fagos sin recombinación eran de manera uniforme ligeros o pesados. Este resultado sólo podía darse si los fagos recombinantes contenían DNA procedente de ambos orígenes, mediante la ruptura y nueva unión del mismo.

Este experimento tuvo otro importante resultado. La producción del fago a partir de los cruzamientos se analizó de la forma estándar, mediante el examen visual de las placas. Aunque cada placa procede de una sola partícula de fago, muchas de las placas del experimento de Meselson-Weigle contenían fagos con dos genotipos diferentes, a pesar de que todos procedían de un solo fago infectante. Esto sugirió que la recombinación implica la formación de una región de **DNA heterodúplex** en la que una cadena de DNA procede de un progenitor y la otra del otro. Si la región heterodúplex contiene un mal apareamiento, la posterior replicación de ese DNA da lugar a dos moléculas de DNA progenie con genotipos diferentes, como se muestra en la Figura 25.19.

Otra observación inicial fue que la recombinación se estimula por procesos que crean mellas o rupturas en las cadenas de DNA, como por ejemplo la falta de timidina o la radiación UV. Ello sugirió que en la iniciación de la recombinación podía intervenir DNA de una sola cadena o extremos de DNA libres.

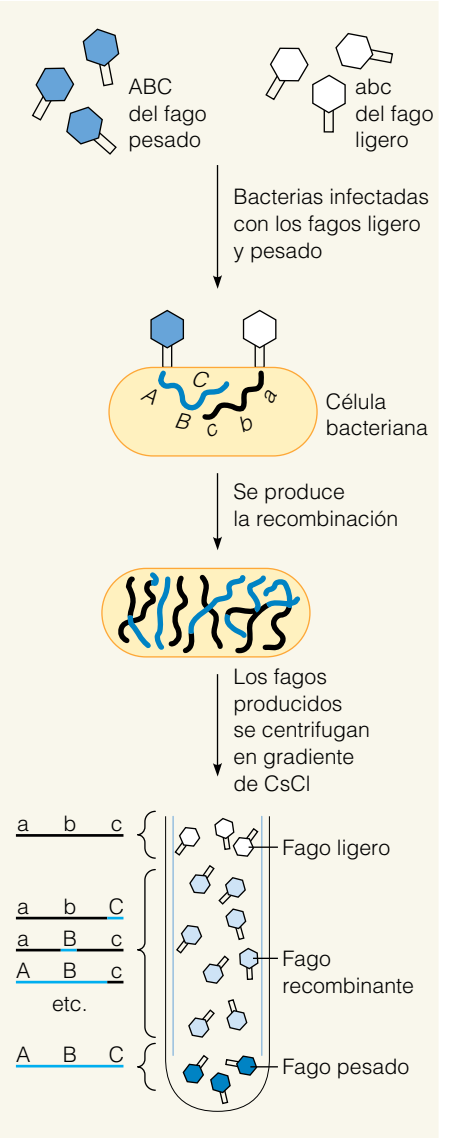


FIGURA **25.18**

Experimento de Meselson-Weigle. Este experimento estableció que se produce una recombinación genética mediante ruptura y nueva unión de las cadenas de DNA.

Modelos de recombinación

Combinando las observaciones anteriores con los datos obtenidos sobre la recombinación en los hongos, Robin Holliday propuso en 1964 un modelo para la recombinación homóloga entre moléculas de DNA de doble cadena. Este modelo, detallado en la Figura 25.20, continúa estimulando la reflexión y los experimentos sobre este proceso.

Holliday propuso que la recombinación se inicia con la formación de mellas en el mismo lugar en dos cromosomas apareados (paso 1). El desenrollamiento parcial de las dobles hélices va seguido de la **invasión de la cadena**, en la que un extremo libre de una sola cadena de un dúplex se aparea con su cadena complementaria que no está rota en el otro dúplex, y viceversa (paso 2). La unión enzimática genera un intermediario de cadena cruzada, que se denomina **unión de Holliday** (paso 3). La estructura de cadena cruzada puede despla-

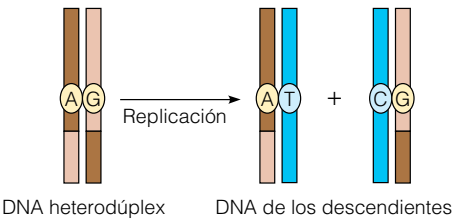


FIGURA **25.19**

Generación de descendientes del fago que contienen dos genotipos mediante la replicación de DNA heterodúplex.

La recombinación homóloga comporta la ruptura y la nueva unión de los cromosomas.

zarse en ambas direcciones mediante el desenrollamiento y nuevo enrollamiento del dúplex (paso 4). La unión de Holliday se "resuelve" en dos dobles cadenas sin romper, mediante un proceso de rotura y nueva unión de las cadenas. El proceso que da lugar a la recombinación se inicia con la isomerización de la estructura de Holliday (paso 5), seguida de la ruptura de la cadena, con lo que las cadenas que se van a romper (en el paso 9) son las que *no* estaban rotas en el paso 1. La resolución de la estructura resultante (pasos 10 y 11) genera dos cromosomas recombinantes para el DNA que flanquea la región y cada uno contiene una región heterodúplex. Sin embargo, si las cadenas cruzadas originales (las que *sí estaban* rotas en el paso 1) se rompen y vuelven a unirse (pasos 6-8), los productos son dobles cadenas no recombinantes, cada una de las cuales contiene una región heterodúplex (es decir, no recombinante respecto a los marcadores exteriores A y Z).

En la actualidad existe una cantidad considerable de datos que respaldan los conceptos centrales del modelo de Holliday, en especial la visualización de las uniones de Holliday con el microscopio electrónico (Figura 25.21). Sin embargo, el modelo se ha modificado tras la aparición de nuevos datos. Matthew Meselson y Charles Radding propusieron que la recombinación podría iniciarse con una sola mella (lo que elimina la molesta pregunta de cómo pueden mellarse dos dobles cadenas precisamente en el mismo punto). Como se indica en la Figura 25.22, se produce la síntesis con desplazamiento de la cadena (flecha roja, paso 1), de manera que un extremo de cadena única desplazado del dúplex con mella, A, invade la región homóloga del dúplex sin romper, B (paso 2). Finalmente, el bucle desplazado en el dúplex B se fragmenta y degrada parcialmente (paso 3), y el extremo desplazado del dúplex A se liga al B (paso 4). A continuación, se produce una isomerización, como en el modelo de Holliday, con las cadenas que originalmente no se habían roto cruzadas (paso 5). Una característica adicional del modelo de Meselson-Radding es el hecho de que la migración de rama pueda conducir a que los cortes finales de estas cadenas puedan producirse a cierta distancia del lugar de la invasión de la cadena o de la mella original (pasos 6 y 7). En principio, un extremo 5′ o 3′ podría iniciar el

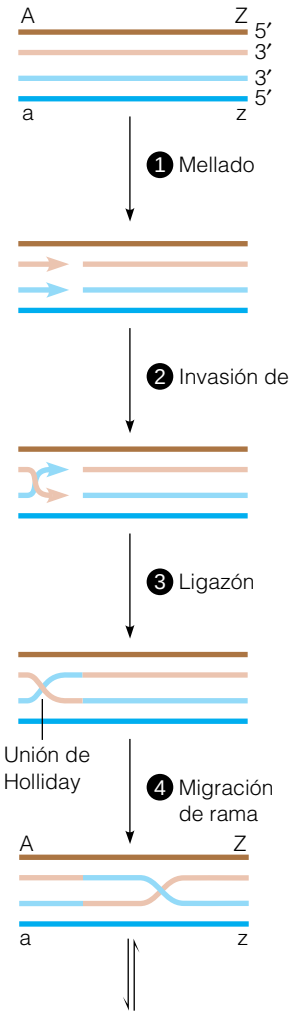


FIGURA **25.20**

Modelo de Holliday de la recombinación homóloga. A, a, Z y z son marcadores genéticos.

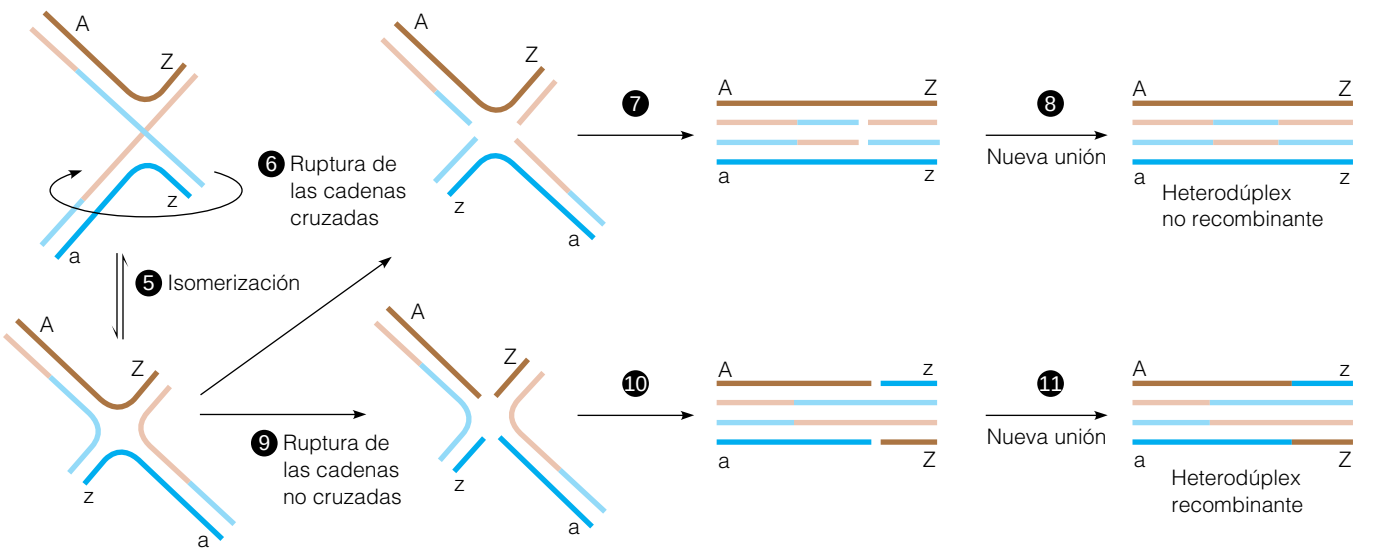




FIGURA **25.21**

Fotografía de microscopia electrónica en la que se ve una unión de Holliday. Esta unión se creó durante la recombinación entre dos moléculas de DNA de plásmido.

Cortesía de H. Potter y D. Dressler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1977) 74:4168-4172.

proceso de invasión de la cadena. Como se indica más adelante, es probable que un extremo 3′ inicie la recombinación en *E. coli*.

Proteínas que participan en la recombinación homóloga

Los modelos de Holliday y de Meselson-Radding explicaban la mayor parte de los datos existentes sobre la recombinación homóloga entre cromosomas apareados, en especial en cuanto a los estudios realizados en eucariotas inferiores como las levaduras. Además, los modelos podían adaptarse con facilidad para explicar la reparación del hueco de la cadena hija o la recombinación que se produce en las bacterias después de la transformación o la conjugación. Algunas de las proteínas que se cree que intervienen en el proceso, en especial la DNA polimerasa, la DNA ligasa y la proteína de unión al DNA de cadena única, se han caracterizado y se ha demostrado su participación en la recombinación. ¿Qué puede decirse de otras proteínas que deben actuar si los modelos son básicamente correctos? Para responder a esta pregunta volvamos a *E. coli* y a sus fagos y a las características de las bacterias mutantes con una recombinación deficiente. Las mutaciones que confieran un fenotipo de recombinación deficiente (*rec*⁻) se encuentran en varios loci, y hay dos productos génicos importantes, que son los responsables de la mayor parte de los fenómenos de recombinación bacterianos. Uno de estos productos, la proteína RecA, se ha mencionado ya antes. La otra proteína se denomina exonucleasa V o nucleasa RecBCD.

La RecA es una proteína multifuncional asombrosa con un M_r de aproximadamente 38 000. En la recombinación, impulsa el apareamiento de las cadenas homólogas, como se ha descrito antes en relación con la reparación por recombinación. In vitro pueden demostrarse varias reacciones de apareamiento de las cadenas, con dos ejemplos que se exponen en la Figura 25.23. Un ejemplo implica un intercambio de tres cadenas, y el otro implica cuatro cadenas. Cualquiera que sean las estructuras que participan, está claro que RecA se une a tres cadenas de DNA durante la reacción de intercambio de cadenas que cataliza. Como se esquematiza en la Figura 25.24, el proceso comienza con una reacción entre la RecA y el DNA de cadena única (ss) para dar un filamento nucleoproteico característico. Como muestran la observación del filamento al microscopio electrónico (véase en la Figura 25.25 la fotografía de microscopia de tunelización de barrido) y los análisis cristalográficos de la proteína, RecA se envuelve alrededor del ssDNA como una hélice a derechas con múltiples subunidades, con seis monómeros RecA por vuelta. Una vez unido el ssDNA, el filamento rastrea el DNA de doble cadena (ds) buscando secuencias complementarias de las de la cadena única ya unida. En este proceso, el dsDNA también es captado dentro del filamento, dando una estructura denominada molécula compartida (véase la Figura 25.26). La unión del dsDNA requiere ATP, pero ese ATP no necesita hidrolizarse en el proceso. En cambio, el movi-

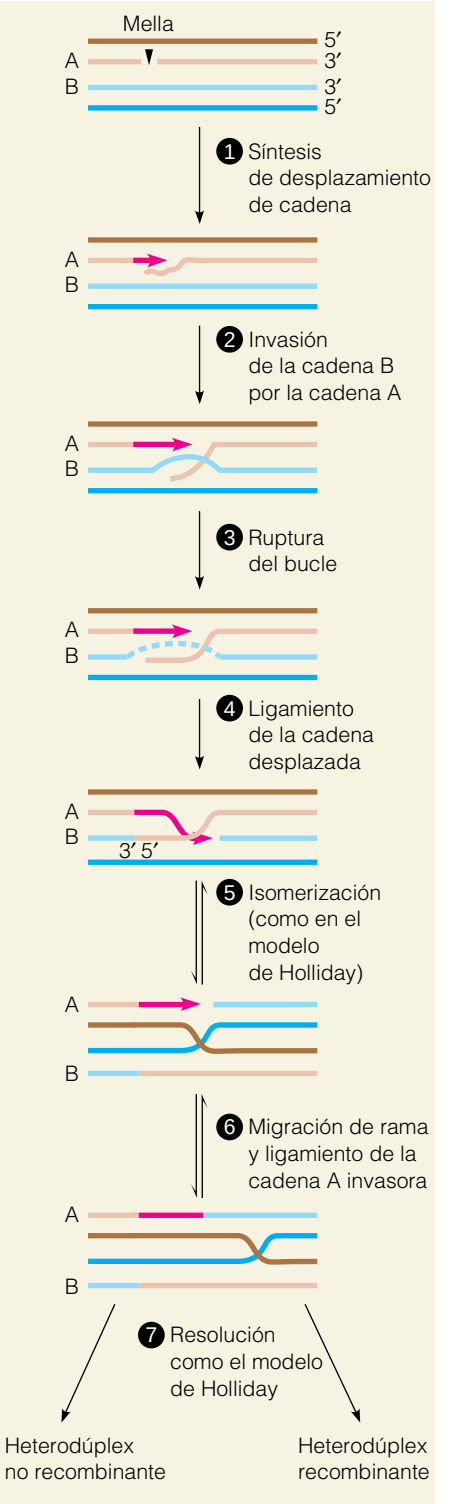


FIGURA **25.22**

Modelo de Meselson-Radding de la recombinación homóloga.

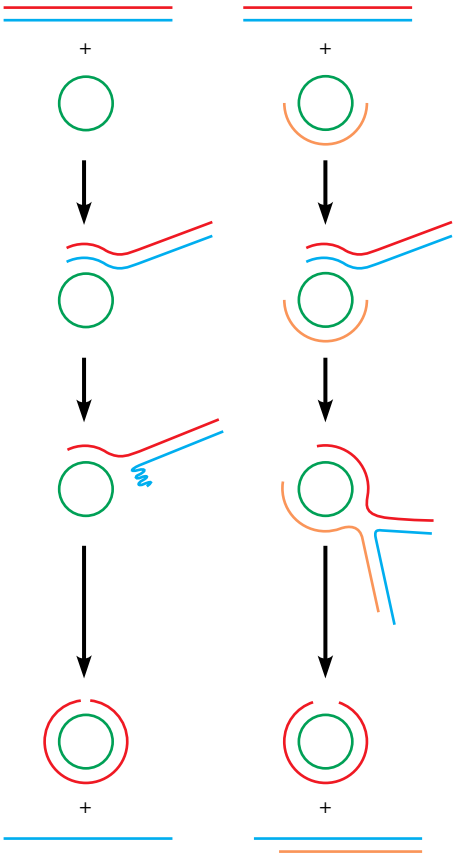


FIGURA **25.23**

Reacciones de intercambio de cadenas de DNA por medio de la proteína RecA. **(a)** Proceso de intercambio de tres cadenas; **(b)** intercambio de cuatro cadenas. No obstante, como se señala en el texto, sólo se asocian simultáneamente con la RecA tres cadenas.



FIGURA **25.25**

Complejo RecA-DNA visto mediante microscopia de tunelización de barrido. Los cordones gruesos corresponden al complejo RecA-DNA y muestran una estructura helicoidal. Los filamentos finos corresponden a DNA sin recubrimiento.

Reproducido con permiso de M. Amrein et al., *Science* (1988) 240:514-516. © 1988 AAAS, proporcionado por G. Travaglini.

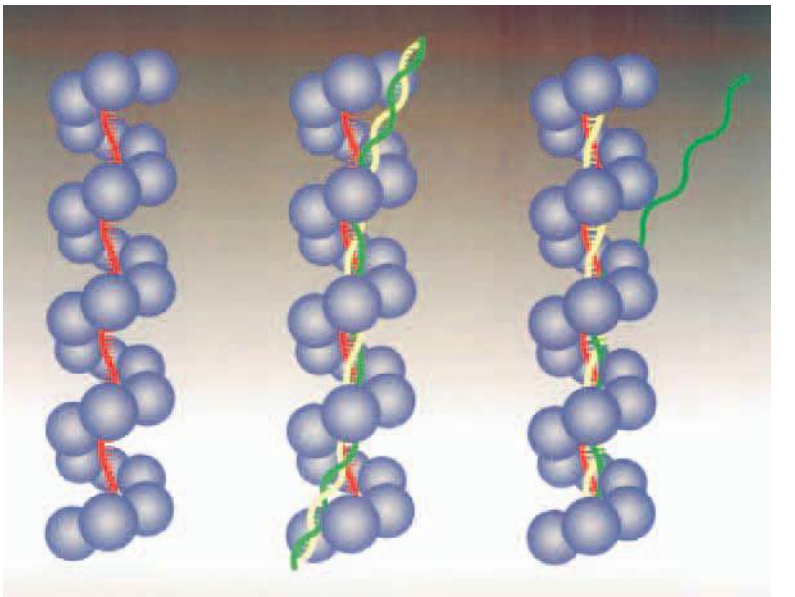


FIGURA **25.24**

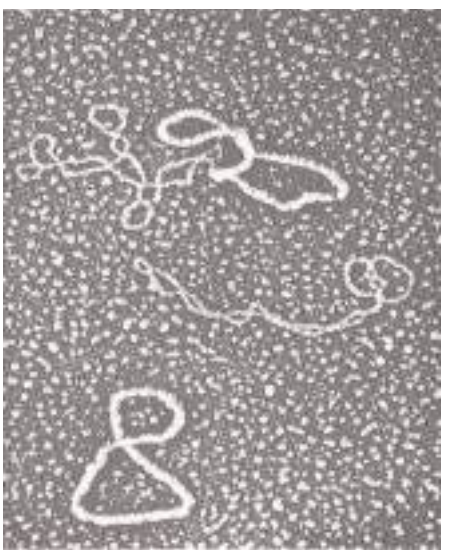
Modelo del intercambio de cadena por medio de RecA. A la izquierda, un filamento RecA-ssDNA, con el ssDNA en rojo. En el centro, una molécula de unión, con DNA de triple cadena; el ssDNA original está envuelto en el surco secundario del DNA dúplex (cadenas amarilla y verde). A la derecha, se está produciendo el intercambio de cadenas. El ssDNA rojo es de secuencia complementaria con la cadena amarilla del dúplex, y la acción de RecA es desplazar la cadena verde, coincidiendo con la formación de un nuevo dsDNA rojo-amarillo.

Cortesía de M. Kubista et al., *Biological Structure and Dynamics*, R. H. Sarma y M. H. Sarma, eds. (Schenectady, Nueva York: Adenine Press, 1996), pp. 49-59. © 1996 Adenine Press, Inc.

FIGURA **25.26**

Fotografía de microscopia electrónica en que se ven moléculas conjuntas. Por razones técnicas, esta imagen se obtuvo con la proteína UvsX del T4, que tiene una acción similar a la RecA de *E. coli*. El DNA de una sola cadena tiene un aspecto mucho más grueso que el DNA de doble cadena porque está recubierto por la proteína UvsX. En la parte inferior se observa un DNA de una sola cadena circular; en la parte media, un DNA de doble cadena circular, y en la parte superior una molécula conjunta, con uno de cada. Las moléculas conjuntas pueden formarse entre secuencias homólogas de moléculas circulares, pero las cadenas no se entrelazan.

Cortesía de L. D. Harris y J. Griffith, *J. Biol. Chem.* (1987) 262:9285-9292.



miento del complejo ssDNA-proteína con respecto al dsDNA requiere la hidrólisis del ATP. Durante este proceso, el dsDNA se desenrolla y se estira hasta alrededor de 1.5 veces su longitud normal. El movimiento del complejo está polarizado en la dirección 5′ a 3′ a lo largo del ssDNA unido inicialmente. Durante el movimiento, se forma transitoriamente una estructura de triple cadena, con el ssDNA (la cadena roja de la Figura 25.24) enrollada en el surco secundario del

dsDNA. El ssDNA analiza continuamente la cadena antiparalela en el dsDNA (amarilla) buscando complementariedad de secuencia. No está claro cómo ocurre esto, pero evidentemente sobresalen de la estructura de doble cadena secuencias cortas de oligonucleótidos que pueden aparearse con el ssDNA si se encuentra complementariedad de secuencia. Una vez establecida la complementariedad, se produce la migración de rama, con el intercambio simultáneo de cadena. Se forma un dúplex entre la cadena roja (originalmente ssDNA) y la cadena amarilla (complementaria de la cadena roja), mientras que la cadena desplazada (verde) se desenrolla, saliendo del complejo. La hidrólisis de ATP durante este período puede impulsar la rotación del DNA dentro del filamento, facilitando la liberación de la cadena desplazada.

La recombinación se produce preferentemente en o cerca de determinadas secuencias del DNA. En *E. coli*, la recombinación está favorecida cerca de la secuencia octanucleotídica específica, 5′-GCTGGTCC, denominada Chi (*c*rossover *h*otspot *i*nstigator; instigador de punto caliente de entrecruzamiento). ¿Cómo estimula este lugar la recombinación? Otra enzima importante, la proteína RecBCD, una enzima heterotrímera multifuncional codificada por los genes *recB*, *recC* y *recD* exhibe especificidad de secuencia para Chi. Esta enzima se une en una rotura de doble cadena en un DNA dúplex y utiliza una actividad helicasa para desenrollar y degradar parcialmente el DNA. El extremo 3′ está desplazado como un bucle, que se recubre con la proteína SSB; este tipo de bucles pueden verse en el DNA tratado con RecBCD, si se inhibe la actividad nucleasa de la enzima (Figura 25.27). Cuando la enzima alcanza Chi, una interacción específica de secuencia hace que RecBCD cambie las cadenas y cambie su polaridad preferida de degradación del DNA. Estos cambios facilitan también, de alguna manera, la carga de RecA a un extremo 3′ libre, lo cual inicia la invasión de la cadena de un dúplex cercano, como se expone en la Figura 25.28.

Una vez formada la unión de Holliday, la migración de rama es esencial para la formación definitiva de las estructuras recombinantes, como se muestra en las Figuras 25.20 y 25.22. Esto es, en gran parte, responsabilidad de otras tres proteínas. En *E. coli*, estas tres proteínas son los productos de los genes *ruvA*, *ruvB* y *ruvC*. RuvA es una proteína de unión al DNA, cuya especificidad la dirige hacia la estructura de Holliday de cuatro cadenas. La proteína RuvB es una "proteína motora" que requiere ATP, que se une a dos brazos opuestos de la unión. En el modelo de la Figura 25.29, que se basa en las estructuras cristalinas de las proteínas RuvA y RuvB aisladas, las dos moléculas de RuvB actúan como bombas gemelas, girando los dos brazos en direcciones opuestas. Esto fuerza la migración de rama impulsando el movimiento rotatorio de las otras dos cadenas hacia la unión. Finalmente, RuvC se une y comienza la resolución de la estructura de Holliday mellando las dos cadenas.

Aunque no se han detectado homólogos de la proteína Ruv en células eucariotas, la mayor parte de la bioquímica de la recombinación homóloga en eucariotas es semejante a lo descrito aquí. En particular, la proteína RAD51 de las células del ser humano y de las levaduras tiene una actividad de apareamiento de cadenas semejante (aunque no idéntica) a la de RecA y las dos proteínas tienen una gran homología de secuencia con RecA. En las células eucariotas, una función esencial de la recombinación homóloga es la reparación de las roturas de doble cadena, que puede crear la radiación ionizante, el estrés oxidativo u otro daño ambiental y que sería letal si no se reparasen. En los eucariotas, un cromosoma roto puede utilizar la información de secuencia de su homólogo para reconstruir la secuencia de DNA original del lugar de ruptura, como se sugiere en la Figura 25.30. Los datos más recientes implican a las proteínas RuvA y RuvB, o sus correspondientes en eucariotas, en la formación de la estructura

La RecA, una enzima bacteriana multifuncional, utiliza ATP para impulsar el apareamiento de secuencias de DNA homólogas.

La RecBCD, una enzima multifuncional, desenrolla y vuelve a enrollar el DNA, iniciando la recombinación mediante cortes del DNA específicos de secuencia.

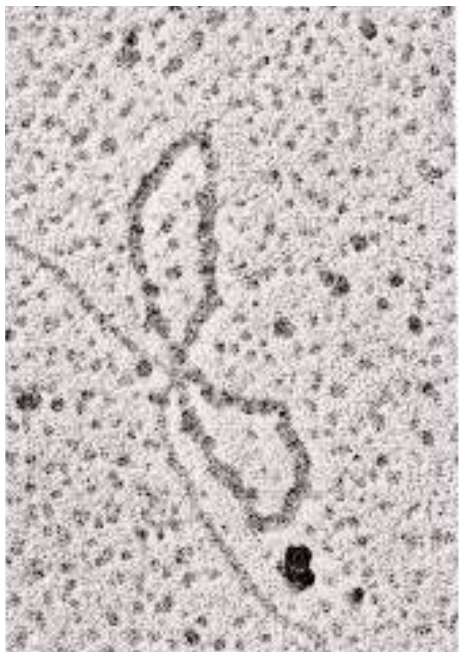


FIGURA **25.27**

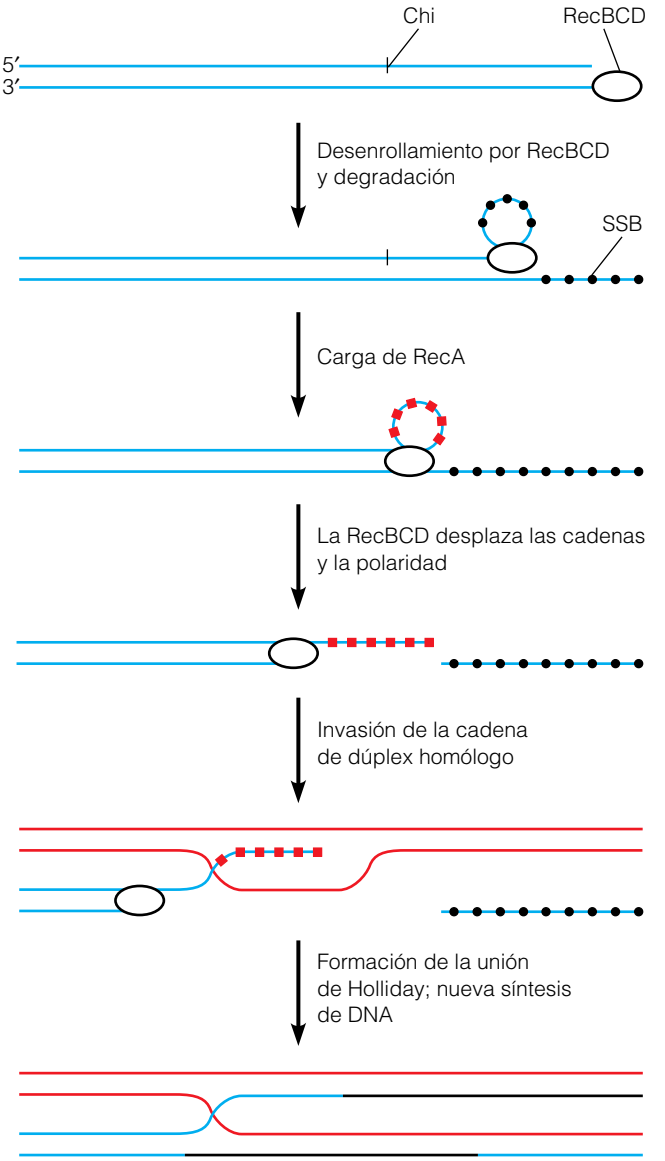
"Orejas de conejo". Esta estructura se creó mediante la acción de la enzima RecBCD sobre el DNA del fago T7, con la adición de Ca^{2+} para inhibir la nucleasa. Los bucles de una sola cadena parecen más gruesos que el DNA de doble cadena porque están revestidos por una proteína de unión al DNA de una sola cadena.

Cortesía de G. R. Smith et al., *Coli Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* (1984) 49:485-495, proporcionado por A. F. Taylor.

FIGURA **25.28**

Modelo de la acción de la RecBCD, los lugares Chi y la RecA en la iniciación de la recombinación homóloga.

Reproducido de D. G. Anderson y S. C. Kowalczykowski, *Cell* (1997) 90:77-86.



de Holliday cuya resolución conduce a la reparación de las roturas de doble cadena.

El proceso que hemos esbozado se basa en fotografías de microscopia electrónica de las moléculas de unión (Figura 25.26) y de los filamentos nucleoproteicos DNA-RecA (Figura 25.25). Las mejores imágenes de las moléculas de unión se han obtenido no con la proteína RecA de *E. coli* sino con la proteína UvsX del fago T4, que realiza funciones similares en el metabolismo del DNA del fago a las que realiza la proteína RecA en el metabolismo del DNA en *E. coli*.

RECOMBINACIÓN ESPECÍFICA DE LUGAR

La recombinación para integrar o escindir los cromosomas de los fagos temperados comporta interacciones específicas DNA-proteína.

Como hemos comentado, la alineación de lugares para la recombinación homóloga se produce a través de interacciones DNA-DNA (apareamiento de bases). Otra clase importante de reacciones de recombinación está dirigida por interacciones DNA-proteína muy específicas, aunque existe un corto tramo de homología de DNA en la zona real de corte y nueva unión. Nuestro conoci-

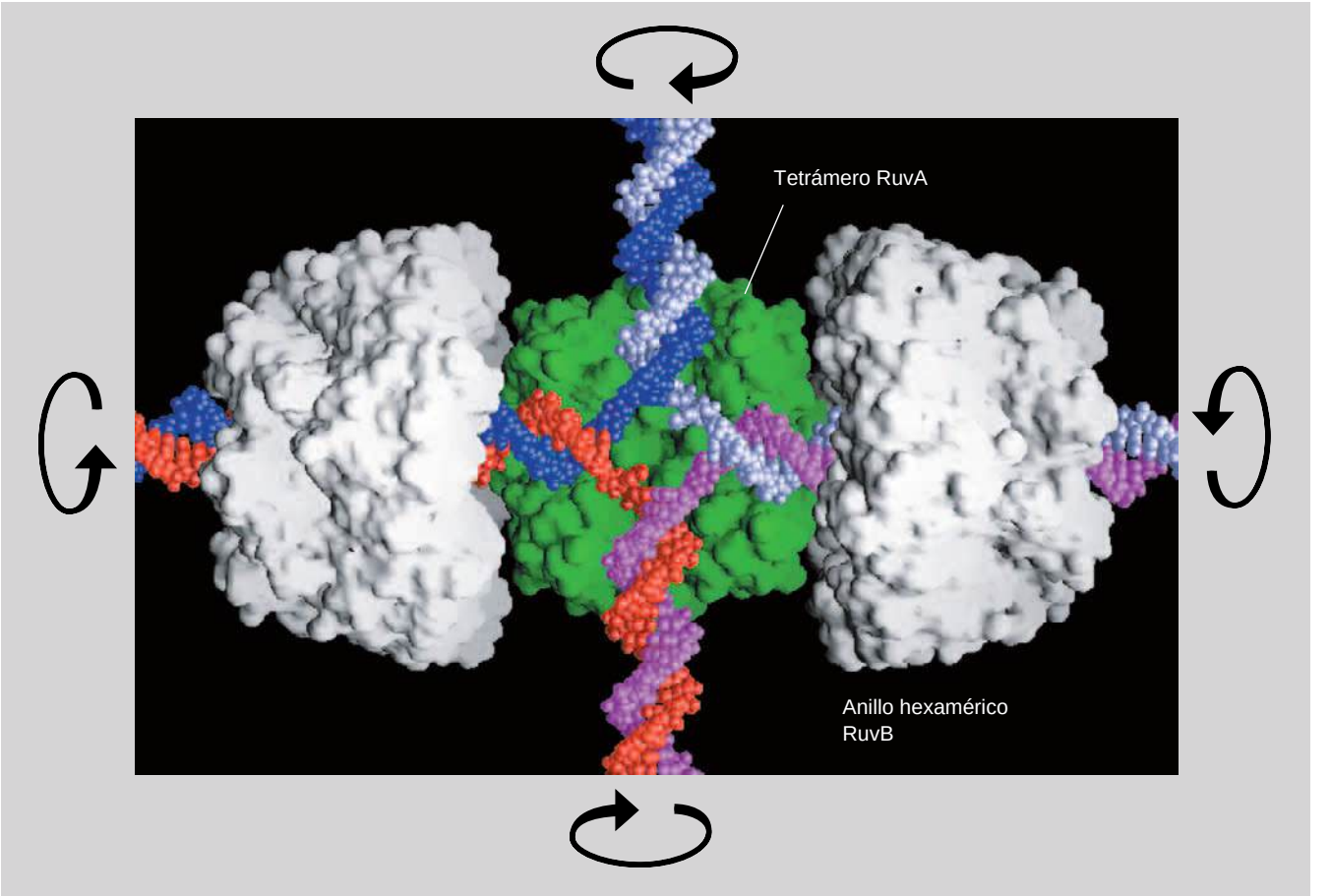


FIGURA **25.29**

Modelo de la estructura RuvA-RuvB-unión de Holliday. Se basa en las estructuras cristalinas de RuvA y RuvB. La migración de rama se supone implica desenrollar el DNA de izquierda a derecha, a través de las bombas gemelas de RuvB, con los brazos superior e inferior dibujados en el centro y finalmente fuera a través de las bombas.

Cortesía de Peter Artymiuk, Krebs Institute, Sheffield.

miento bioquímico de esta recombinación específica de lugar está más avanzado en lo relativo al mecanismo mediante el que los fagos moderados como el λ se integran en lugares específicos del cromosoma de la bacteria infectada. Este proceso proporciona un modelo importante para el estudio de las reacciones equivalentes en los organismos superiores, como los reordenamientos del DNA que intervienen en la maduración de los genes que forman los anticuerpos (véase la página 1076).

El cromosoma del fago λ circularizado se integra en un lugar específico del cromosoma de *E. coli*, el *attB*, que se encuentra entre los genes implicados en la utilización de la galactosa y la síntesis de biotina (los marcadores *gal* y *bio*), como se esquematizó en la Figura 25.17. La integración se produce en un lugar específico del cromosoma del fago, denominado *attP*. Se requieren dos proteínas para esta recombinación específica de lugar: (1) integrasa del fago (Int, el producto del gen *int*) y (2) una proteína de *E. coli* llamada IHF (*i*ntegration *h*ost *f*actor; factor de integración del hospedador). Mediante cristalografía de rayos X se ha visto que IHF fuerza un giro de 90° cuando se une al DNA (Figura 25.31a). El DNA del fago debe estar superenrollado para que pueda producirse la recombinación. Este superenrollamiento, más la distorsión creada por la unión de IHF a lugares específicos en *attP*, facilita la unión de Int a lugares adyacentes. Se forma una estructura nucleoproteica especializada denomina intasoma, con la región *attP* de 230 pares de bases envolviendo siete moléculas de Int, cada una de ellas unida a un lugar específico. Esta estructura se alinea con *attB*, que tiene una longitud de tan sólo 23 pares de bases, y se une a dos moléculas de Int. En la zona central de cada lugar hay una región de 15 pares de ba-

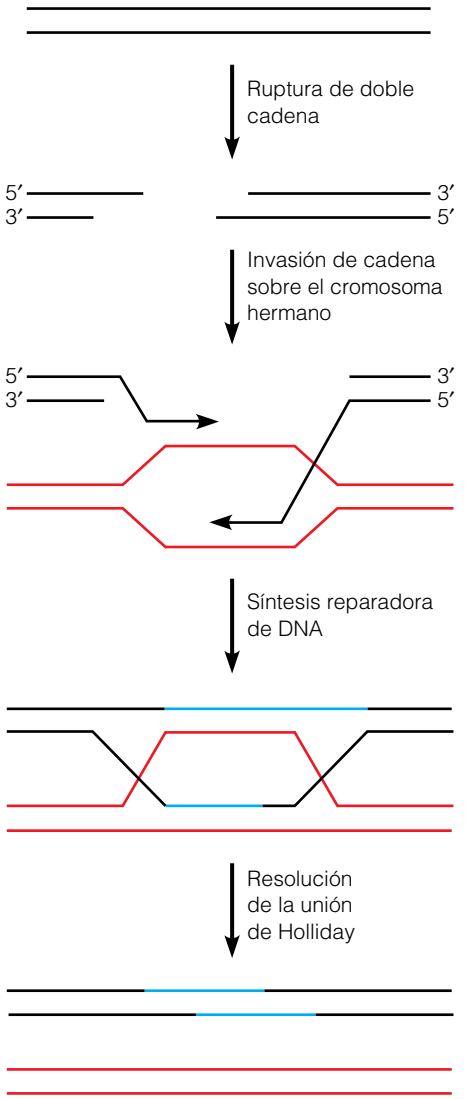


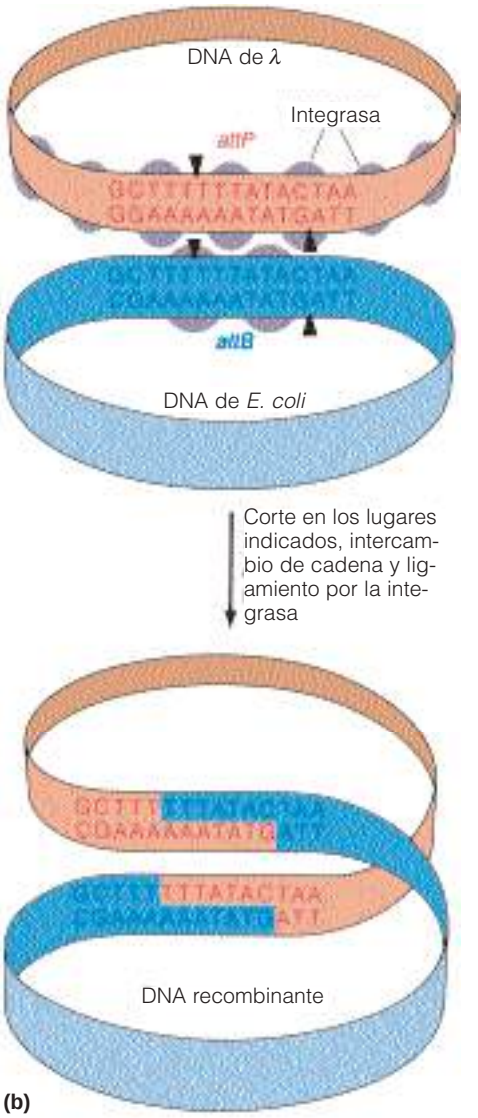
FIGURA **25.30**

Modelo de la reparación de la rotura de doble cadena a través de la recombinación homóloga. Participan RAD51 y varias otras proteínas.

Reproducido de P. Baumann y S. C. West, *Trends Biochem. Sci.* (1998) 23:247-251. © 1998 con permiso de Elsevier Science.



(a)



(b)

FIGURA **25.31**

Recombinación integradora en el fago λ. **(a)** Doblado del DNA por IHF que muestra la cristalografía de rayos X. **(b)** Recombinación específica de lugar. Tras la unión de IHF (no se muestra), se forma el intasoma, y la integrasa cataliza la rotura en los lugares indicados con cuñas y luego vuelve a unir las cadenas para crear lugares de enganche híbridos. Por simplicidad, no se muestra una migración de rama corta que tiene lugar antes de resolverse la unión de Holliday.

(a) Cortesía de P. A. Rice, S. Yang, K. Miznuchi y H. A. Nash, *Cell* (1996) 87:1298.

ses con homología completa (Figura 25.31b). En cada una de esas secuencias, la Int crea un corte escalonado, con un solapamiento de siete nucleótidos. Los extremos se intercambian para formar una unión de Holliday. Las secuencias centrales de la bacteria y el fago producen dos secuencias híbridas, cada una de las cuales contiene DNA tanto del fago como bacteriano. La proteína Int multifuncional, que ha catalizado ya el corte con especificidad de lugar y el intercambio de cadenas, completa ahora el proceso con una reacción de DNA ligasa para unir los extremos de manera covalente.

Cuando un cromosoma del fago λ se integra, queda básicamente en un estado latente. Casi todos sus genes están desactivados y sólo se replican como parte del cromosoma bacteriano en el que se encuentran. Sin embargo, los cambios de la expresión génica (véase el Capítulo 26) pueden activar el cromosoma integrado o **profago**. Cuando esto sucede, se invierte la secuencia de pasos que se ha descrito antes, con la escisión de un cromosoma circular del fago. Es necesaria otra proteína, denominada Xis, además de la Int y de la IHF. Xis proporciona especificidades de unión para su enganche a los lugares fago-bacteria híbridos que flanquean al profago, de forma que sólo se produce la escisión cuando están presentes Int y Xis.

Reordenamientos génicos

Hasta mediados los años 1970, se consideraba que el contenido de información genética de un organismo o una población se mantenía estático. Se creía que todas las células de un organismo diferenciado tenían un contenido de DNA idéntico, y que las variaciones entre distintas células se producían a nivel de la expresión de los genes. En favor de esta idea estaba el hecho de que en algunas plantas, como las zanahorias, una sola célula diferenciada puede manipularse en cultivo para dar lugar a una planta completa normal. Sin embargo, los avances más recientes han demostrado una plasticidad inesperada del DNA. En el desarrollo normal de los eucariotas, pueden eliminarse segmentos de DNA del genoma, pueden trasladarse de un lugar a otro dentro del mismo o duplicarse múltiples veces. Además, se han descrito elementos genéticos móviles tanto en los procariotas como en los eucariotas. Estos segmentos de DNA pueden desplazarse de un lugar de integración cromosómico a otro, aparentemente sin relación con los procesos del desarrollo. Como se ha señalado antes, estos procesos constituyen una forma especializada de recombinación.

De hecho, se predijo la plasticidad del DNA, pero fueron muy pocos los científicos que lo hicieron. El trabajo de Barbara McClintock sobre la genética del maíz, iniciado en los años 1940, le llevó a postular la existencia de mecanismos de regulación genética que actuaran a través de la acción de elementos genéticos móviles. Sin embargo, transcurrieron tres décadas antes de que la demostración física de estos elementos en las bacterias hiciera que se prestara atención a los trabajos pioneros de McClintock. En el resto de este capítulo consideraremos tres aspectos muy estudiados de la plasticidad del genoma: la base genética de la variabilidad de los anticuerpos en los vertebrados, la transposición génica y la amplificación génica.

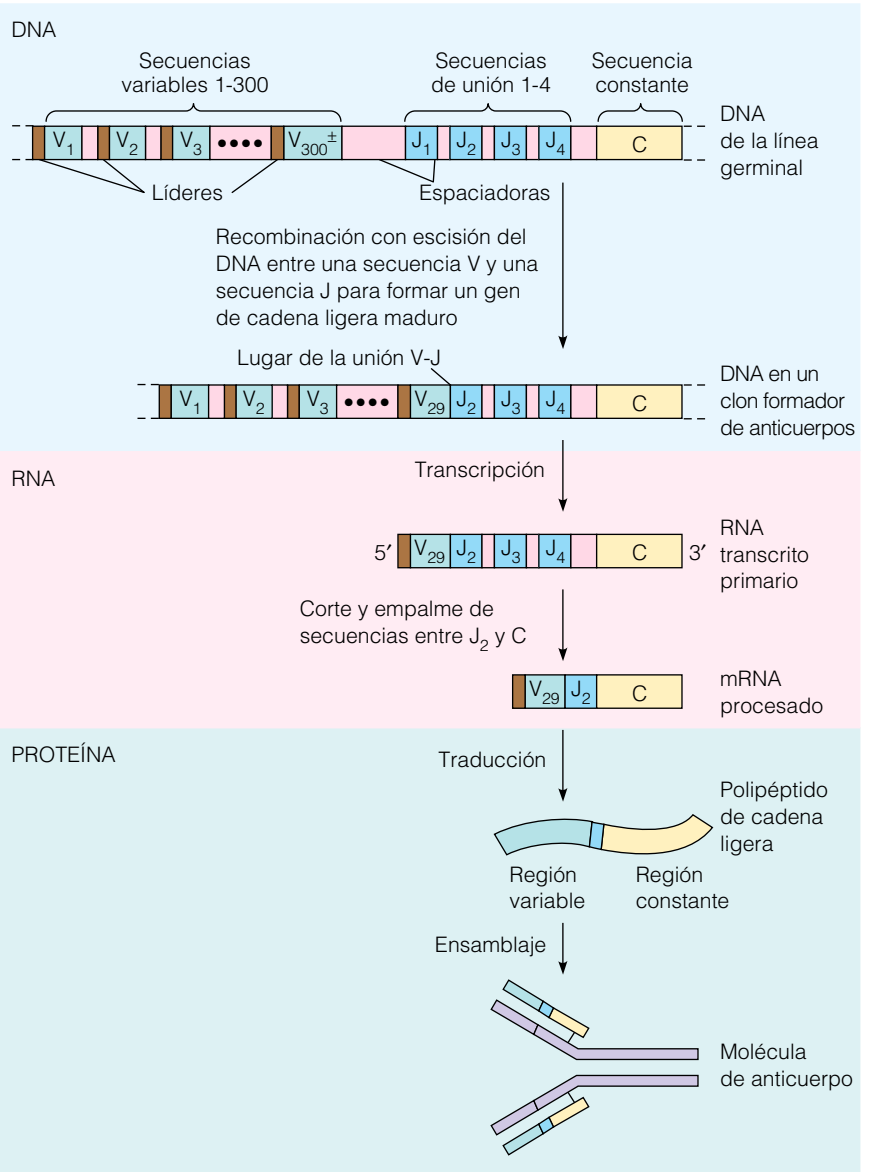
SÍNTESIS DE LAS INMUNOGLOBULINAS: GENERACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE ANTICUERPOS

Recuérdese del Capítulo 7 que los anticuerpos son proteínas elaboradas por los sistemas inmunitarios de los vertebrados, que colaboran en la defensa frente a los agentes infecciosos y otras sustancias extrañas al animal. La respuesta inmunitaria, que se produce como consecuencia de la introducción de un antígeno, da lugar a la formación de varios anticuerpos muy específicos. Se calcula que un ser humano es capaz de sintetizar más de 10 millones de anticuerpos diferentes. La mayor parte de esta gran diversidad se genera a través de la acción de reordenamientos génicos controlados con gran precisión, en los que participa tan sólo una pequeña fracción de la capacidad de codificación del genoma. Estos reordenamientos se producen durante la diferenciación de muchos clones celulares individuales, de tal manera que cada clon se especializa en la síntesis de uno y sólo uno de los anticuerpos. Otras familias grandes de proteínas se diversifican mediante mecanismos similares. La respuesta inmunitaria comporta una proliferación de clones de células que producen anticuerpos especializados para reaccionar con el antígeno específico, o inmunógeno, que ha provocado esa respuesta. Esta **expansión clonal** permite la producción a gran escala de anticuerpos específicos, que son necesarios para combatir la infección u otra amenaza para el sistema inmunitario.

Para ver la forma en que se genera la diversidad inmunológica, consideremos un tipo de anticuerpos, la clase de inmunoglobulina G o **IgG**. Recuérdese del Capítulo 7 que estas proteínas están formadas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras (véase la Figura 25.32). Cada cadena comprende dos segmentos diferenciados, un dominio de secuencia polipeptídica variable y un dominio

FIGURA **25.32**

Reordenamientos génicos en la maduración de los genes de los anticuerpos. El reordenamiento de las secuencias C, V y J produce un gen de cadena ligera κ maduro, y la transcripción, procesamiento y traducción de este gen da lugar a una cadena ligera κ del anticuerpo.



constante, que se mantiene prácticamente invariable en las distintas cadenas ligeras o pesadas de las IgG. Nos centramos en las cadenas ligeras, y en concreto en la clase κ. (Otra clase, la λ, tiene unas secuencias algo diferentes en su región constante, pero su desarrollo se basa en mecanismos similares.)

En la Figura 25.32 se muestra la organización de los genes precursores de las cadenas κ en las células de la línea germinal, no diferenciadas para la formación de anticuerpos, y los reordenamientos que dan lugar a un gen de este tipo en una célula diferenciada productora de anticuerpos. Cada cadena ligera está codificada por secuencias de DNA que no son contiguas en el genoma de las células indiferenciadas, pero que están todas en el mismo cromosoma. Estas secuencias se denominan V (variable), C (constante) y J (de unión). El genoma humano contiene unas 300 secuencias V diferentes, cada una de las cuales codifica los primeros 95 aminoácidos de la región variable; 4 secuencias J diferentes, cada una de las cuales codifica los 12 últimos residuos de la región variable y los une a la región constante; y una secuencia C, que codifica la región constante. En una célula embrionaria, las secuencias V, cada una de ellas prece-

dida por una secuencia líder que contiene un activador transcripcional que no se expresa, forman una agrupación estrecha; las secuencias J forman otra agrupación a una cierta distancia, y la secuencia C se encuentra poco después de la agrupación J. Cada secuencia J está flanqueada por secuencias espaciadoras que no se expresan.

En la diferenciación de un clon de células formadoras de un anticuerpo, un reordenamiento génico une una de las aproximadamente 300 secuencias V con una de las 4 secuencias J. Todo el DNA que se encuentra entre estas dos secuencias cortadas y vueltas a unir se elimina en este reordenamiento y desaparece de todas las células descendientes en esa línea celular. Cualquier secuencia V situada por encima (en el lado 5′, a la izquierda de la Figura 25.32) así como las secuencias J situadas por debajo (en el lado 3′, a la derecha) permanecen en estas células pero no se utilizan en la síntesis del anticuerpo.

Se obtiene una diversidad adicional en función del modo en que se recombinan las secuencias V y J. Los procesos de corte y nueva unión pueden producirse en las secuencias de trinucleótidos terminales de V y J en cualquier disposición que produzca una secuencia de trinucleótidos en el producto empalmado (Figura 25.33). Ello hace aumentar el número total de secuencias de cadena ligera diferentes en aproximadamente 2.5 (el número medio de aminoácidos diferentes codificados por cuatro tripletes aleatorios). Así pues, el número total de secuencias posibles de cadenas ligeras que pueden formarse a partir de 300 secuencias V y 4 secuencias J es de aproximadamente 3000 (300 × 4 × 2.5).

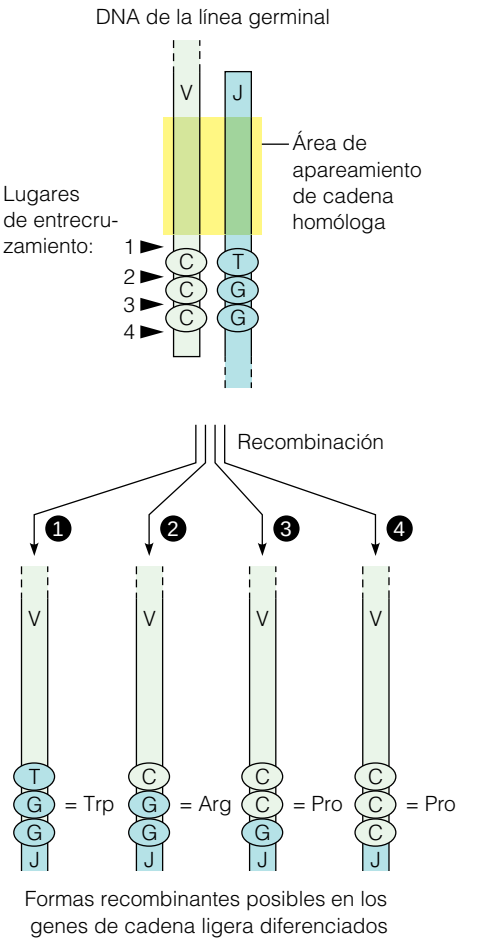
Se encuentran secuencias de DNA relacionadas en el lado 3′ de cada secuencia V y en el lado 5′ de cada secuencia J, y constituyen lugares de reconocimiento para las enzimas que participan en las reacciones de unión. Estas secuencias, que se denominan secuencias señal de reconocimiento, son las siguientes:

5′···V···CACAGTG···12 bases···ACAAAAAC···3′

3′···J···GTGTCAC···23 bases···TGTTTTTG···5′

Obsérvese que las regiones homólogas de estas secuencias son repeticiones invertidas. La recombinación comienza con dos proteínas denominadas RAG1 y RAG2. Estas proteínas actúan de forma semejante a las proteínas bacterianas implicadas en la transposición de genes (página 1078), comenzando el proceso al catalizar la rotura de doble cadena entre las dos secuencias señal de reconocimiento implicadas y las secuencias codificadoras respectivas V y J. Las proteínas celulares de reparación del DNA procesan las roturas del DNA de doble cadena, creando una "unión codificadora", en la que se fusionan las secuencias V y J en el marco de lectura adecuado, y una "unión señal", que fusiona el DNA interpuesto en una molécula circular. Las secuencias palindrómicas de siete bases casi idénticas y las regiones con abundancia de AT de ocho bases casi complementarias en estos segmentos permiten la alineación de regiones distantes del cromosoma, con un proceso similar al de la integración del fago λ, recombinando las secuencias y eliminando el DNA interpuesto. Además, el análisis de secuencias indica que las reacciones de unión del DNA son imprecisas, con la eliminación de nucleótidos de uno o ambos extremos, y la creación de una diversidad adicional.

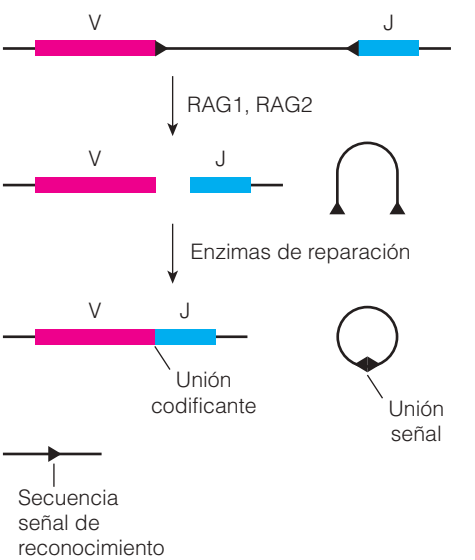
El último paso en la producción de una cadena polipeptídica ligera consiste en la unión de los segmentos C y J (véase la Figura 25.32). Esto se produce no a nivel del DNA sino a nivel del RNA mensajero. Como se considera en los Capítulos 7 y 28, la expresión de los genes eucariotas suele comportar el corte y la nueva unión del RNA mensajero, con eliminación de las secuencias que no están representadas en el producto génico final. En este caso, la transcripción da



Formas recombinantes posibles en los genes de cadena ligera diferenciados

FIGURA **25.33**

Generación de diversidad mediante mecanismos de unión V-J variables. Son posibles cuatro fenómenos de entrecruzamiento en una unión V-J, que dan lugar a codones para cualquiera de los tres posibles aminoácidos de este ejemplo. Tan sólo se muestra una cadena de DNA.



La diversidad de la respuesta inmunitaria se basa en la recombinación de centenares de secuencias de DNA diferentes, para producir una amplia gama de anticuerpos.

lugar a una molécula de RNA que se extiende desde el lado 5′ del gen V que se empalma a J hasta el lado 3′ del C. Según cuál sea la región J que se haya empalmado a V en esta célula, el RNA eliminado durante el proceso de empalme puede contener secuencias correspondientes a otras regiones J.

Las cadenas pesadas se forman de un modo similar a partir de secuencias V, secuencias J y una clase de secuencias denominadas D. Además, existen ocho secuencias C diferentes que intervienen también en la síntesis de otras clases de anticuerpos. El número total de posibles cadenas pesadas IgG es de unas 5000. Dado que cualquier cadena ligera puede combinarse con cualquier cadena pesada para formar una IgG completa, el número total posible de moléculas de IgG es de 3000×5000, es decir, 1.5×10^7. De esta forma puede generarse una enorme diversidad a partir de una fracción muy pequeña del DNA total de las células de la línea germinal. Se produce una diversidad aún mayor como consecuencia de la elevada tasa de mutación de la secuencia V durante el desarrollo de la célula productora del anticuerpo. Mediante este proceso de **mutación somática** (que no afecta a las células de la línea germinal), las células que sufren el mismo fenómeno de unión V-J pueden continuar diferenciándose para producir diferentes IgG.

No está claro si los dos cromosomas homólogos de una célula diploide formadora de anticuerpos sufren reordenamientos idénticos. Sin embargo, teniendo en cuenta que cada célula produce tan sólo un tipo de anticuerpo, o bien sucede esto o bien un cromosoma se silencia cuando el otro ha completado su reordenamiento.

ELEMENTOS GENÉTICOS TRANSPONIBLES

En este apartado consideramos los **elementos genéticos transponibles**, es decir, los genes que no tienen una localización fija en un genoma sino que pueden desplazarse de un lugar a otro del mismo, aunque con una frecuencia baja. La transposición se produce sin aprovechar la homología de secuencia del DNA, sino que las enzimas que catalizan la transposición reconocen secuencias cortas de alrededor de media docena de nucleótidos. Aunque la existencia de la transposición de genes había sido predicha ya por el trabajo de Barbara McClintock sobre la genética del maíz, la primera caracterización física de los elementos transponibles se efectuó en los estudios de las cepas de bacterias resistentes a los antibióticos. A comienzos de los años 1970 se sabía que los genes que confieren la resistencia a fármacos como la tetraciclina o la penicilina suelen encontrarse en plásmidos, cuyas secuencias de DNA no tienen ninguna homología identificable con las secuencias del DNA cromosómico del hospedador. No obstante, los genes de la resistencia antibiótica aparecerán, con una frecuencia baja, en el cromosoma de la bacteria o en el DNA de un fago que haya infectado a esa célula. La presencia del nuevo DNA insertado en el cromosoma del hospedador o del fago podía confirmarse mediante análisis de ruptura de restricción del DNA o mediante análisis heterodúplex al microscopio electrónico. La existencia de estos "genes saltarines" que pasaban de un cromosoma a otro de una manera aparentemente aleatoria, modificó de manera notable nuestra concepción de la organización y la evolución génica. Los nuevos conceptos tenían un interés que iba mucho más allá del puramente académico, puesto que tenían relación con el uso de antibióticos para tratar las infecciones bacterianas, y concretamente con la facilidad con la que pueden aparecer poblaciones de bacterias resistentes a los antibióticos.

Se ha demostrado la existencia de elementos transponibles en muchos eucariotas, como el maíz, *Drosophila* y las levaduras. Sin embargo, nos centraremos en las bacterias, cuyas estructuras físicas y mecanismos de transposición se co-

nocen mejor. Señalemos primero varias distinciones entre la transposición bacteriana y otros mecanismos de recombinación que hemos tratado. En primer lugar, la transposición no requiere una homología amplia de la secuencia del DNA. Además, la transposición se produce normalmente en un hospedador *recA*$^-$ lo que sugiere que no se producen fenómenos de recombinación homóloga. En segundo lugar, la síntesis de DNA interviene en la transposición bacteriana. La transposición comporta siempre una duplicación del lugar en que se produce, la secuencia corta (3-12 pares de bases) en la que se inserta el elemento transponible. En muchos casos, el elemento transponible se autorreplica, de manera que una copia queda depositada en la nueva secuencia y otra permanece en la secuencia donadora. Por último, los elementos transponibles pueden reestructurar un cromosoma hospedador. Un elemento transponible puede desplazarse de un lugar a otro dentro del mismo cromosoma, produciendo dos secuencias homólogas residentes en el mismo cromosoma. Según que la orientación de estas secuencias sea idéntica o inversa, la recombinación homóloga entre ellas puede dar lugar a una pérdida o a una inversión, como se indica en la Figura 25.34. Los elementos transponibles tienen también otros efectos sobre los cromosomas a los que se desplazan: la inactivación de cualquier gen al que vayan a parar (puesto que la inserción interrumpe la secuencia de codificación) o la activación de genes adyacentes (por cuanto podría crearse cerca del gen un promotor o un activador transcripcional). Los fenómenos de transposición abortivos pueden causar pérdidas o inversiones en el cromosoma. Dado que estos sucesos suelen ser letales, la evolución ha seleccionado los organismos con bajas tasas de transposición. En el laboratorio, la inactivación de genes mediante inserción es útil para aislar mutantes con déficit de funciones específicas y para el cartografiado de los genes.

Se consideran tres clases diferentes de elementos transponibles en las bacterias, con las estructuras generales que se indican en la Figura 25.35. Al clasificar estos elementos, consideramos la intervención de dos enzimas, la **transposasa** y la **resolvasa**, cuyas funciones consideraremos en breve. Los elementos de clase I,

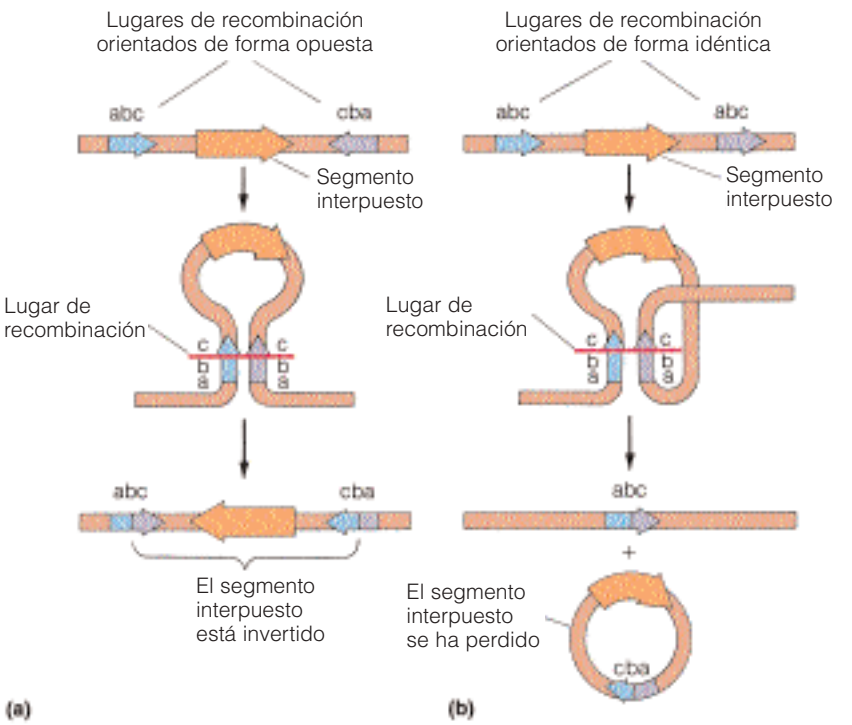
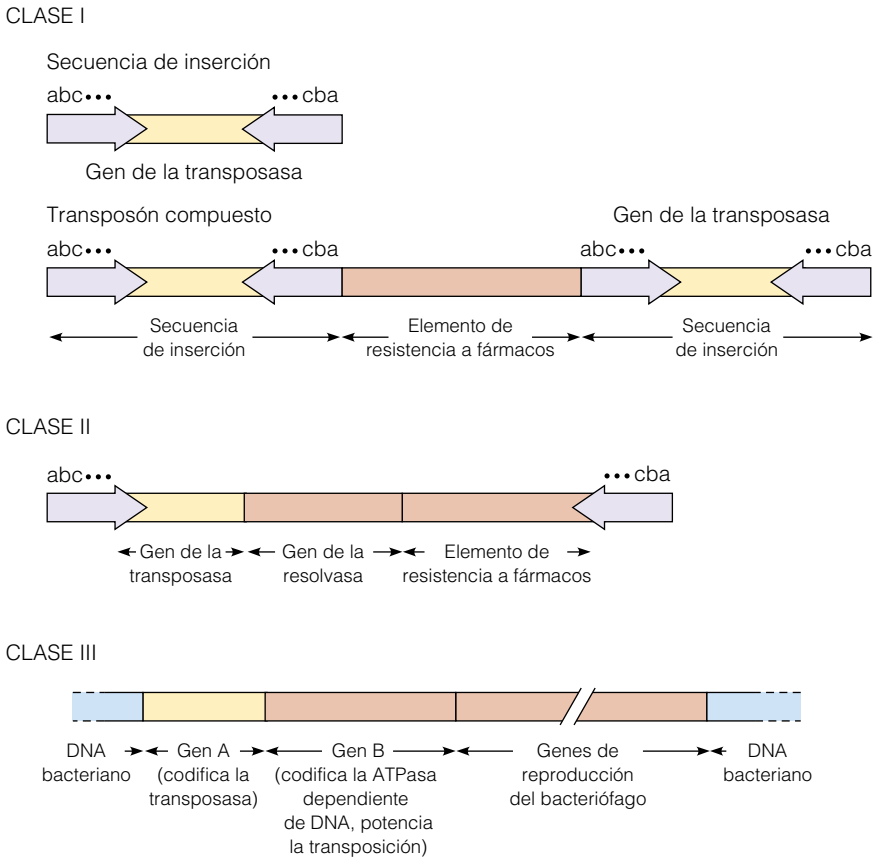


FIGURA **25.34**

Reordenamiento genómico que puede promoverse por la recombinación homóloga entre dos copias del mismo elemento transponible. Según la orientación de las dos copias, puede producirse una inversión **(a)** o una eliminación **(b)**.

FIGURA **25.35**

Estructuras de los elementos genéticos móviles de clase I, clase II y clase III. Las repeticiones invertidas se muestran en púrpura. El "elemento de resistencia a los fármacos" puede ser un gen codificador de proteína distinto.



Los elementos genéticos transponibles incluyen secuencias de inserción, transposones y determinados bacteriófagos que pueden insertarse en diversas localizaciones.

que codifican una transposasa pero no una resolvasa, son de dos tipos. El elemento transponible más sencillo, denominado **secuencia de inserción** (**IS**), consiste simplemente en un gen para la transposasa, flanqueado por dos secuencias repetidas invertidas cortas de unos 15 a 25 pares de bases. Una estructura menos sencilla denominada **transposón compuesto** está formada por un gen que codifica una proteína, como el que confiere la resistencia antibiótica, flanqueado por dos secuencias de inserción, o elementos de tipo IS. Estos elementos pueden tener una orientación idéntica o invertida. Los transposones de clase II contienen tan sólo un conjunto de secuencias cortas repetidas directas adyacentes. Además de un gen que codifica a una proteína (que a menudo confiere resistencia antibiótica) y un gen de transposasa, estos elementos incluyen un gen para la resolvasa. Por último, los elementos de clase III pertenecen a un pequeño grupo de bacteriófagos, de los que el mejor conocido es el fago Mu. Se sabe que este fago inserta su cromosoma de manera aleatoria en el cromosoma del hospedador mediante un mecanismo de transposición y también replica su genoma mediante un mecanismo de transposición, similar al de los elementos de tipo II. Un gen de este fago, A, codifica una transposasa. Otro gen, B, codifica una proteína con actividad ATPasa dependiente de DNA. Mientras que los elementos transponibles de clase I y II sintetizan la transposasa en cantidades tan bajas que la transposición se produce con frecuencias de tan sólo 10^{-7} a 10^{-5} por generación, el fago Mu se integra unas 100 veces por infección lítica. El producto del gen B es responsable, en parte, de esta eficacia de transposición mucho mayor. Otros genes codifican proteínas estructurales y de otro tipo del virus.

La Tabla 25.4 resume las propiedades de diversos transposones y secuencias de inserción. Obsérvese que cada transposón (al que nos referimos por conve-

TABLA 25.4 Estructura de algunos elementos transponibles de *E. coli*

Elemento	Tamaño (pb)	DNA diana (pb)	Resistencia conferencia
Secuencias de inserción			
IS1	768	9	Ninguna
IS2	1327	5	Ninguna
IS10-R	1329	9	Ninguna
Transposones compuestos			
Tn5	5700	9	Kanamicina
Tn10	9300	9	Tetraciclina
Tn2571	23,000	9	Cloranfenicol, ácido fusídico, estreptomicina, sulfamidas y mercurio
Transposones de clase II			
Tn3	4957	5	Ampicilina
Transposones de clase III			
Fago Mu	38,000	5	Ninguna

Fuente: Extractado de N. Kleckner, *Annu. Rev. Genet.* (1981) 15:354. © 1981 Annual Reviews, Inc.

nio con la abreviatura Tn) e IS se insertan en una secuencia diana específica de cinco o nueve pares de bases en los ejemplos mostrados. La inserción comporta una duplicación de ese lugar, y produce dos copias de la secuencia diana, una en cada lado del elemento integrado (Figura 25.36). Parece probable que ello se deba a la acción de la transposasa, que genera un corte escalonado que encierra a la secuencia diana. La fijación del elemento móvil (Tn o Is) a cada extremo da lugar a huecos, que se llenan y unen luego para generar las repeticiones directas de flanqueo.

Dado que el elemento transponible no se encuentra nunca en forma de DNA lineal libre, ¿cómo se generan los extremos del elemento, para unirse con los extremos del corte escalonado? El modelo que actualmente es más aceptado es el que se presenta en la Figura 25.37, y se basa en que la transposasa introduce tanto los cortes escalonados en el lugar diana como una mella en cada uno de los extremos 3′ del elemento, exactamente entre la secuencia del transposón y

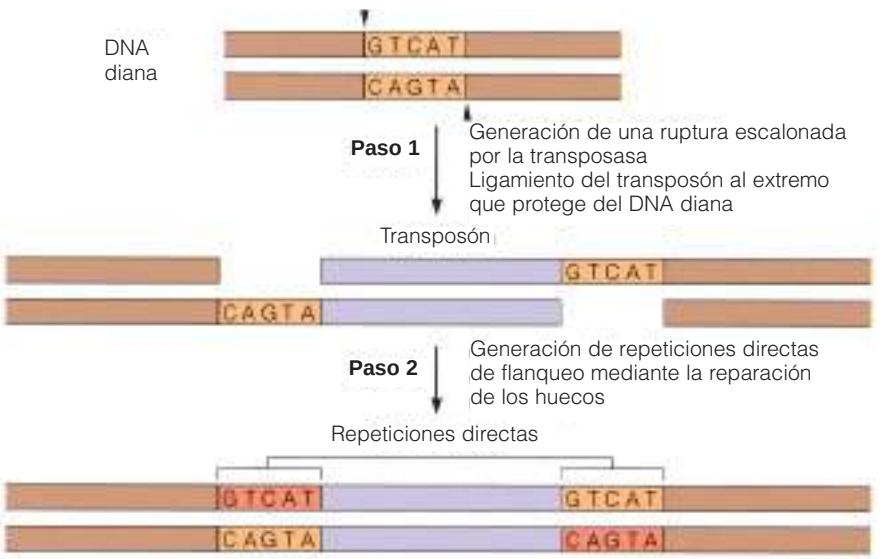


FIGURA **25.36**

Modelo de la forma en que se generan repeticiones directas durante la inserción de un transposón o de una secuencia de inserción.

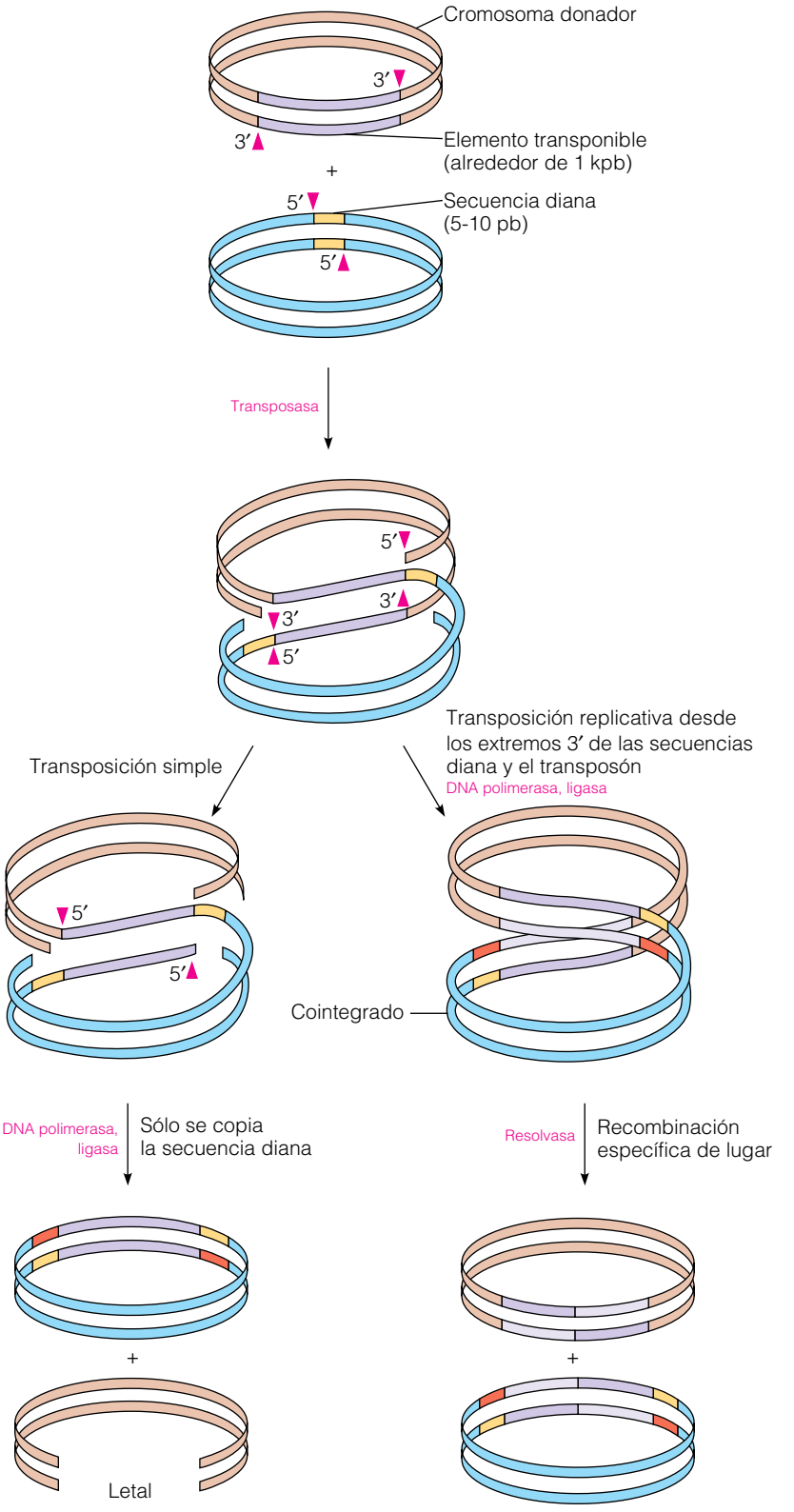


FIGURA **25.37**

Modelos de transposición simple y de transposición replicativa.

la repetición directa de flanqueo. A continuación, los extremos 5′ libres de la secuencia diana del DNA receptor se unen a los extremos 3′ del elemento. Hay dos resultados posibles. En la **transposición simple**, la unión va seguida del corte de los extremos 5′ del transposón, también en una posición inmediatamente adyacente a las secuencias de flanqueo. Esto produce una estructura con huecos, como la que se muestra en la Figura 25.36, que pueden llenarse y cerrarse por la acción de la DNA polimerasa y la ligasa. En esta forma de transposición, tan sólo se copia la secuencia diana; el cromosoma donador sufre una ruptura de doble cadena letal. La Tn10 (Tabla 25.4) realiza la transposición mediante un mecanismo conservador, de manera que las dos cadenas originales se transfieren de alguna manera a la nueva localización.

El otro proceso, la **transposición replicativa**, requiere la enzima resolvasa, por lo que se da tan sólo con los elementos de clase II y de clase III. Los extremos 3′ del cromosoma diana, tras el primer proceso de corte y unión, actúan como cebadores de replicación para la copia tanto de los huecos, como se muestra en la Figura 25.37, como de las dos cadenas del propio elemento transponible. La acción de la ligasa genera un **cointegrado**, que es una gran estructura circular que contiene los cromosomas donador y diana con dos copias recién formadas del elemento transponible. La otra enzima, la resolvasa, cataliza entonces una recombinación específica de lugar entre los dos elementos, dando lugar a una copia del elemento transponible que se inserta en cada uno de los dos cromosomas. Los análisis estructurales de la enzima de *E. coli*, denominada $\gamma\delta$ resolvasa, están proporcionando datos importantes de este proceso complejo.

RETROVIRUS

La transposición de genes en los sistemas eucariotas presenta claras semejanzas y algunas diferencias bien definidas respecto a la transposición de las bacterias. La primera distinción importante es que, en los eucariotas, la integración y la escisión son procesos diferenciados. Así pues, el elemento transponible puede aislarse en la forma libre, a menudo como un DNA circular de doble cadena. En segundo lugar, la replicación de ese DNA comporta a menudo la síntesis de un RNA intermediario. Ambas propiedades se observan en los retrovirus de los vertebrados, que son tal vez la clase de elementos transponibles de los eucariotas más estudiada. Como hemos señalado en el Capítulo 24, estos virus de RNA utilizan la transcriptasa inversa para sintetizar un DNA de doble cadena circular, que puede integrarse en múltiples lugares del cromosoma de la célula hospedadora. El genoma del retrovirus integrado presenta una notable semejanza con un transposón compuesto bacteriano, como puede observarse comparando la Figura 25.38 con la Figura 25.35. El prototipo del genoma del retrovirus posee tres genes estructurales: *gag*, que codifica una poliproteína que sufre una degradación para dar lugar a las proteínas centrales del virión; *pol*, que codifica la polimerasa vírica o transcriptasa inversa, y *env* que es la glucoproteína principal de la cubierta del virus. En los flancos de estos genes estructurales hay dos repeticiones directas, las **repeticiones terminales largas** (**LTR**), de unos 250 a 1400 pares de bases cada una. Cada LTR está flanqueada, a su vez, por secuencias de repetición invertidas cortas, de una longitud de entre 5 y 13 pares de bases. La integración se produce mediante un mecanismo que duplica el lugar diana, con lo que el gen del virus integrado, denominado **provirus**, queda flanqueado por repeticiones directas, de 5 a 13 pares de bases cada una, del DNA de la célula hospedadora.

De la misma forma que los transposones bacterianos pueden transportar genes pasajeros, también los retrovirus pueden hacerlo. El primer retrovirus conocido fue el virus del sarcoma de Rous, que fue también el primer virus que se

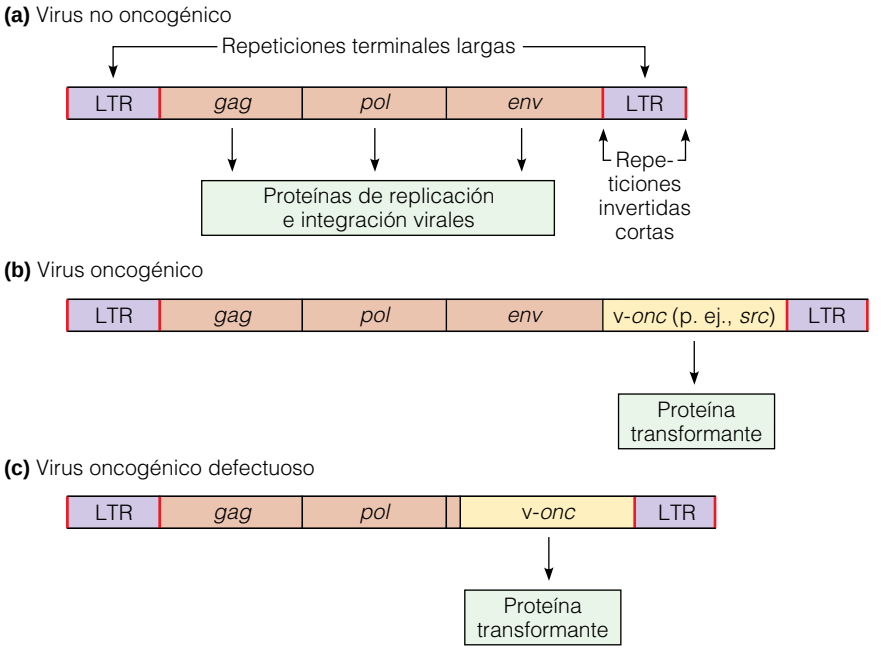


FIGURA **25.38**

Estructura de genomas retrovíricos en el estado integrado. **(a)** Un virus no oncogénico. **(b)** Un virus oncogénico como el virus del sarcoma de Rous, en que se muestra el oncogén vírico en la parte hacia delante (a la derecha) a partir de los genes de replicación vírica. **(c)** Un virus oncogénico defectuoso, como el virus del sarcoma del ratón de Moloney, con el oncogén vírico que sustituye, en parte o por completo, un gen esencial (*env*) para la replicación vírica. En cada caso, los LTR son repeticiones directas, flanqueadas por repeticiones invertidas cortas.

vio contiene un oncogén (véase el Capítulo 23). El virus del sarcoma de Rous se aisló en 1911 y se demostró que causaba tumores en los pollos. Sin embargo, hubo que esperar a 1978 para que se identificara el gen *src* y se demostrara que era el causante de la tumorogénesis. El producto del gen *src* es una proteína de 60 kilodalton con una actividad tirosina quinasa proteica. Puede detectarse una secuencia relacionada pero diferente en el genoma del hospedador. En el virus del sarcoma de Rous, el oncogén *src* se encuentra en el lado 3′ del gen *env*. Otros virus tumorogénicos contienen el oncogén ya sea insertado en uno de los genes *gag*, *pol* o *env*, ya sea sustituyendo a uno de ellos. Dado que la pérdida de un gen esencial hace que el virus no pueda replicarse, esta última clase de virus sólo pueden crecer en una célula coinfectada por un **virus colaborador**, un retrovirus relacionado que proporcione la función o funciones perdidas.

Puede demostrarse de diversos modos que la acción de un oncogén es esencial para que el virus produzca la **transformación oncogénica**, es decir, el cambio de una célula normal en una célula cancerosa (véanse las páginas 967-974 en el Capítulo 23). Así, por ejemplo, la inactivación mediante mutación del gen *src* del virus del sarcoma de Rous no afecta a la capacidad de replicación del virus, pero sí hace que éste no sea capaz de causar tumores en los animales infectados. Dado que cada oncogén del virus está relacionado en su secuencia con un correspondiente gen celular, cabe suponer que el oncogén del virus se originó en una célula hace muchas generaciones y sufrió mutaciones independientes tras ser captado por un genoma vírico. Además, puesto que muchos de los productos de los oncogenes, como la proteína Src, tienen actividad proteína quinasa, puede haber formas aberrantes de elementos reguladores celulares normales, y su expresión puede participar en el control del crecimiento anormal que caracteriza a las células tumorales. Existe otro mecanismo que puede estar relacionado con la activación de genes celulares mediante la inserción del DNA provírico. La LTR situada más a la izquierda en un provirus integrado contiene el activador transcripcional, o **promotor**, para el gen *gag* adyacente y los genes *pol* y *env* situados más adelante. Dado que las LTR son repeticiones directas, la LTR situada más a la derecha puede activar la transcripción de genes celulares más allá del lugar de integración. Si estos genes incluyen los que intervienen en

la regulación metabólica, su sobreexpresión puede desequilibrar el metabolismo de alguna manera todavía no definida, y, por tanto, contribuir a la oncogénesis.

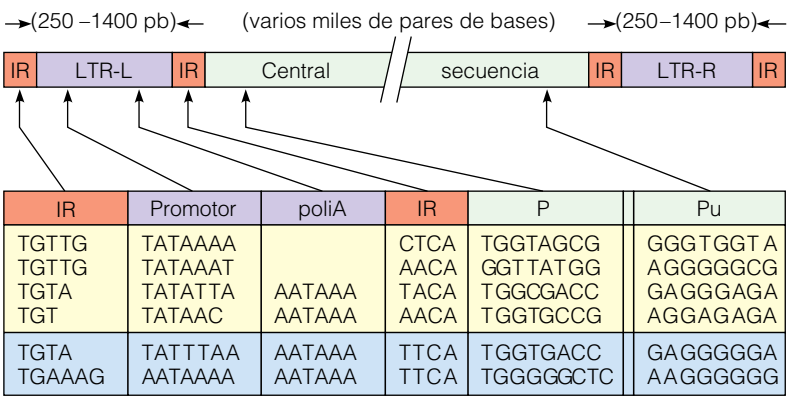
Los elementos transponibles de las células eucariotas presentan semejanzas notables con los retrovirus en cuanto a la organización de la secuencia. De hecho se utiliza el término **retrotransposón** para denominar a esta clase de elementos. Estas semejanzas se ilustran en la Figura 25.39 para dos retrovirus y el Ty, un transposón de la levadura; para copia y 412, elementos transponibles de *Drosophila*; y para IAP, un transposón que se encuentra en el genoma del ratón.

Los genomas retrovíricos y los elementos transponibles de los eucariotas presentan semejanzas de secuencias entre sí y con los transposones bacterianos.

Amplificación génica

El último proceso que consideramos en cuanto a la reestructuración de la información es la amplificación selectiva de regiones específicas del genoma, principalmente en las células eucariotas. Esto se produce en los procesos normales del desarrollo y como consecuencia de situaciones de especial tensión metabólica.

Se sabe desde hace tiempo que durante la ovogénesis de determinados anfibios, los genes que codifican los RNA ribosómicos aumentan su número de copias unas 2000 veces, como preparación para el grado elevado de síntesis proteica que debe producirse en la fase inicial del desarrollo. El DNA amplificado se encuentra en forma de círculos extracromosómicos, cada uno de los cuales contiene varias copias del DNA ribosómico repetido y un origen de replicación. Se ha analizado una situación semejante en *Drosophila*, en donde los genes que codifican las proteínas del huevo se amplifican en una fase concreta del desarrollo. Sin embargo, en este último caso, la amplificación se debe a ciclos repetidos de iniciación de la replicación dentro de la región amplificada, y las secuencias amplificadas permanecen dentro del cromosoma de origen.

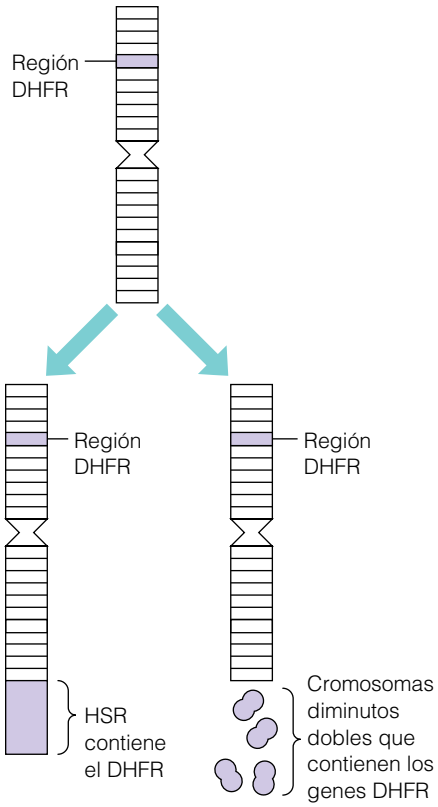


IR	Promotor	poliA	IR	P	Pu	
TGTTG TGTTG TGTA TGT	TATAAAA TATAAAT TATATTA TATAAC	 AATAAA AATAAA	CTCA AACA TACA AACA	TGGTAGCG GGTTATGG TGGCGACC TGGTGCCG	GGGTGGTA AGGGGGCG GAGGGAGA AGGAGAGA	Ty Copia 412 IAP
TGTA TGAAAG	TATTTAA AATAAAA	AATAAA AATAAA	TTCA TTCA	TGGTGACC TGGGGGCTC	GAGGGGGA AAGGGGGG	RSV MoMLV

FIGURA **25.39**

Características estructurales comunes de los retrovirus integrados y de otros elementos transponibles de los eucariotas. Todos estos elementos están rodeados en los lados izquierdo y derecho por secuencias repetidas terminales largas (LTR-L y LTR-R, respectivamente). Cada LTR está flanqueada por secuencias repetidas invertidas (IR) cortas (flechas). Se indican las localizaciones aproximadas de diversas características estructurales, y en la tabla se indican algunas secuencias específicas asociadas a cada característica en varios elementos transponibles: IR; promotor, una señal de inicio de la transcripción en cada LTR; poliA, una secuencia con abundante adenilato (que no se encuentra en el transposón Ty de la levadura y en el elemento de copia de *Drosophila*); P, una secuencia que se alinea con un RNA que actúa como cebador para la replicación; Pu, secuencia con abundantes purinas. El 412, como el elemento copia, es un elemento transponible de *Drosophila*; IAP es un transposón que se encuentra en el genoma del ratón; y RSV y MoMLV son retrovirus (virus del sarcoma de Rous y virus de la leucemia del ratón de Moloney, respectivamente).

Tomado de M. Singer y P. Berg, *Genes and Genomes* (Sausalito, CA: University Science Books, 1991), p. 755.



La amplificación de genes genera múltiples copias de secuencias de DNA en un lugar distinto del mismo cromosoma. La recombinación de segmentos homólogos produce secuencias amplificadas extracromosómicas.

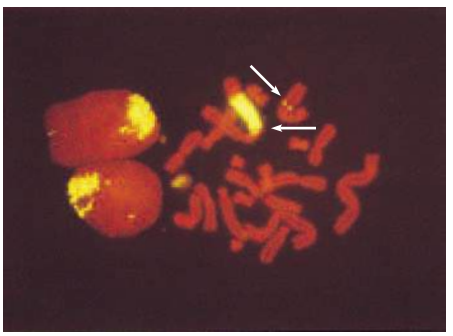


FIGURA **25.40**

Modificaciones estructurales del cromosoma que acompañan a la amplificación del gen de la dihidrofolato reductasa. En la fotografía microscópica se muestran los cromosomas en metafase de células de ovario de hámster chino, que son muy resistentes al metotrexato. Se sometió el DNA cromosómico a una hibridación *in situ* con una sonda génica de DHFR marcada con fluorescencia. Las flechas blancas señalan genes de copia únicos. Las secuencias cromosómicas amplificadas están en una forma gigante del cromosoma que contiene también una de las secuencias de copia única originales.

Cortesía de B. J. Trask y J. L. Hamlin, *Genes Dev.* (1989) 3:1913-1925, proporcionado por Joyce Hamlin.

Ambos tipos de mecanismos parecen actuar durante el desarrollo en cultivo de determinadas líneas celulares de los mamíferos resistentes a los fármacos. Este proceso se ha estudiado mucho en las células que se hacen resistentes al metotrexato, un inhibidor de la dihidrofolato reductasa. Como se consideró en el Capítulo 22, el tratamiento de la leucemia con metotrexato conduce a menudo a la aparición de poblaciones de células leucémicas con resistencia al fármaco, que contienen unas concentraciones muy elevadas de la enzima diana, la dihidrofolato reductasa (DHFR). Tal como demostró por primera vez Robert Schimke, la sobreproducción de la enzima se debe generalmente a la amplificación específica de un gran segmento de DNA que incluye el gen DHFR. En un proceso, la duplicación en tándem del segmento de DNA genera un cromosoma gigante, con múltiples copias del gen, en lo que se denomina una **región de tinción homogénea (HSR)**, puesto que carece del patrón característico de bandas cromosómicas. Otra posibilidad, es que un segmento de DNA que contiene el gen DHFR pueda eliminarse, aparentemente mediante un proceso de recombinación, para formar minicromosomas denominados **cromosomas diminutos dobles**. Algunas células resistentes contienen ambos tipos de genes amplificados. Los cromosomas diminutos dobles se mantienen en el interior de una célula tan sólo mientras persiste la presión selectiva por el crecimiento de la célula en metotrexato. Sin embargo, el fenotipo amplificado cromosómicamente es estable a lo largo de muchas generaciones de crecimiento celular. En la Figura 25.40 se muestra una microfotografía de fluorescencia de los cromosomas en metafase, procedente de una línea de células ováricas de hámster chino con una amplificación estable. Las secuencias DHFR se visualizaron mediante hibridación *in situ* con un DNA con marcaje fluorescente que contenía secuencias DHFR. Esta técnica es lo suficientemente sensible como para permitir la detección de secuencias de copia única (flechas blancas). Obsérvese también el cromosoma gigante que contiene muchos equivalentes génicos de secuencias génicas de la DHFR.

La amplificación de los genes en condiciones selectivas se ha observado ampliamente, por ejemplo, en el desarrollo de formas de insectos resistentes a los pesticidas. El mecanismo de la amplificación no está claro aún. Sin embargo, existen pruebas como la de la Figura 25.40 que indican que las secuencias amplificadas se encuentran en el mismo cromosoma en que está el lugar original del gen de copia única, aunque a una distancia importante de dicho lugar. Estas estructuras podrían aparecer o bien mediante una recombinación con un intercambio desigual de cromátides hermanas, tal como se esquematiza en la Figura 25.41, o bien mediante un proceso de transposición conservador. Posteriormente, la recombinación homóloga dentro de una región amplificada puede causar una escisión de secuencias que contengan una o más secuencias amplificadas. Para que se repliquen de manera autónoma, estas secuencias que han sufrido una escisión deben tener un centrómero. Estos elementos representan probablemente los cromosomas diminutos dobles.

La presencia de una presión selectiva, como la presencia continua de metotrexato, impulsa específicamente la supervivencia de las células que puedan responder a esa presión, por ejemplo, con una sobreproducción de DHFR. Cuando hay dos o más copias del gen en un cromosoma, pueden generarse otras copias adicionales mediante nuevos procesos de recombinación o mediante anomalías de la replicación. Se establece entonces una resistencia de manera escalonada a lo largo de muchas generaciones de crecimiento. Estos resultados tienen una enorme repercusión práctica, puesto que la quimioterapia del cáncer comporta a menudo un tratamiento a largo plazo con dosis bajas de un antimetabolito, y éstas son precisamente las condiciones más probables para anular el efecto del tratamiento al generar células resistentes al fármaco. Las observaciones

realizadas sobre la amplificación génica no sólo han modificado la forma en que se administran los fármacos antineoplásicos, sino que también han extendido al propio proceso de tumorogénesis. Los investigadores han observado que hay oncogenes específicos que se amplifican durante la progresión clínica de determinados tumores humanos. Así pues, la amplificación génica se interpreta como un mecanismo del desarrollo normal, de la adaptación celular a las situaciones de tensión y de los procesos de desarrollo anormales. Además, es probable que las duplicaciones génicas que se han producido durante la evolución (véase el Capítulo 7, páginas 259-261) hayan tenido lugar por rutas semejantes.

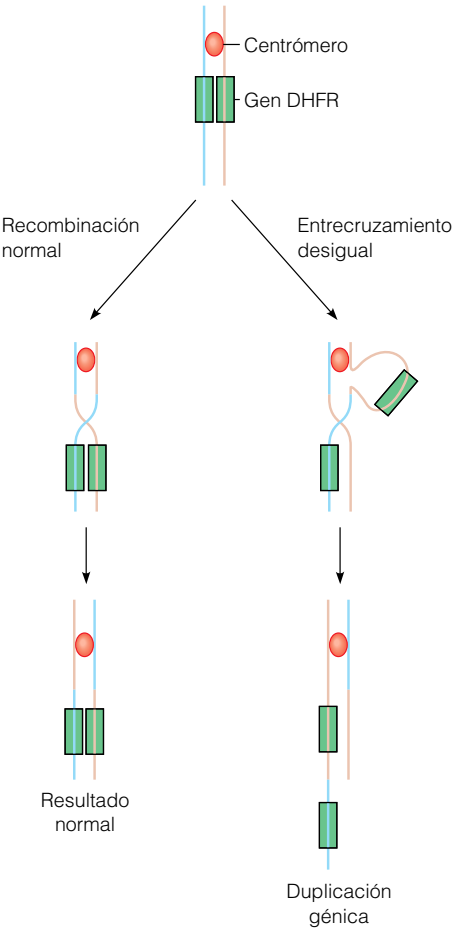


FIGURA **25.41**

Entrecruzamiento desigual, como mecanismo para explicar los pasos iniciales de la amplificación génica.

RESUMEN

Diversos procesos de reestructuración de la información afectan al DNA, protegiéndole de los daños causados por el entorno o por organismos extraños, diversificando a los individuos de una especie, o diversificando la constitución genética de las células somáticas en la diferenciación. Estos procesos comprenden la restricción y modificación bacterianas, en las que la metilación de residuos de adenina en secuencias de DNA específicas puede proteger al DNA frente a la ruptura de la doble cadena catalizada por nucleasas específicas de lugar que actúan en estos puntos. La reparación del DNA engloba varios procesos, como la fotorreactivación, en la que la energía luminosa se captura para revertir la formación de dímeros de pirimidina, y la eliminación de alquilguaninas mediante "enzimas" que actúan una sola vez. Los sistemas de reparación por escisión de nucleótidos reconocen los nucleótidos dañados y los eliminan y sustituyen un fragmento de 12 a 30 nucleótidos que flanquea al segmento dañado. La reparación de escisión de bases comienza con una reacción de *N*-glucosilasa, seguida de enzimas de reparación que escinden uno o varios nucleótidos en el lugar sin base. Los daños sufridos pueden repararse también mediante un proceso de recombinación o mediante la reparación inducida (propensa a errores). Los sistemas de reparación de mal apareamiento corrigen los errores ocasionales que aparecen durante la replicación. La recombinación genética entre segmentos homólogos de DNA se basa en un desplegamiento de la doble cadena catalizado por la helicasa, la ruptura del DNA en lugares específicos, la invasión de la doble cadena por terminaciones 3′ hidroxilo de cadena única, la extensión de la cadena, la migración de rama y la resolución de las estructuras de Holliday. Algunos fenómenos de recombinación, como la integración del bacteriófago λ, son específicos de lugar y están gobernados por interacciones DNA-proteína. Existe una gama amplia de reordenamientos génicos que incluyen las reacciones de unión en la diferenciación de la respuesta inmunitaria, la transposición génica, la integración del genoma retrovírico y la amplificación génica, que probablemente se produce mediante un mecanismo de recombinación. La amplificación génica puede ser un proceso normal del desarrollo o puede producirse como respuesta a una tensión ambiental específica.

BIBLIOGRAFÍA

Metilación de los ácidos nucleicos

Heithoff, D. M., R. L. Sinsheimer, D. A. Low y M. J. Mahan (1999) An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science* 284:967-970. Un enlace inesperado entre la metilación del DNA y la patogenia bacteriana.

Jones, P. A., W. M. Rideout, J-C. Shen, C. H. Spruck y Y. C. Tsai (1992) Methylation, mutation, and cancer. *BioEssays* 14:33-36. Presenta la idea de que la metilación del DNA es un fenómeno mutágeno en las células de los mamíferos.

Roberts, R. J. y X. Cheng (1998) Base flipping. *Annu. Rev. Biochem.* 67:181-198. Las DNA metilasas no son las únicas enzimas que sueltan bases en los DNA sustratos.

Walsh, C. P. y T. H. Bestor (1999) Cytosine methylation and mammalian development. *Genes Dev.* 13:26-34. Este estudio sugiere

que la metilación es una consecuencia, no una causa, de acontecimientos que silencian a determinados genes eucariotas.

Restricción y modificación

McClarin, J. A., C. A. Frederick, B.-C. Wang, P. Greene, H. W. Boyer y J. M. Rosenberg (1986) Structure of the DNA-*Eco*RI endonuclease recognition complex at 3 Å resolution. *Science* 234:1526-1541. La primera determinación de la estructura de una enzima de restricción.

Wilson, G. G. (1993) Restriction enzymes: A brief overview. *NEB Transcript* 5:1-5. Este boletín técnico, publicado por New England BioLabs, contiene una breve y excelente revisión de la biología y bioquímica de las enzimas de restricción y la base estructural de su especificidad de secuencia.

Reparación del DNA

Demple, B. y L. Harrison (1994) Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and biology. *Annu. Rev. Biochem.* 63:915-948. Una revisión relativamente reciente y completa sobre este tema.

Friedberg, E. C., G. C. Walker y W. Siede (1995) *DNA Repair and Mutagenesis.* ASM Press, Washington, D.C. Una actualización de 698 páginas del influyente libro de Friedberg sobre la reparación del DNA publicado en 1985.

Jiricny, J. (1994) Colon cancer and DNA repair: Have mismatches met their match? *Trends Genet.* 10:164-168. La observación de que un gen alterado en algunos cánceres de colon está relacionado con la proteína MutS de la reparación por mal apareamiento en *E. coli* causó un gran revuelo.

Kunkel, T. A. (1993) Slippery DNA and disease. *Nature* 365:207-208. Varios trabajos han indicado que los genes humanos mutantes que causan enfermedades tienen tramos cortos de DNA repetidos. En esta breve revisión, Kunkel plantea que la base bioquímica es la reparación por mal apareamiento defectuosa.

Mellon, I., D. K. Raipal, M. Koi, C. R. Boland y G. N. Champe (1996) Transcription-coupled repair deficiency and mutations in human mismatch repair genes. *Science* 272:557-560. Relaciones importantes entre estos dos procesos de reparación en las células humanas.

Modrich, P. (1997) Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 272:24727-24730. Una revisión de la especificidad de la cadena y de la relación de la reparación del mal apareamiento defectuosa con el cáncer; una de las cuatro minirevisiones del JBC sobre la reparación del DNA eucariota.

McMurray, C. T. (1999) DNA secondary structure: A common and causative factor for expansion in human disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1823-1825. Una breve revisión sobre las expansiones de tripletes repetidos en el DNA genómico asociadas con enfermedades en el ser humano.

Sancar, A. (1993) Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* 33:2-9. Una revisión minuciosa de la fotorreactivación.

Sancar, A. (1996) DNA excision repair. *Annu. Rev. Biochem.* 65:43-82. Este número de *Annual Reviews* contiene también artículos sobre la reparación acoplada con la transcripción, la reparación de mal apareamiento y la reparación del DNA eucariota.

Tanaka, K. y R. D. Wood (1994) Xeroderma pigmentosum and nucleotide excision repair of DNA. *Trends Biochem. Sci.* 19:83-87. Una perspectiva de la reparación del DNA humano basada en las enfermedades genéticas humanas.

Walker, G. C. (1998) Skiing the black diamond slope: Progress on the biochemistry of translesion DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10348-10350. Un breve comentario que describe el progreso sobre los conocimientos de la reparación propensa a errores.

Recombinación

Baumann, P. y S. C. West (1998) Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends Biochem. Sci.* 23:247-251. Revisa aspectos importantes de la recombinación en procariotas y eucariotas.

Bianco, P. R., R. B. Tracy y S. C. Kowalczykowski (1998) DNA strand exchange proteins: A biochemical and physical comparison. *Frontiers Biosci.* 3:570-603. Una revisión detallada de los mecanismos de recombinación homóloga y las proteínas que participan en *E. coli*, el fago T4 y las levaduras.

Haber, J. E. (1999) DNA recombination: The replication connection. *Trends Biochem. Sci.* 24:271-275. Una revisión actualizada de la reparación de las roturas de doble cadena y su relación con la replicación del DNA y la recombinación.

Landy, A. (1999) Coming or going it's another pretty picture for the λ-Int family album. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7122-7124. Una mini-revisión de lectura fácil sobre la recombinación específica de lugar que lleva a cabo una familia de proteínas de la que λ-Int fue el primer miembro conocido.

Smith, G. R., S. K. Amurdsen, P. Dabert y A. F. Taylor (1995) The initiation and control of homologous recombination in *Escherichia coli. Phil. Trans. Royal Soc. London Series B* 347:13-20. Mecanismos propuestos para la recombinación catalizada por RecA y RecBCD tras la conjugación.

Story, R. M., I. T. Weber y T. A. Steitz (1992) The structure of the *E. coli recA* protein monomer and polymer. *Nature* 355:318-324. Un análisis cristalográfico.

West, S. C. (1998) RuvA gets X-rayed on Holliday. *Cell* 94:699-701. Una minirrevisión que describe los análisis estructurales de los complejos que participan en la migración de rama y en la resolución de la unión de Holliday.

Reordenamientos génicos

Craig, N. L. (1997) Target site selection in transposition. *Annu. Rev. Biochem.* 66:437-474. Contiene referencias de todos los aspectos de la transposición de los genes.

Lewin, B. (1997) *Genes VI.* Oxford University Press, Oxford, UK. Los Capítulos 18 y 19 de este libro de texto de genética molecular presentan una exposición detallada de transposones, retrovirus y otros elementos transponibles.

McClintock, B. (1984) The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226:792-801. Presentación del premio Nobel de Barbara McClintock en que describe la historia de la primera descripción de los elementos genéticos móviles.

Milstein, C. (1986) From antibody structure to immunological diversification of the immune response. *Science* 231:1261-1268. Milstein recibió el premio Nobel por el descubrimiento de los anticuerpos monoclonales, pero en esta presentación correspondiente al premio comenta la generación de la diversidad de anticuerpos.

Murley, L. L. y N. D. F. Grindley (1998) Architecture of the γδ resolvase synaptosome: Oriented heterodimers identify interactions for synapsis and recombination. *Cell* 95:553-562. Los mecanis-

mos de la resolvasa explorados mediante cristalografía y mutagénesis de lugar dirigida.

Roth, D. B. y N. L. Craig (1998) VDJ recombination: A transposase goes to work. *Cell* 94:411-414. Una mini-revisión reciente que describe los acontecimientos recombinatorios en la maduración de los genes que forman los anticuerpos.

Singer, M. y P. Berg (1991) *Genes and Genomes.* University Science Books, Mill Valley, Calif. El Capítulo 10 de este excelente libro revisa la transposición génica y otros reordenamientos.

Retrovirus

Varmus, H. (1988) Retroviruses. *Science* 240:1427-1435. Aún es una de las mejores revisiones de que se dispone.

Amplificación génica

Sharma, R. C. y R. T. Schimke (1994) The propensity for gene amplification: A comparison of protocols, cell lines, and selection agents. *Mutat. Res.* 304:243-260. Información práctica proporcionada por el laboratorio que descubrió la amplificación génica de la dihidrofolato reductasa.

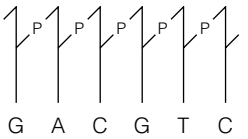
Smith, K. A. et al. (1995) Regulation and mechanisms of gene amplification. *Phil. Trans. Royal Soc. London Series B* 347:49-56. Una revisión bien referenciada y de fácil lectura.

PROBLEMAS

1. Prediga si un déficit de metilasa *dam* hará aumentar o disminuir, o no tendrá efecto alguno, sobre las tasas de mutación espontáneas, y explique la base de su predicción.
2. Para cada proceso de reparación del DNA de la columna I, indique *todas* las características de la columna II que describen correctamente ese proceso.

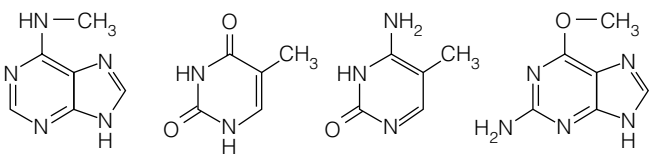
I	II
(a) Reparación por escisión de nucleótidos	(1) Interviene la proteína RecA.
(b) Fotorreactivación	(2) Los nucleótidos dañados se eliminan mediante traslación de mella.
(c) Reparación por escisión de bases	(3) Participa un mecanismo de radical libre.
(d) Reparación por recombinación	(4) La enzima de reparación actúa una sola vez.
(e) Reparación SOS propensa a errores	(5) La enzima clave contiene un cofactor de folato unido.
(f) Reparación mediante alquiltransferasa	(6) No se eliminan bases ni nucleótidos del DNA.
(g) Reparación de mal apareamiento	(7) El déficit de esta enzima en el ser humano aumenta enormemente el riesgo de cáncer de piel.
	(8) Este sistema es el principal responsable del efecto mutágeno de la luz ultravioleta.
	(9) La primera enzima de esta ruta rompe dos enlaces fosfodiéster.
	(10) Este proceso se inicia a una distancia de hasta 1 kpb del lugar a reparar.
	(11) La DNA ligasa cataliza la última reacción.

3. ¿Cuáles de las enzimas de restricción que se indican en la Tabla 25.2 generan fragmentos igualados o de extremos romos? En las que reconocen lugares no igualados y generan cortes escalonados, ¿cuáles de estos cortes no pueden convertirse en extremos igualados por la acción de la DNA polimerasa? ¿Por qué?
4. Se muestra a continuación la mitad de un lugar de restricción.
   (a) Dibuje la otra mitad.



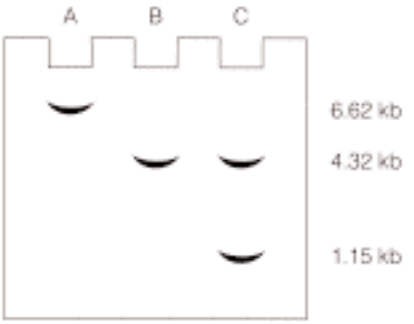
   (b) Identifique mediante flechas gruesas (↓↑) los lugares de ruptura de tipo II que darían lugar a productos de DNA de doble cadena con extremos romos.
   (c) Indique mediante flechas finas (↓↑) los lugares de ruptura de tipo II que dan cortes escalonados que podrían convertirse directamente en moléculas de DNA recombinante por la DNA ligasa, sin la participación de otras enzimas.
   (d) Si éste fuera el lugar de reconocimiento de una endonucleasa de restricción de tipo I, ¿en dónde se produciría el corte de la doble cadena?
   (e) Si las secuencias de DNA fueran completamente aleatorias, ¿qué longitud (en kilopares de bases) tendría el intervalo previsto entre copias idénticas de esta secuencia de DNA?

5. **A** **B** **C** **D**



   Para cada una de las siguientes características, indique todas las bases a las que se aplica.
   (a) Una señal que identifica una cadena de DNA original en el sistema de corrección de mal apareamiento MutH,L,S.
   (b) Lo más probable es que participe en la formación del dímero de ciclobutano tras la irradiación ultravioleta del DNA.
   (c) Una base metilada que se encuentra junto al lado 5′ de los residuos de dGMP en el DNA eucariota.
   (d) Creada mediante el tratamiento del DNA con agentes alquilantes que transfieren grupos metilo y son reparados por una "enzima" que actúa una sola vez en su vida.
   (e) Creada por una metilación dependiente de AdoMet de un residuo de un nucleótido del DNA.
   (f) Un sustrato para la desaminación a nivel del DNA, que daría lugar a una transición GC ⟶ AT.
6. La recombinación homóloga en *E. coli* forma regiones heterodúplex de DNA que contienen bases mal apareadas. ¿Por qué no se eliminan estos mal apareamientos mediante el sistema de reparación de mal apareamiento?
7. Las deficiencias de la actividad dUTPasa o DNA ligasa estimulan la recombinación. ¿Por qué?
8. Se rompió el DNA pBR322 (4.32 kb) con la nucleasa *Hin*dIII y se ligó a un producto de digestión *Hin*dIII del DNA mitocondrial humano. Se analizó un plásmido de DNA recombinante

mediante electroforesis en gel de los fragmentos de la ruptura de restricción, con los siguientes resultados: calle A = recombinante tratado con *Eco*RI, calle B = vector tratado con *Hin*dIII y calle C = recombinante tratado con *Hin*dIII.



(a) ¿Por qué se trató el plásmido recombinante con *Eco*RI para determinar su tamaño?
(b) ¿Cómo podría explicar la discrepancia existente entre el tamaño de la molécula recombinante y la suma de los tamaños de los fragmentos de ruptura de *Hin*dIII?
(c) Dibuje un esquema del recombinante en que se muestren las localizaciones de los lugares de ruptura de *Hin*dIII.

9. Se fragmentó una pequeña molécula de DNA con varias nucleasas de restricción diferentes, y se determinó el tamaño de cada fragmento mediante electroforesis en gel. Se obtuvieron los siguientes datos.

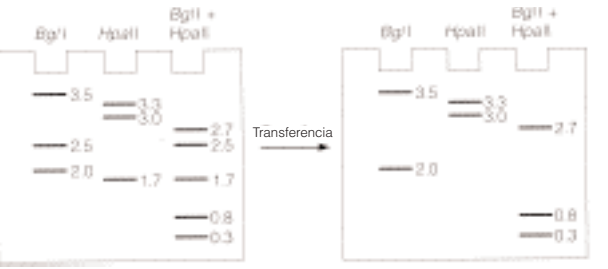
Enzima	Tamaño de los fragmentos (kb)
*Eco*RI	1.3, 1.3
*Hpa*II	2.6
*Hin*dIII	2.6
*Eco*RI + *Hpa*II	1.3, 0.8, 0.5
*Eco*RI + *Hin*dIII	0.6, 0.7, 1.3

(a) ¿Es la molécula original lineal o circular?
(b) Dibuje un mapa de lugares de restricción, indicando las distancias entre los mismos, que concuerde con los datos presentados.
(c) ¿Cuántos otros mapas son compatibles con los datos?
(d) ¿Qué debería hacerse para localizar los lugares de ruptura sin ambigüedades entre ellos?

10. **A.** pApGpApTpCpT **B.** pGpGpApTpCpC
C. pGpTpCpGpApC **D.** pCpTpGpCpApG
E. pGpTpTpApApC **F.** pGpApGpTpCpNpNpNpN

(a) Utilizando el mismo método que en el Problema 4, indique la estructura completa de cualquiera de los lugares de ruptura de restricción indicados (ambas cadenas y lugares de corte).
(b) ¿Qué dos de las rupturas mostradas producirán fragmentos que *no pueden* volver a unirse mediante la DNA ligasa de *E. coli*? ¿Por qué no? (Nota: In vitro, la DNA ligasa muestra una clara preferencia para la reparación de un extremo escalonado en vez de romo).
(c) Los productos de ruptura de dos de estas reacciones pueden unirse con facilidad entre sí mediante la acción de la DNA ligasa, a pesar de que las dos enzimas reconozcan lugares diferentes. ¿Cuáles son?
(d) Si quisiera linearizar un DNA de plásmido recién aislado, ¿cuál de los lugares mostrados sería *menos* probable que estuviera representado una sola vez en la molécula de DNA? Suponga que el DNA tiene proporciones iguales de los cuatro nucleótidos.

11. Un fragmento de DNA bacteriano clonado de 8.0 kb contiene un gen que usted desea cartografiar con respecto a sus puntos finales de transcripción. Dispone de mRNA muy purificado y muy radiactivo transcrito a partir de ese gen, para utilizarlo como sonda de hibridación.



A la izquierda del dibujo se muestran los patrones de ruptura de restricción del fragmento de 8 kb, visualizados con bromuro de etidio.
A la derecha se muestra el patrón de autorradiografía obtenido al transferir los fragmentos a nitrocelulosa y aplicar la sonda de RNA radiactivo. En el diagrama siguiente, indique las localizaciones de todos los lugares de restricción *Bgl*I y *Hpa*II, y muestre los puntos finales aproximados del transcrito. ¿Cómo podría establecer qué extremo corresponde al 5′ y cuál corresponde al extremo 3′ del transcrito?

Lugares *Bgl*I
0 kb——————————————————8 kb
Lugares *Hpa*II

*12. Suponga que desea estudiar los mecanismos de integración de retrovirus mediante la determinación de la secuencia de nucleótidos en el lugar de integración, varias docenas de nucleótidos a cada lado de la unión del DNA vírico-celular. Describa cómo aislar el DNA que contiene una zona de unión en cantidad suficiente para poder efectuar un análisis de secuencia.

13. En la mutagénesis de lugar dirigida, a menudo se diseña el oligonucleótido mutágeno no sólo para forzar una sustitución de aminoácido deseada sino también para crear un nuevo lugar de restricción en el gen mutante o para eliminar un lugar de restricción preexistente. ¿Por qué es esto deseable?

14. Pretendemos determinar si el residuo de serina de una enzima es esencial para su actividad catalítica sustituyéndolo por una glicina y determinando la actividad de la proteína mutante. También queremos eliminar un lugar de restricción e introducir otro nuevo, sin provocar otros cambios de aminoácidos. Pueden tolerarse un máximo de dos cambios de bases en un cebador de 18 nucleótidos que todavía hibride con el molde. Utilizando las asignaciones de codones genéticos que se indican en la Figura 27.3 y la información de lugares de restricción de la Tabla 25.2, diseñe un oligonucleótido de 18 residuos que permita alcanzar estos objetivos, empezando con la secuencia indicada en el gen clonado del diagrama adjunto. Indique los

lugares en que se añaden y se pierden lugares de ruptura. Otros lugares de ruptura adicionales que podrían ser útiles son los siguientes: *Ava*I, C↓PyCGPuG; *Bal*I, TGG↓CCA; *Xma*I, C↓CCGGG; *Hae*II, PuGCGC↓Py; *Hin*cIII, GTPy↓PuAC. (Py y Pu indican pirimidina y purina, respectivamente).



15. En la mutagénesis de lugar dirigida, utilizando cebadores oligonucleótidos, la proporción de clones mutantes que se recupera suele ser bastante inferior al 50% de lo esperado. ¿Cuál podría ser la razón?
16. Las enzimas de restricción *Msp*I y *Hpa*II rompen ambas el DNA dentro de la secuencia CCGG. *Msp*I rompe el DNA esté o no metilada la segunda C, pero *Hpa*II sólo rompe en lugares sin metilar. Utilizando esta información junto con la técnica de transferencia Southern, describa cómo podría identificar los lugares dentro de un determinado gen que contiene 5-metilcitosina.
17. Los análisis de las mutaciones del gen p53 en los tumores humanos muestran que una gran proporción de estas mutaciones son transiciones GC→AT que se originan en lugares de metilación del DNA. Proponga un modelo para explicar la mutagénesis preferente de este tipo en estos lugares.
18. Un artículo en el *Journal of Bacteriology* describe que una cepa mutante de *E. coli*, *mutT*, presenta un fenotipo mutador cuando la bacteria se cultiva anaerobiamente. ¿Es éste un resultado sorprendente? Explique brevemente su respuesta. Presente una o dos explicaciones posibles de esta observación.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 25A

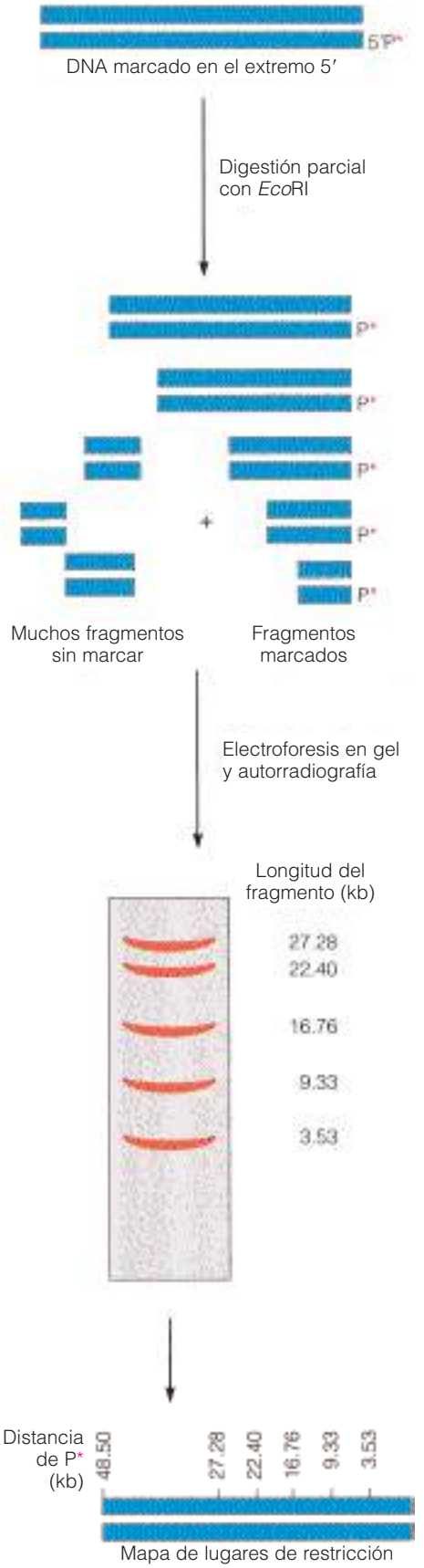
Cartografiado del genoma

Una de las primeras aplicaciones de las enzimas de restricción, a comienzos de los años 1970, fue la generación de mapas físicos de las moléculas de DNA. Uno de los objetivos de la biología molecular es determinar el tamaño y la localización de cada gen del genoma de un organismo. Hasta los años 1970, el cartografiado del genoma se basaba en la determinación del ligamiento genético entre marcadores, valorado mediante las determinaciones de la frecuencia de recombinación. Los primeros intentos de correlacionar la posición en el mapa genético con la localización física en un cromosoma se basaron en técnicas de microscopia electrónica bastante laboriosas.

La **ruptura de restricción** es una forma mucho más fácil de generar un mapa físico, en este caso un mapa de los lugares de ruptura de una nucleasa de restricción de tipo II. En la Figura 25.6 podrá apreciar que la ruptura del DNA de λ con una enzima como la *Eco*RI, proporciona las longitudes de los seis fragmentos del producto de la digestión pero no aporta información alguna acerca del orden en que se encuentran estos fragmentos en el genoma intacto del fago. Se obtiene una información comparable mediante el análisis de los lugares de *Bam*HI. Sin embargo, si el DNA se digiere tanto con *Eco*RI como con *Bam*HI, este patrón de doble digestión aporta mucha más información acerca de la posición de los lugares de ambas enzimas. Del análisis de tres patrones de ruptura, un investigador puede deducir a menudo mapas para dos lugares de restricción, como podrá ver si resuelve los Problemas 9 y 11 del Capítulo 25. Si los datos son difíciles de interpretar, por ejemplo, porque un producto de digestión contiene dos o más fragmentos diferentes que tienen el mismo tamaño, la información necesaria puede obtenerse mediante una digestión parcial, es decir, aplicando las reacciones de ruptura de restricción tan sólo parcialmente en vez de completarlas. Otra forma de simplificar la interpretación de los datos de cartografiado es marcar los extremos 5′ con γ-[^{32}P]ATP y polinucleótido quinasa y realizar luego una digestión parcial, seguida de una electroforesis y autorradiografía de los fragmentos marcados (Figura 25A.1). La autorradiografía proporciona una escalera de fragmentos, comparable a la que se observa en un gel de secuenciación de Maxam-Gilbert (página 1157), que permite ordenar los lugares a partir del extremo 5′.

Con métodos como éstos, a finales de los años 1970 y comienzos de los 1980 se generaron los mapas de restricción de muchos DNA pequeños, de virus, orgánulos y plásmidos. Fue posible establecer mapas de genomas de hasta 200 kpb o kilopares de bases (2×10^5 pares de nucleótidos). Sin embargo, los genomas celulares más pequeños tienen un tamaño unas 20 veces superior, y la dificultad de determinar el mapa de un genoma aumenta de manera desproporcionada al aumentar el tamaño del mismo, debido al gigantesco número de fragmentos de restricción que han de analizarse. Evidentemente eran necesarias nuevas tecnologías para manejar la enorme cantidad de datos generados en los trabajos de determinación de los mapas génicos.

En 1987, dos laboratorios describieron mapas físicos del genoma de *E. coli*, que contiene 4.7 millones de pares de bases; este esfuerzo fue fundamental para la determinación de la secuencia completa del genoma, completada una década más tarde. Un laboratorio clonó y separadamente situó 3400 fragmentos de restricción procedentes de la ruptura del DNA de *E. coli* con nucleasas de restricción que reconocen lugares de corte de seis bases. El otro laboratorio utilizó una nucleasa de restricción, ***Not*I**, que reconoce una secuencia de corte de ocho bases y genera, por tanto, un menor número de fragmentos



(que son más grandes). Estos fragmentos se separaron mediante **electroforesis en gel con campo pulsante**, una técnica que se basa en aplicar cambios periódicos de la orientación del campo eléctrico. Esta técnica permite la resolución de fragmentos de DNA del tamaño de cromosomas enteros, de hasta 3000 kpb de longitud.

Consideremos ahora el trabajo que implicará la determinación del mapa de todo el genoma humano, que contiene 2900 millones de pares de bases de DNA, y que es varios cientos de veces mayor y más complejo que el genoma de *E. coli*. Ese esfuerzo, el Proyecto Genoma Humano, está en buen camino. Se están utilizando varias técnicas para clonar y analizar fragmentos de DNA grandes, en especial el empleo de **cromosomas artificiales de levadura** (**YAC**). Los YAC se construyen mediante técnicas de DNA recombinante a partir de un centrómero de levadura, dos secuencias teloméricas (extremos de cromosomas), marcadores seleccionables y DNA clonado del orden de megabases (1000 kpb). La mayor parte de los datos del cartografiado de los genes del Proyecto Genoma Humano realmente es el resultado de los análisis directos de la secuencia de DNA a gran escala.

Gran parte del trabajo de determinación del mapa llevado a cabo por el Proyecto Genoma Humano ha conducido al aislamiento de genes cuya función defectuosa es la causante de enfermedades específicas (véase Herramientas de la Bioquímica 25D). A pequeña escala, se ha aprendido mucho del análisis del DNA mitocondrial humano. Los genes mitocondriales se heredan de la madre, puesto que las mitocondrias de la célula espermática no entran en el óvulo fertilizado. Comparando mapas de restricción del DNA mitocondrial de 147 personas de diversos orígenes, Allan Wilson llegó a la conclusión de que todas las líneas mitocondriales proceden de una mujer, que vivió en Africa hace unos 200 000 años. Esa conclusión ha generado una intensa controversia, que ha continuado tras la muerte prematura de Wilson. Sea cual sea el resultado final de esta controversia, el hecho de que datos relativamente sencillos puedan conducir a generalizaciones sobre el origen del hombre indica la potencia de las técnicas de determinación de los mapas de restricción.

Bibliografía

Drlica, K. A. (1994) *Double-Edged Sword. The Promises and Risks of the Genetic Revolution*. Helix Books, Reading, Mass. Una información legible de las bases técnicas y de las implicaciones sociales de la nueva biología humana.

Maniatis, T., E. F. Fritsch y J. Sambrook (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. El manual de laboratorio definitivo para los métodos de biología molecular.

FIGURA **25A.1**

Cartografiado de los lugares de *Eco*RI en el DNA de λ mediante autorradiografía de los fragmentos marcados en el extremo 5′ en un producto de digestión parcial de *Eco*RI.

Stoneking, M. y H. Soodyall (1996) Human evolution and the mitochondrial genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6:731-736. Una actualización de este tema controvertido, realizada por uno de los primeros colaboradores de Allan Wilson.

Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller (1992) *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Scientific American Books, Nueva York. Los Capítulos 29 y 30 analizan la determinación de mapas genómicos grandes y el Proyecto Genoma Humano.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 25B

Clonación de genes

En la biología clásica, un **clon** es una población de organismos que son genéticamente homogéneos ya que proceden de un único predecesor. Así, por ejemplo, todas las células bacterianas de una colonia constituyen un clon, ya que proceden de una sola célula que se ha depositado en ese lugar de la placa de Petri. En 1973, Herbert Boyer y Stanley Cohen se dieron cuenta de que podían utilizar las enzimas de restricción para "clonar" un gen de una manera comparable. Construyeron in vitro una nueva molécula de DNA formada por un fragmento de restricción que contenía un gen de interés, ligado a otra molécula de DNA, como un plásmido, capaz de dirigir su propia replicación. Esta molécula podía propagarse biológicamente mediante la introducción en una célula bacteriana. Cuando la bacteria prolifera, esta **molécula de DNA recombinante**, que recibe este nombre porque se forma mediante la unión extremo con extremo de dos DNA diferentes, se replica junto con su célula hospedadora. En una aplicación inicial de la técnica, se introdujo un plásmido recombinante que contenía el gen de la triptófano sintasa en bacterias que carecían de esta enzima, con lo que las bacterias transformadas adquirían la capacidad de crecer en ausencia de triptófano.

Boyer y Cohen se dieron cuenta de que, dada la simetría de los lugares de restricción de tipo II, las enzimas que producían cortes escalonados generaban extremos cohesivos que podían juntarse de forma covalente mediante la DNA ligasa, igual que ocurre en la replicación del DNA del fago λ (véase el Capítulo 24). Es posible juntar moléculas de DNA de cualquier origen, siempre que tengan los mismos extremos cohesivos (Figura 25B.1). Tras la reacción de la DNA ligasa in vitro, la mezcla de DNA se introduce en las bacterias que se han hecho permeables gracias a un tratamiento con cloruro cálcico seguido de un choque térmico o bien gracias a la aplicación de un pulso de corriente eléctrica. Alrededor del 0.01% de las bacterias pueden experimentar una transformación genética, es decir, la captación del DNA y su replicación en la célula receptora. Este proceso se ilustra en la Figura 25B.2.

La clonación satisfactoria de un gen requiere varios elementos. En primer lugar, es necesario disponer de un fragmento de DNA que contenga el gen de interés. Generalmente, se trata de un fragmento de restricción, aunque a menudo se utiliza la PCR para crear un fragmento que contiene el gen. Los extremos cohesivos pueden generarse también mediante síntesis. Una enzima denominada **desoxinucleotidiltransferasa terminal** añade nucleótidos a los extremos 3′ del DNA, sin necesidad de un molde. Así pues, puede colocarse una "cola" poli(dC) en un DNA y una "cola" poli(dG) en el otro, y estas colas son complementarias entre sí, de igual modo que los extremos cohesivos creados por las nucleasas de restricción.

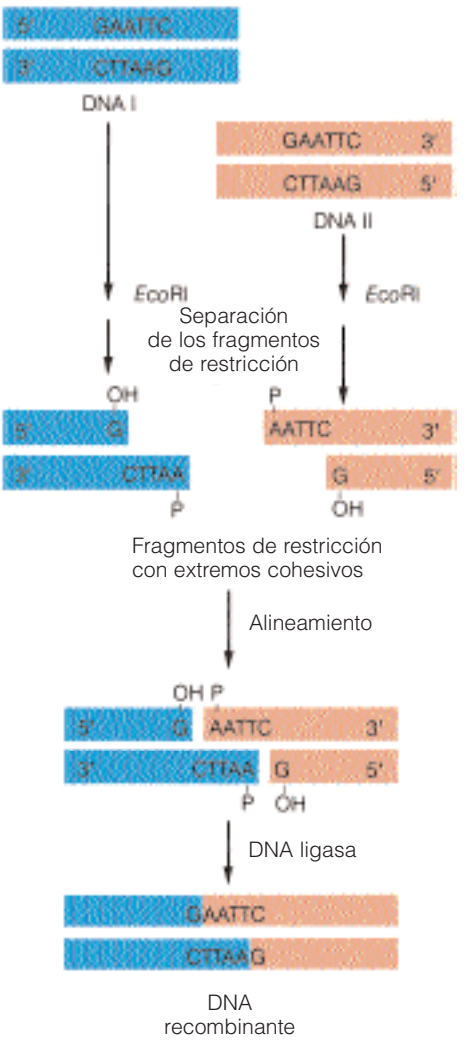


FIGURA **25B.1**
Creación de moléculas de DNA recombinante in vitro.

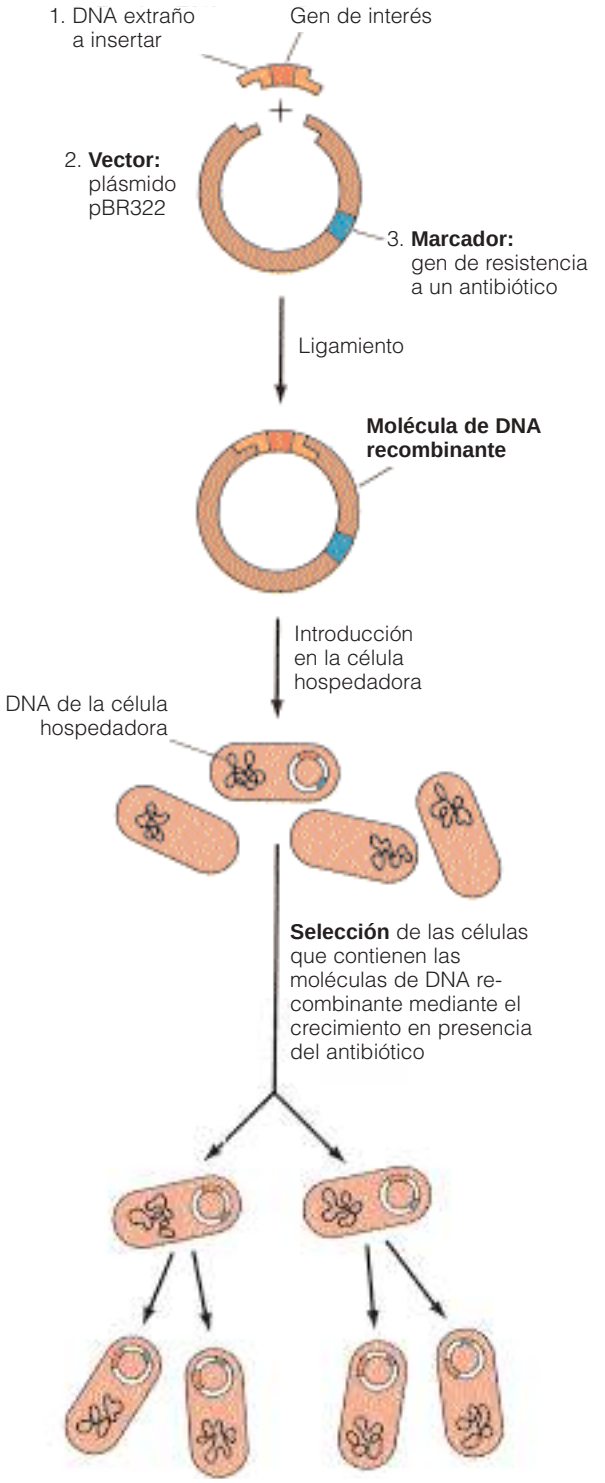


FIGURA **25B.2**

Clonación de un fragmento de DNA en un vector plásmido e introducción de la molécula recombinante en las bacterias.

Además, actualmente se dispone de técnicas para la unión extremo con extremo de fragmentos de DNA con extremos romos y también para la clonación de productos de PCR, que a menudo tienen extremos de una sola cadena de un solo nucleótido de longitud. Las copias de DNA (cDNA), creadas mediante la acción de la transcriptasa inversa sobre el RNA mensajero, se utilizan a menudo como sustratos para la clonación del gen.

En segundo lugar es necesario disponer de un **vector**, es decir, una molécula de DNA en la que se injertará el gen. Un vector puede ser cualquier DNA que contenga un origen de replicación y que pueda replicarse tras su entrada en una célula adecuada (generalmente una bacteria, aunque los genes se clonan también en células eucariotas). Los plásmidos y los cromosomas de bacteriófagos son los vectores utilizados con más frecuencia, puesto que pueden replicarse de manera independiente de la célula hospedadora en la que se introducen. Esto permite amplificar el DNA recombinante, esto es, replicarlo en un número de copias muy superior al del DNA cromosómico.

En tercer lugar, dado que la ligazón y la transformación se producen con una eficacia baja, es necesario disponer de una técnica de detección adecuada, es decir, de un método para identificar las bacterias que contienen el gen clonado, en presencia de una enorme cantidad de células que no lo tienen. Si se prevé que el gen clonado se exprese, pueden seleccionarse unas condiciones en las que el gen clonado confiera a la bacteria receptora un fenotipo seleccionable, como por ejemplo la resistencia a un determinado fármaco o la pérdida de un requerimiento nutritivo. La reacción con un anticuerpo contra el producto del gen clonado es otra forma de determinar la presencia de los clones deseados entre un gran número de células transformadas. Sin embargo, si no se sabe si el gen clonado se va a expresar, pueden buscarse las *secuencias de DNA* deseadas en vez del producto del gen clonado. En una técnica denominada **hibridación de colonias**, se utiliza una sonda de ácido nucleico marcado homóloga a la secuencia deseada para buscar en las distintas colonias bacterianas la presencia de esa secuencia de DNA (Figura 25B.3). La sonda de hibridación puede ser un fragmento de restricción del DNA natural o bien un oligonucleótido sintetizado químicamente que se sepa contiene una secuencia representada en el clon deseado. Otra posibilidad, si el DNA se ha clonado en un fago vector en vez de un plásmido, es realizar una **hibridación de placa**, en la que se examinan placas de fago individuales de la misma manera.

La búsqueda de los recombinantes deseados se facilita en gran manera con el diseño de vectores con lugares de restricción adecuados y marcadores seleccionables. El pBR322 es un plásmido vector popular que es él mismo una molécula de DNA recombinante producida in vitro (Figura 25B.4). El pBR322 es una molécula de DNA circular que contiene un origen de replicación procedente de un plásmido natural, el ColE1, junto con genes que le confieren resistencia a los antibióticos ampicilina (amp^R) y tetraciclina (tet^R). Algunos lugares de restricción se encuentran dentro de los genes amp^R y tet^R que son los genes que confieren la resistencia a estos dos antibióticos. Un investigador puede "clonar en" el lugar de *Hin*dIII, abriendo el pBR322 con *Hin*dIII y ligando el DNA a los extremos del DNA resultantes, con lo que se crea un recombinante en el que el gen clonado forma un inserto que in-

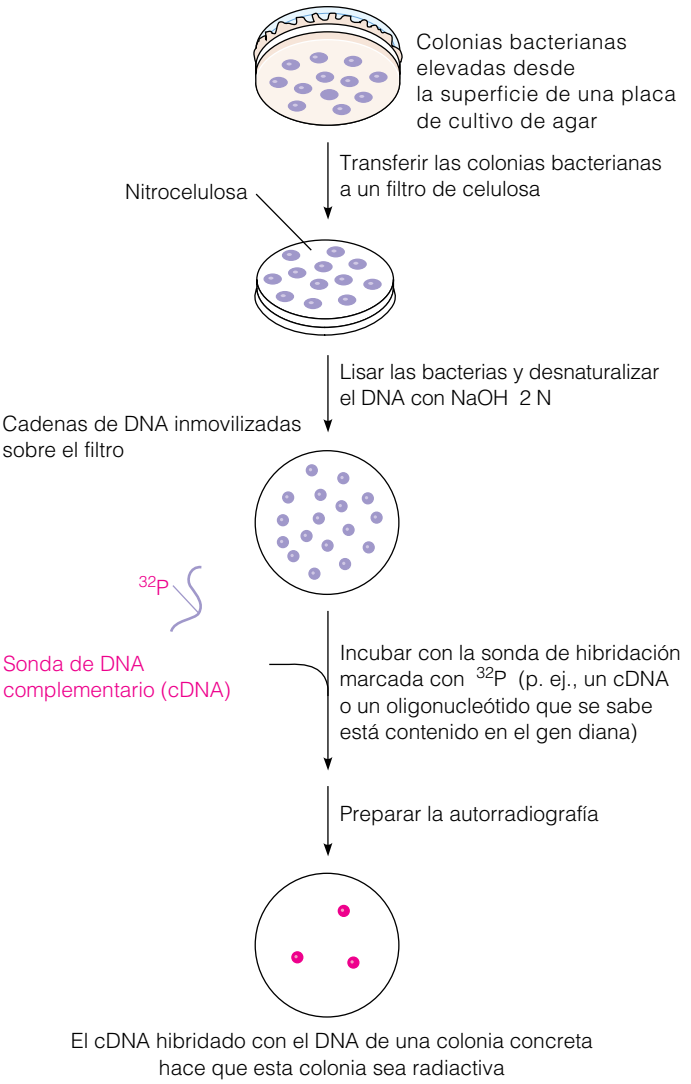


FIGURA **25B.3**

Hibridación de colonias. Se utiliza un DNA complementario o un oligonucleótido sonda radiactivos para identificar las bacterias que contienen secuencias clonadas homólogas a la sonda.

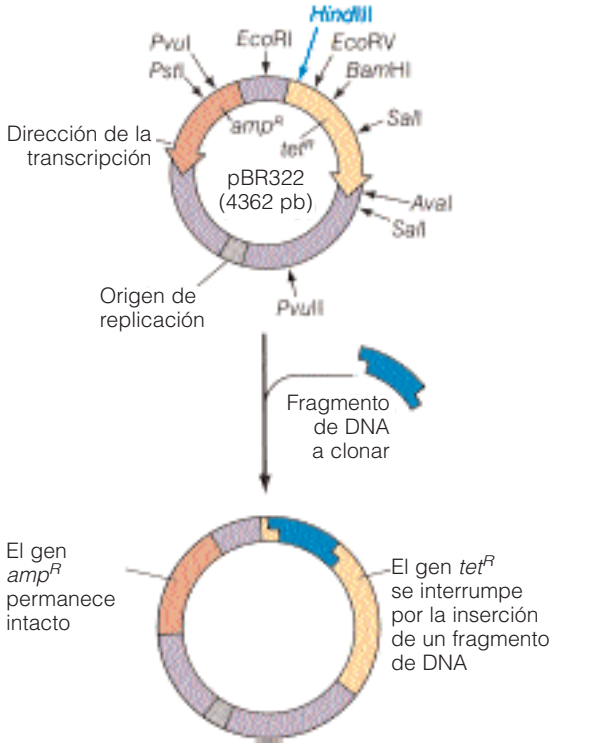


FIGURA **25B.4**

pBR322, un vector de clonación plásmido muy utilizado. Se muestran algunos de los lugares de restricción, así como la dirección de la transcripción de los genes de resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. En el esquema de la parte inferior se muestra el efecto de la clonación de una nueva secuencia en el lugar de *Hin*dIII.

terrumpe y, por tanto, inactiva, el gen tet^R. Esta técnica facilita en gran manera la identificación de los clones. Todas las bacterias que se transforman, tanto con el vector original como con un DNA recombinante, se hacen resistentes a la ampicilina. Sin embargo, tan sólo las bacterias que contienen un plásmido recombinante son también sensibles a la tetraciclina. La transformación con el plásmido inalterado confiere resistencia a ambos antibióticos. En consecuencia, pueden tomarse células de las diversas colonias de bacterias transformadas que crecen en placas con ampicilina y volver a sembrarse en presencia de tetraciclina. Las células que no crecen en estas placas es probable que contengan los plásmidos recombinantes.

Desde la introducción del pBR322, se han descrito centenares de vectores de clonación diferentes. Resultan especialmente útiles los **vectores de expresión**, en los que se han introducido regiones de control que afectan a la transcripción y la traducción, para permitir la expresión de alto nivel de los genes clonados, con objeto de producir los productos génicos. Veremos numerosos ejemplos de la utilidad de la clonación génica como herramienta de investigación. Sin embargo, el interés generado por la tecnología del DNA recombinante derivó en parte de las posibilidades que proporciona de abordar problemas prácticos. El primer ejemplo fue la clonación y expresión en *E. coli* de un gen que codifica la insulina humana. Esto se consiguió en 1977, y en 1982 se empezó a distribuir el producto recombinante purificado para el tratamiento de la diabetes. Otros productos recombinantes son los factores de la coagulación, las enzimas de disolución de los coágulos que se emplean para tratar a quienes han sufrido un ataque de corazón, otras hormonas polipeptídicas (como la hormona de crecimiento hipofisaria) y los interferones.

Una ayuda útil para la clonación del vector de expresión es añadir "marcas" a las proteínas recombinantes, para facilitar su purificación tras la expresión. Una aplicación popular de esta técnica es la "marca de histidina". Se empalma un oligonucleótido que contiene seis codones de histidina junto al inserto en un vector de expresión, de forma que la proteína recombinante que se expresa tenga una secuencia de seis residuos de histidina ligada al extremo C-terminal o al N-terminal. El anillo imidazol de la histidina hace que la secuencia de hexahis-

tidina se una estrechamente a una columna de afinidad que contenga ion níquel coordinado con un quelante unido covalentemente, como el nitriloacetato (que se muestra en la figura siguiente). De esta forma, cuando se aplica a esta columna un extracto crudo que contiene la proteína recombinante marcada con histidina, la proteína recombinante se une fuertemente y específicamente y, posteriormente, puede eluirse de la columna con un amortiguador de imidazol. Con frecuencia, esto permite la purificación completa de una proteína recombinante con un solo paso de fraccionamiento. Posteriormente, puede eliminarse la marca, si se desea, diseñando el oligonucleótido para que contenga tanto los seis codones de His como un lugar de ruptura para una proteasa específica.

Ha habido un gran interés por la ingeniería genética de las plantas, con objeto de dotarles de propiedades deseables, como la resistencia al frío, a la deshidratación, a los virus o a los pesticidas. La naturaleza nos ha proporcionado un excelente vehículo para introducir nuevos genes en las plantas. *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria patógena que produce una enfermedad denominada agalla de corona, mediante la transferencia de parte de su propio DNA a las plantas infectadas. Los genes causantes de la enfermedad se encuentran en un plásmido denominado **plásmido Ti**. Pueden introducirse genes extraños en el plásmido utilizando el método del DNA recombinante, y la infección de las plantas por *Agrobacterium* modificado resultante puede transferir estos nuevos genes a las plantas. Los trabajos actuales se centran en el control de la expresión de estos genes tras la infección y en dirigir su integración en el genoma celular, de manera que las características deseables queden incorporadas permanentemente en el genoma.

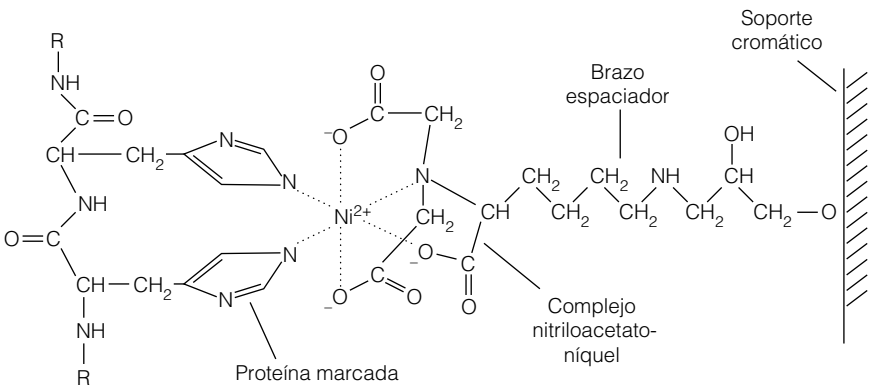
Existen técnicas de transferencia génica comparables para los animales. En 1982, Ralph Brinster y Richard Palmiter introdujeron, mediante microinyección, un gen clonado de la hormona de crecimiento de la rata en el pronúcleo masculino de óvulos de ratón fertilizados. El gen se clonó a partir de un promotor inducible para aumentar sus probabilidades de expresión. Tras la inserción de los óvulos microinyectados en el útero de una hembra de ratón diferente, un número importante de las crías expresaron el gen, produjeron cantidades elevadas de la hormona de crecimiento de la rata y alcanzaron un tamaño de aproximadamente el doble del de los ratones normales. Aunque el éxito inicial de este experimento con animales **transgénicos** tal vez fuera fortuito, algunos avances más recientes han incrementado en gran manera nuestra capacidad de conseguir la recombinación homóloga del DNA tras la trasferencia a células de mamíferos. De hecho, estas técnicas están siendo analizadas en la actualidad para el tratamiento de algunas enfermedades genéticas humanas, como la inmunodeficiencia asociada con la carencia de adenosina desaminasa (véanse las páginas 901-902).

Bibliografía

Barinaga, M. (1994) Knockout mice: Round two. *Science* 265:26-28. Un artículo de noticias en el que se detalla el reciente éxito obtenido con el empleo de una transferencia génica dirigida para abolir determinadas funciones génicas en el ratón y para estudiar las consecuencias biológicas.

Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller (1992) *Recombinant DNA*, 2.ª ed. Scientific American Books, Nueva York. Los Capítulos 5 y 7 abordan fundamentalmente las técnicas de clonación génica, pero todo el libro trata sobre el empleo de la tecnología del DNA recombinante.

Wu, R., L. Grossman y K. Moldave, eds. (1989) *Recombinant DNA Methodology*. Academic Press, San Diego, Calif. Artículos seleccionados de varios volúmenes de *Methods in Enzymology*.

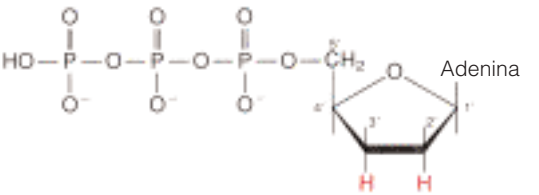


Secuenciación de genes con didesoxinucleótidos

En el Capítulo 4, hemos mencionado la técnica innovadora de secuenciación de DNA de Maxam-Gilbert, que se basa en la ruptura en bases específicas de una molécula de DNA marcada en el extremo 5′ para dar una serie de fragmentos de diversas longitudes, que pueden analizarse mediante electroforesis en gel. En 1976, Fred Sanger presentó una metodología de secuenciación alternativa, que en la actualidad se utiliza casi universalmente puesto que puede aplicarse a fragmentos más largos y es más rápida y puede automatizarse.

La secuenciación de Sanger es similar en principio a la de Maxam-Gilbert en cuanto a que genera una serie de fragmentos con un origen 5′ común y terminaciones 3′ con bases específicas. Sin embargo, las terminaciones 3′ se crean no por una ruptura en bases específicas a partir de una molécula de longitud completa, sino mediante una *interrupción* en bases específicas de la síntesis enzimática de la molécula in vitro, al incorporar análogos de nucleótidos que sirven como terminadores de cadena. El principio del método se muestra en la Figura 25C.1. En primer lugar, se suele clonar el fragmento a secuenciar en un vector que permita aislarlo en forma de DNA de una sola cadena (aunque otros métodos similares utilizan DNA de doble cadena). El vector más utilizado es el bacteriófago M13. Se puede aislar la forma replicativa de doble cadena de este virus y clonar la secuencia diana en él, de la misma manera que se clona en un plásmido como el pBR322. Tras la introducción del DNA de doble cadena en una bacteria, la célula produce partículas víricas, que contienen DNA de una sola cadena. El genoma de M13 se ha modificado mediante ingeniería genética para este tipo de clonación, en primer lugar para que contenga lugares de restricción adecuados para la clonación y, en segundo lugar, para permitir la identificación rápida de placas que contengan el fago y hayan adquirido un inserto de DNA en el proceso de clonación.

El DNA circular de una sola cadena aislado del fago que contiene el inserto deseado pasa a ser el molde de cuatro reacciones catalizadas por la DNA polimerasa. El cebador es un oligonucleótido complementario de una secuencia del M13 situada en el lado 3′ del inserto. La extensión de este cebador mediante la DNA polimerasa copiará el inserto. Estas reacciones de la polimerasa se realizan en presencia de análogos de desoxirribonucleósidos trifosfato, los **2′,3′-didesoxirribonucleósidos trifosfato**, que actúan como factores de terminación de la extensión de la cadena puesto que carecen de terminaciones 3′ hidroxilo. Se muestra aquí el análogo didesoxi (ddATP) de la adenosina trifosfato.



2′, 3′-Didesoxiadenosina trifosfato

Para generar una serie de fragmentos con terminación A, se efectúa la reacción de la DNA polimerasa en presencia de concentraciones equivalentes de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, junto con un décimo de equivalente de ddATP. Cuando se encuentra T en la cadena molde, la DNA polimerasa inserta ocasionalmente ddAMP en vez de dAMP. Cuando esto ocurre, se detiene la elongación de la cadena y el fragmento se libera de la enzima. Así pues, se acumulan una serie de fragmentos de diversas longitudes, de manera que cada fragmento identifica una T en la secuencia de nucleótidos del inserto. De igual modo, se identifican los lugares que terminan en C, G o T, simplemente mediante la realización de reacciones comparables de la polimerasa, con los otros tres análogos didesoxi. La inclusión de un marcaje radiactivo en la mezcla de polimerización y la electroforesis en gel seguida de autorradiografía genera cuatro escaleras de secuenciación, donde cada escalera tiene una especificidad de bases absoluta.

La tecnología introducida más recientemente permite la determinación automatizada de la secuencia con el método de Sanger. Se modifica el cebador de secuenciación en su extremo 5′ mediante un colorante fluorescente rojo, azul, verde o amarillo. Cada una de las cuatro reacciones de secuenciación se realiza con un cebador combinado con un color diferente, que confiere una fluorescencia característica a todos los fragmentos que terminan en A, T, G o C, respectivamente. Esto permite tanto una determinación de la secuencia sin isótopos radiactivos como una lectura asistida por ordenador del gel de secuenciación y del procesamiento de los datos. Otros métodos presentados recientemente permiten la determinación directa de la secuencia con DNA de doble cadena, sin necesidad de clonarlo en un vector de DNA de una sola cadena como el M13.

La aplicación de éstas y otras modificaciones de secuenciación de gran capacidad ha conducido, al final de los años 1990, a la determinación de la secuencia completa de varios genomas bacterianos. La secuencia del genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* también se ha publicado y la secuencia completa del genoma de un organismo multicelular, el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, se publicó a finales de 1998. Los científicos predicen que el genoma humano completo se

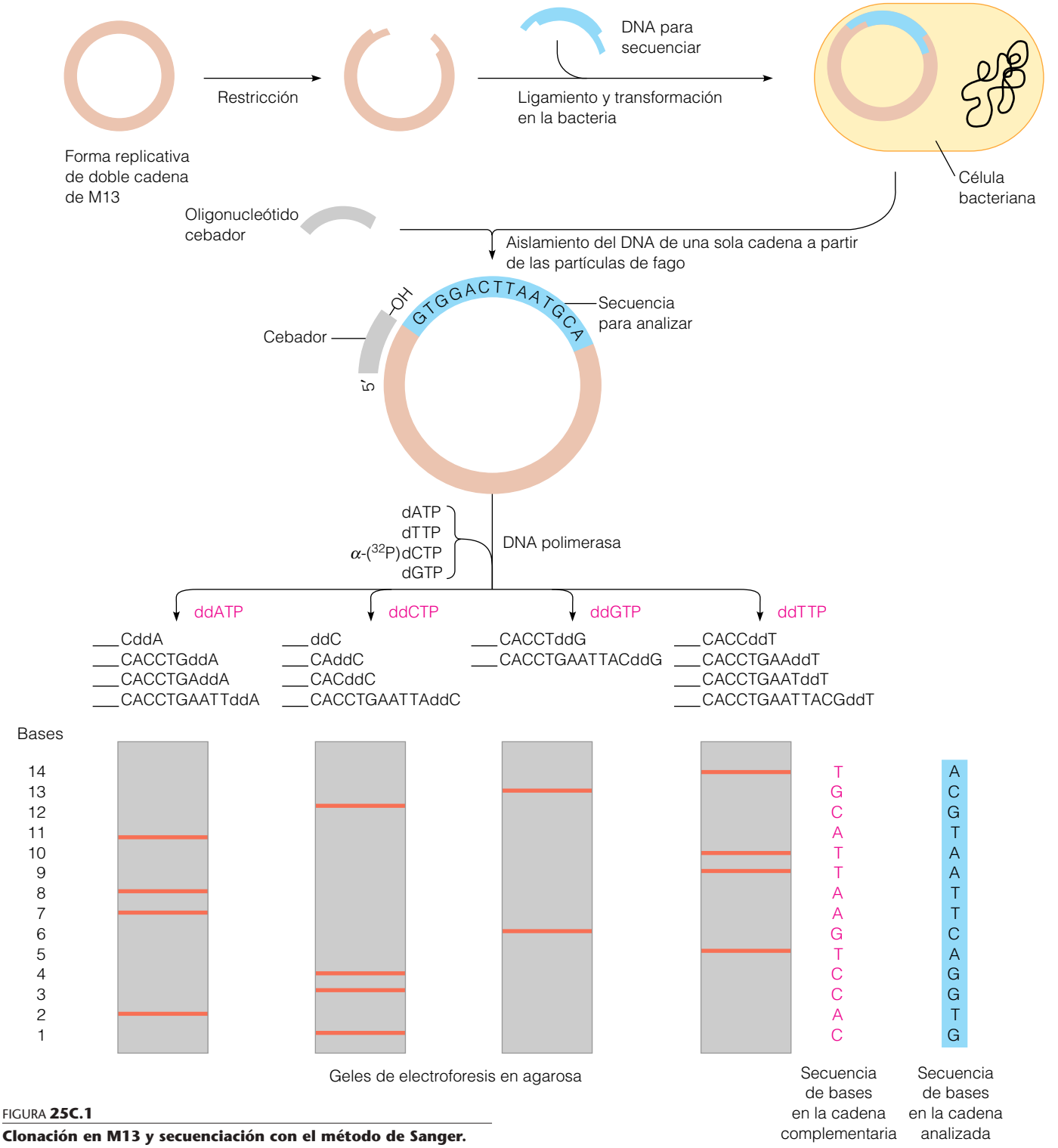


FIGURA **25C.1**
Clonación en M13 y secuenciación con el método de Sanger.

habrá secuenciado en los dos o tres primeros años del siglo XXI. Ya, el esfuerzo del cartografiado de genes y de la secuenciación que ha conllevado el Proyecto Genoma Humano ha identificado muchos de los genes llamados de enfermedad, que son genes humanos en los que determinadas mutaciones son responsables de enfermedades específicas. Estas técnicas de cartografiado emplean análisis de hibridación de ácidos nucleicos, que se describen en Herramientas de la Bioquímica 25D.

Bibliografía

Blattner, F. R. y 16 coautores (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K12. *Science* 277:1453-1462. Una de las pri-

meras determinaciones de la secuencia completa de un genoma bacteriano.

Harris, E. E. y J. Hey (1999) X chromosome evidence for ancient human histories. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3320-3324. El análisis de la secuencia del DNA nuclear proporciona conclusiones diferentes de las que se obtienen del análisis del DNA mitocondrial.

Karlin, S., A. M. Campbell y J. Mrazek (1998) Comparative DNA analysis across genomes. *Annu. Rev. Genet.* 32:185-225. Conceptos y métodos para el análisis comparativo de los genomas completos; una introducción a la genómica.

Pandey, A. y F. Lewitter (1999) Nucleotide sequence databases: A gold mine for biologists. *Trends Biochem. Sci.* 24:276-280. Una introducción excelente a las principales bases de datos y cómo deben utilizarse.

Venter, J. C., M. D. Adams, G. G. Sutton, A. R. Kerlavage, H. O. Smith y M. Hunkapiller (1998) Shotgun sequencing of the human genome. *Science* 280:1540-1542. Este artículo corto esboza el cartografiado, la secuenciación y las técnicas de manejo de datos de gran capacidad propuestas para la terminación rápida del Proyecto Genoma Humano.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 25D

Transferencia Southern

Una aplicación importante de las nucleasas de restricción es la detección y el cartografiado de secuencias específicas en genomas complejos. Así, por ejemplo, en el Capítulo 24 hemos visto que el DNA del fago λ se integra en el cromosoma de la bacteria hospedadora durante una infección lisogénica y que los virus tumorales también insertan sus genomas en los cromosomas de las células animales infectadas. ¿Cómo conocemos estos fenómenos? Una forma de establecerlo es la búsqueda específica de secuencias víricas en productos de digestión de restricción del DNA cromosómico procedente de células infectadas.

Anteriormente hemos descrito la determinación del mapa físico de los DNA de virus o de plásmidos mediante la ruptura con enzimas de restricción, seguida de la separación electroforética de los fragmentos y su visualización con bromuro de etidio. Cualquier genoma celular, incluso el de una bacteria, es tan complejo que este análisis proporcionaría una "mancha" formada por un número muy elevado de fragmentos, cada uno de los cuales presente en una cantidad minúscula. Sin embargo, gracias a la potencia del marcaje radiactivo y a las técnicas de realineación de ácidos nucleicos, podemos detectar secuencias de DNA específicas dentro de un producto de digestión de este tipo, a pesar de que puedan encontrarse en cantidades tan bajas como una copia por genoma o incluso una millonésima parte del total del DNA existente en un gel.

El método consiste en marcar radiactivamente una secuencia de interés con una actividad específica elevada y utilizar luego esta "sonda" marcada para buscar secuencias complementarias entre los fragmentos de una digestión de restricción tras la electroforesis. Esto se hace mediante la desnaturalización de la sonda y del producto de restricción, un realineamiento y, a continuación, la búsqueda de moléculas radiactivas de doble cadena. Esta búsqueda es difícil de realizar con fragmentos de DNA incluidos en un gel de agarosa, debido a la fragilidad del gel. Sin embargo, en 1975, E. M. Southern diseñó una forma de transferir los fragmentos desde la agarosa a una lámina de nitrocelulosa, seguido de la desnaturalización alcalina de los fragmentos. Como se muestra en la Figura 25D.1, la transferencia se realiza mediante acción capilar. El líquido asociado al gel de agarosa, en el que están disueltos los fragmentos de DNA, es literalmente "tachado" (blotted out), y los fragmentos de DNA de una sola cadena del producto desnaturalizado quedan unidos de manera irreversible a la lámina de nitrocelulosa. Por este motivo la técnica se denomina en inglés **Southern blotting** o, más descriptivamente, **transferencia Southern**. Otra posibilidad es realizar la transferencia electroforéticamente.

La lámina de nitrocelulosa, que ahora contiene una replica del gel de DNA original, se incuba en condiciones de alineamiento con la sonda marcada radiactivamente, y se detectan los heterodúplex de DNA mediante autorradiografía tras un lavado abundante de la nitrocelulosa. Se realiza también un tratamiento de "prelavado" para reducir la fijación inespecífica de la sonda de hibridación. Una de las aplicaciones iniciales de la transferencia Southern demostró que los genomas de los virus tumorales se integraban en el DNA cromosómico de las células transformadas por el virus. Se detectaron secuencias víricas en los productos de digestión por restricción del DNA de las células transformadas, a veces en fragmentos de longitud superior a la del propio genoma vírico.

Una variación de esta técnica, denominada inevitablemente **transferencia northern**, permite la detección de las moléculas de RNA infrecuentes de una célula con una sensibilidad semejante. En este caso, se prepara el RNA celular total y se resuelven las diferentes clases de tamaño electroforéticamente, con la posterior transferencia y aplicación de la sonda de DNA con marcaje radiactivo, seguida de la detección autorradiográfica de dobles cadenas híbridas DNA-RNA. La tecnología de la transferencia es ligeramente diferente, y se basa en la formación de enlaces covalentes del RNA con diazobenziloximetil (DBM) celulosa o la transferencia del RNA tratado con formaldehído a la nitrocelulosa.

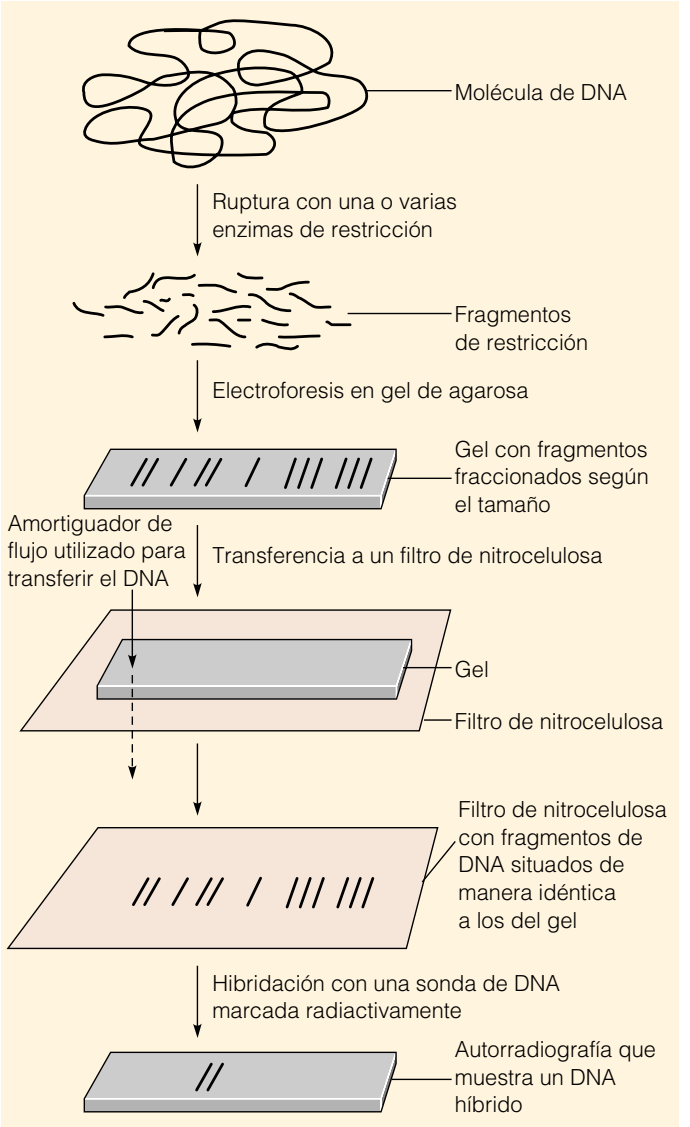


FIGURA **25D.1**

Principio de la técnica de transferencia Southern.

Tomado de J. D. Watson et al., *Molecular Biology of the Gene,* 4.ª ed. (Redwood City, Calif.: Benjamin/Cummings, 1987). © 1987 J. D. Watson.

Mencionaremos aquí algunas de las múltiples aplicaciones de la transferencia Southern y la hibridación. En primer lugar, la transferencia Southern es un instrumento de inestimable valor para la clonación, cuando se conoce la secuencia de aminoácidos de al menos una parte del producto proteico del gen diana. A partir de la secuencia, se diseñan los oligonucleótidos que se espera que sean homólogos con parte de la secuencia. Estos oligonucleótidos se sintetizan químicamente, se marcan con radiactividad y se utilizan para examinar una **biblioteca**, es decir, una amplia colección aleatoria de fragmentos de DNA clonados procedentes del organismo de interés. Este examen sistemático se basa en hibridación en placa o de colonias, como se describe en Herramientas de la Bioquímica 25B. Se analizan entonces los segmentos clonados homólogos a la sonda de hibridación, para comprobar cuáles contienen una copia de longitud completa del gen diana. Dado que esta técnica se inicia con una proteína y avanza "hacia atrás", para aislar el gen estructural de esa proteína, se la denomina **genética inversa**.

En segundo lugar, la técnica de transferencia Southern puede utilizarse también para identificar lugares metilados en genes concretos. Son especialmente útiles las nucleasas de restricción *Msp*I y *Hpa*II, que reconocen y rompen en la misma secuencia (véase la Tabla 25.2). Sin embargo, la *Hpa*II requiere que una C situada dentro de ese lugar esté metilada, mientras que la *Msp*I sólo rompe el DNA no metilado en ese lugar. Así pues, cualquier zona metilada situada dentro de una secuencia analizada con una sonda determinada será rota por la primera de estas enzimas, pero no por la segunda de ellas.

Una tercera aplicación de la transferencia Southern es el empleo de los **polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción** (**PLFR**) para establecer la localización en el mapa genético de los genes causantes de enfermedades hereditarias del ser humano. Muchas mutaciones crean un nuevo lugar de restricción en un genoma o destruyen uno existente. Si se produce una mutación de este tipo dentro de un determinado gen o cerca de él, el patrón de fragmentación de restricción se modificará, y este patrón puede determinarse mediante transferencia Southern y el estudio con una sonda utilizando una secuencia situada en la misma región del genoma. Así, por ejemplo, algunos casos de drepanocitosis pueden detectarse mediante una alteración del patrón de restricción cuando se estudia el DNA humano con una sonda consistente en parte del gen de la subunidad β de la globina. La sensibilidad de la técnica permite el diagnóstico prenatal de la drepanocitosis, utilizando células cultivadas a partir del líquido amniótico que rodea al feto. Más recientemente, esta técnica se ha utilizado para determinar la posición en el mapa y aislar los genes de enfermedades hereditarias para las que no se han identificado aún los genes causales, como es el caso de la fibrosis quística, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica (enfermedad de Lou Gehrig) y, más recientemente, el cáncer de colon.

Es de prever que los métodos de detección que utilizan sondas no radiactivas tendrán una amplia aplicación en el diagnóstico clínico de las enfermedades infecciosas, como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, causado por un retrovirus. La primera prueba para el SIDA utiliza la detección de anticuerpos contra una proteína vírica. Sin embargo, puede ser necesario que pasen 4 meses tras la infección antes de que se acumulen estos anticuerpos hasta concentraciones detectables en sangre. En consecuencia, los trabajos actuales se orientan hacia pruebas de hibridación rápida para el genoma del virus infectante, que deberá ser detectable mucho antes, una vez producida la infección inicial.

Estas técnicas están encontrando también aplicaciones en el ámbito de la investigación criminal. Con el uso de diferentes enzimas de restricción y sondas de hibridación, se puede generar un patrón de PLFR que es casi único para cada per-

sona, es decir, una especie de "huella dactilar" de DNA. Utilizando la reacción en cadena de la polimerasa, actualmente se puede aislar y analizar el DNA de una muestra de tejido tan pequeña como un cabello humano o una gota de semen. Así pues, la presencia de un pelo o una cantidad de tejido igualmente pequeña de un sospechoso en el lugar en que se ha cometido un delito puede identificarse a partir de la huella dactilar de DNA, no con una certeza absoluta, pero sí con más certeza que la que proporcionan las huellas dactilares manuales. Tal vez tenga aún más importancia el que las huellas dactilares de DNA se hayan utilizado para exonerar de manera definitiva a ciertos sospechosos, incluyendo algunas personas que han pasado años en la cárcel. A finales de 1998, esta tecnología se utilizó en un tema de importancia histórica, cuando la PCR y el análisis de hibridación del DNA obtenido de descendientes de Thomas Jefferson y su esclava, Sally Hemings, establecieron, casi con certeza, que nuestro tercer presidente o un pariente cercano tuvo, al menos, un hijo con su esclava.

Finalmente, los análisis de hibridación con sondas de DNA o RNA fluorescente son el centro de la tecnología de los microchip de DNA, una técnica que genera una enorme cantidad de información sobre los patrones de expresión de los genes. La técnica implica la síntesis automática de cientos o miles de oligonucleótidos diferentes, cada uno en una posición definida en un chip de silicio. Las reacciones de acoplamiento para la síntesis de estos oligonucleótidos están activadas por la luz y cada ciclo de activación se lleva a cabo a través de una "máscara" que permite iluminar sólo los lugares donde debe añadirse una base específica en un ciclo determinado de síntesis de oligonucleótidos. Tras una tanda de adición, se coloca sobre el chip una máscara diferente, que permite añadir el siguiente nucleótido sólo al conjunto deseado de cadenas de oligonucleótidos en crecimiento sobre el chip. Con estos medios, 32 ciclos de este tipo pueden crear, en un chip de sólo 1 pulgada cuadrada, un conjunto de 65 000 octámeros diferentes (oligonucleótidos de ocho bases de longitud) en una posición precisa, cada uno de ellos capaz de funcionar como una sonda de hibridación. Un planteamiento diferente utiliza la tecnología de la impresión por inyección de tinta. En cualquier caso, el RNA total de una célula u organismo puede analizarse primero, utilizando la transcriptasa inversa y dNTP modificados con grupos fluorescentes para sintetizar cDNA representativos de la población de RNA. A continuación, se deja que hibriden éstos con los oligonucleótidos en el chip. La formación de los híbridos DNA-oligonucleótidos genera una mancha fluorescente que indica la abundancia relativa del cDNA unido. La Figura 25D.2 muestra el tipo de datos que pueden obtenerse. En la medida en que el experimentador conozca la secuencia de nucleótidos de los genes de interés, así puede analizar los datos para conocer el grado de expresión de un gran número de genes en respuesta, por ejemplo, a la secreción hormonal, los cambios del desarrollo o las presiones ambientales.

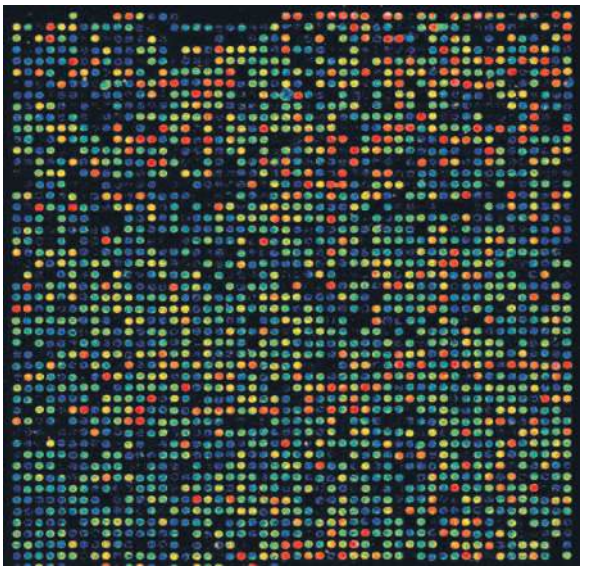


FIGURA **25D.2**

Un dispositivo microchip de DNA. En este experimento, utilizando el sistema de detección MICROMAX, se alinean 2 μg de mRNA humano con cDNA inmovilizados que representan 2400 genes humanos. Las intensidades de los puntos y los colores indican la abundancia de los mRNA particulares específicos de los genes.

Cortesía de Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA, de R. F. Service, *Science* (1998) 282:396-399, con permiso de *Science*.

Bibliografía

Gerhold, D., T. Rushmore y C. T. Caskey (1999) DNA chips: Promising toys have become powerful tools. *Trends Biochem. Sci.* 24:168-173. El título lo dice todo.

Morell, V. (1993) Huntington's gene finally found. *Science* 260:28-29. Un artículo de noticias en que se describe un triunfo de la genética molecular del ser humano.

Rommens, J. M. et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping. *Science* 245:1059-1079. Una descripción detallada de otro triunfo de este tipo.

Service, R. F. (1998) Microchip arrays put DNA on the spot. *Science* 282:396-399. Un artículo de noticias que describe las aplicaciones y las promesas de esta nueva tecnología.

Zurer, P. (1994) DNA profiling fast becoming accepted tool for identification. *Chem. Eng. News* 72:8-15. Un artículo de noticias escrito de manera muy clara, en el que se describen las aplicaciones forenses del análisis de PLFR, incluyendo su empleo en casos delictivos de gran trascendencia pública.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 25E

Mutagénesis de lugar dirigida

El análisis de la función de una proteína comporta alterar la estructura de la proteína y luego determinar si se modifican o no las funciones biológicas de la proteína y de qué manera. Clásicamente se han utilizado dos métodos para generar proteínas modificadas. Uno de ellos consiste en modificar químicamente determinados residuos mediante un tratamiento con reactivos modificadores de proteínas. Esta técnica carece de especificidad, ya que pueden modificarse todos los residuos de un determinado aminoácido, y no sólo aquél o aquellos dos que son de especial interés. Otro método consiste en producir una mutagénesis en un organismo con luz ultravioleta, radiación ionizante o mutágenos químicos y seleccionar luego a los organismos sobrevivientes que contienen mutaciones que afectan a la proteína de interés. Las mutaciones pueden identificarse mediante un análisis de la secuencia del gen mutante o de su producto proteico. El problema de este enfoque es la imposibilidad de dirigir las mutaciones a una determinada región del gen, habitualmente la parte que especifica el lugar catalítico de una molécula enzimática o que especifica una región reguladora que interviene en interacciones DNA-proteína.

Cuando se hizo posible clonar el gen que codifica una proteína de interés, se pudo modificar sistemáticamente el gen en lugares específicos para generar prácticamente cualquier mutación deseada, con una técnica denominada **mutagénesis de lugar dirigida**. La introducción del gen mutante en una célula hospedadora, seguida de la expresión, podía producir la proteína modificada para el estudio de la modificación de la función. Los primeros experimentos se orientaron a la generación de eliminaciones. Así, por ejemplo, la digestión parcial de un DNA clonado con una nucleasa de restricción, seguida de una ligazón, podía producir genes mutantes en los que se hubiera eliminado la región situada entre dos lugares de corte. Podrían generarse eliminaciones más cortas abriendo en un lugar de ruptura, seguido del tratamiento con una exonucleasa que digiriera de nuevo a partir de los dos extremos creados por la ruptura. Una enzima de este tipo es la exonucleasa *Bal*31, que digiere las dos cadenas a partir de un lugar de corte. Los extremos pueden cortarse con una nucleasa S1 (una enzima que rompe tan sólo el DNA de una cadena), seguido de la ligazón en unas condiciones que permitan que se unan los extremos de DNA romos. A menudo, se introduce en esta fase un oligonucleótido que contiene un lugar de restricción (por ejemplo, "ligadores" *Bam*HI). Este método permite generar eliminaciones de diversas longitudes simplemente mediante la variación del período de tratamiento con la exonucleasa.

El método más potente y más utilizado para la mutagénesis de lugar dirigida permite la introducción de prácticamente cualquier mutación en cualquier lugar, incluyendo las sustituciones de una sola base, las eliminaciones cortas o las inserciones. El método, que se ilustra en la Figura 25E.1, requiere que primero se clone el gen en un vector de una sola cadena, como el fago M13. A continuación se sintetiza químicamente un oligonucleótido, de unos 20 nucleótidos de longitud, cuya secuencia sea complementaria a la del gen clonado en el lugar de la mutación deseada, *excepto en el centro de la secuencia*. Aquí, la secuencia contiene uno o dos errores deliberados, nucleótidos aislados que no están apareados con el

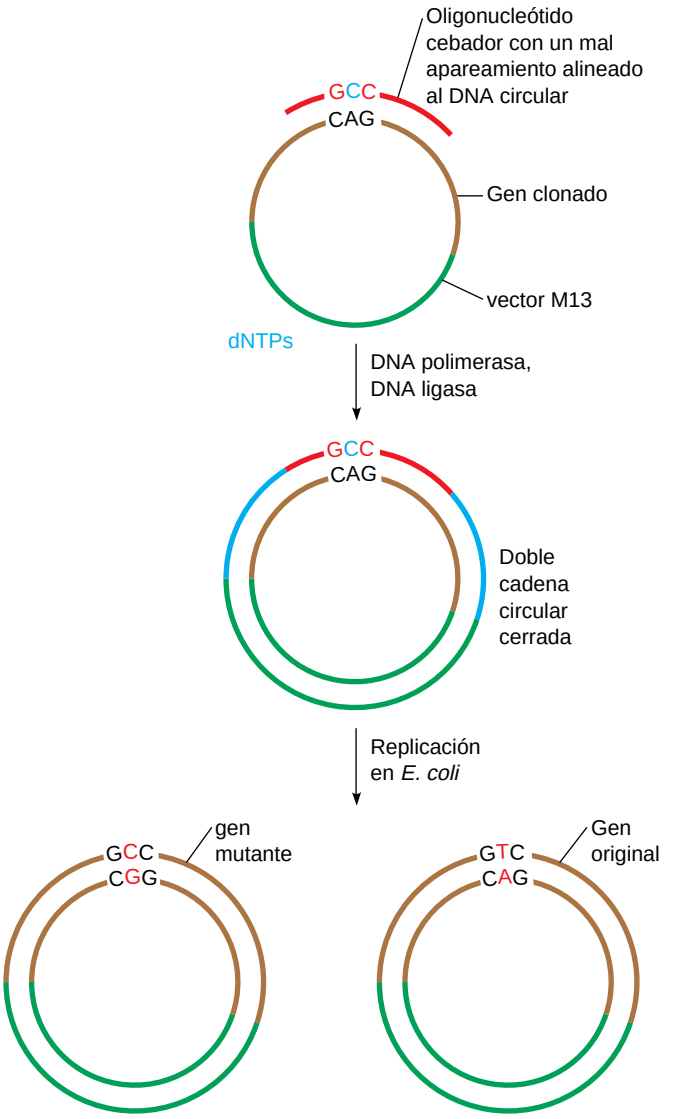


FIGURA **25E.1**

Uso de un oligonucleótido sintético cebador con apareamiento erróneo para inducir mutaciones en un gen clonado en un vector de una sola cadena.

molde o inserciones o huecos de unos pocos nucleótidos. Al alinearse con el gen clonado, estas alteraciones generan pares de bases que no son los de Watson y Crick o bien bases que no tienen pareja y crean, por tanto, un "bucle externo". Las bases correctamente apareadas que se encuentran a ambos lados del mal apareamiento hacen que la estructura se mantenga alineada, a pesar del mal apareamiento. Se utiliza entonces una DNA polimerasa para sintetizar alrededor del vector circular a partir de este cebador, seguido de una ligazón para crear una doble cadena circular cerrada. Tras la introducción de esta doble cadena en las bacterias, las dos cadenas se replican y producen el fago. En principio, el 50% de los fagos debe contener la mutación deseada. En la práctica, esta fracción es considerablemente inferior, aunque puede aumentarse con diversas técnicas. Uno de los métodos utiliza un molde que contiene una sustitución amplia de timina por uracilo. Esta sustitución se consigue mediante el cultivo del clon del fago M13 en una cepa de *E. coli* que carece de dUTPasa y de uracilo-DNA *N*-glucosilasa (véase el Capítulo 24). A continuación, tras la síntesis de DNA in vitro, el DNA se introduce en bacterias de tipo natural, en las que la acción de la uracilo-DNA *N*-glucosilasa rompe selectivamente la cadena molde y deja intacta la cadena mutante deseada. Si se quieren producir diversos mutantes con distintas sustituciones de aminoácidos en el mismo lugar, puede usarse una mezcla de oligonucleótidos cebadores, que difieran entre sí tan sólo en el codón a modificar.

Bibliografía

Kunkel, T. A., J. D. Roberts y R. A. Zakour (1989) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. En: *Recombinant DNA Methodology*, editado por R. Wu, L. Grossman y K. Moldave, pp. 587-601. Academic Press, San Diego, Calif. Instrucciones de laboratorio para el método más utilizado de mutagénesis de lugar dirigida.

CAPÍTULO 26

Lectura de la información: transcripción

VOLVEMOS AHORA A LA *TRANSCRIPCIÓN*, EN LA QUE LA INFORMACIÓN almacenada en la secuencia de nucleótidos del DNA se lee mediante la síntesis de polirribonucleótidos dependiente de un molde. Desde el punto de vista del mecanismo, la transcripción es semejante a la replicación del DNA, en especial en cuanto al uso de sustratos nucleósidos trifosfato y al crecimiento dirigido por un molde de las cadenas de ácido nucleico, en la dirección 5′→3′. Las dos diferencias principales son las siguientes: (1) con pocas excepciones conocidas, sólo se transcribe una cadena molde de DNA y (2) sólo una pequeña fracción del potencial genético global de un organismo se ejecuta en una célula. En una célula eucariota diferenciada, la parte del DNA total que se transcribe es muy pequeña. Incluso en los organismos unicelulares, en los que prácticamente todas las secuencias de DNA pueden transcribirse, en un momento dado se transcribe mucho menos de la mitad de los genes. En consecuencia, gran parte del interés por la transcripción se centra en los mecanismos utilizados para seleccionar determinados genes y cadenas molde para la transcripción, puesto que esta selección es la que gobierna en gran medida las capacidades metabólicas de una célula. Estos mecanismos actúan fundamentalmente en los niveles de iniciación y terminación de la transcripción, mediante la acción de proteínas que entran en contacto con el DNA a través de una elevada especificidad en cuanto a la localización (Figura 26.1).

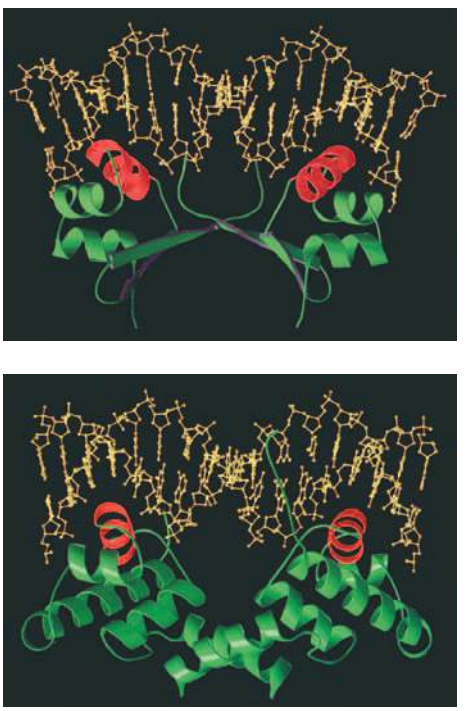


FIGURA **26.1**

Complejos DNA-proteína que regulan la transcripción. La expresión de los genes está controlada por proteínas que reconocen determinadas secuencias del DNA y se unen a esos lugares. Aquí se muestran dos proteínas reguladoras del bacteriófago λ, que se unen a los mismos lugares *operadores* en el DNA de λ y controlan el ciclo de reproducción del virus regulando la transcripción de genes adyacentes a esos lugares. Arriba, el represor cI de λ; abajo, la proteína Cro. En cada gráfico, el DNA está en dorado y la proteína en verde, excepto las regiones de hélice α en contacto con el DNA en el surco principal, que están en rojo. En las páginas 1133-1142 se describen estas proteínas y sus funciones.

Cortesía de R. A. Albright y B. W. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95:3431-3436, con permiso de PNAS.

Las primeras ideas sobre la transcripción surgieron a partir de los experimentos con las bacterias y sus virus. En consecuencia, nuestro conocimiento de la transcripción procariota es mucho más profundo que el que tenemos del proceso en los organismos multicelulares más complejos. Por consiguiente, este capítulo se centra en los sistemas procariotas, mejor conocidos, y se muestra cómo han servido de modelos para comprender la transcripción eucariota. Este último tema se abordará de manera más completa en el Capítulo 28.

El DNA como molde para la síntesis de RNA

El concepto de que los RNA se generan mediante la copia de secuencias de bases del DNA dirigida por el molde está tan firmemente establecido que tendemos a olvidar los experimentos cruciales que permitieron llegar al conocimiento actual. Este tema merece su consideración, puesto que constituye un proceso intelectual fascinante, con muchos participantes y algunos razonamientos deductivos brillantes. Incluso algunos de los comienzos erróneos aportaron contribuciones importantes. Además, algunos sistemas experimentales utilizados en los primeros trabajos continúan siendo útiles en la actualidad, como el operón lactosa y los bacteriófagos T4 y λ.

La intervención del RNA en la transferencia de la información se sospechó desde el momento en que se identificó por primera vez el DNA como almacén genético, tanto por la semejanza química del RNA con el DNA, como por el conocimiento de que las proteínas se sintetizan en los ribosomas. Este último hecho implicaba que, en las células eucariotas, la información debe transferirse de algún modo desde el núcleo, en el que está almacenada la información en el DNA, al citosol, en donde residen la mayoría de los ribosomas. Sin embargo, la naturaleza de esta transferencia de la información no se aclaró hasta que se demostró la existencia del RNA mensajero. Esta demostración no fue en modo alguno sencilla, puesto que el RNA mensajero es muy inestable. Además, constituye una porción del RNA celular total tan pequeña (1 a 3% en las bacterias) que en los fraccionamientos habituales su presencia queda enmascarada por los RNA ribosómicos y de transferencia, mucho más abundantes.

PREDICCIÓN DE LA EXISTENCIA DEL RNA MENSAJERO

Nuestros conceptos iniciales sobre la síntesis del RNA procedieron de los estudios genéticos que predecían la existencia del RNA mensajero.

Hasta aproximadamente 1960 se pensaba que el RNA ribosómico (rRNA) constituía el conjunto de moldes para la síntesis proteica. François Jacob y Jacques Monod, del Instituto Pasteur de Francia, pusieron en duda esta idea, en parte porque los rRNA son de un tamaño homogéneo (5S, 16S y 23S en las bacterias, como se señalará en el Capítulo 27), mientras que los pesos moleculares de las proteínas varían al menos en dos órdenes de magnitud. Mediante el análisis de mutantes de *E. coli* que presentan alteraciones del control del metabolismo de la lactosa, Jacob y Monod predijeron la existencia del RNA mensajero (mRNA), un tipo de RNA que se sintetiza a partir de un DNA molde y se utiliza, a su vez, como molde para la síntesis proteica.

Se sabía que la utilización de lactosa en *E. coli* está controlada por tres enzimas, cuyos genes son adyacentes en el cromosoma. Una de ellas es la **β-galactosidasa**, que hidroliza la lactosa y otros β-galactósidos. Cuando se cultivan las bacterias con glucosa como única fuente de carbono, las concentraciones de las enzimas que utilizan la lactosa son muy bajas, y hay menos de una molécula de β-galactosidasa por célula. Sin embargo, la sustitución de la glucosa por lactosa, o un β-galactósido similar, en el medio hace que se produzca una rápida **inducción** enzimática, o la síntesis de las tres enzimas. La β-galactosidasa repre-

senta finalmente hasta un 6% de las proteínas solubles totales de la célula. La eliminación de la lactosa del medio de cultivo lentifica la ulterior síntesis de moléculas de la enzima. Los rápidos cambios en la capacidad de formación de la β-galactosidasa sugerían que el molde para la síntesis de esta enzima es metabólicamente inestable, es decir, se sintetiza rápidamente cuando hay una demanda y se degrada cuando no hay un estímulo continuado para la inducción (de otra forma, el control podría ejercerse al nivel de la traducción). Dado que los rRNA son estables, era improbable que estas moléculas actuaran como intermediarios en la transferencia de la información.

Jacob y Monod analizaron numerosos mutantes de *E. coli* que presentaban un control defectuoso de la inducción de las enzimas que utilizan la lactosa. Algunos de estos mutantes expresaban los tres genes a un nivel elevado a pesar de la ausencia de lactosa o de un inductor similar, y otros no eran capaces de inducir ninguna de las enzimas, ni siquiera tras la adición de lactosa. Estos experimentos llevaron al concepto de un *represor* macromolecular que regulaba la concentración de un RNA mensajero mediante su unión a una secuencia *operador* específica del DNA, y de este modo desconectaban la síntesis de este RNA (véanse las páginas 1126-1128).

Basándose en estos estudios, y en los trabajos paralelos de Andre Lwoff con el bacteriófago λ, Jacob y Monod propusieron en 1961 una hipótesis unificadora para la regulación génica, en la que la transcripción estaba regulada de forma específica al nivel de la iniciación. Unos elementos reguladores hipotéticos, denominados represores y operadores controlaban la síntesis de otras entidades hipotéticas denominadas RNA mensajeros (mRNA). Se proponía que el mRNA era una copia complementaria del DNA que incluía una serie de genes estructurales, que codificaban proteínas, como se muestra esquemáticamente en la Figura 26.2. Al conjunto de genes contiguos y a los elementos de regulación adyacentes que controlan su expresión se le denominó **operón**, y la hipótesis de Jacob-Monod recibió, pues, el nombre de **modelo del operón**.

Jacob y Monod predijeron correctamente varias características del hipotético RNA mensajero. En primer lugar, predijeron una gran velocidad de síntesis del mRNA, seguida de una rápida degradación, que podía explicar la rápida puesta en marcha de los genes tras la inducción y la desactivación de los mismos una vez retirado el inductor. En segundo lugar, dada la rápida síntesis y degradación, cabía prever que el mRNA se acumulara rápidamente pero no en unas concentraciones de estado estacionario elevadas. En tercer lugar, puesto que pensaban que el mensajero era una copia de dos o más genes contiguos, era de prever que fuera bastante grande y que perteneciera a una clase de RNA de tamaño heterogéneo. Por último, si el RNA mensajero era una copia complementaria del DNA, su secuencia de nucleótidos debería ser idéntica a la de una de las cadenas del DNA molde.

La genética bacteriana predecía que el RNA mensajero era una colección de RNA metabólicamente activos presentes en cantidades bajas, de tamaño heterogéneo y con una secuencia complementaria al DNA.

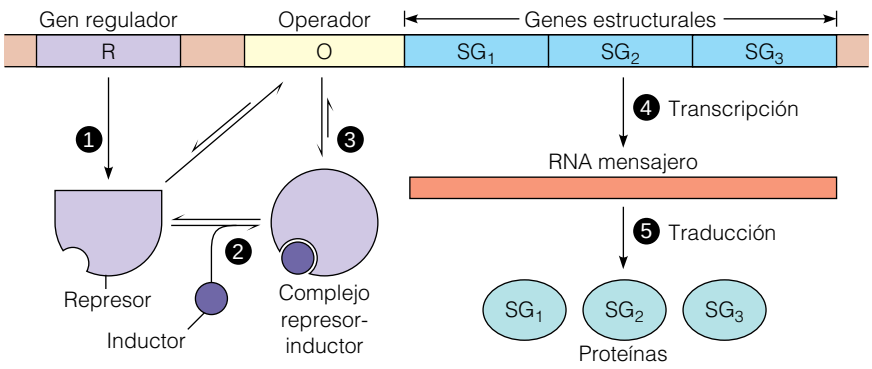


FIGURA **26.2**

Modelo del operón, tal como fue propuesto en 1961 por Jacob y Monod. Paso 1: el gen regulador R codifica una molécula represora, que puede unirse al operador (O) e inhibir, por tanto, la transcripción de los genes estructurales adyacentes $SG_{1,2,3}$. **Paso 2:** una pequeña molécula inductora forma complejo con el represor, con lo que modifica el equilibrio existente entre los estados conformacionales del represor. **Paso 3:** el complejo represor-inductor se une de manera menos intensa al operador. **Paso 4:** esta mayor laxitud facilita la transcripción de los genes estructurales, dando lugar a la producción de RNA mensajero, es decir, una copia de RNA de los genes estructurales. **Paso 5:** la secuencia de mRNA se traduce a proteínas.

EL BACTERIÓFAGO T2 Y LA DEMOSTRACIÓN DEL RNA MENSAJERO

La capacidad del RNA del fago T2 para hibridar con el DNA de T2 y asociarse con los ribosomas formados antes de la infección demostró la existencia del RNA mensajero.

La primera demostración física del mRNA se debió al trabajo realizado con los bacteriófagos T2 y T4. La infección producida por estos virus grandes de DNA detiene toda la expresión de los genes de la célula hospedadora, y no puede detectarse acumulación alguna de RNA tras la infección. Sin embargo, en 1956, el empleo de isótopos radiactivos permitió detectar un RNA peculiar en *E. coli* infectado por el fago T2. Cuando se realizaba un marcado de pulso de los cultivos infectados, utilizando [^{32}P]ortofosfato durante 3 ó 4 minutos, aproximadamente un 2% del RNA total se hacía radiactivo. Este RNA marcado radiactivamente tenía dos propiedades que permitieron finalmente su identificación como RNA mensajero vírico. En primer lugar, era metabólicamente lábil pues en los experimentos de pulso y caza (véase Herramientas de la Bioquímica 12A), la radiactividad de este RNA se perdía rápidamente. En segundo lugar, el RNA parecía ser un producto del metabolismo del DNA vírico, puesto que su composición de nucleótidos era parecida a la del DNA del T2, con abundante adenina y uracilo, y con poca cantidad de guanina y citosina.

Otros datos importantes fueron los obtenidos mediante la centrifugación en gradiente de sacarosa del RNA con marcaje de pulso, que demostraron que el material marcado sedimentaba de manera heterogénea y diferente de cualquiera de las especies de rRNA o tRNA conocidas (Figura 26.3a). Benjamin Hall y Sol Spiegelman establecieron que este RNA es un producto del gen vírico al efectuar el primer experimento de hibridación DNA-RNA, que demostró que el RNA marcado tenía una secuencia complementaria a la del DNA del fago. Los primeros experimentos se basaron en el hecho de que el RNA es de densidad superior al DNA. Así, pudo detectarse un híbrido DNA-RNA en la centrifugación de gradiente de equilibrio, como una especie de densidad intermedia que contenía el marcaje procedente del DNA y del RNA. Se formaba un híbrido de este tipo cuando el RNA de T2 se calentaba y se enfriaba lentamente junto con DNA de T2, pero no cuando el DNA procedía de *E. coli*.

Se obtuvieron otros datos que respaldaban la existencia del RNA mensajero del fago mediante un experimento de desplazamiento de densidad llevado a cabo por François Jacob, Matthew Meselson y Sydney Brenner. Se cultivó *E. coli* en un medio denso (^{13}C—^{15}N) y se infectó con T2 en un medio ligero. Tras un marcaje de pulso con aminoácidos radiactivos, el análisis de densidad en gradientes de CsCl demostró que las proteínas del fago se sintetizan en ribosomas densos, es decir, ribosomas sintetizados antes de la infección. El hecho de que

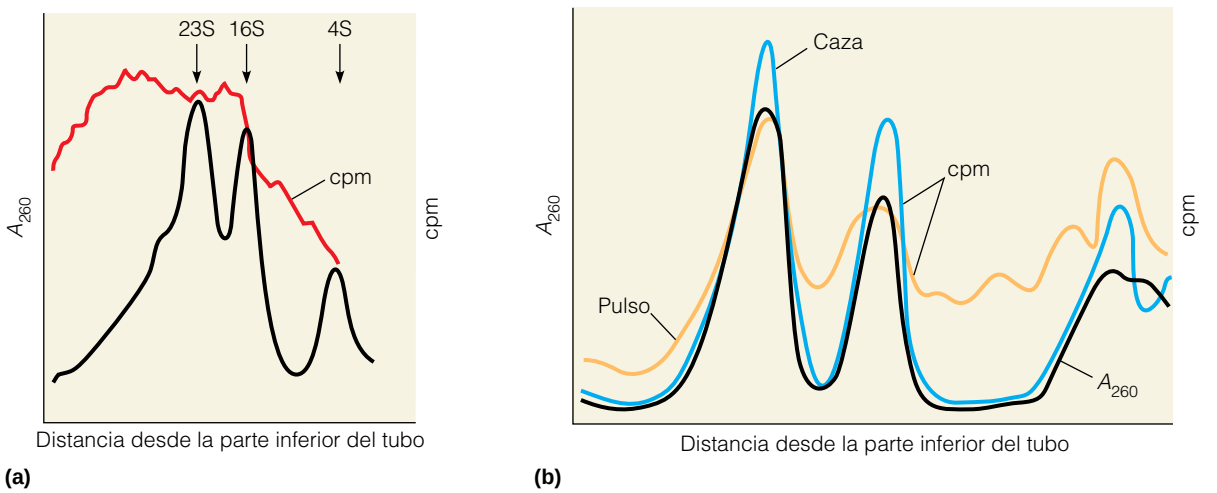


FIGURA **26.3**

Demostración del mRNA mediante marcado de pulso y sedimentación. **(a)** Perfil de sedimentación de los RNA totales y con marcaje de pulso en *E. coli* infectadas por el fago T2. La concentración total de RNA en cada fracción (en negro) se determinó mediante la absorbancia ultravioleta (A_{260}). El perfil de radiactividad (en rojo) indica la distribución de las especies sintetizadas durante el pulso. **(b)** Especies de RNA marcadas con pulsos en las bacterias no infectadas y su destino en una caza. La línea naranja indica las células marcadas durante 3 minutos, la línea azul corresponde a un cultivo idéntico con el marcador cazado por la 0.7 generación de crecimiento en medio no radiactivo tras el pulso, y la línea negra es el perfil de A_{260}.

(a) Datos tomados de K. Asano, *J. Mol. Biol.* (1965) 14:71-84; **(b)** datos tomados de M. Hayashi y S. Spiegelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1961) 47:1569.

sólo se elaboraran proteínas del fago descartaba toda posibilidad de que el RNA ribosómico proporcionara un molde. En su lugar, este experimento hizo que se considerara al ribosoma como un banco de trabajo inespecífico, en el cual podía ensamblarse cualquier proteína, en función del mensajero molde que se asociara con ese banco de trabajo.

DINÁMICA DEL RNA EN LAS CÉLULAS NO INFECTADAS

Los experimentos que se han descrito en el apartado anterior demostraron la existencia de mRNA en *E. coli* infectada por un fago. ¿Qué sucedía en las bacterias no infectadas? Spiegelman y sus colaboradores demostraron que el RNA con marcaje de pulso procedente de *E. coli* no infectada hibrida con el DNA de *E. coli*. A intervalos de marcaje muy cortos, el patrón de sedimentación mostraba la incorporación tanto al rRNA como al tRNA *y* a una especie de sedimentación heterogénea. Después de una caza (Figura 26.3b), el perfil de la radiactividad seguía al perfil de la absorbancia, lo que indicaba que todas las especies de RNA se habían marcado con actividades específicas equivalentes. Este resultado concuerda con el tiempo corto de vida postulado para el RNA mensajero ($t_{1/2}$ de 2 ó 3 minutos). El mRNA alcanzaría su máxima radiactividad en unos minutos, pero durante la caza, el recambio metabólico del mRNA liberaría nucleótidos que pasarían a especies de RNA estables. Dado que estas moléculas no se recambian, el marcaje se acumula, y la fracción del marcaje total en las especies de RNA estables continúa aumentando. En consonancia con esta idea, Spiegelman observó también que los RNA ribosómicos y de transferencia muy marcados hibridan con el DNA de *E. coli*, lo cual indicaba que las tres clases principales de RNA se sintetizan a partir de cadenas de DNA molde.

Como se ha indicado antes, los primeros experimentos de hibridación DNA-RNA se realizaron mediante centrifugación en gradiente de equilibrio, una técnica laboriosa y cara. Spiegelman y sus colaboradores realizaron el importante descubrimiento de que el DNA de una sola cadena se une de manera irreversible a los filtros de membrana, como los de nitrocelulosa. Esta técnica permitió los análisis de hibridación rápidos de un gran número de muestras, puesto que un RNA marcado radiactivamente podía hibridar con el DNA desnaturalizado inmovilizado en un filtro. Después de un tratamiento adecuado y el lavado del filtro, podía determinarse la cantidad de hibridación simplemente colocando el filtro en un contador de centelleo líquido y contando su radiactividad. El mismo principio, inmovilización del ácido nucleico sobre nitrocelulosa, seguido del análisis de la radiactividad unida subyace en las técnicas de transferencia Southern y transferencia northern (descritas en Herramientas de la Bioquímica 25D), que se emplean en la actualidad mucho más para analizar la organización y expresión de los genes.

El último capítulo de la saga del RNA mensajero fue la demostración de que los mRNA aislados tienen actividad molde in vitro. Es decir, pueden programar la síntesis de moléculas proteicas específicas en presencia de los 20 aminoácidos y otros factores. La traducción de moldes de RNA definidos, tanto sintéticos como naturales, fue crucial para descifrar el código genético (véase el Capítulo 27).

Enzimología de la síntesis del RNA: RNA polimerasa

En la actualidad sabemos que la síntesis del RNA utiliza un proceso de copiado de una cadena de DNA molde, mediante la RNA polimerasa. Sin embargo, la primera descripción de una enzima capaz de sintetizar RNA in vitro se realizó

La polinucleótido fosforilasa cataliza la síntesis reversible e independiente de un molde de polirribonucleótidos de secuencia aleatoria.

a finales de los años 1950, aproximadamente al mismo tiempo que el descubrimiento de la DNA polimerasa I. Esta enzima de síntesis del RNA, denominada **polinucleótido fosforilasa**, era muy diferente de la DNA polimerasa. La enzima no necesitaba molde alguno, y utilizaba ribonucleósidos *difosfato* (rNDP) como sustratos para producir un polinucleótido de secuencia aleatoria, cuya composición de bases se correspondía con la composición de nucleótidos del medio de reacción.

$$n\,\text{rNDP} \rightleftharpoons (\text{rNMP})_n + n\text{P}_\text{i}$$

Inicialmente se pensó que la polinucleótido fosforilasa podría ser la enzima principal de la síntesis del RNA, pero el hecho de que no requiriera un molde era preocupante, al igual que la aparente ausencia de la enzima en las células eucariotas. Finalmente, se comprobó que la polinucleótido fosforilasa no desempeñaba papel alguno en la síntesis del RNA in vivo, sino que participa en la *degradación* de los RNA mensajeros bacterianos. Sin embargo, la enzima fue de gran utilidad para la síntesis de los polinucleótidos utilizados como moldes para la síntesis proteica in vitro, a la hora de determinar el código genético (véase el Capítulo 27).

Los investigadores continuaron la búsqueda de una enzima que pudiera copiar un molde de DNA in vitro. Esta enzima se descubrió de manera casi simultánea en cuatro laboratorios diferentes. La enzima, la **RNA polimerasa dirigida por el DNA**, se parecía a las DNA polimerasas en cuanto a la naturaleza de la reacción catalizada.

$$n(\text{ATP} + \text{CTP} + \text{GTP} + \text{UTP}) \xrightleftharpoons{\text{Mg}^{2+},\ \text{DNA}} (\text{AMP–CMP–GMP–UMP})_n + n\text{PP}_\text{i}$$

El producto de reacción es una copia complementaria del DNA molde.

PAPEL BIOLÓGICO DE LA RNA POLIMERASA

Las bacterias utilizan una sola RNA polimerasa para transcribir todos los genes. Las células eucariotas emplean tres RNA polimerasas diferentes.

Una sola RNA polimerasa cataliza la síntesis de las tres clases de RNA de *E. coli*, mRNA, rRNA y tRNA. Este hecho se demostró en experimentos realizados con **rifampicina** (Figura 26.4a), un antibiótico que inhibe la RNA polimerasa in vitro y bloquea la síntesis de mRNA, rRNA y tRNA in vivo. Se observó que los mutantes de *E. coli* resistentes a la rifampicina contienen una forma de RNA polimerasa resistente a la rifampicina y son capaces de sintetizar las tres clases de RNA in vivo en presencia de rifampicina. Dado que una sola mutación afecta tanto a la RNA polimerasa como a la síntesis de todos los tipos de RNA in vivo, la RNA polimerasa debe ser la única enzima que catalice todas las formas de transcripción en las bacterias.

En cambio, los eucariotas contienen tres RNA polimerasas diferentes, una para la síntesis del rRNA, otra para la del mRNA y otra para los RNA pequeños (tRNA y la especie 5S del rRNA). Se las denomina RNA polimerasas I, II y III, respectivamente. La existencia de enzimas diferentes se descubrió en parte porque difieren en su sensibilidad a la inhibición por la **α-amanitina** (Figura 26.4b), una toxina contenida en la seta venenosa *Amanita*. La RNA polimerasa II se inhibe a concentraciones bajas, la RNA polimerasa III se inhibe a concentraciones altas, y la RNA polimerasa I es bastante resistente.

En la Figura 26.4 se muestran las estructuras de otros dos inhibidores. La **cordicepina**, o 3′-desoxiadenosina, es un terminador de cadena de la transcripción, ya que carece del grupo 3′ hidroxilo a partir del cual continuar. El nucleótido de la cordicepina se incorpora a las cadenas en crecimiento, y confirma que el crecimiento de la cadena en la transcripción se produce en la dirección

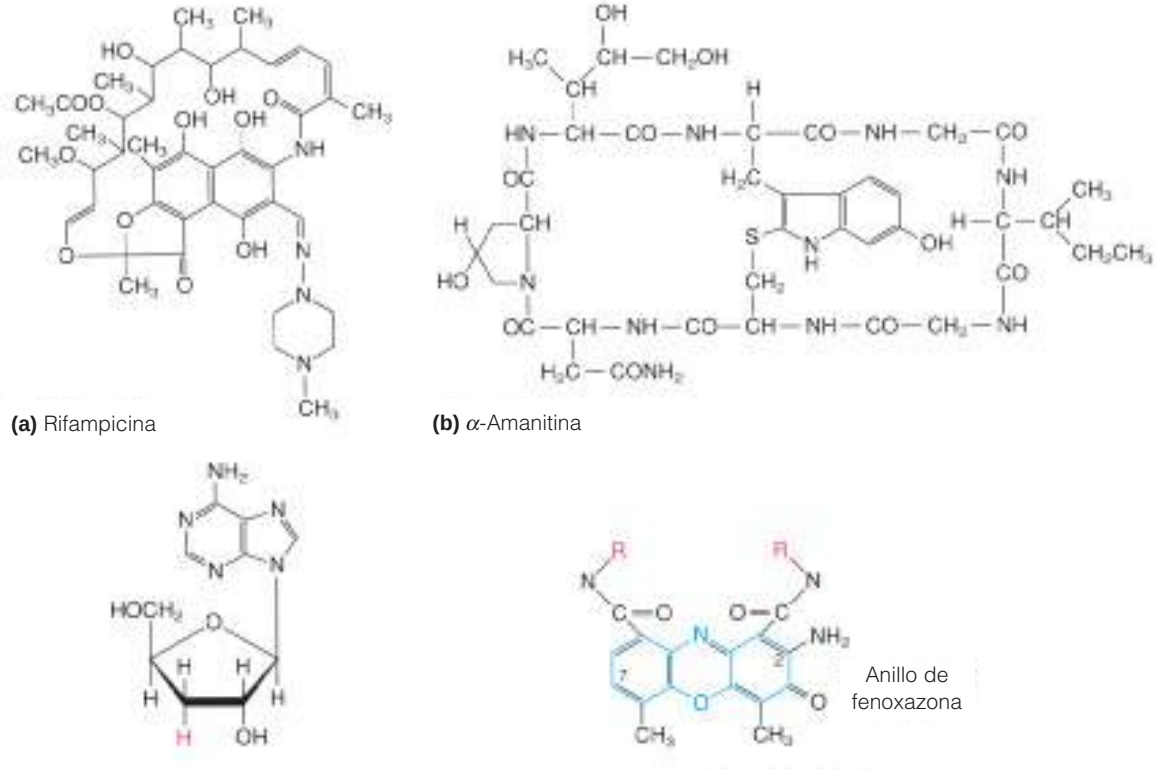


FIGURA **26.4**

Algunos inhibidores de la transcripción. La rifampicina es un inhibidor de la iniciación de la transcripción en las bacterias y la α-amanitina es un inhibidor de las RNA polimerasas eucariotas. La cordicepina es un terminador de la transcripción ya que la posición 3′ del azúcar está ocupada por H (en rojo) en vez de por un grupo hidroxilo. El sistema de anillo tricíclico de la actinomicina (en azul) se intercala entre pares de bases G-C adyacentes en el DNA. Los grupos R de la molécula (en rojo) son polipéptidos cíclicos y ocupan los surcos estrechos de la hélice.

5′→3′. Otro inhibidor importante es la **actinomicina D**, que actúa mediante la unión al DNA. El sistema de anillo tricíclico (fenoxazona) se intercala entre los pares de bases G-C adyacentes, y los brazos del polipéptido cíclico llenan el surco estrecho próximo.

Dado que las DNA polimerasas y las RNA polimerasas catalizan reacciones similares, es interesante comparar algunas de sus características cinéticas. La $V_{máx}$ de la holoenzima DNA polimerasa III, de aproximadamente 500 a 1000 nucleótidos por segundo, es muy superior a la velocidad de crecimiento de la cadena en la transcripción bacteriana (50 nucleótidos por segundo), que es la misma que la $V_{máx}$ de la RNA polimerasa purificada. Aunque tan sólo hay unas 10 moléculas de DNA polimerasa III por célula de *E. coli*, hay unas 3000 moléculas de RNA polimerasa, y la mitad de ellas podría intervenir en la transcripción en un momento dado. Esto concuerda con las observaciones que indican que el crecimiento de la cadena de DNA replicativo es rápido pero se produce en pocos lugares, mientras que la transcripción es mucho más lenta pero tiene lugar en muchos sitios. El resultado es que se acumula mucho más RNA que DNA en la célula. Como en el caso de la holoenzima DNA polimerasa III, la acción de la RNA polimerasa es muy procesativa. Una vez pasadas las fases iniciales de la transcripción, la RNA polimerasa rara vez, o nunca, se disocia del molde hasta que se llega a la señal específica de terminación. Aunque este análisis se basa principalmente en la transcripción de los procariotas, estas características de la transcripción son semejantes en las células eucariotas.

La replicación del DNA se basa en un crecimiento rápido de la cadena en algunos lugares intracelulares, y la transcripción comporta un crecimiento más lento en muchos lugares. Se acumula más RNA que DNA.

Otra diferencia importante entre la DNA y la RNA polimerasa es la exactitud con la que se copia un molde. Con una frecuencia de errores de aproximadamente 10^{-5}, la RNA polimerasa es mucho menos exacta que las holoenzimas replicativas de DNA polimerasa, aunque la RNA polimerasa es mucho más

exacta de lo que cabría prever según el apareamiento de Watson y Crick solamente. Dado que el RNA no transporta información de una generación celular a la siguiente, evidentemente no es necesario un mecanismo de copia del molde con una fidelidad ultraelevada. Sin embargo, algunas observaciones recientes sugieren la existencia de mecanismos de corrección de errores. En *E. coli*, dos proteínas, denominas GreA y GreB, catalizan la separación hidrolítica de nucleótidos en los extremos 3′ de las moléculas de RNA en formación. Estos procesos pueden ser similares a la corrección de pruebas 3′ exonucleolítica de las DNA polimerasas, aunque existen algunas diferencias importantes: (1) la separación de los extremos 3′ de las moléculas de RNA suele eliminar oligonucleótidos en vez de nucleótidos simples y (2) la velocidad de la hidrólisis es muy inferior a la de la extensión de la cadena de RNA efectuada por la RNA polimerasa. Como se señala más adelante, la ruptura del transcrito 3′ desempeña probablemente un papel diferente, al escapar del bloqueo para continuar la elongación. Así pues, el mecanismo de corrección de errores de transcripción está aún en discusión.

ESTRUCTURA DE LA RNA POLIMERASA

Cuando se analiza la RNA polimerasa muy purificada de *E. coli* en geles electroforéticos desnaturalizantes, se observan cinco subunidades polipeptídicas diferentes. Sus propiedades se resumen en la Tabla 26.1. Hay dos copias de la subunidades α, junto con una copia de la β, la β' la σ y la ω, con un M_r de aproximadamente 450 000 para la holoenzima. La subunidad ω puede intervenir en la regulación, pero no se ha aclarado aún su función exacta, y su asociación con la RNA polimerasa puede ser circunstancial. Sin embargo, se ha averiguado mucho sobre las funciones de las demás subunidades, en parte mediante los estudios de reconstitución, en los que se renaturalizan las subunidades disociadas y se permite que se vuelvan a reasociar, con la formación de la enzima activa. Dado que la subunidad ω no es necesaria para la reconstitución de la enzima activa, no la incluiremos en nuestros comentarios posteriores.

Las funciones de las diversas subunidades de la RNA polimerasa pueden determinarse mediante la reconstitución de la enzima activa a partir de las subunidades aisladas.

Un planteamiento útil para analizar la función de cada subunidad de la RNA polimerasa es el de la **reconstitución mixta**, en el que se combinan subunidades aisladas de dos o más RNA polimerasas diferentes. Así, por ejemplo, cuando la β procedente de una forma de RNA polimerasa resistente a la rifampicina se recombina con α, β' y σ procedentes de células de tipo natural, la enzima reconstituida es resistente a la rifampicina. Esta observación demuestra que la subunidad β es la diana de la inhibición de la rifampicina, y puesto que se sabe que la rifampicina inhibe la iniciación de la transcripción, la subunidad β debe desempeñar también un papel en la iniciación. El hecho de que la subu-

TABLA 26.1 Composición de subunidades de la RNA polimerasa de *E. coli*

Subunidad	M_r	Número por molécula enzimática	Función
α	36,500	2	Iniciación de la cadena, interacción con las proteínas reguladoras y elementos promotores hacia arriba
β	151,000	1	Iniciación y elongación de la cadena
β'	155,000	1	Unión al DNA
σ	70,000[a]	1	Reconocimiento del promotor
ω	11,000	1	Desconocida

[a] La subunidad σ de 70 kDa es una de las varias subunidades σ.

nidad β sea también la diana de la inhibición por un inhibidor de la elongación denominado **estreptolidigina** señala que la subunidad β es la que contiene el lugar catalítico para la elongación de la cadena.

La subunidad σ se disocia con facilidad de la RNA polimerasa, por ejemplo, mediante el paso de la enzima purificada a través de una columna de carboximetilcelulosa. La enzima sin σ, denominada **polimerasa central**, continúa siendo catalíticamente activa, pero se une al DNA en muchos más lugares que la holoenzima RNA polimerasa, y no muestra especificidad de cadena. La subunidad σ desempeña un papel importante en el direccionamiento de la RNA polimerasa para que se una al molde en el lugar adecuado para la iniciación, el lugar **promotor**, y para seleccionar la cadena adecuada para la transcripción. La adición de la subunidad σ a la polimerasa central reduce la afinidad de la enzima por los lugares *no promotores* en alrededor de 10^4, con lo que aumenta la especificidad de la enzima para la unión a los promotores.

Estos descubrimientos acerca de la subunidad σ se realizaron a comienzos de los años 1970 y sugirieron que la expresión de los genes podría regularse haciendo que la polimerasa central interactuara con distintas formas de la subunidad σ, que a su vez dirigirían a la holoenzima hacia distintos promotores. En muchos casos ocurre realmente así. Por ejemplo, cuando se induce la **esporulación** (es decir, la generación de células metabólicamente inertes capaces de crecer en un momento posterior) de *Bacillus subtilis*, se produce una nueva forma de σ. Esta forma se combina con la polimerasa central para redirigir el metabolismo celular hacia la transcripción de los genes que participan en la esporulación. Otro ejemplo es el que se da cuando se aplica a un cultivo de *E. coli* un aumento brusco de la temperatura. En estas células sometidas a un choque térmico, aparece una nueva forma de σ, y la RNA polimerasa modificada se dirige hacia una serie diferente de promotores, con lo que se activa la transcripción de un bloque de genes denominados genes del choque térmico. La σ más abundante en *E. coli* y la única que centrará nuestro análisis se denomina σ^{70} debido a su peso molecular de 70 kDa.

Las RNA polimerasas de distintos orígenes procariotas son muy similares en cuanto al tamaño y composición de las subunidades. En muchos casos, puede observarse una reconstitución mixta, con formación de una enzima activa a partir de subunidades de las RNA polimerasas de especies procariotas muy diferentes. En cambio, las RNA polimerasas de los eucariotas tienen unas estructuras de subunidades mucho más complejas y diversas (véase el Capítulo 28), aunque las subunidades grandes son bastante homólogas de β y β'.

Aunque el motivo de múltiples subunidades de las RNA polimerasas es el tema estructural dominante, no es universal. La excepción mejor conocida es la RNA polimerasa especificada por el bacteriófago T7. Este virus tiene un genoma de DNA de doble cadena lineal. El 20% de la izquierda del cromosoma (tal como suele representarse) se transcribe en la fase inicial de la infección por la RNA polimerasa de *E. coli*. Uno de estos productos génicos iniciales es una RNA polimerasa especificada por el virus. Esta enzima de una sola subunidad (M_r = 98 000) responde a secuencias de control del DNA diferentes y es la responsable de toda la transcripción de T7 en la parte final de la infección. Estos fenómenos transcripcionales tardíos se inician en promotores situados en el 80% de la derecha de la molécula de DNA. Los análisis cristalográficos de la RNA polimerasa de T7 indican que hay un dominio de unión al DNA similar a la estructura de "mano" que se observa en las DNA polimerasas (véase la Figura 24.17), con una palma, dedos y pulgar, que envuelven al DNA molde (Figura 26.5).

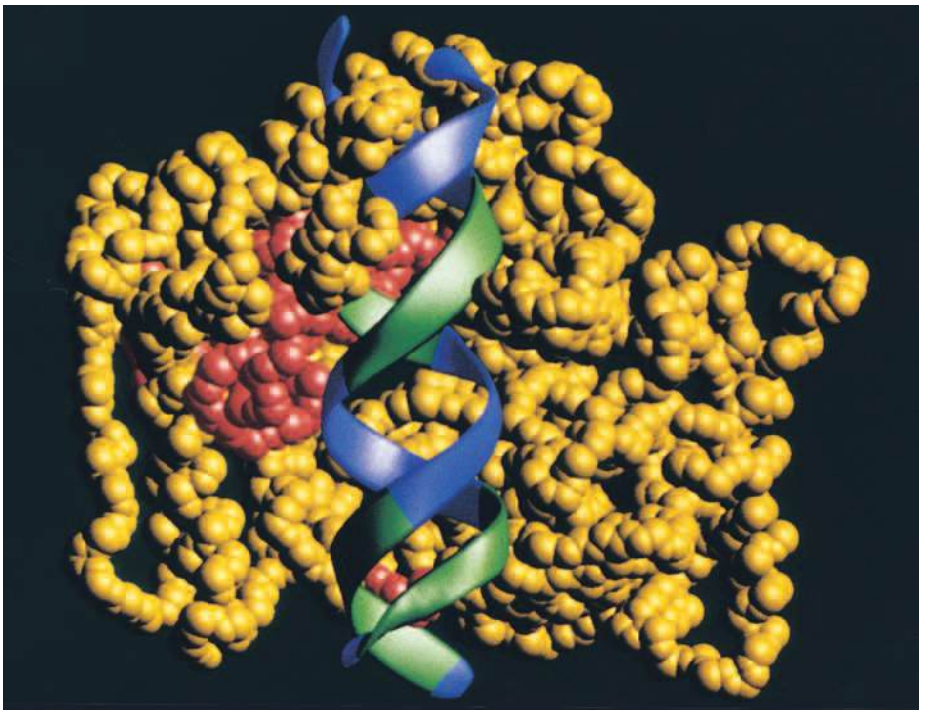


FIGURA **26.5**

Estructura de la RNA polimerasa del fago T7 determinada mediante cristalografía de rayos X. Este modelo de relleno espacial muestra el complejo enzima-DNA. Los residuos de aminoácidos que se cree que participan en la catálisis y la unión a la región promotora del DNA se indican en rojo. El pulgar está hacia la izquierda y los dedos hacia la derecha en la estructura tal y como está dibujada.

Reproducido con permiso de R. Sousa, Y. J. Chung, J. P. Rose y B-C. Wang, *Nature* (1993) 364:593-599. © 1993 Macmillan Magazines, Ltd.

Mecanismo de la transcripción

Al igual que la replicación del DNA y la síntesis proteica, la transcripción se produce en tres fases diferentes: iniciación, elongación y terminación. Las señales de iniciación y terminación en la secuencia del DNA orientan el mensaje genético, dirigiendo a la RNA polimerasa a genes concretos y especificando dónde debe iniciarse la transcripción, dónde se detendrá y cuál es la cadena que se transcribirá. Las señales incluyen instrucciones codificadas en las secuencias de bases del DNA e interacciones entre el DNA y proteínas diferentes de la RNA polimerasa. La mayor parte de nuestra exposición se centrará en las RNA polimerasas procariotas, y se utilizará como ejemplo la enzima de *E. coli*, muy estudiada, pero los mecanismos básicos de la transcripción son semejantes en todos los organismos.

INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN: INTERACCIONES CON LOS PROMOTORES

El proceso global de iniciación y elongación se resume en la Figura 26.6. El primer paso de la transcripción es la unión de la RNA polimerasa al DNA, tras lo cual se produce la migración a un lugar de iniciación del DNA, el promotor. En Herramientas de la Bioquímica 26A describimos la técnica de las *huellas dactilares* (*footprinting*), que se utiliza para localizar los lugares del DNA en contacto con proteínas de unión al DNA específicas de secuencia, y en las páginas 1119-1122 se considera el reconocimiento del promotor. Por el momento, nos centraremos en los detalles del mecanismo de síntesis de las cadenas de polirribonucleótidos.

La RNA polimerasa bacteriana encuentra a los promotores mediante un proceso de búsqueda (Figura 26.6, paso 1), en el que la holoenzima se une de manera inespecífica al DNA, con una baja afinidad, y luego se desplaza a lo largo del DNA hasta llegar a una secuencia promotora, a la que se une con una afinidad mucho mayor. El factor σ es esencial para esta búsqueda, ya que, como se

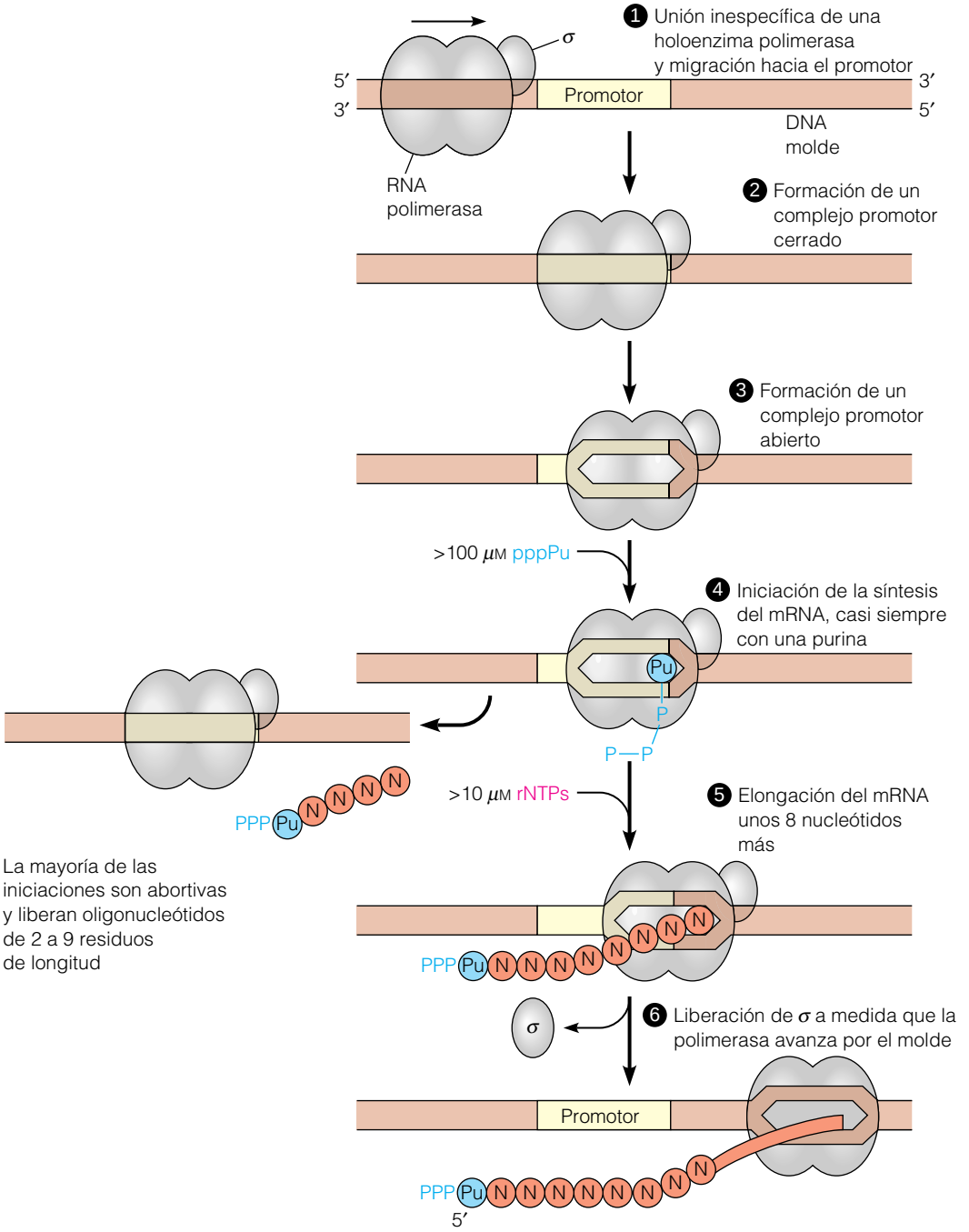


FIGURA **26.6**

Pasos de iniciación y elongación de la transcripción por la RNA polimerasa bacteriana.

ha indicado antes, la enzima central no se une a los promotores de manera más estrecha que a los lugares no promotores. Existen datos biofísicos que indican que la RNA polimerasa se desliza a lo largo del DNA, sin disociarse del mismo, aunque el mecanismo de este deslizamiento no se conoce. El análisis cinético sugiere que un proceso de búsqueda aleatorio, con múltiples encuentros enzima-DNA, no puede explicar la rapidez con la que la RNA polimerasa encuentra a los promotores. La unión al DNA y el movimiento a lo largo del mismo reducen la complejidad de la búsqueda desde tres dimensiones a una, de la misma manera que encontrar una casa es más fácil una vez que se encuentra la calle en la que esa casa está situada.

La transcripción comienza con la interacción específica de secuencia entre la RNA polimerasa y un lugar promotor, en donde se produce el desenrollamiento de la doble cadena y la selección de la cadena molde.

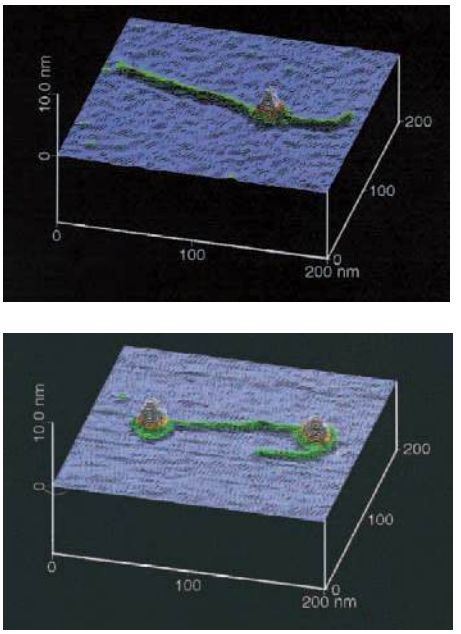


FIGURA **26.7**

Complejos RNA polimerasa-promotor, según se observan mediante microscopia de fuerza de barrido. Arriba, un complejo promotor cerrado. Abajo, un complejo promotor abierto. El fragmento de DNA utilizado en estos experimentos contiene el promotor *glnA*, el lugar de comienzo de la transcripción del gen por la glutamina sintetasa. La holoenzima RNA polimerasa contiene σ^{54}, una forma de 54 kDa, en lugar de la σ^{70} que se muestra en la Tabla 26.1. La activación de la transcripción requiere la unión de otra proteína, NtrC, en un lugar más hacia delante. En el complejo promotor abierto, ambas proteínas están unidas de forma independiente con la RNA polimerasa unida a la derecha, tal como se muestra. Obsérvese el doblado brusco, casi una vuelta en U, que tiene el DNA en ese lugar.

Cortesía de M. Guthold de K. Rippe et al., *J. Mol. Biol.* (1997) 270:125-138.

El encuentro inicial entre la holoenzima RNA polimerasa y un promotor genera un **complejo promotor cerrado** (paso 2). Mientras que las cadenas de DNA se desenrollan más tarde en la transcripción, no se detecta desenrollamiento en un complejo promotor cerrado. El complejo se forma con una K_a entre 10^7 y 10^8 M^{-1} con NaCl 0.1 M. La unión es fundamentalmente electrostática, puesto que la K_a depende de la fuerza iónica. El complejo es relativamente lábil, y se disocia con una semivida de aproximadamente 10 segundos. Las técnicas de huellas dactilares muestran que la polimerasa está en contacto con el DNA desde alrededor del nucleótido –55 hasta –5, donde +1 representa el primer nucleótido del DNA que se transcribe.

A continuación, como muestran los análisis con reactivos químicos que reaccionan específicamente con el DNA de cadena única, la RNA polimerasa desenrolla varios pares de bases del DNA, desde –10 a –1, dando un **complejo promotor abierto**, denominado así porque se une al DNA cuya cadena está abierta o desenrollada (paso 3). Esta reacción, muy dependiente de la temperatura, se produce con semividas de alrededor de 15 segundos a 20 minutos, según la estructura del promotor. El complejo promotor abierto es muy estable y no se descompone fácilmente por una fuerza iónica elevada y se forma con una K_a tan elevada como 10^{12} M^{-1}. A continuación, se produce una isomerización dependiente de Mg^{2+} dando una forma modificada del complejo promotor abierto con la región desenrollada del DNA que va ahora desde –12 a +2. El análisis de microscopia de fuerza de barrido (Herramientas de la Bioquímica 1A) indica que el doblado del DNA en la región promotora acompaña la transición desde un complejo promotor cerrado a un complejo promotor abierto (Figura 26.7). Esto podría estar relacionado con el hecho, que se indica posteriormente, de que la activación de la transcripción de determinados genes suele utilizar la interacción entre el promotor y sus proteínas asociadas y con proteínas unidas a lugares reguladores hacia arriba, lejos del lado 5′ del gen que se está transcribiendo.

INICIACIÓN Y ELONGACIÓN: INCORPORACIÓN DE LOS RIBONUCLEÓTIDOS

Tras haber localizado un promotor y formado un complejo promotor abierto, la enzima está preparada para iniciar la síntesis de una cadena de RNA. La RNA polimerasa contiene dos lugares de unión para los ribonucleósidos trifosfato. Uno de ellos, que se utiliza durante la elongación, une cualquiera de los cuatro ribonucleósidos trifosfato (rNTP) comunes, con una concentración de semisaturación de alrededor de 10 μM. El segundo lugar, que se emplea para la iniciación, une preferentemente ATP y GTP, con unas concentraciones de semisaturación de alrededor de 100 μM. Así pues, la mayor parte de los mRNA tienen una purina en el extremo 5′. El crecimiento de la cadena comienza con la unión del rNTP especificado por el molde en este lugar (Figura 26.6, paso 4), seguido de la unión del siguiente nucleótido en el otro lugar. A continuación, el ataque nucleófilo por el hidroxilo 3′ del primer nucleótido sobre el fósforo α (interior) del segundo nucleótido genera el primer enlace fosfodiéster y deja una porción trifosfato intacta en la posición 5′ del primer nucleótido. El transcrito está unido de forma inestable durante las primeras reacciones de formación de enlaces fosfodiéster, como lo demuestra el hecho de que la mayor parte de las iniciaciones son abortivas, con la liberación de oligonucleótidos de 2 a 9 residuos de longitud. No se comprende cuál es el sentido de esta baja eficacia de la iniciación.

Durante la transcripción de los 10 primeros nucleótidos, la subunidad σ se disocia del complejo de transcripción, y el resto del proceso de transcripción está

catalizado por la polimerasa central (pasos 5 y 6). Una vez disociada la subunidad σ, el complejo de elongación se hace bastante estable. La transcripción, tal como se ha estudiado in vitro, ya no puede inhibirse por la adición de rifampicina, y prácticamente todos los procesos de transcripción se completan.

Durante la *elongación* (pasos 5 y 6), la enzima central se desplaza a lo largo del DNA de doble cadena molde. A medida que se desplaza, desenrolla simultáneamente el DNA, dejando al descubierto un molde de una sola cadena para el apareamiento de bases con los nucleótidos que llegan y con el transcrito en formación (el RNA sintetizado más recientemente), y vuelve a enrollar el molde por detrás del extremo 3′ de la cadena de RNA en crecimiento, como sugiere la Figura 26.8. En este modelo, están desenrollados unos 18 pares de bases del DNA para formar una "burbuja de transcripción" que se mueve. Cuando un par de bases se desenrolla al avanzar el extremo 3′ de la cadena de RNA en formación, otro par de bases vuelve a enrollarse cerca del extremo de cola de la molécula de RNA polimerasa. Alrededor de 8 pares de bases del extremo 3′ del transcrito en formación están hibridados con la cadena de DNA molde.

Los complejos de elongación de la transcripción son extraordinariamente estables, una característica que permite aislarlos y estudiarlos con reactivos de entrecruzamiento de proteínas y ácidos nucleicos. De esta forma, está emergiendo un cuadro detallado de interacciones estabilizantes distintas del apareamiento de bases de los ácidos nucleicos, a pesar de no disponerse de una estructura cristalina completa de alguna RNA polimerasa con múltiples subunidades. Como se muestra en la Figura 26.9, algunos residuos de aminoácidos de ambas subunidades β y β' contactan con el RNA naciente, el DNA en la región heterodúplex (DNA-RNA) y el DNA dúplex más abajo del extremo 3′ del RNA naciente. Un tema de investigación muy activo en la actualidad es llegar a entender la coordinación de estas interacciones de unión, de forma que permitan a la enzima moverse a lo largo del DNA. Las técnicas de análisis de complejos únicos demuestran que la RNA polimerasa, como motor molecular, genera fuerzas mayores que las de las proteínas motoras del citoesqueleto, como la miosina y la cinesina (Capítulo 8).

En la Figura 26.8, se describe el concepto de la burbuja de transcripción como intermediario central de la transcripción, que sugiere que la enzima se mueve a lo largo del DNA molde en registro con el RNA transcrito en crecimiento, con el rastro avanzando un par de bases por cada ribonucleótido incorporado en el transcrito. De hecho, el rastreo de numerosos complejos de iniciación y elongación ha demostrado que la enzima suele avanzar de forma discontinua, manteniendo su posición durante varios ciclos de adición de nucleótido y luego saltando hacia delante varios pares de bases a lo largo del molde. Éstas y otras observaciones sugirieron que los medios de translocación de la RNA polimerasa son fundamentalmente diferentes del movimiento continuo

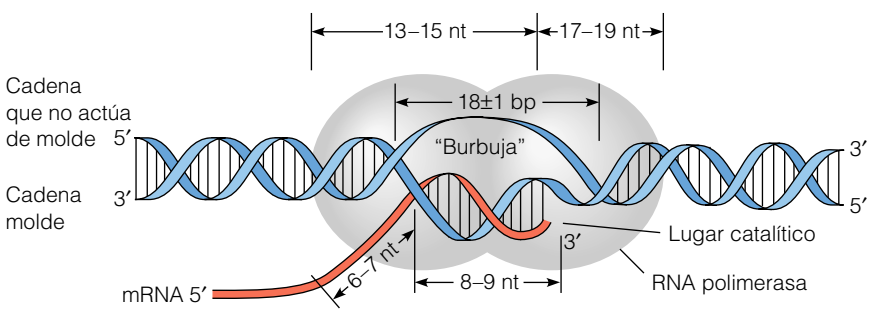


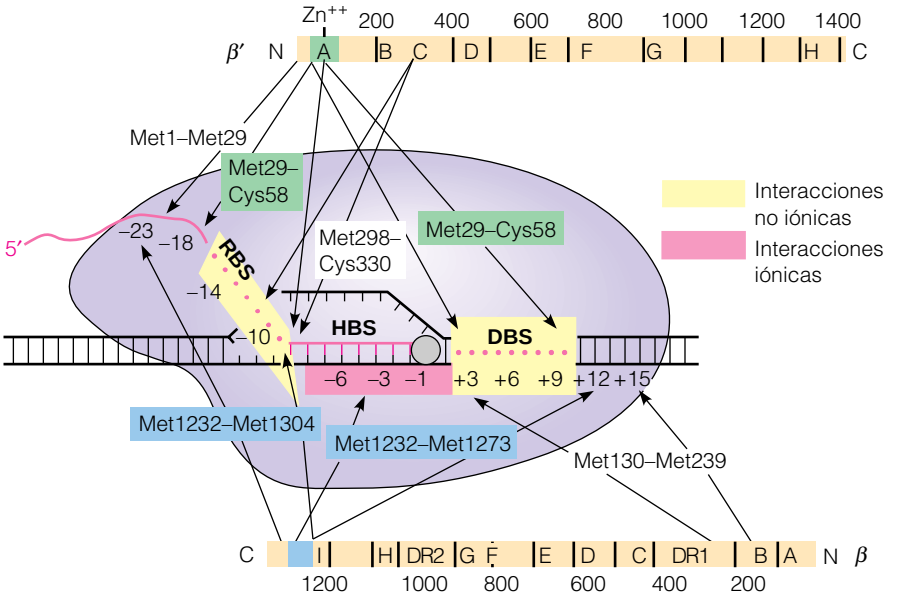
FIGURA **26.8**

Burbuja de transcripción. Se han calculado las longitudes del DNA desenrollado y del híbrido DNA-RNA a partir de las reactividades de los complejos de transcripción con reactivos como el $KMnO_4$, que oxida las bases en los ácidos nucleicos de cadena simple. Mediante la técnica de huellas dactilares (véase Herramientas de la Bioquímica 26A), se determina la longitud del DNA en contacto con la enzima. Seis o siete nucleótidos del RNA detrás del DNA híbrido están protegidos del ataque de la ribonucleasa mediante su unión a la enzima. nt = nucleótido.

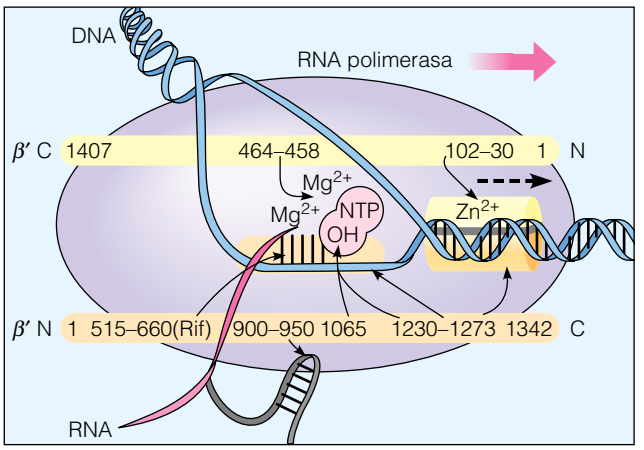
FIGURA **26.9**

Interacciones proteína-ácido nucleico en el complejo de elongación de la transcripción. **(a)** Interacciones específicas ácido nucleico-proteína. Las flechas identifican a las regiones o residuos en los polipéptidos β y β' que forman parte del lugar de unión del DNA (DBS), del lugar de unión del RNA (RBS) o del lugar de unión del heterodúplex (HBS). **(b)** Representación esquemática del complejo, con el lugar de unión del DNA representado como una pinza deslizante, que mantiene la procesividad de forma semejante a las pinzas deslizantes en la replicación del DNA. La figura muestra también zinc unido, que representa un dominio como un dedo de zinc (Capítulo 28) en la pinza. También se muestran los dos iones Mg^{2+} unidos en el lugar activo. Parece como si la RNA polimerasa operara por el mecanismo de "dos iones metálicos" descrito previamente para la DNA polimerasa (Capítulo 24). La formación de una horquilla de RNA, que se muestra en gris, está probablemente implicada en la terminación de la transcripción, debilitando las interacciones con el lugar de unión del RNA de la enzima o con el molde.

(a) Tomado de E. Nudler, I. Gusarov, E. Avetissova, M. Kozlov y A. Goldfarb, *Science* (1998) 281:424-428. © 1998 AAAS; **(b)** tomado de R. Landick y J. W. Roberts, *Science* (1996) 273:202-203.



(a)



(b)

que implica el cuadro de la burbuja de transcripción. Sin embargo, las observaciones más recientes parecen reconciliar el paradigma de la "burbuja de transcripción" con los datos del rastreo. Se sabe, desde hace tiempo, que algunas secuencias de DNA son difíciles de transcribir y la RNA polimerasa "hace una pausa" cuando in vitro alcanza un lugar de éstos, a menudo descansando en el mismo lugar durante varios minutos antes de reanudar la transcripción. Los experimentos recientes indican que, en esos lugares, la RNA polimerasa suele translocarse hacia atrás y, en el proceso, el extremo 3′ del transcrito naciente es desplazado del lugar catalítico de la enzima, dando una "cola" 3′ que puede tener una longitud de varios nucleótidos y que no forma apareamientos de bases con el molde, sobresaliendo hacia atrás de la enzima (Figura 26.10). Para reanudarse la transcripción, debe posicionarse un extremo RNA 3′ en el lugar activo. Evidentemente, ésta es la función principal de las reacciones de rotura 3′ del RNA, que mencionamos en la página 1112 como acontecimientos posibles para optimizar la fidelidad de la transcripción. El "retroceso" que se muestra en la Figura 26.10 se observó inicialmente sólo en los complejos de transcripción de un doble mutante *greA* y *greB*; de otro modo, el extremo 3′ del RNA des-

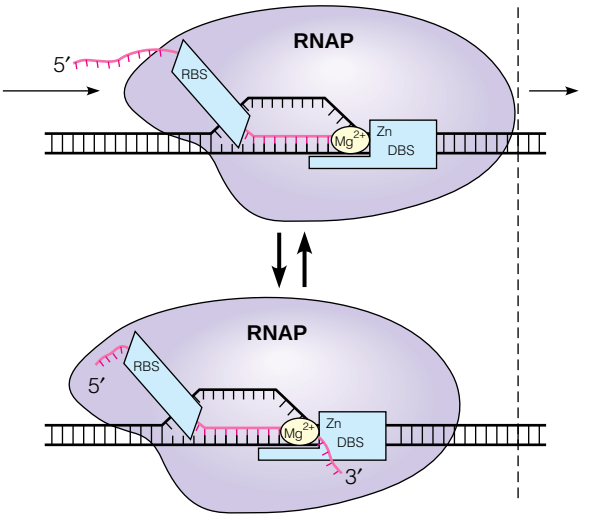


FIGURA **26.10**

Retroceso de un complejo de elongación. Arriba, el 3′ terminal del transcrito está en el lugar activo (señalado por Mg^{2+}). Debajo, la enzima se ha deslizado hacia atrás, dejando el 3′ terminal del transcrito en el extremo de una cola de RNA sin apareamiento de bases, de unos 5 nucleótidos de longitud. La transcripción puede reanudarse, bien deslizándose la polimerasa hacia delante, hacia atrás de la estructura representada arriba, o, lo más probable, rompiendo la parte sin apareamiento de bases del transcrito, creando un nuevo término 3′ con apareamiento de bases.

Cortesía de E. Nudler, A. Mustaev, E. Lukhtanov y A. Goldfarb, *Cell* (1997) 89:33-41.

plazado se rompe y no puede detectarse. Se ha visto que las proteínas GreA y GreB estimulan una actividad de rotura del transcrito que es intrínseca a la propia polimerasa. Estas observaciones sugieren que la RNA polimerasa se mueve generalmente hacia delante hasta que se alcanza una de estas secuencias especiales o quizás hasta que un error de inserción de la transcripción genera un mal apareamiento DNA-RNA que debilita al híbrido y permite el retroceso.

PUNTUACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN: RECONOCIMIENTO DEL PROMOTOR

El reconocimiento del promotor es un paso crucial de la transcripción, desde el punto de vista de la regulación y también en lo que se refiere al mecanismo. En *E. coli*, se considera que los genes que se transcriben con mayor frecuencia inician la transcripción aproximadamente una vez cada 10 segundos, mientras que algunos genes se transcriben de manera muy infrecuente, tan sólo una vez por generación (30 a 60 minutos). El reconocimiento del promotor es un paso limitante de la velocidad de la transcripción. Dado que todos los genes de las bacterias se transcriben por la misma enzima central, las variaciones de la estructura del promotor han de ser en gran parte las responsables de la enorme variación de la frecuencia de iniciación. La información acerca de la estructura del promotor tiene gran utilidad práctica en el diseño de vectores de expresión para genes clonados.

¿Qué características estructurales del DNA dirigen a la RNA polimerasa a unirse a un lugar promotor y formar un complejo promotor abierto? La primera pista para responder a esta pregunta se obtuvo en 1975, cuando David Pribnow y Heinz Schaller examinaron de manera independiente los datos limitados existentes respecto a la secuencia del DNA y observaron que todos los genes que se transcribían en *E. coli* compartían una secuencia corta común con abundante adenina y timina, centrada unos 10 nucleótidos hacia el lado 5′ del lugar de comienzo de la transcripción (Figura 26.11). (La identificación de los puntos de comienzo de la transcripción se describe en Herramientas de la Bioquímica 26B.) Existía alguna variación entre los promotores analizados, pero surgió una **secuencia de consenso** dentro de esta región conservada. Una secuencia de consenso comprende las bases que aparecen con más frecuencia en cada posición de la secuencia en una serie de secuencias que se cree que tienen una función común. Entre las diferentes secuencias de iniciación analizadas en *E. coli*,

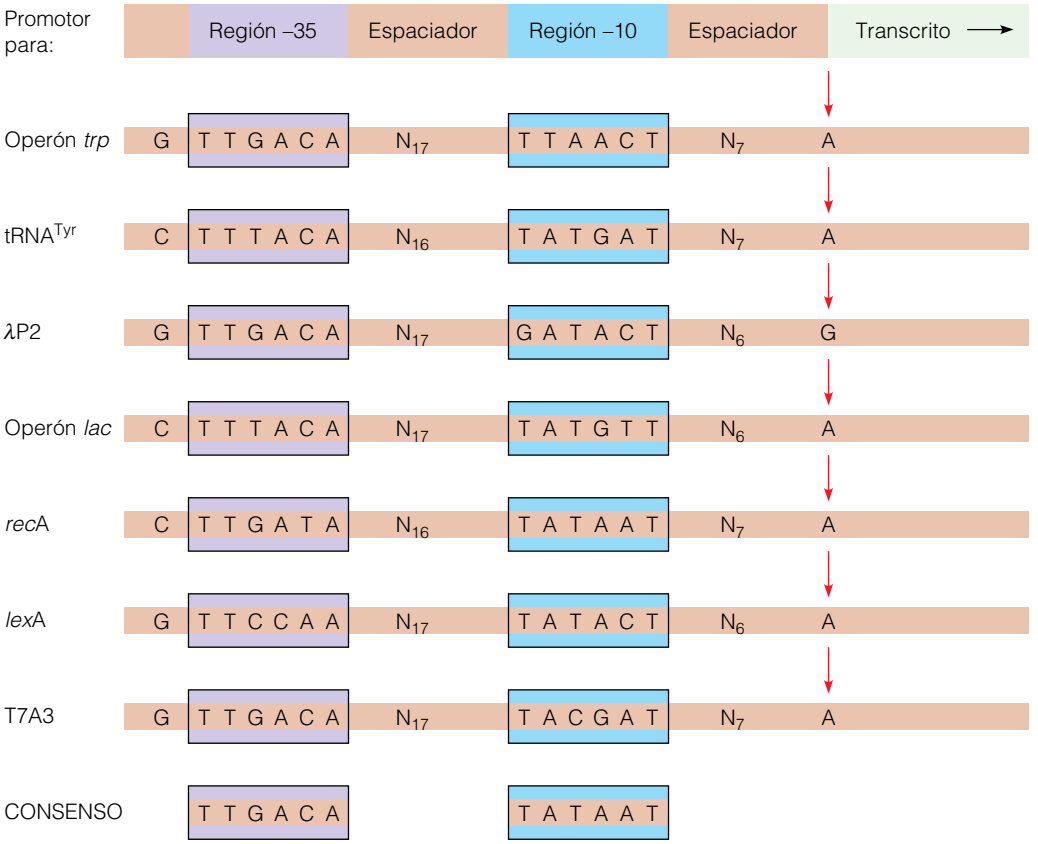


FIGURA **26.11**

Secuencias conservadas de los promotores reconocidos por la RNA polimerasa de *E. coli*. Se indica también la longitud de las secuencias espaciadoras. Las flechas rojas señalan el lugar de comienzo de la transcripción.

esa secuencia de consenso era TATAAT, en la **cadena con sentido**. La cadena con sentido es la cadena de DNA que no se transcribe. Dado que su secuencia es complementaria de la de la cadena molde, la cadena con sentido es idéntica en su secuencia de bases al RNA producto en la región transcrita, pero con T en vez de U. Posteriormente se observó otra región de secuencia de nucleótidos conservada en el nucleótido –35, con una secuencia de consenso TTGACA.

Las dos secuencias conservadas se denominan región –35 y región –10 (esta última también recibe el nombre de *caja de Pribnow*). No hay ningún promotor natural conocido que tenga regiones –35 y –10 idénticas a las de las secuencias de consenso, pero en general, cuanto más se parecen estas regiones de un promotor a las secuencias de consenso, más eficaz es el promotor en la iniciación de la transcripción. Las variaciones de la estructura del promotor representan una forma sencilla que tiene la célula para variar las tasas de transcripción de distintos genes. En la Figura 26.12 se indica el grado de conservación de los diferentes nucleótidos. En 114 promotores de *E. coli* examinados en un estudio inicial, 6 de los 12 nucleótidos de las dos secuencias de consenso se encontraron en más del 75% de los promotores.

La frecuencia con la que se transcribe un gen en *E. coli* viene dada, en gran parte, por la semejanza de sus secuencias promotoras con las secuencias de consenso.

¿Qué datos apuntan a un papel funcional de estas secuencias conservadas en la unión de la RNA polimerasa y la iniciación de la transcripción? En primer lugar, diversas mutaciones se sitúan en las regiones del promotor y afectan a la eficacia de la transcripción in vivo. Como se indica en la Figura 26.12, la mayor parte de las mutaciones de los promotores que se han secuenciado modifican su estructura en la región –35 o en la región –10, lo cual apunta directamente a que estas secuencias son las que tienen un mayor efecto sobre la eficacia de la iniciación de la transcripción. En general, las mutaciones que aumentan la fuerza del promotor (**mutaciones ascendentes del promotor**) cambian la región –35 o

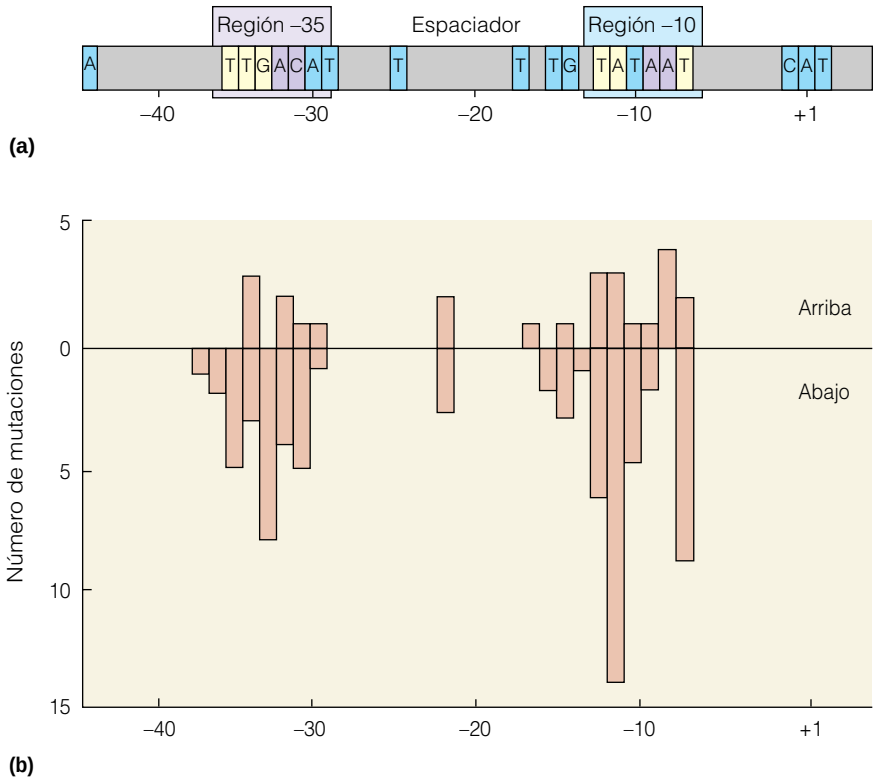


FIGURA **26.12**

Estudio de los nucleótidos conservados en los promotores de *E. coli*. Se compararon las secuencias de nucleótidos de 114 promotores conocidos de *E. coli*. **(a)** Las posiciones de los nucleótidos que se mantenían invariables en al menos un 75% de los promotores se indican en amarillo, las de los nucleótidos conservados moderadamente (50-75%) en morado, y la de los conservados débilmente (40-50%) en azul. **(b)** Número de mutaciones de promotores conocidos que afectan a cada lugar. Las mutaciones ascendentes del promotor aumentan la fuerza del promotor, mientras que las descendentes tienen el efecto contrario.

Reproducido con permiso de D. Hawley y W. R. McClure, *Annu. Rev. Biochem.* (1985) 54:171-204. © 1985 Annual Reviews, Inc.

–10 de manera que se parecen más a las secuencias de consenso. Las **mutaciones descendentes del promotor**, que reducen la fuerza del mismo, cambian la secuencia haciéndola más diferente de las de consenso. Se han extraído conclusiones similares en los estudios de mutagénesis de lugar dirigida de los promotores y en el análisis de su eficacia in vitro. Estos últimos estudios han confirmado la importancia del espaciamiento entre las dos regiones. Aunque la mayor parte de los promotores naturales tienen un espaciador de 17 nucleótidos entre las regiones –35 y –10, muchos tienen 16 ó 18. Los estudios in vitro indican que un espaciador de 17 nucleótidos es el que produce la estructura del promotor más eficaz.

El otro dato que indica la importancia de las regiones –35 y –10 es que la mayor parte de los nucleótidos del DNA que están en contacto estrecho con la RNA polimerasa son los que están en las dos secuencias conservadas o cerca de ellas. Esto puede establecerse determinando la susceptibilidad de los nucleótidos concretos a la modificación química, en presencia o en ausencia de la RNA polimerasa. Así, por ejemplo, el dimetil sulfato puede utilizarse para determinar la susceptibilidad de los residuos de guanina a la metilación. Esta técnica comporta la metilación de un fragmento marcado en el extremo 5′, seguido de la ruptura, como en la reacción de secuenciación de Maxam-Gilbert (página 1157), y la identificación de los fragmentos con terminación G en un gel de electroforesis (Figura 26.13). En algunos casos, la intensidad de las bandas aumenta por la presencia de la RNA polimerasa, lo que indica que la unión de la proteína potencia la reactividad. En otros casos, la reactividad se reduce, lo cual indica que la unión de la proteína protege a esa guanina concreta frente al reactivo de metilación. En ambos casos, el resultado indica que la proteína está en contacto con las guaninas en esas regiones y modifica su reactividad. Este experimento y otros semejantes demuestran que la RNA polimerasa contacta también con bases hacia arriba de la caja –35, en la región –40 a –60. En estos contactos, par-

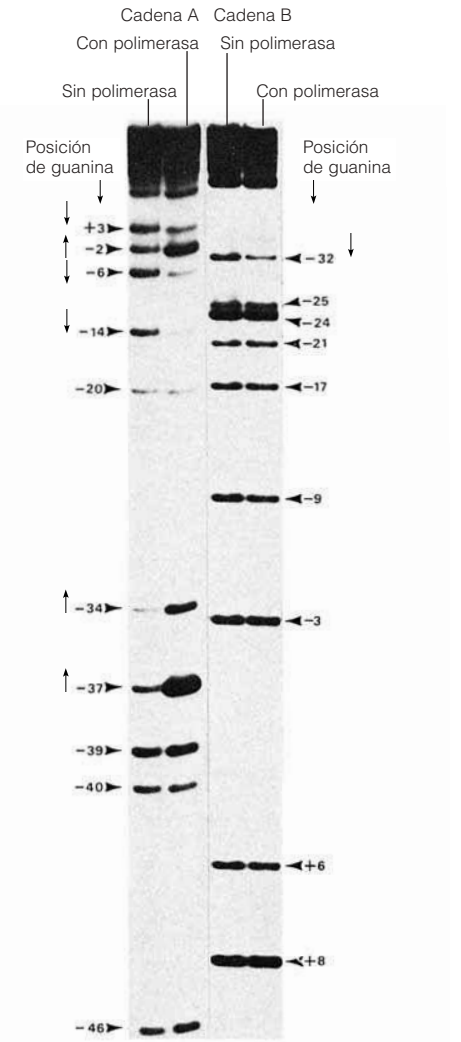


FIGURA **26.13**

Identificación de los residuos G que contactan con la RNA polimerasa en el promotor del triptófano de *E. coli*. ↑ = potenciación de la ruptura mediante la unión de la polimerasa; ↓ = inhibición de la ruptura.

Cortesía de D. S. Oppenheim, G. N. Bennett y C. Yanofsky, *J. Mol. Biol.* (1980) 144:133-142. Academic Press Ltd, Londres.

ticipa la subunidad α de la polimerasa, mientras que en los contactos con las cajas –35 y –10 participa α. Los contactos hacia arriba (–40 a –60) son especialmente importantes en los promotores de los genes de las proteínas ribosómicas, que se transcriben de forma muy activa.

En el promotor analizado en la Figura 26.13, la mayor parte de las guaninas afectadas, las de las posiciones –37, –34, –32, –14 y –6, están en las regiones –35 ó –10, o cerca de ellas. La modificación de las condiciones de reacción puede identificar también adeninas que estén situadas cerca de la RNA polimerasa. Además, la reacción con etilnitrosourea puede identificar oxígenos de fosfato con una reactividad potenciada o disminuida. Por último, las timinas que están en contacto con la proteína pueden identificarse mediante la sustitución de la timina del DNA por bromodesoxiuridina y la posterior determinación del grado en que cada residuo de bromo-dUMP puede sufrir fotoentrecruzamiento con la proteína. Obsérvese que estos métodos, como la técnica de huellas dactilares, permiten identificar nucleótidos críticos en cualquier lugar del DNA que unan específicamente una proteína, y no sólo en los promotores.

Todas estas técnicas indican que la región –35 y la región –10, así como algunos nucleótidos situados por encima de –10, son los principales puntos de contacto en un complejo promotor abierto. La Figura 26.14 resume los resultados de estos métodos cuando se aplican a uno de los promotores de la RNA polimerasa de *E. coli* sobre el DNA de T7. Obsérvese que, como hay dos vueltas de hélice entre las regiones –35 y –10, se propone que la RNA polimerasa se une al DNA fundamentalmente en un lado de la doble cadena. Los datos sobre la reactividad de los nucleótidos respaldan esta conclusión.

Otro factor que afecta a la eficacia de la transcripción, además de la secuencia de bases del promotor, es la tensión superhelicoidal en el DNA molde. La relación entre la topología del DNA y la eficacia de la transcripción está recibiendo actualmente una gran atención. La relación no está clara, puesto que la transcripción de algunos genes se activa in vivo cuando el molde está muy superenrollado, por ejemplo por la inactivación de la topoisomerasa I. En cambio, la transcripción de otros genes se inhibe en estas condiciones. Es interesante señalar que el promotor de la transcripción de las subunidades de la DNA girasa se activa cuando el gen está en un estado relajado. Dado que la girasa introduce vueltas superhelicoidales, esta observación parece corresponder a un mecanismo de retroacción en el que la célula responde de manera adecuada a una señal de que el DNA intracelular está adquiriendo una disposición demasiado relajada.

PUNTUACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN: TERMINACIÓN

Dada la gran estabilidad de los complejos de la transcripción, la terminación de la transcripción, con la liberación del transcrito naciente, es un proceso bastante

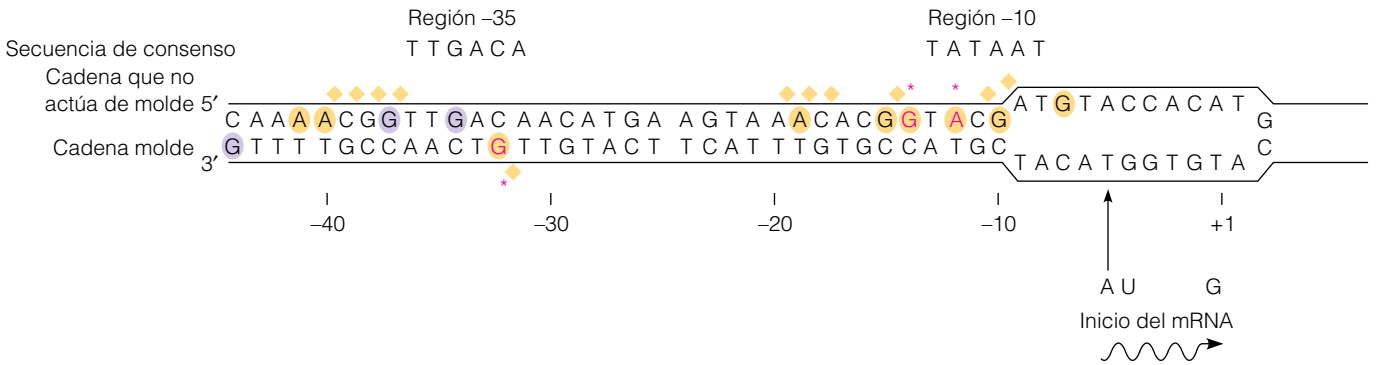


FIGURA **26.14**

Estructura del promotor A3 de T7. Este promotor es uno de los tres de la RNA polimerasa de *E. coli* que se encuentran en el DNA de T7. Los nucleótidos que pasan a ser resistentes a la metilación por la unión de la RNA polimerasa se indican de color naranja; los nucleótidos que pasan a ser más vulnerables a ella se indican de color morado. Los asteriscos indican purinas metiladas que interfieren con la unión de la polimerasa. Los rombos indican contactos de fosfato. Las dos regiones conservadas del promotor están separadas exactamente por dos vueltas de hélice.

Cortesía de U. Siebenlist y W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1980) 77:125. © 1980 National Academy of Sciences, USA.

complejo. En las bacterias se reconocen dos tipos diferentes de fenómenos de terminación: los que dependen de la acción de un **factor de terminación** proteico, denominado ρ (rho), y los que son independientes de ρ.

Terminación independiente del factor

La secuenciación de los extremos 3′ de los genes que terminan de una forma independiente del factor revela dos características estructurales que son comunes a muchos de estos genes y que se ilustran en la Figura 26.15: (1) dos segmentos simétricos con abundante GC, que en el transcrito son capaces de formar una estructura de bucle troncal, y (2) un trayecto posterior de cuatro a ocho residuos de A. Estas características sugieren los siguientes elementos del mecanismo de terminación. En primer lugar, la RNA polimerasa reduce su velocidad o realiza una pausa, cuando llega al primer segmento con abundante GC, debido a que la estabilidad de los pares de bases G-C hace que el molde sea difícil de desenrollar. In vitro, la RNA polimerasa realiza una pausa de varios minutos en un segmento con abundante GC. En segundo lugar, la pausa proporciona tiempo a las partes con abundante GC complementarias del transcrito naciente para que se apareen entre sí desplazando, de esta manera, esta parte del transcrito de su molde o de su lugar de unión a la enzima. Así pues, el complejo ternario de la RNA polimerasa, el DNA molde y el RNA se debilita. Se produce luego un nuevo debilitamiento, que causa la disociación, cuando el segmento con mucha A se transcribe para dar una serie de enlaces A—U (muy débiles) que ligan el transcrito al molde.

El mecanismo real de terminación es más complejo de lo que acabamos de describir, debido en parte a las secuencias de DNA situadas por encima y por debajo de las regiones que se muestran en la Figura 26.15, que influyen también en la eficacia de la terminación. Además, no todos los lugares de pausa son lugares de terminación. Sin embargo, el esquema mostrado incluye los elementos clave de la terminación independiente del factor.

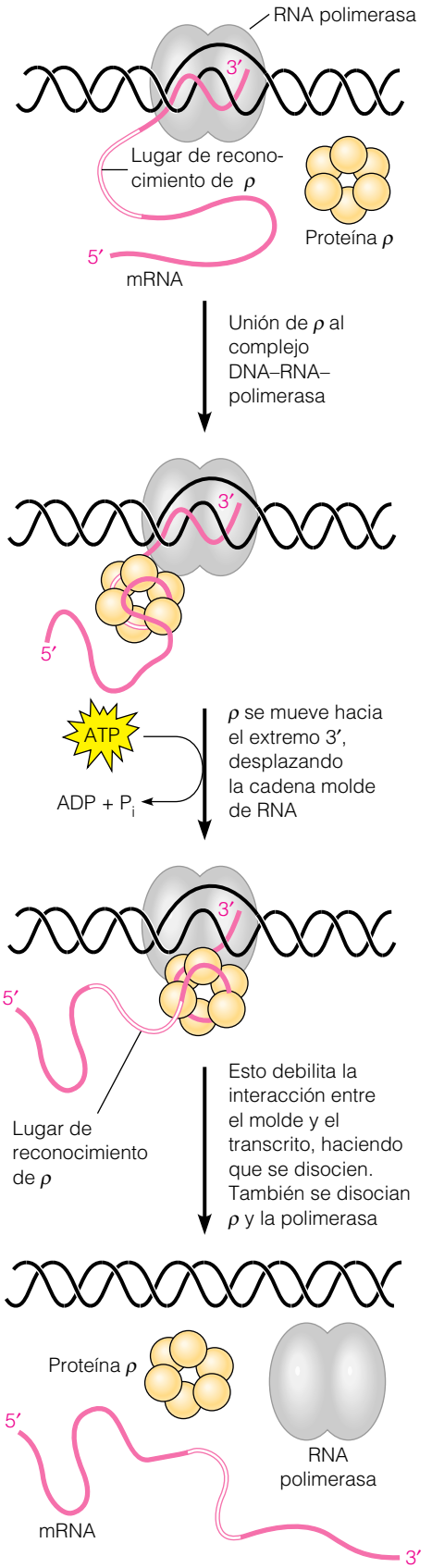
Las secuencias de DNA que promueven la terminación independiente del factor incluyen una serie de 4 a 8 residuos de A y una región con abundante GC que forma un bucle troncal.

Terminación dependiente del factor

Los lugares de terminación dependientes del factor son menos frecuentes, y el mecanismo de este tipo de terminación es aún más complejo. La proteína ρ, un hexámero formado por subunidades idénticas, se descubrió inicialmente en los estudios sobre la terminación de la transcripción del DNA del fago λ in vitro. Esta proteína, que se ha caracterizado como una RNA-DNA helicasa, contiene una actividad nucleósido trifosfatasa que se activa por la unión a polinucleótidos. Al parecer ρ actúa uniéndose al transcrito en formación en un lugar específico cerca del extremo 3′, cuando la RNA polimerasa realiza una pausa (Figura 26.16). A continuación, ρ se desplaza a lo largo del transcrito hacia el extremo 3′, de manera que la actividad helicasa desenrolla el extremo 3′ del transcrito separándolo del molde (y/o de la molécula de RNA polimerasa) y causando su liberación.

En la terminación dependiente del factor, la proteína ρ actúa como una RNA-DNA helicasa, desenrollando la doble cadena molde-transcrito y facilitando la liberación del transcrito.

No está claro qué es lo que hace que la RNA polimerasa realice una pausa en los lugares de terminación dependientes de ρ. Interviene en ello, de algún modo, la acción de otra proteína, la NusA. Esta proteína se descubrió durante los estudios de la **antiterminación** en el fago λ. La antiterminación se produce en una fase temprana del programa de transcripción del fago, cuando se inactivan dos lugares de terminación dependientes de ρ, con lo que la RNA polimerasa puede avanzar más allá de estos lugares y transcribir genes que son esenciales para el desarrollo del fago (véase la página 1138). Para que se produzca esta inactivación, una proteína del virus, el producto del gen *N*, debe interaccionar con NusA (*N* *u*tilization *s*ubstance; *s*ustancia que *u*tiliza *N*) mediante un mecanismo todavía desconocido. Las mutaciones que afectan a *N* o al gen *nusA* de



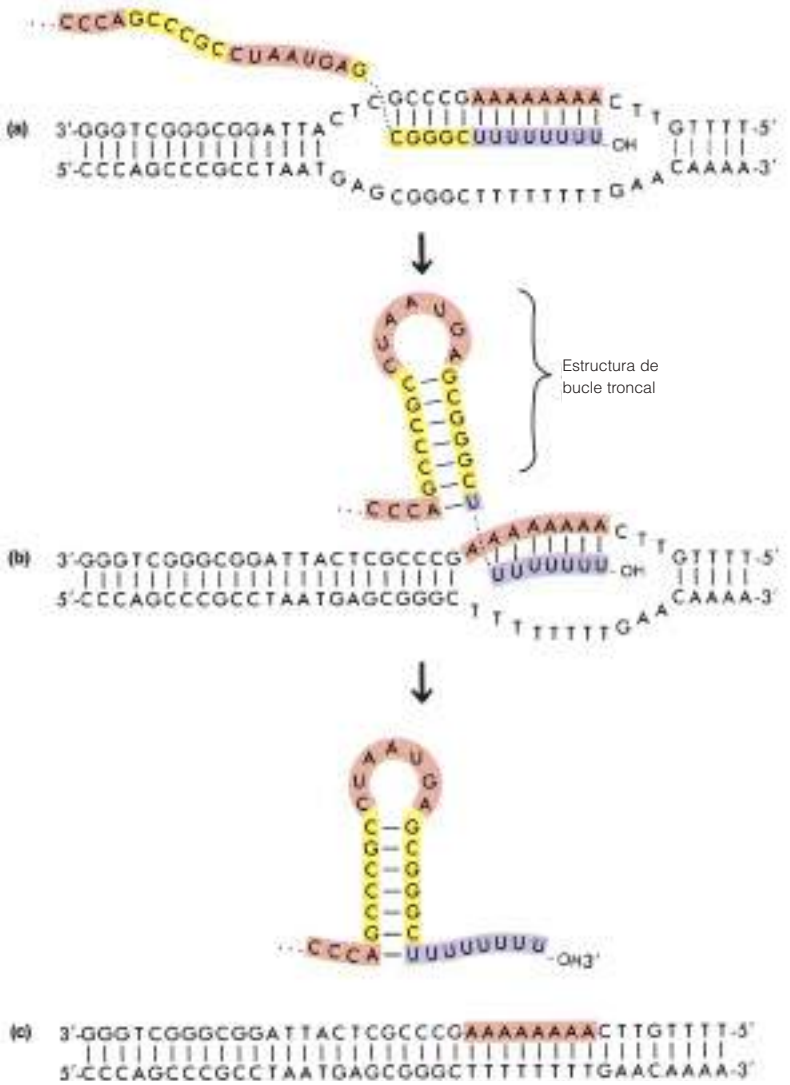


FIGURA **26.15**

Modelo para la terminación de la transcripción independiente del factor. **(a)** Un segmento con abundante A del molde (segmento marrón de la derecha) acaba de transcribirse a un segmento de mRNA con abundante U. **(b)** La doble cadena RNA-RNA, estabilizada mediante pares de bases G-C (en amarillo), elimina algunos de los apareamientos de bases entre el molde y el transcrito. **(c)** Los enlaces A—U inestables que ligan el transcrito al molde híbrido se disocian, liberando el transcrito.

E. coli interfieren en la antiterminación y bloquean el desarrollo del fago. La proteína NusA se asocia evidentemente con la RNA polimerasa, y existen motivos para creer que se une en algún momento de la transcripción, después de que se haya disociado el factor σ, ya que las dos proteínas purificadas compiten entre sí por unirse a la RNA polimerasa central.

Se ha obtenido una idea más clara de los mecanismos de la terminación a partir de un mecanismo regulador muy estudiado al que se denomina **atenua-**

FIGURA **26.16**

Terminación dependiente del factor ρ. El factor ρ se une a un lugar del transcrito en formación y desenrolla la doble cadena RNA-DNA. Cuando el factor ρ llega a la RNA polimerasa, la interacción con la proteína NusA unida (no mostrada) conduce a la terminación.

ción. La atenuación controla la tasa de transcripción de determinados operones mediante la terminación de la síntesis de un transcrito en formación antes de que la RNA polimerasa haya llegado a los genes estructurales. La atenuación, que se ha investigado como un modelo para la terminación de final de transcrito, se considerará en las páginas 1140-1142.

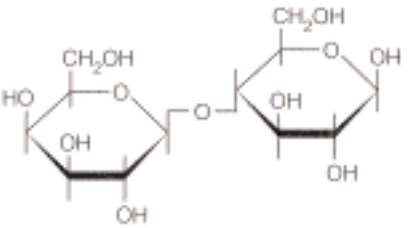
Regulación de la transcripción

Las bacterias responden rápidamente a los cambios de su entorno. Como hemos visto, los genes para la utilización de la lactosa se activan cuando las células de *E. coli* perciben la presencia de lactosa o de un compuesto similar, y se inducen las enzimas de utilización de lactosa. Otros muchos genes se mantienen en un estado desactivado semejante hasta que son necesarios sus productos. Los hay también, principalmente de entre los que participan en el anabolismo, que se mantienen en un estado activado a menos que esté presente el producto de la secuencia anabólica, y cuando esto ocurre se **reprimen**, es decir, se desactivan. La lógica metabólica de todo ello es evidente: muchos genes se expresan únicamente cuando se necesitan los productos génicos, es decir, para utilizar un sustrato disponible, para sintetizar un metabolito complejo que no está en el medio o para responder de algún modo a los cambios de las condiciones ambientales.

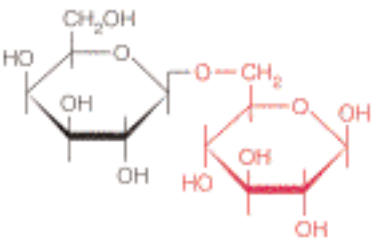
Tanto la inducción como la represión enzimáticas actúan a través del control de la transcripción, fundamentalmente en el paso de iniciación. De forma análoga, los bacteriófagos utilizan principalmente la maquinaria de transcripción de la célula hospedadora para expresar sus propios genes. Los mecanismos de control de la transcripción del hospedador se utilizan tal como están o se modifican para que satisfagan las necesidades del virus. En consecuencia, los estudios de la inducción y represión enzimáticas, así como los del desarrollo de los bacteriófagos, son los que nos han proporcionado la perspectiva más clara respecto a cómo se controla la transcripción en los procariotas. Este trabajo ha aportado, a su vez, los paradigmas para comprender los procesos mucho más complejos de la regulación de la transcripción en los organismos multicelulares que pueden explicar la diferenciación y el desarrollo. Por este motivo, centraremos nuestro tratamiento de la regulación de la transcripción en los sistemas procariotas que han aportado mayor información, y ampliaremos estos conceptos a los eucariotas en el Capítulo 28.

OPERÓN LACTOSA: PRIMEROS INDICIOS DEL CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES

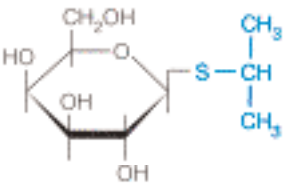
El operón lactosa está formado por tres genes estructurales ligados que codifican las enzimas de utilización de la lactosa, junto con los lugares de regulación adyacentes. Los tres genes estructurales, *z*, *y*, y *a*, codifican respectivamente la *β*-galactosidasa, la ***β*-galactosidasa permeasa** (una proteína de transporte) y la **tiogalactósido transacetilasa**, una enzima cuya función metabólica no se conoce aún. En presencia de un inductor, las tres enzimas se acumulan de manera simultánea, pero a concentraciones diferentes. La lactosa en sí causa una inducción del operón lactosa, pero el verdadero inductor intracelular es la **alolactosa**, Gal*β*(1→6)Glc, un producto menor de la acción de la *β*-galactosidasa. En el laboratorio, generalmente se utiliza un inductor sintético como el **isopropil tiogalactósido** (**IPTG**), que induce el operón lactosa pero que no se degrada por la *β*-galactosidasa. Ello hace que su concentración no se modifique durante un experimento.



Lactosa



Alolactosa



Isopropil *β*-tiogalactósido

Regulación del operón lactosa

La mutación de un gen estructural, por ejemplo, el gen *z*, puede inactivar su producto (β-galactosidasa) sin afectar al control de los otros dos genes. Sin embargo, las mutaciones en las regiones reguladoras situadas *fuera* de los genes *z*, *y*, y *a* pueden afectar a la expresión de los tres genes estructurales. En su trabajo inicial, Jacob y Monod identificaron dos fenotipos mutantes distintos: **constitutivo**, en el que los tres productos génicos se sintetizan en cantidades elevadas a pesar de la ausencia del inductor, y **no inducible**, en el que las tres actividades enzimáticas se mantienen bajas incluso tras la adición de un inductor. Estas mutaciones se encuentran en dos lugares distintos del mapa genético, denominados *o* e *i*. El Problema 14 del final de este capítulo le ayudará a comprender las relaciones que existen entre las mutaciones reguladoras, los fenotipos mutantes y las concentraciones de las enzimas del operón *lac*.

El modelo original de Jacob-Monod para la regulación de los genes, basado en este sistema, se ha presentado en la Figura 26.2. En la Figura 26.17 se muestra una descripción más completa del operón *lac*. Como propusieron acertadamente Jacob y Monod, la transcripción de los tres genes estructurales se inicia cerca de un lugar adyacente, el **operador**. La transcripción produce un solo **RNA mensajero policistrónico**, es decir, una copia de RNA de los tres genes. (El término **cistrón** tiene un significado genético. Para nuestros fines, es una región de un genoma que codifica una cadena polipeptídica.) El producto del gen *i* es un **represor** macromolecular, que en la forma activa se une al operador, bloqueando la transcripción (Figura 26.18a).

El represor tiene también un lugar de unión para el inductor. La unión del IPTG, la alolactosa, o de algún otro inductor en este lugar inactiva el represor mediante una reducción muy importante de su afinidad por el DNA (Figura 26.18b). Esta inactivación del represor estimula la transcripción de *z*, *y*, y *a*, ya que la disociación del complejo represor-inductor del operador elimina un bloqueo estérico de la unión de la RNA polimerasa en el lugar de iniciación. Así pues, la introducción de lactosa activa la síntesis de los productos de los genes que intervienen en su catabolismo al eliminar una barrera para su transcripción. Este modo de regulación es fundamentalmente negativo, puesto que el elemento de regulación activo (el represor) es un *inhibidor* de la transcripción. El control positivo se descubrió más tarde, y afecta al lugar CRP que se muestra en la Figura 26.17. Lo comentaremos en breve.

Un elemento central del éxito de Jacob y Monod en la formulación de un modelo tan detallado como éste, fue su capacidad para analizar mutaciones reguladoras del *lac* en diploides parciales, bacterias que contienen un cromosoma complejo y parte de otro, transferido mediante conjugación. Una copia del operón reside en el cromosoma, mientras que un cromosoma incompleto puede introducirse en una célula como parte del proceso de apareamiento bacteriano. Las mutaciones no inducibles que se encontraban en el gen *i* tenían un fenotipo dominante, lo que indicaba que la expresión de los genes estructurales era baja cuando estaban presentes tanto el alelo de tipo natural como los alelos mutantes de *i*. Jacob y Monod propusieron que los alelos mu-

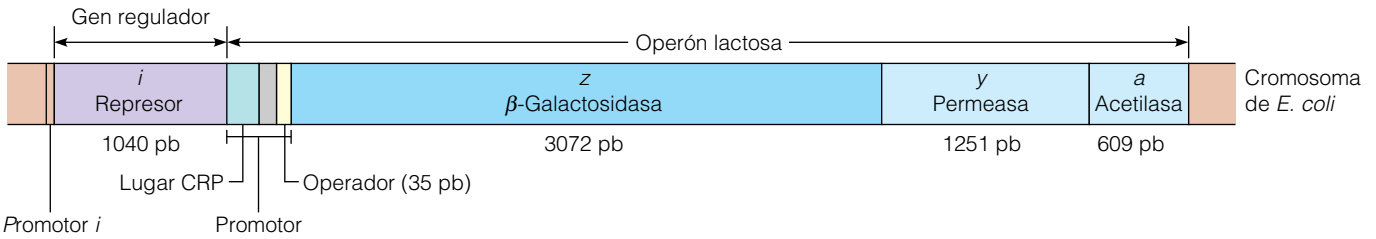


FIGURA **26.17**

Mapa del operón lactosa. El lugar CRP es el lugar de unión de la proteína receptora de cAMP, un factor regulador (página 1131). El promotor incluye también los lugares de unión de la RNA polimerasa y del represor *lac*. La síntesis del represor se inicia por sus propios medios (promotor *i*). Existen otros lugares de unión para el represor, 2 nucleótidos hacia arriba y 432 nucleótidos hacia abajo, respectivamente, del punto de partida de la transcripción.

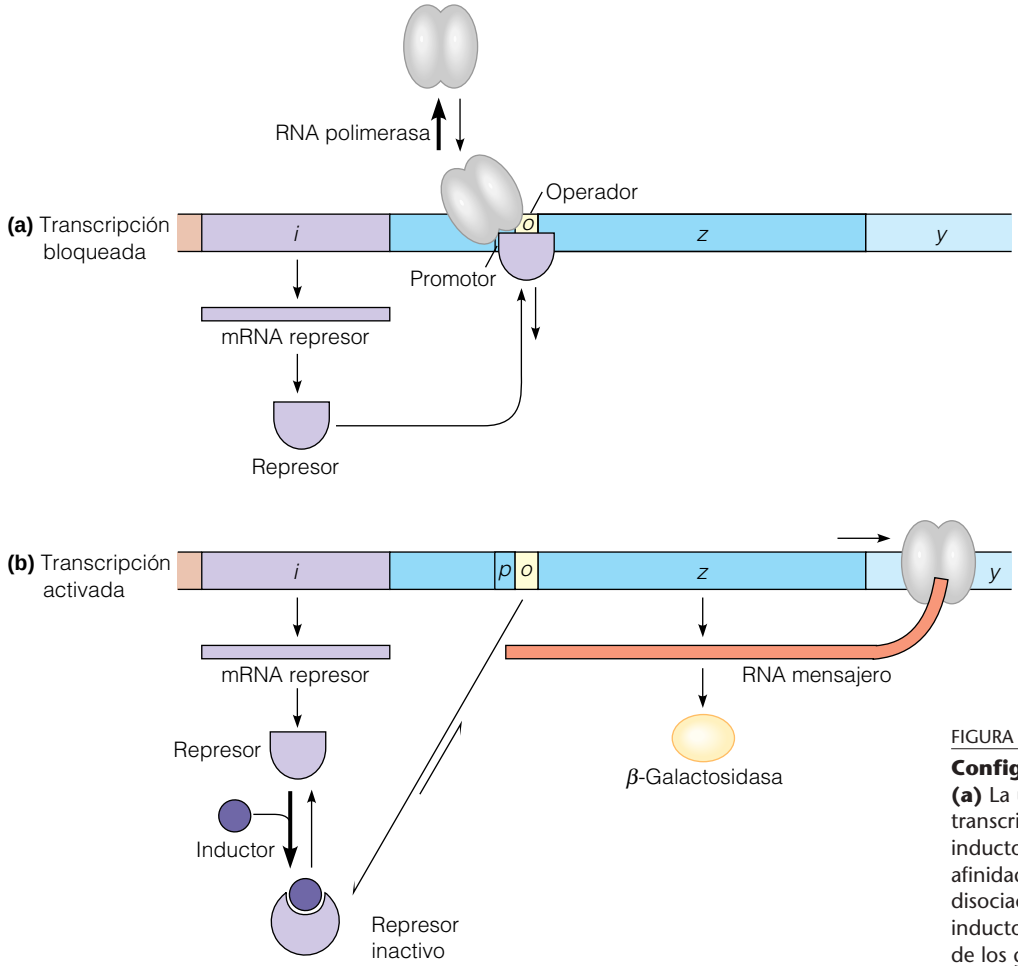


FIGURA **26.18**

Configuraciones del operón lactosa. **(a)** La unión del represor al operador inhibe la transcripción de los genes estructurales. **(b)** El inductor se une al represor, reduciendo la afinidad del represor por el operador. La disociación del complejo inactivo represor-inductor del operador permite la transcripción de los genes estructurales.

tantes dan lugar a represores mutantes incapaces de unir el inductor. Estos represores mutantes se mantendrían unidos al DNA en los lugares operadores, tanto del cromosoma mutante como del normal, a pesar de la presencia del inductor.

Las mutaciones constitutivas localizadas en el mapa en *i* tenían un fenotipo recesivo. Es decir, daban lugar a una expresión elevada del gen, pero tan sólo cuando estaban presentes dos alelos mutantes. Estos alelos mutantes generaban represores que eran defectuosos en su unión al operador, y, por tanto, no podían desactivar la expresión de los genes. Estas mutaciones son recesivas porque un represor normal en el mismo citosol puede unirse a todos los operadores e inhibir la transcripción.

Estas observaciones indicaron que las mutaciones del represor son ***trans*-dominantes**, es decir, que el producto del gen *i* codificado por un genoma puede afectar a la expresión de los genes de otros genomas. Esta observación llevó a la conclusión de que el represor es un producto difusible, capaz de actuar sobre cualquier lugar del DNA de la célula al que pueda unirse. En cambio, las mutaciones constitutivas que se encontraban en el mapa en *o* tenían un efecto ***cis*-dominante**. Esto es, en una célula con un operador de tipo natural y un operador mutante, tan sólo se expresaban de manera constitutiva los genes del mismo cromosoma del operador mutante. Dado que una proteína podía difundir por el citosol y actuar sobre otros cromosomas, esta observación sugería que el operador no codifica un producto génico.

Los fenotipos de los diploides parciales que implican a los genes reguladores de *lac* proporcionaron claves indispensables de los mecanismos de regulación de la transcripción.

Para un mecanismo molecular basado casi por entero en pruebas indirectas del análisis genético, el modelo del operón propuesto por Jacob y Monod ha superado muy bien la prueba del tiempo. Se han realizado tres modificaciones principales del modelo, al someter el sistema a un análisis más detallado. En primer lugar, se ha descubierto que el promotor es un elemento diferenciado del operador, aunque los dos lugares se solapan. En segundo lugar, aunque inicialmente se pensó que el represor era el RNA del gen *i*, su aislamiento ha demostrado que se trata de una proteína. En tercer lugar, Jacob y Monod propusieron que toda la regulación de la transcripción era negativa, es decir, que la unión de una proteína reguladora inhibía siempre la transcripción. Sin embargo, el operón lactosa, como otros muchos genes regulados, presenta también un control *positivo* de la transcripción, es decir, la *activación* de la transcripción mediante la unión de una proteína, como se describe en las páginas 1129-1032.

Aislamiento y propiedades del represor

El represor *lac* fue aislado en 1966 por Walter Gilbert y Benno Müller-Hill. Dado que este represor constituye tan sólo el 0.001% del total de proteínas de la célula, Gilbert y Müller-Hill utilizaron mutantes diseñados para una sobreproducción del mismo, con objeto de aumentar al máximo la síntesis (hasta llegar a aproximadamente un 2% del total de proteínas). A continuación, purificaron la proteína basándose en su capacidad de unir el inductor sintético IPTG. El represor *lac* purificado es un tetrámero, formado por cuatro subunidades idénticas, cada una de 360 aminoácidos (M_r = 38 350). La proteína une IPTG con una K_a de aproximadamente 10^6 M^{-1}, y se une de manera inespecífica a un DNA de doble cadena con una K_a de aproximadamente 3×10^6 M^{-1}. Sin embargo, su unión específica en el operador *lac* es mucho más intensa, con una K_a de 10^{13} M^{-1}. Al igual que la RNA polimerasa, el represor busca su lugar operador uniéndose primero al DNA en un lugar cualquiera y desplazándose luego en una dimensión a lo largo del DNA. Se desplaza o bien por deslizamiento o bien por transferencia de un lugar a otro, cuando los dos lugares se aproximan en bucles de DNA adyacentes.

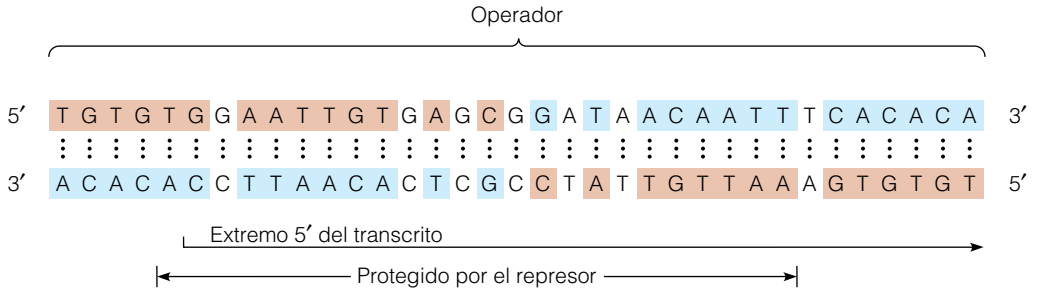
El control por el represor *lac* es extraordinariamente eficaz, en especial si se tiene en cuenta la cantidad mínima de represor existente en una célula de *E. coli*. El gen *i* se expresa a una velocidad muy lenta, y da lugar a unas 10 moléculas de tetrámero represor por célula. Aunque esto corresponde a una concentración de tan sólo alrededor de 10^{-8} M, este valor es varios órdenes de magnitud superior al de la constante de *disociación*, lo cual implica que en una célula *no inducida*, el operador está unido al represor durante más del 99.9% del tiempo; ello explica las concentraciones muy bajas de proteínas del operón *lac* en las células no inducidas (menos de una molécula por célula). Sin embargo, la unión del inductor reduce la afinidad del complejo represor-inductor por el operador en muchos órdenes de magnitud. En estas condiciones, la unión inespecífica del complejo represor-inductor en otros lugares del DNA pasa a ser significativa, con lo que en las células *inducidas* el operador está ocupado por el represor menos del 5% del tiempo.

Un sistema represor-inductor proporciona el control negativo del operón *lac*. El represor se une al operador, e interfiere en la iniciación de la transcripción. Un inductor se une al represor, reduciendo su afinidad por el operador.

El lugar de unión del represor

El lugar del DNA al que se une el represor *lac* se ha analizado mediante la técnica de huellas dactilares y experimentos de protección de la metilación, del tipo que se han descrito antes para la RNA polimerasa (véase la Figura 26.13). Como se presenta en el diagrama siguiente, el operador comprende 35 pares de bases, que incluyen 28 pares de bases de secuencia simétrica, es decir, incluye una secuencia que es idéntica en ambas direcciones (sombreada en el diagrama). Así

pues, el operador es un palíndromo imperfecto; imperfecto debido a los 7 pares de bases que no presentan esta simetría.



El punto de comienzo de la transcripción está incluido dentro de la secuencia de unión del represor, como se muestra en el diagrama. Veinticuatro de los 35 pares de bases del operador están protegidos del ataque de la DNasa por la unión del represor. Las mutaciones constitutivas del operador (o^c) comportan alteraciones de la parte central de esta secuencia de nucleótidos. En la Figura 26.19 se muestra la forma en que se solapan el operador y el promotor, que viene dada por las regiones del DNA protegidas mediante la unión del represor o de la RNA polimerasa, respectivamente.

Una vez secuenciado el operón *lac*, quedó claro que hay otros dos lugares de unión del represor *lac* situados en las cercanías, uno centrado hacia arriba en la posición –82 y otro dentro del propio gen *lacZ*, en la posición +432; el operador original está centrado en +11. Los análisis genéticos indicaron que ambos lugares participan en la regulación del operón *lac*. Aunque no está claro el significado del lugar hacia abajo, las mutaciones que afectan al lugar hacia arriba (–82) conducían a la represión incompleta del operón. Las pruebas indicaban que era esencial para la represión completa una estructura de DNA en bucle, con el represor en contacto con ambos lugares –82 y +11. En 1996 llegó la confirmación, con la determinación de la estructura cristalina del represor tetramérico completo *lac* por sí mismo, como un complejo con un fragmento oligonucleotídico definido, y como un complejo con el IPTG. Como se muestra en la Figura 26.20a, la proteína tetramérica consta de dos unidades diméricas unidas por una región bisagra. Cada dímero se une al DNA de forma independiente, lo cual sugiere que la proteína tetramérica se une a ambos lugares +11 y –82, creando un bucle de DNA de 93 pares de bases entre ellos. El dominio de unión al DNA de la proteína se encuentra en una región de hélice α que contiene bases dentro del surco principal del DNA operador. Este motivo de unión helicoidal se ha visto en otras proteínas de unión al DNA de secuencia específica, como señalaremos más adelante.

La Figura 26.20b sugiere el mecanismo de inducción. El represor es una proteína alostérica que, tras la unión del inductor, aumenta significativamente el ángulo al que dos unidades monoméricas en un dímero están relacionadas una con la otra. Esto separa las hélices de unión al DNA 3.5 Å, de forma que ya no puede contactar con los lugares de unión al DNA, como deben hacer para unirse fuertemente.

Regulación del operón lac por la glucosa: un sistema de control positivo

El sistema represor-operador *lac* mantiene el operón *desactivado* en ausencia de β-galactósidos utilizables. Un sistema regulador solapado, que se resume en la Figura 26.21, *activa* el operón tan sólo cuando no se dispone de fuentes de energía alternativas. Desde hace tiempo se sabe que *E. coli* utiliza la glucosa con preferencia a la mayor parte de los demás sustratos energéticos. Cuando se

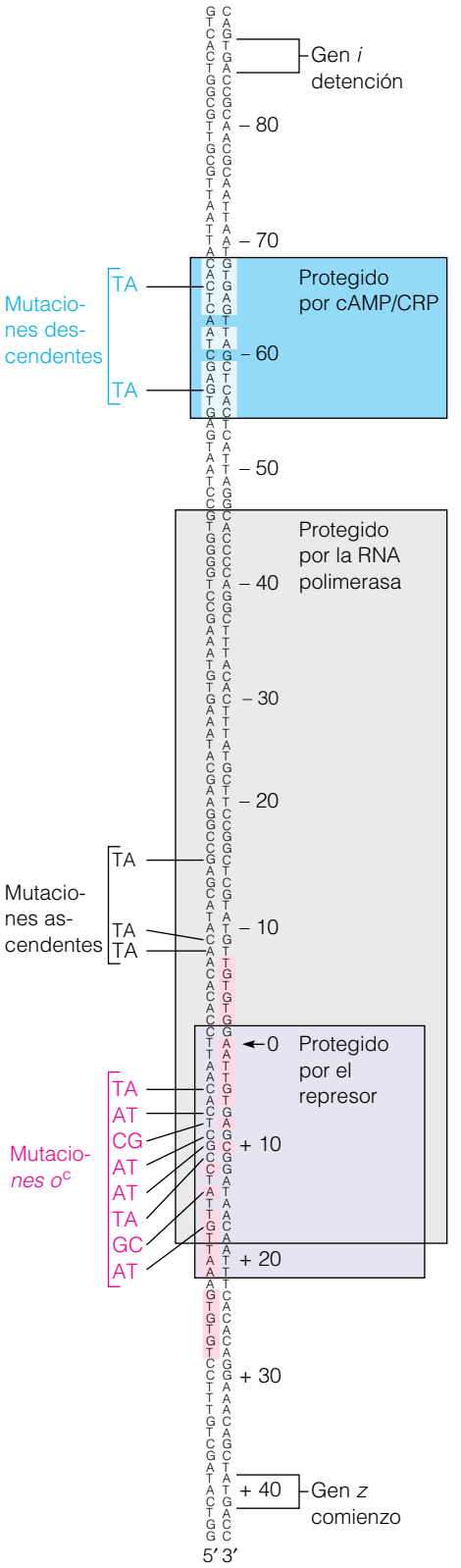
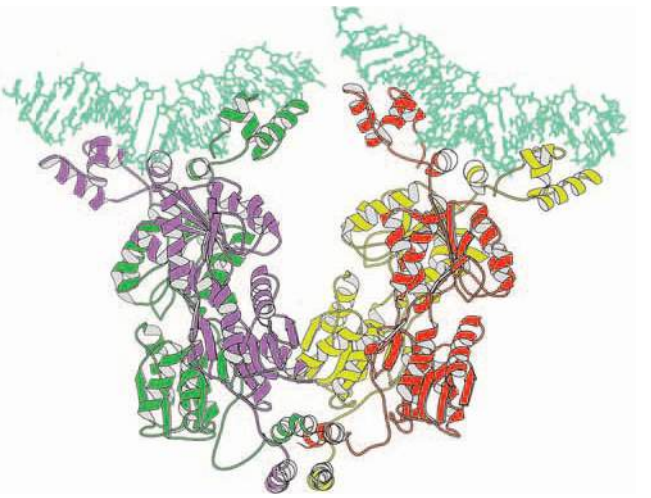
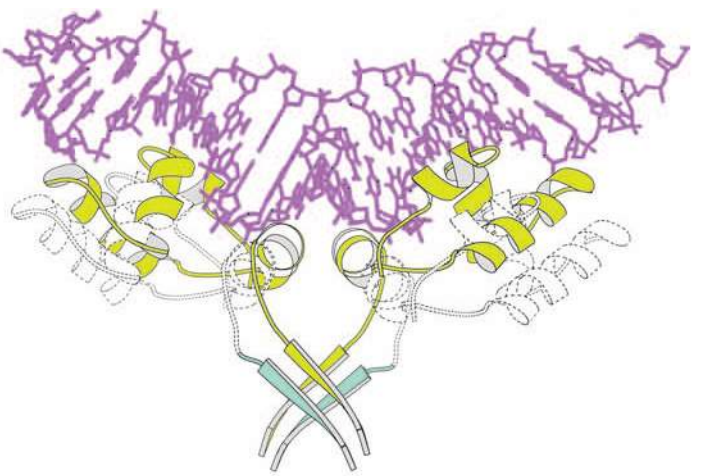


FIGURA **26.19**

Región reguladora del *lac* de 122 bases. La secuencia repetida invertida del lugar de unión de la CRP está sombreada en azul, y las áreas palindrómicas del operador están sombreadas en rosa. Los lugares de las tres proteínas (CRP, represor y RNA polimerasa), según lo determinado mediante la técnica de huellas dactilares con DNasa I, se indican mediante recuadros. Se muestran los cambios de secuencia encontrados en las mutaciones del promotor y del operador, así como el codón de inicio para la proteína *lacZ* (gen *z*) y el codón de detención para la proteína represora (gen *i*). Los nucleótidos se numeran a partir de 0 en el punto de comienzo de la transcripción del *lac* (el primer nucleótido del mRNA es +1).



(a)



(b)

FIGURA **26.20**

Estructura del represor *lac*. **(a)** El complejo represor-DNA, con el DNA (en verde) unido separadamente a cada una de las dos unidades diméricas, una que se muestra con los monómeros en verde y morado, y la otra en amarillo-verdoso y rojo. **(b)** Efecto de la unión del IPTG. En amarillo-verdoso, los extremos de los N-terminales de las dos unidades monoméricas de la proteína (residuos 1-68), unidos al DNA, en morado. Las estructuras punteadas representan las supuestas posiciones de las hélices de unión al DNA tras la unión del inductor IPTG a la proteína, lo cual impulsa la separación de las hélices de unión al DNA.

Cortesía de M. Lewis, G. Chang, N. C. Horton, M. A. Kercher, H. C. Pace, M. A. Schumacher, R. G. Brennan y P. Lu, *Science* (1996) 271:1247-1254, con permiso de *Science*.

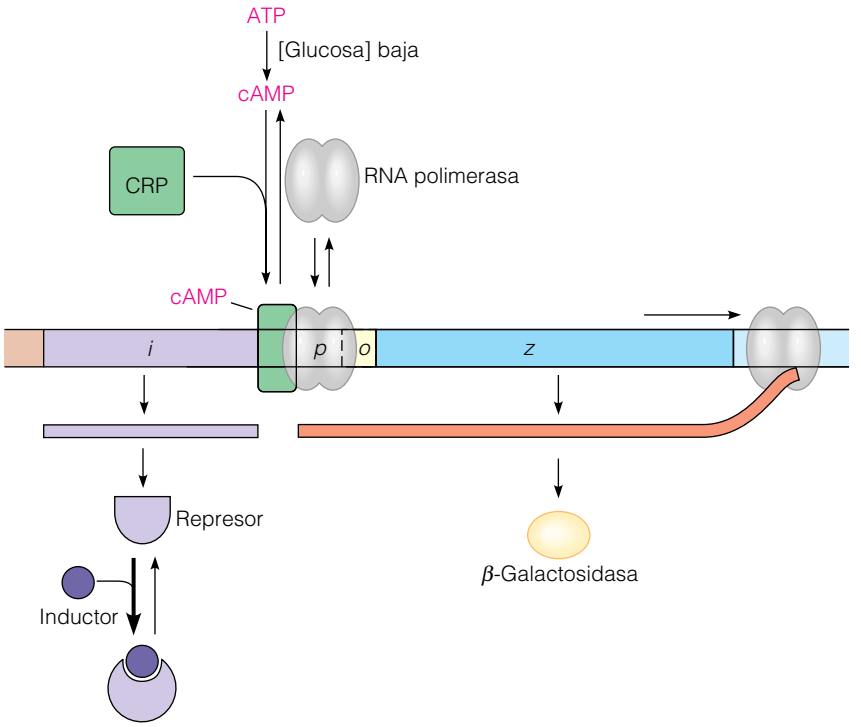


FIGURA **26.21**

Activación del operón *lac*. El represor se inactiva por la unión del inductor, y la proteína receptora de cAMP (CRP) se activa por la unión del AMP cíclico. La unión del complejo CRP-cAMP al DNA facilita la iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa.

cultivan en un medio que contiene tanto glucosa como lactosa, las células metabolizan la glucosa de manera selectiva hasta que se agota el aporte de la misma. A continuación, la proliferación es más lenta, y se activa el operón lactosa como preparación a la continuación de la proliferación utilizando lactosa. Este fenómeno, que ahora sabemos que utiliza un mecanismo de *activación* de la transcripción, se denominó inicialmente represión por glucosa o represión por un catabolito. La activación de la transcripción se produce cuando las concentraciones de glucosa son bajas; el control se ejerce a través de las concentraciones intracelulares de AMP cíclico.

Recuérdese que en las células animales, el aumento de las concentraciones de cAMP estimula las enzimas catabólicas, lo cual hace aumentar las concentraciones de los sustratos energéticos. Esos efectos están mediados metabólicamente a través de señales hormonales y el desencadenamiento de cascadas metabólicas. En las bacterias, la activación comporta el control de la expresión de los genes, pero los resultados finales son similares. En *E. coli*, las concentraciones de cAMP son bajas cuando las concentraciones intracelulares de glucosa son altas. El mecanismo de regulación real no se conoce aún. Al parecer, la adenilato ciclasa percibe la concentración intracelular de un intermediario no identificado del catabolismo de la glucosa; de ahí la denominación actual del proceso regulador, **activación por un catabolito**. Cuando cae la concentración de glucosa, como se muestra en la Figura 26.21, aumenta la concentración de cAMP, y se desencadena la activación del operón lactosa mediante su interacción con una proteína denominada **proteína receptora de cAMP** (**CRP**), a la que anteriormente se denominó **proteína activadora de catabolito** (**CAP**). Esta proteína es un dímero, formado por dos cadenas polipeptídicas idénticas que contienen cada una 210 residuos de aminoácidos. Cuando une cAMP, la CRP sufre un cambio de conformación. El cambio aumenta enormemente su afinidad por determinados lugares del DNA, incluyendo un lugar del operón *lac* adyacente al lugar de unión de la RNA polimerasa. La unión de cAMP-CRP en este

La proteína receptora de AMP cíclico (CRP) proporciona un control positivo de *lac* y varios otros operones represibles por catabolitos. El complejo cAMP-CRP se une al promotor *lac* cuando las concentraciones de glucosa son bajas y facilita la iniciación de la transcripción.

lugar protege a una secuencia del DNA desde –68 a –55, como se muestra en la Figura 26.19. Esta unión facilita la transcripción del operón *lac* mediante la estimulación de la unión de la RNA polimerasa para formar un complejo promotor cerrado o aumentando la velocidad de formación de un complejo promotor abierto.

Nuestro conocimiento de la acción de la CRP es todavía incompleto, debido en parte a que el complejo cAMP-CRP activa varios sistemas génicos diferentes en *E. coli,* que intervienen todos ellos en la generación de energía. Entre estos sistemas están los operones para la utilización de otros azúcares, como la galactosa, la maltosa, la arabinosa y el sorbitol, y varios aminoácidos. Entre los operones que se han analizado, el lugar de unión al DNA del dímero activado por el cAMP varía considerablemente respecto al punto de comienzo de la transcripción, lo cual sugiere que los mecanismos reguladores que implican a esta proteína son complejos.

El complejo CRP-DNA

La estructura del complejo CRP-cAMP-DNA, tal como muestra la cristalografía de rayos X (Figura 26.22), indica la forma en que la proteína se une al DNA. Cada subunidad de CRP contiene un par característico de hélices α unidas por una vuelta. Una hélice de cada par, que se muestra perpendicular al plano de la figura, se sitúa dentro del surco principal del DNA. Este motivo estructural **hélice-vuelta-hélice**, que se observó aproximadamente al mismo tiempo en la estructura del represor Cro del fago λ (véanse las páginas 1135-1140), se encuentra en varias proteínas reguladoras de unión al DNA, lo que sugiere un origen evolutivo común para esta familia de proteínas. Volveremos a este motivo y a su importancia reguladora al comentar los represores del fago λ.

El análisis del complejo DNA-proteína muestra también que la CRP induce al DNA a doblarse considerablemente cuando se une. Este doblado puede facilitar la iniciación de la transcripción al llevar secuencias de DNA hacia una parte más adelante, en contacto directo con el promotor o con el lugar de inicio de la transcripción. Las pruebas indican una interacción importante entre la subunidad α y el DNA, que se produce como resultado del doblado del DNA.

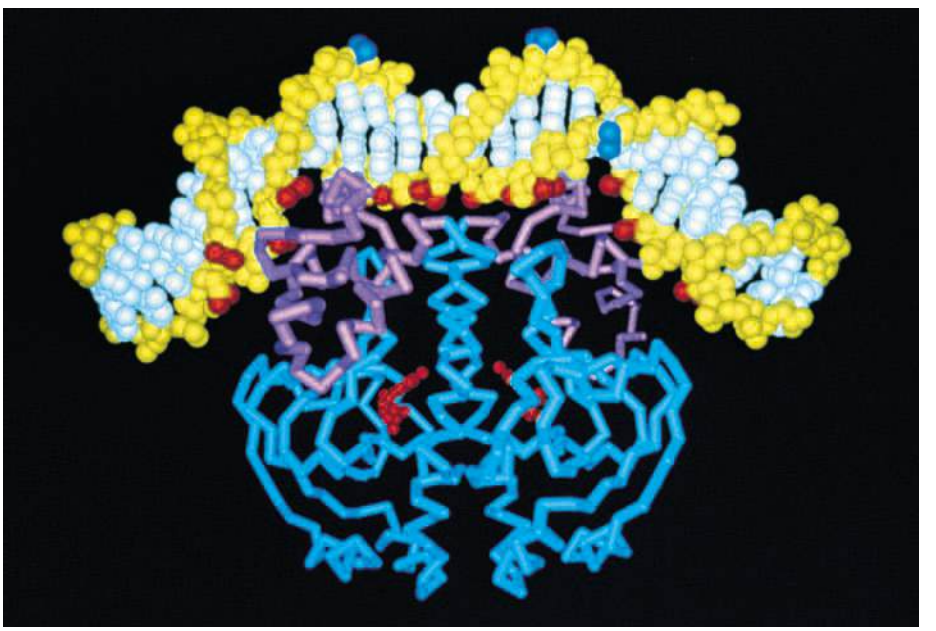


FIGURA **26.22**

Doblado del DNA por la unión a CRP-cAMP. Este modelo se dedujo a partir de la estructura cristalina del complejo DNA-proteína-cAMP. Las bases del DNA se indican de color azul claro, y el armazón azúcar-fosfato en amarillo. Los dominios de unión al DNA de la proteína, dos hélices α en contacto con las bases del DNA en el surco principal (véase el texto), se indican en morado y son perpendiculares al plano de la página. El dominio de unión del cAMP se muestra en azul, y dos moléculas de cAMP unido en rojo. En las moléculas de DNA, los fosfatos que están en contacto más estrecho con la proteína y cuya etilación interfiere en la unión de la misma se indican en rojo. Los fosfatos cuya reactividad a la etilación está aumentada (en el borde externo del doblez) se muestran en azul.

Cortesía de T. A. Steitz, *Q. Rev. Biophys.* (1990) 23:205-280. Reproducido con permiso de Cambridge University Press.

BACTERIÓFAGO λ: OPERADORES MÚLTIPLES, REPRESORES DUALES Y MODELOS PARA LA ESPECIFICIDAD DE UNIÓN AL DNA

Volvemos de nuevo al fago λ, un sistema genético mucho más grande y más complejo que el operón lactosa, pero que se regula por factores similares: la unión de proteínas a lugares reguladores específicos en el DNA, hacia arriba de los genes que controlan, conduciendo la unión a la activación o a la inhibición de la iniciación de la transcripción. Sin embargo, debido a la variedad de relaciones entre el virus y su bacteria hospedadora, los controles específicos utilizados son más complejos y más sutiles que los que hemos presentado. Recuérdese del Capítulo 25 que la infección puede tener dos resultados posibles: un ciclo lítico de crecimiento, comparable al del fago T4, o la lisogenización, en la que el cromosoma del virus se hace circular y sufre una integración específica de lugar en el cromosoma de la célula hospedadora (véase la Figura 25.17), con la consiguiente represión de casi todos los genes del virus. Una vez establecida la lisogenia, el cromosoma del fago puede mantenerse como un profago con la transcripción reprimida durante muchas generaciones. Puede romperse el estado de represión conduciendo a la escisión del cromosoma del virus como un DNA circular, seguido de la replicación del DNA del virus, seguido de la activación de los genes necesarios para el ensamblaje de las partículas víricas. El virus debe confiar en cuatro patrones distintos de expresión de los genes necesarios para sus cuatro estados fisiológicos: (1) infección conducente a un crecimiento lítico, (2) infección conducente al establecimiento de la lisogenia, (3) mantenimiento a largo plazo de la lisogenia, y (4) ruptura de la lisogenia con el consiguiente crecimiento lítico.

Los acontecimientos clave en la regulación de la transcripción de λ implican dos proteínas represoras diferentes, denominadas cI y Cro, cada una de las cuales se une a dos operadores diferentes. Cada operador contiene no sólo un lugar de unión del represor (como en el operón lactosa), sino tres, y cada uno de ellos contiene lugares promotores entremezclados con los lugares de unión del represor. La transcripción de los dos lugares promotor-operador tiene lugar en direcciones opuestas a lo largo del genoma (véase la Figura 26.23). Los represores se unen a cada uno de los seis lugares operadores con afinidades variables, lo que conduce a una ocupación variable de cada lugar de unión por cada represor en diversas condiciones fisiológicas. Para complicarlo más, el represor cI también actúa, en determinadas condiciones, como activador de la transcripción, estimulando la expresión de algunos genes y reprimiendo otros. Para entenderlo, debemos considerar primero los genes y sus posiciones en el

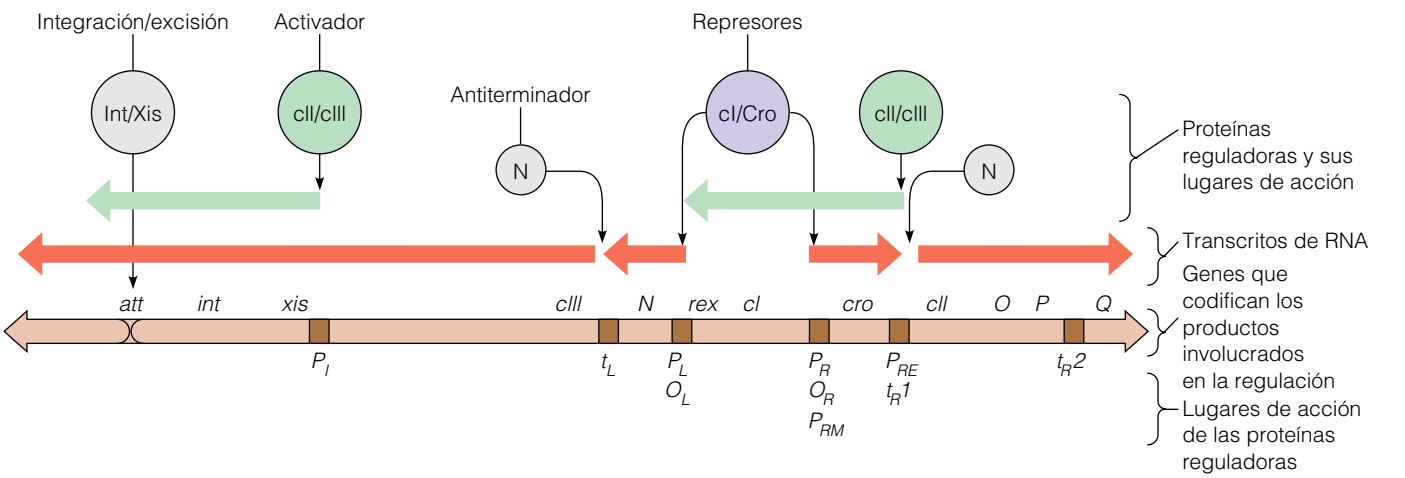


FIGURA **26.23**

Región reguladora temprana del fago λ. Se indican los lugares de acción de varias proteínas reguladoras (bandas marrones sobre la cinta oscura). Estas proteínas son los represores cI y Cro, el activador cII, cIII (que actúa estabilizando cII), el antiterminador N, y las proteínas de integración y escisión Int y Xis. Los RNA transcritos indicados en verde y rojo se sintetizan en distintas condiciones y en las direcciones señaladas con las puntas de flecha.

genoma de λ (Figura 26.23), así como los fenotipos de los mutantes alterados en estos genes reguladores.

Genes y mutaciones en el sistema λ

Los mutantes del fago que presentan deficiencias en el establecimiento o mantenimiento de la lisogenia tienen fenotipos comparables a los que presentan deficiencias en la regulación de *lac*, y estas semejanzas ayudaron a Jacob y Monod a establecer las generalizaciones que incluye su modelo del operón. La respuesta lisogénica incluye procesos de inactivación génica del virus, que se realizan mediante la unión de un represor a un operador, comparable al que mantiene al operón *lac* desactivado cuando no hay inductor. En la Tabla 26.2 se resumen los fenotipos principales de λ y las mutaciones de *lac* comparables.

Cuando un represor defectuoso no puede unirse a los operadores, los fagos mutantes producen cuando se siembran unas placas claras. Normalmente, una placa de λ es turbia, ya que contiene no sólo el fago sino también bacterias lisogenizadas, que continúan creciendo, puesto que son **inmunes** a la infección por otro fago. En cambio, los mutantes que no pueden establecer lisogenia dan lugar a placas claras, puesto que se lisan todas las células. Las mutaciones de λ con placas claras se encuentran en tres genes diferentes (*cI*, *cII* y *cIII*). *cI* es el gen estructural de un represor, y los otros dos genes controlan la síntesis de la proteína *cI*.

Las mutaciones **virulentas**, cuyas localizaciones en el mapa génico se encuentran en los operadores, dan lugar también a un fenotipo de placa clara, pero con una diferencia importante. Las bacterias lisogénicas para λ son inmunes a la infección por un segundo fago λ, ya que el represor de la célula se une a los operadores de cualquier fago que llegue. Esto ocurre en los mutantes *cI*, debido a que contienen operadores normales, que pueden unir a los represores. Sin embargo, los mutantes virulentos pueden producir una descendencia de fagos en la infección de un lisógeno inmune, puesto que sus operadores no pueden unirse al represor tras la entrada en la célula. Estas observaciones son similares en principio a las obtenidas en experimentos con diploides parciales del operón *lac*.

La regulación de la lisogenia en el fago λ es semejante a la regulación del operón lactosa, aunque más compleja.

El represor *cI* de λ y sus operadores

En el año 1967, aproximadamente al mismo tiempo que se aislaba el represor de *lac*, Mark Ptashne aisló el represor de λ codificado por *cI*. El represor cI es una proteína dímera, con un M_r de la subunidad de 27 000, que se une a través de sus secuencias N-terminales a los lugares del operador con una K_a de aproximadamente 3×10^{13} M (Figura 26.24). Las interacciones represor-DNA se han utilizado para localizar en el mapa genético y caracterizar lo que resultaron ser dos operadores, uno en cada lado de *cI*. Los dos operadores controlan procesos de transcripción divergentes a partir de una región reguladora central, hacia la

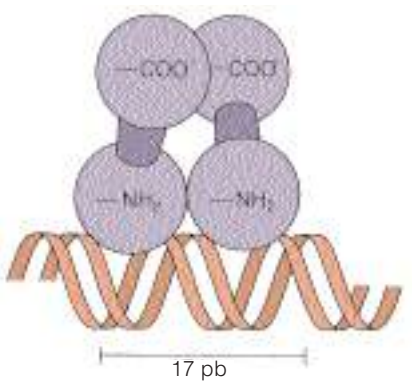


FIGURA **26.24**

Estructura y unión al DNA del represor cI de λ. El represor es un dímero y se une a una región de 17 pares de bases en un operador λ.

Tomado de M. Ptashne, *A Genetic Switch: Gene Control and Phage λ*. (Cambridge, Mass.: Cell Press & BSI, 1986).

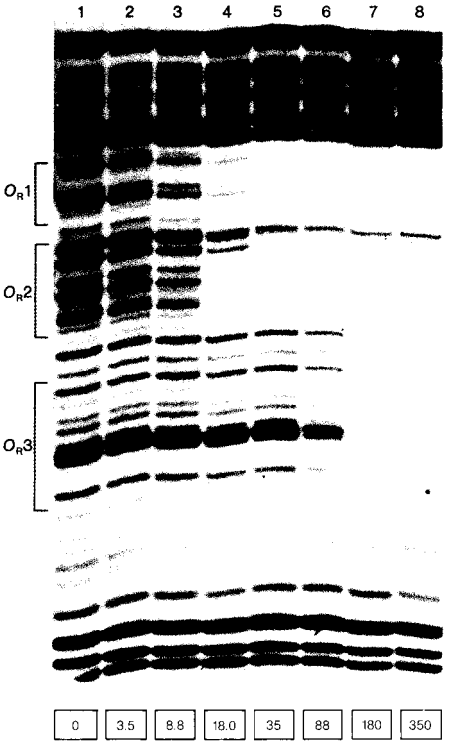
TABLA **26.2 Fenotipos de las mutaciones *lac* y λ comparables**

Fenotipo *lac*	Fenotipo λ correspondiente	Anomalía de la regulación
Inductor-constitutivo, recesivo	Placa clara; no puede establecer lisogenia	Represor defectuoso en la unión del operador
Operador-constitutivo, *cis*-dominante	Virulento; puede replicarse en un lisógeno inmunitario superinfectado	Operador incapaz de unirse al represor
No inducible, *trans*-dominante	No inducible (no puede inducirse por luz UV u otros tratamientos)	El represor no puede unir al inductor o inactivarle

FIGURA **26.25**

Estructuras de los operadores de λ, determinadas mediante la técnica de huellas dactilares, con DNasa I de un fragmento de restricción que contiene los tres lugares de O_R. La concentración del represor se incrementó desde 0 nM (calle 1) a 350 nM (calle 8). La determinación de huellas se describirá en la página 1155.

Cortesía de A. D. Johnson, B. J. Meyer y M. Ptashne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979) 76:5062.

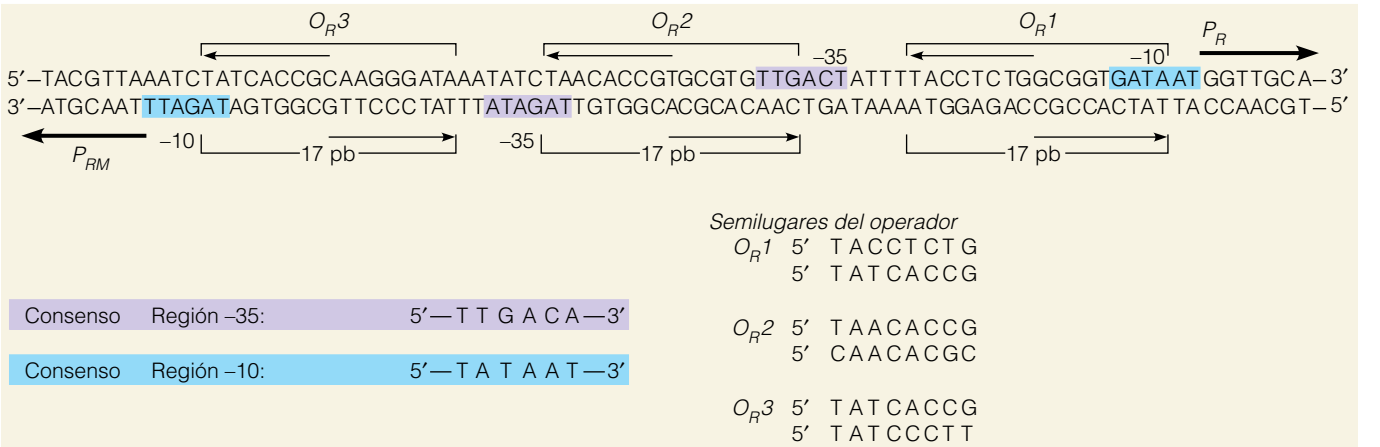


izquierda, (O_L), y hacia la derecha, (O_R). Como muestran las técnicas de huellas dactilares, cada operador contiene tres lugares diferentes de unión del represor, cada uno de ellos de 17 pares de bases de longitud. En la Figura 26.25 se muestra este resultado para la región O_R. Los tres lugares de unión del represor son homólogos, aunque no completamente (Figura 26.26), y están separados por regiones espaciadoras de entre tres y siete pares de bases. Las mutaciones que confieren virulencia se encuentran en las regiones de unión del represor. Un mutante totalmente virulento tiene al menos dos mutaciones, una en O_L y otra en O_R.

Los operadores de λ son notables en varios aspectos, aparte de sus múltiples lugares de unión del represor. (1) Las mutaciones que afectan a la actividad del promotor se encuentran entre los lugares de unión del represor. Así pues, los operadores y los promotores están *intercalados*, de manera que las regiones reguladoras han de denominarse más correctamente O_LP_L y O_RP_R. (2) Como se observa en la Figura 26.26, O_RP_R controla la transcripción a partir de *dos promotores diferentes*, uno hacia la derecha (P_R) y otro hacia la izquierda (P_{RM}). (3) La transcripción a partir de O_LP_L y O_RP_R se controla por *dos represores diferentes*, cI y una proteína denominada Cro (el acrónimo del gen *cro* procede de *c*I *r*epresor *o*ff). (4) En determinadas condiciones, el represor cI es un *activador* de la transcripción en vez de un inhibidor. Otra característica novedosa de este sistema de regulación es que la transcripción de *cI* se inicia por diferentes promotores en distintas condiciones fisiológicas. Todas estas complejidades están relacionadas con la necesidad de establecer un control ordenado y eficaz de los genes del fago en condiciones fisiológicas muy diferentes, como veremos más adelante.

FIGURA **26.26**

Región O_RP_R. En el esquema superior se indica la secuencia de nucleótidos de la región O_RP_R, incluyendo los tres lugares de unión del represor (O_R1, O_R2 y O_R3), el promotor hacia la izquierda P_{RM} y las regiones –35 y –10 de los dos promotores (sombreadas en morado y azul, respectivamente). Las flechas horizontales finas indican los semilugares del operador. En la parte inferior se muestran las secuencias de consenso para las regiones –35 y –10 y un plano que muestra la homología parcial entre los semilugares del operador (es decir, los lugares de unión del represor).



Genes tempranos del fago λ

Para comprender la importancia de la regulación del gen *cI*, debemos identificar varios genes de λ que se expresan en la fase temprana de la infección (véase la Figura 26.23). *cI* y *cro* codifican represores, como se ha indicado, y *cII* y *cIII* estimulan la síntesis de *cI*. El gen *rex* tiene una función todavía desconocida, y

es el único gen, aparte de *cI*, que se expresa durante la lisogenia. Hemos visto los genes *int*, *xis* y *att* en el Capítulo 25, al considerar la recombinación específica de lugar. *O* y *P* intervienen en la iniciación de la replicación del DNA de λ. El producto del gen *N* interacciona con NusA (véase la página 1123) impidiendo la terminación. El producto *Q* activa la transcripción tardía de los genes.

Interacciones entre los dos represores de λ

Los O_LP_L intercalados controlan la transcripción de *N*, mediante interacciones de sus lugares de unión del represor con la proteína cI. Sin embargo, la mayor parte de la acción reguladora se produce en O_RP_R, y es aquí donde se toma la decisión que conduce a la infección lítica o a la lisogénica. Esta decisión se basa en las interacciones de los dos represores, cI y Cro.

Los experimentos cuantitativos de huellas dactilares (véase la Figura 26.25) indican que de los tres lugares de unión del represor en O_RP_R, cI se une de manera más intensa al lugar O_R1, menos intensa al O_R2 y todavía menos intensa al O_R3. Además, la unión de cI es *cooperativa*, por lo que, cuando un dímero del represor se une a O_R1, la afinidad para una segunda molécula aumenta en el O_R2. La proteína Cro es un dímero de subunidades idénticas de 66 residuos. Se une de manera considerablemente menos intensa a cualquiera de los lugares en comparación con cI, y en el orden inverso. Es decir, se favorece el lugar O_R3, seguido de una unión aproximadamente igual a O_R2 y O_R1. La unión no es cooperativa.

Aunque la proteína Cro es un represor, puede considerarse también un **antirrepresor**, ya que antagoniza la acción de cI de una forma muy específica. Para comprender cómo actúa, debemos considerar primero los fenómenos de transcripción que se producen en presencia de diversas concentraciones de cI, como se indica en la Figura 26.27. Dada la unión cooperativa de cI a sus operadores, tanto el lugar O_R1 como el O_R2 suelen estar ocupados en el estado lisogénico (Figura 26.27a), a pesar de que la concentración intracelular de cI sea muy baja (de unas 200 moléculas por célula, es decir, 10^{-7} M). Ello inhibe la transcripción hacia la derecha de *cro* a partir de su propio promotor, mientras *activa* la transcripción hacia la izquierda de *cI* a partir del promotor P_{RM} (*M* por "mantenimiento" ya que éste es el promotor a partir del cual se transcribe *cI* durante el mantenimiento de la lisogenia). Las regiones –10 y –35 del promotor P_{RM} se encuentran dentro de los operadores. La prueba de que cI activa realmente su propia transcripción en el estado lisogénico está en la existencia de una clase especial de mutantes de *cI* cuyo represor puede unirse de manera intensa a O_R1 y a O_R2, pero no es capaz de estimular la transcripción de *cI* a partir de P_{RM}.

Durante el *establecimiento* de la lisogenia (Figura 26.27b), cuando los genes líticos y lisogénicos compiten para determinar el destino del genoma del virus, son necesarias mayores cantidades del represor cI que las que se transcriben a partir de P_{RM}. En este momento se activa un promotor *cI* diferente, denominado P_{RE} (*E* por "establecimiento"). En esta activación, la proteína cII se une de manera específica a la región –35 del P_{RE} y estimula la unión de la RNA polimerasa a ese lugar. Este fenómeno transcripcional produce un RNA mensajero de *cI* más largo, que se traduce de manera más eficaz que el mensaje sintetizado a partir de P_{RM}. El resultado es una cantidad de represor cI suficiente para unirse a los tres lugares de O_R y, por tanto, para bloquear los fenómenos de iniciación de la transcripción.

La lisogenia en el fago λ se controla por dos represores, cI y Cro, que se unen con afinidades diferentes a tres operadores en la región O_RP_R de operadores y promotores intercalados.

Consideremos ahora los fenómenos que se producen en la inducción del profago, cuando se rompe la lisogenia, dando lugar a una infección lítica (Figura 26.27c). En primer lugar, el represor cI se inactiva (veremos enseguida de qué forma se produce esto) y los lugares O_R quedan desocupados. Esto permite la

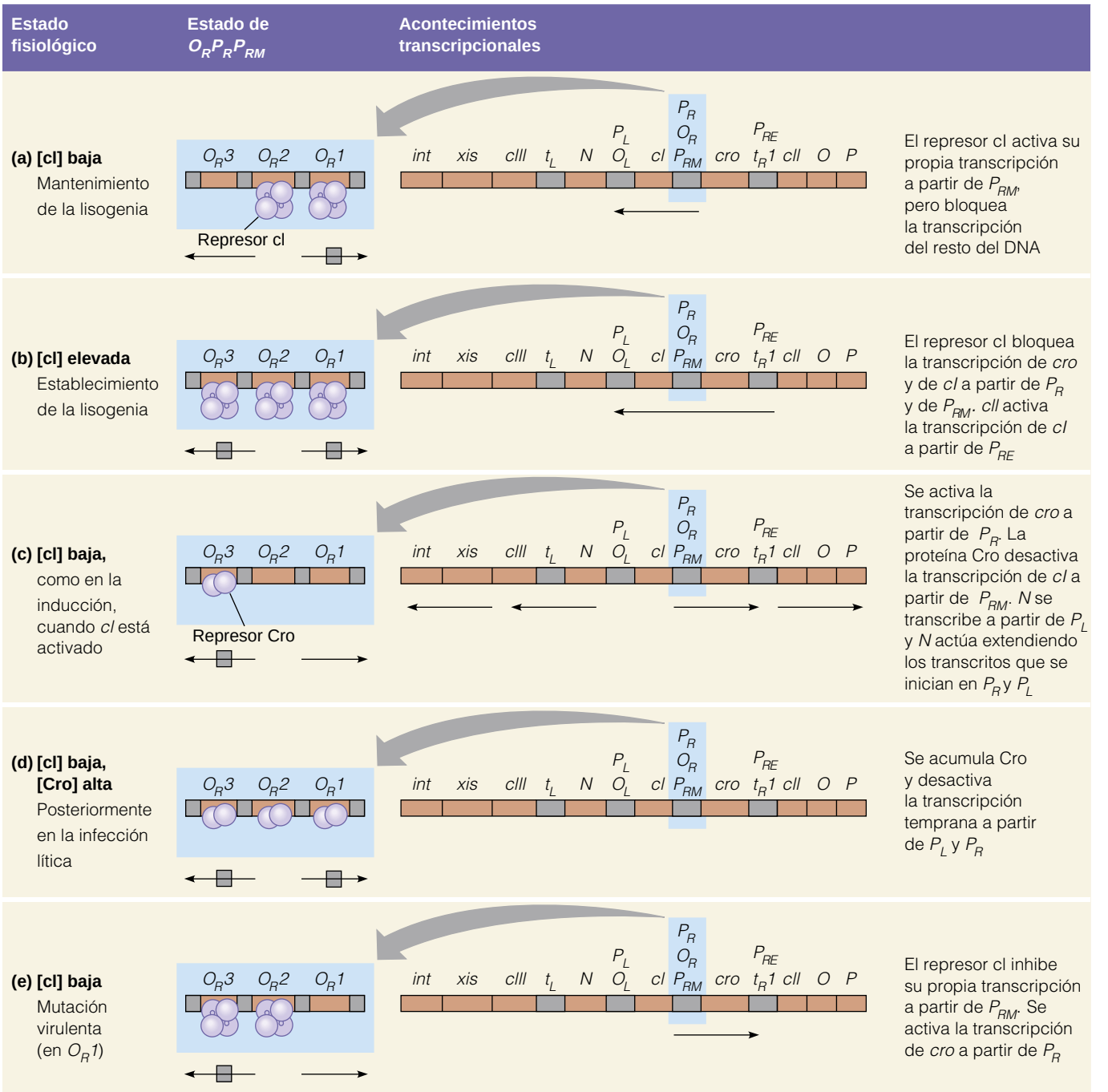


FIGURA **26.27**

Interacciones cI-Cro en la región $O_RP_RP_{RM}$. Diferentes condiciones fisiológicas dan lugar a distintas interacciones, con diversos efectos sobre la transcripción del resto del genoma de λ. Las cajas grises indican acontecimientos de la transcripción bloqueados. Por simplicidad, se omite el gen *rex* que no participa en la regulación.

transcripción de *cro* a partir de P_R, y la proteína Cro bloquea la ulterior transcripción del *cI* a partir del P_{RM}. Al mismo tiempo, la transcripción hacia la izquierda a partir de P_L genera la proteína N, que bloquea la terminación de la transcripción en los lugares que se indican en la Figura 26.27 como t_R1 y t_L. Así pues, los dos transcritos iniciales de Cro y N se extienden para activar genes nuevos. La transcripción hacia la izquierda genera las proteínas Int y Xis, necesarias para la escisión del profago. La transcripción hacia la derecha genera *O* y *P*, necesarias para la replicación del DNA.

Otros fenómenos reguladores posteriores, como la acción de la proteína del gen *Q*, activan la transcripción de genes de acción tardía, que codifican proteínas

estructurales del virus. En este momento, es deseable suprimir la transcripción génica temprana, de manera que las proteínas finales puedan elaborarse a tasas máximas. Esto comporta una nueva acción de la proteína Cro, que por entonces se ha acumulado hasta el punto de que puede unirse tanto a O_R1 como a O_L1, bloqueando la transcripción a partir de P_R y P_L, respectivamente (Figura 26.27d). En la infección por un mutante virulento (Figura 26.27e), la transcripción de *cI* a partir de P_{RM} se bloquea, y ello causa la activación de la transcripción de *cro* a partir de P_R.

ESTRUCTURA DE LOS REPRESORES Cro Y cI Y PROTEÍNAS RELACIONADAS DE UNIÓN AL DNA

Los estudios de la estructura tridimensional de los represores Cro y cI han aportado un notable conocimiento sobre los mecanismos mediante los cuales las proteínas reconocen las secuencias específicas de DNA. Esto ha potenciado a su vez, considerablemente, nuestro conocimiento de la forma en que se regula la transcripción mediante interacciones específicas DNA-proteína.

En 1981 se determinó la estructura cristalina de la proteína Cro. Se trata de un homodímero de subunidades de 66 residuos, plegadas en forma de tres regiones de hélice α y tres cadenas β (Figura 26.28). Los estudios de construcción de modelos demostraron que dos de las hélices, que se indican en la figura con los números 2 y 3, podían encajar dentro del surco principal de la doble hélice del DNA. Estas dos hélices están separadas por una vuelta β corta, formando un motivo hélice-vuelta-hélice del tipo que se ha descrito antes para la proteína CRP (véase la página 1132). En el dímero Cro las dos hélices número 3 están separadas por 3.4 nm, que es la longitud de una vuelta de la doble hélice de DNA. Esta distancia sugirió que las dos subunidades se unen al mismo lado de la hélice, en lugares adyacentes del surco principal, de manera que las hélices número 3 se sitúan longitudinalmente en los surcos. Este modelo se vio claramente respaldado por los experimentos de protección de la metilación y la etilación, que identificaron los grupos funcionales del DNA en estrecho contacto con la proteína. Obsérvese en la Figura 26.26 que cada lugar operador es un palíndromo imperfecto. En consecuencia, cada una de las dos hélices número 3 está en contacto con una serie de bases ligeramente diferentes.

La secuencia de aminoácidos dentro de las hélices 2 y 3, y entre ellas, presenta una homología notable con las correspondientes secuencias de una amplia familia de proteínas de unión al DNA con especificidad de secuencia, pero *no* con las proteínas de unión al DNA que no presentan una preferencia de secuencia. Esta observación sugirió que el motivo hélice-vuelta-hélice es un ele-

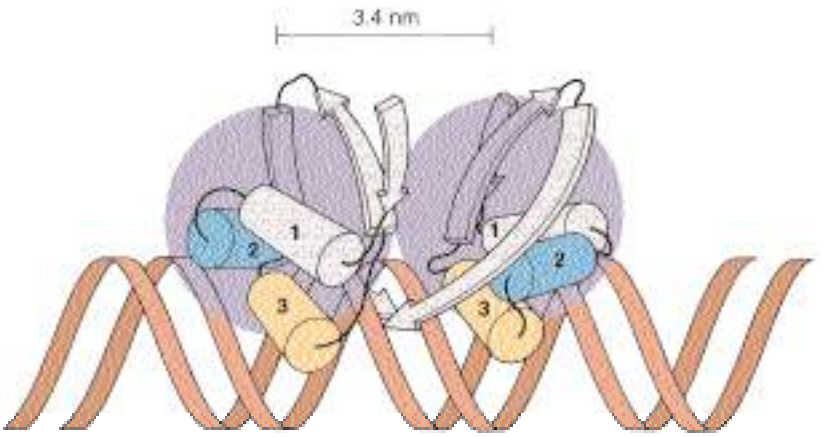


FIGURA **26.28**

Estructura del complejo dímero Cro-operador.

Tomado de M. Ptashne, *A Genetic Switch: Gene Control and Phage λ*. (Cambridge, Mass.: Cell Press & BSI, 1986).

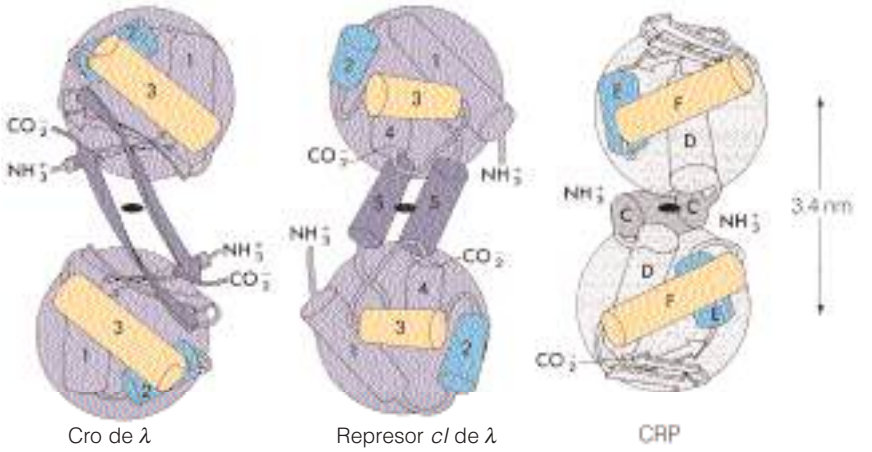


FIGURA **26.29**

Caras de unión del DNA de Cro de λ, el represor cI de λ y la CRP, en que se observa el motivo hélice-vuelta-hélice. Este motivo incluye las hélices 2 y 3 de Cro y de cI, y las hélices E y F de la CRP. Las elipses negras señalan los centros de simetría.

Cortesía de T. A. Steitz e I. T. Weber.

mento estructural evolutivo común de las proteínas reguladoras de la transcripción, al menos en los procariotas. Obsérvese que el represor *lac* contacta también con el DNA en un motivo hélice-vuelta-hélice (Figura 26.20). Además, algunas proteínas eucariotas utilizan este motivo para contactar con el DNA (Capítulo 28). Un motivo diferente, el **dedo de zinc**, está presente en un gran número de proteínas de unión al DNA de los eucariotas (y en unas pocas proteínas procariotas conocidas). Más recientemente, se han descrito otros patrones estructurales de proteínas de unión al DNA, incluyendo la hélice-bucle-hélice y la cremallera de leucina. Estos motivos se considerarán en el Capítulo 28.

La proteína receptora de cAMP tiene un motivo hélice-vuelta-hélice en sus hélices E y F, como se mencionó en la página 1132. Una vez demostrado que la estructura tridimensional del represor cI de λ tiene un motivo hélice-vuelta-hélice, parecía probable que este tipo de estructura interviniera en la unión al DNA de todas estas proteínas. En la Figura 26.29 se muestran las semejanzas tridimensionales relevantes para Cro, CRP y el represor cI. Las homologías de secuencia de aminoácidos entre estas regiones se muestran en la Figura 26.30 para Cro y cI. Obsérvese que las secuencias aunque similares, no son idénticas. Si fueran idénticas, no podríamos explicar de qué manera difieren los represores Cro y cI en sus respectivas afinidades por los diferentes operadores. El represor cI contiene un determinante de unión adicional, un par de "brazos" o segmentos polipeptídicos cortos que se extienden a partir de la hélice 1 y que se observan en la Figura 26.1, alrededor de la hélice y formando contactos con el otro lado de la doble cadena de DNA. Estos brazos explican probablemente por qué cI se une de manera más intensa que Cro a sus operadores.

La hélice α-3 se denomina **hélice de reconocimiento**, debido a que su posición profunda dentro del surco principal le permite entrar en contacto con bases específicas del DNA y determinar, por tanto, la especificidad de secuencia de la unión. La hélice α-2 está en contacto fundamentalmente con los fosfatos del DNA. Estos contactos electrostáticos refuerzan la unión pero no contribuyen a la especificidad. En favor del concepto de que α-3 actúa como hélice de reconocimiento está el hecho de que la mayoría de las mutaciones de *cI* que reducen la unión específica del represor al operador del DNA modifican la secuencia de aminoácidos de esta región de la proteína.

Los análisis cristalográficos de los respectivos complejos DNA-proteína explican cómo se pueden unir Cro y cI a los mismos lugares operadores con diferentes afinidades de unión. Como se muestra en la Figura 26.31, los residuos comunes de ambas proteínas están en contacto con los elementos de las secuencias de DNA que son comunes a todos los operadores. En ambas proteínas,

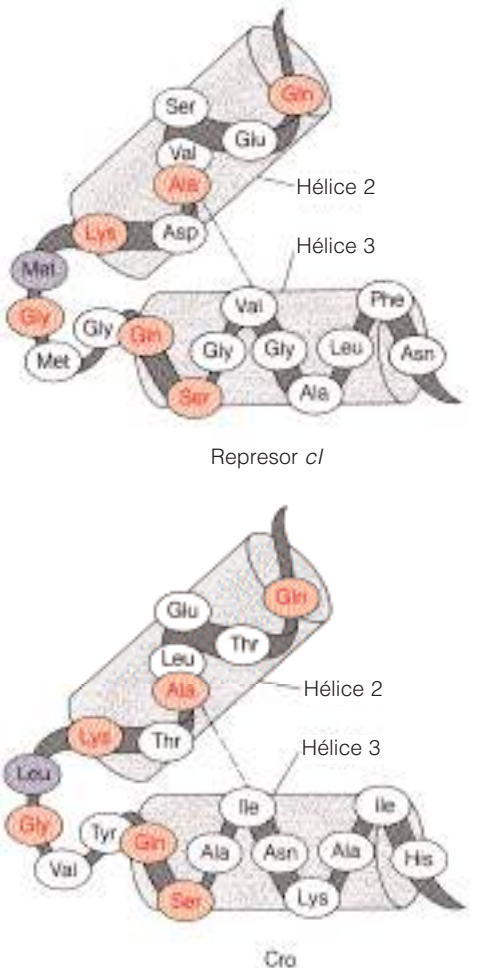


FIGURA **26.30**

Residuos conservados en las hélices de unión al DNA del represor cI y de Cro de λ. Las sustituciones conservativas se indican en morado y las identidades en rosa. En ambas proteínas, la alanina de la hélice 2 contacta con un residuo de la hélice 3, que facilita la colocación de las hélices una respecto a la otra.

Tomado de M. Ptashne, *A Genetic Switch: Gene Control and Phage λ*. (Cambridge, Mass.: Cell Press & BSI, 1986).

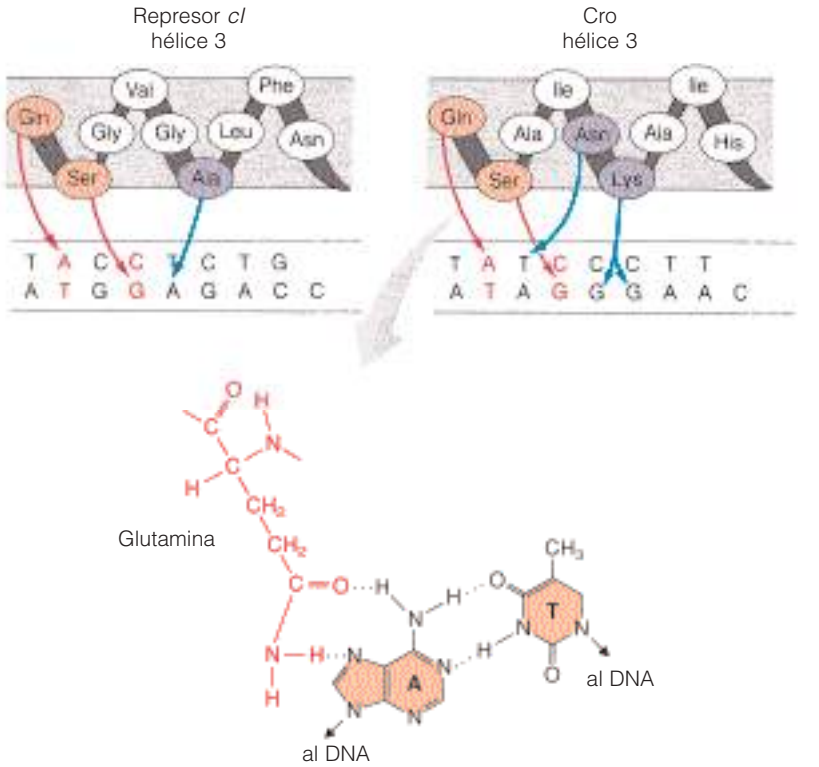


FIGURA **26.31**

Contactos específicos aminoácido-nucleótido para los represores cI y Cro. Los residuos conservados (en rosa) se unen a los nucleótidos comunes a todos los operadores, y hay residuos específicos (en morado) que se unen a los nucleótidos no conservados en los operadores. También se muestra la estructura de un residuo de glutamina en contacto con un par de bases A-T.

Tomado de M. Ptashne, *A Genetic Switch: Gene Control and Phage λ*. (Cambridge, Mass.: Cell Press & BSI, 1986).

El motivo hélice-vuelta-hélice se utiliza mucho en las proteínas de regulación de la transcripción procariota. Se establecen contactos específicos entre las bases del surco principal del DNA y los aminoácidos de la hélice de reconocimiento.

un residuo de glutamina interacciona con un par de bases A-T, como se muestra. El represor cI establece la especificidad a través de un contacto en O_R1 con un residuo de alanina, mientras que Cro puede estar en contacto con tres pares de bases específicos de O_R3, con residuos particulares de asparagina y lisina. También, dado que las dos hélices α-3 se encuentran más juntas en Cro (2.9 nm) que en cI (3.4 nm), las orientaciones de estas hélices con respecto a los surcos principales del DNA operador son bastante diferentes.

REGULÓN SOS: ACTIVACIÓN DE OPERONES MÚLTIPLES MEDIANTE UN CONJUNTO COMÚN DE SEÑALES AMBIENTALES

¿De qué forma se inactiva el represor cI de λ cuando se escinde el profago y se inicia un ciclo de crecimiento lítico? Se sabe que diversos tratamientos que dañan al DNA inducen profagos λ, como por ejemplo la radiación ultravioleta, la inhibición de la replicación del DNA, y el daño químico al DNA. Evidentemente, el virus encuentra ventajoso abandonar una célula dañada, como las ratas abandonan un barco que se hunde. Dada la semejanza del control genético de los sistemas λ y *lac*, los investigadores buscaron una molécula pequeña, tal vez un nucleótido, que se acumulara después de estos tratamientos y que pudiera ser el ligando que se une a cI para inactivarlo. Sorprendentemente, se observó que el represor λ se inactivaba mediante un mecanismo muy distinto, la ruptura proteolítica. El análisis de esta reacción de ruptura evidenció el sistema SOS descrito en el Capítulo 25 como uno de los elementos de la reparación del DNA propensa a errores, en el que los genes se controlan por un sistema de un único represor-operador. Esta serie de genes no ligados, regulados mediante un mecanismo común, se denomina **regulón**. Los genes del choque térmico, que se activan todos por un aumento transitorio de la temperatura, constituyen otro regulón.

Los elementos de control del regulón SOS de *E. coli* son los productos de los genes *lexA* y *recA*. Hemos encontrado ya antes la proteína RecA, en su función

de estimulación del apareamiento de las cadenas de DNA durante la recombinación. Cabe destacar que esta pequeña proteína tiene una actividad enzimática, además de las actividades involucradas en la recombinación. Cuando se une al DNA de una sola cadena, puede estimular la ruptura proteolítica de las proteínas codificadas por *cI*, *lexA* y *umuD*. LexA es un represor que se une al menos a 15 operadores diferentes dispersos en el genoma de *E. coli* (Figura 26.32). Cada operador controla la transcripción de una o más proteínas que facilitan a la célula la respuesta tras un daño ambiental que pudiera alterar el aparato genético. Estas proteínas son los productos de los genes *uvrA* y *uvrB*, que intervienen en la reparación por escisión, *umuC,D*, que intervienen en la mutagénesis propensa a errores, *sulA*, que participa en el control de la división celular, *dinA*, el gen estructural de la DNA polimerasa II, el propio *recA*, el propio *lexA*, y varios genes de función desconocida, como *dinB* y *dinF*.

En una célula sana, *lexA* y *recA* se expresan en un grado bajo, con la producción de una proteína LexA suficiente para desactivar por completo la síntesis de los demás genes SOS. La proteína LexA no consigue abolir por completo la transcripción de *lexA* ni la de *recA*. El desencadenante que activa el sistema SOS tras un daño es el DNA de una sola cadena. Como hemos visto, la radiación UV genera estructuras de DNA con huecos, y lo mismo ocurre con otras condiciones que inducen el sistema SOS. La unión de RecA en un hueco activa la proteólisis mediante un mecanismo que todavía no está claro. Las concentraciones intracelulares de LexA disminuyen, eliminando la barrera de LexA a la transcripción de *recA*. La proteína RecA se acumula en grandes cantidades. La ruptura simultánea de la proteína LexA activa la transcripción de todos los genes que están bajo el control de *lexA*. En un λ lisogénico, está estimulada también la ruptura del represor cI de λ, con lo que se activa la escisión y replicación del profago, como se ha comentado antes.

La secuenciación de los operadores que responden a LexA ha producido una secuencia de consenso, con 7 bases muy conservadas en una región de 20 pares de bases. Sin embargo, diferentes genes sensibles a LexA tienen esta se-

El regulón SOS se activa por el daño del DNA, que estimula a la RecA para que produzca la ruptura proteolítica de los represores LexA y cI de λ.

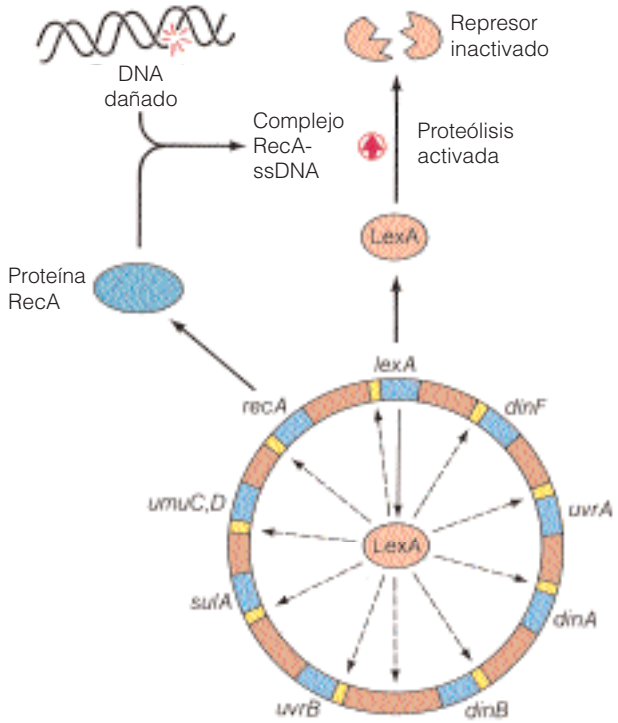


FIGURA **26.32**

Regulón SOS. En la figura se muestran las localizaciones en el cromosoma de *E. coli* de algunos de los genes controlados por el represor LexA. *dinA* es el gen estructural de la DNA polimerasa II, mientras que *dinB* y *dinF* son genes *in*ducibles por el *d*año cuya función se desconoce. El represor LexA (en rosa) se inactiva por la proteólisis, que se potencia de algún modo por un complejo de la proteína RecA (en azul) y del DNA de cadena única.

cuencia situada en lugares muy diferentes respecto al lugar de inicio de la transcripción. En consecuencia, parece que la localización exacta del represor unido no es un aspecto crucial para garantizar que se inhiba la transcripción.

OPERONES BIOSINTÉTICOS: REPRESORES ACTIVADOS POR EL LIGANDO Y ATENUACIÓN

El operón lactosa interviene en el catabolismo de un sustrato. En consecuencia, los productos de los genes no son necesarios, a no ser que esté presente el sustrato para ser consumido. Una situación diferente es la que se da en los genes cuyos productos catalizan la biosíntesis, por ejemplo, de un aminoácido. Dado que la biosíntesis consume energía, a la célula le resulta ventajoso utilizar el aminoácido preformado, si lo hay. En consecuencia, el objetivo regulador es reprimir la actividad de los genes, mediante la *desactivación* de la síntesis de enzimas de la ruta cuando se dispone del producto final de ésta. La regulación del operón *trp* de *E. coli*, que controla las cinco reacciones que van del ácido corísmico al triptófano (véase la Figura 21.14), pone de manifiesto dos formas de conseguirlo: (1) un diseño del represor en el que la unión de una molécula pequeña de ligando *activa* al represor, en vez de inactivarlo, y (2) la terminación prematura de la transcripción.

El represor *trp* inhibe la síntesis de triptófano mediante la unión como complejo represor-triptófano al operador *trp*, bloqueando la transcripción.

El operón *trp* está formado por cinco genes estructurales adyacentes cuya transcripción está controlada por una región reguladora común promotor-operador (Figura 26.33). El represor *trp*, una proteína de 58 kilodalton, codificada por el gen no adyacente *trpR*, se une a un ligando de bajo peso molecular, el triptófano. Sin embargo, en este caso, el complejo proteína-ligando es la forma *activa* de la proteína, que se une al operador y bloquea la transcripción. Cuando las concentraciones intracelulares de triptófano disminuyen, el complejo ligando-proteína se disocia y la proteína libre ("aporrepresor") abandona el operador, con lo que se activa la transcripción. Si denominamos a la lactosa como un inductor en un sistema catabólico, parece lógico denominar al triptófano **correpresor** en este sistema anabólico.

La estructura cristalina del complejo represor *trp*-DNA presenta un motivo hélice-vuelta-hélice, comparable al que se observa en los represores de λ, Cro, cI,

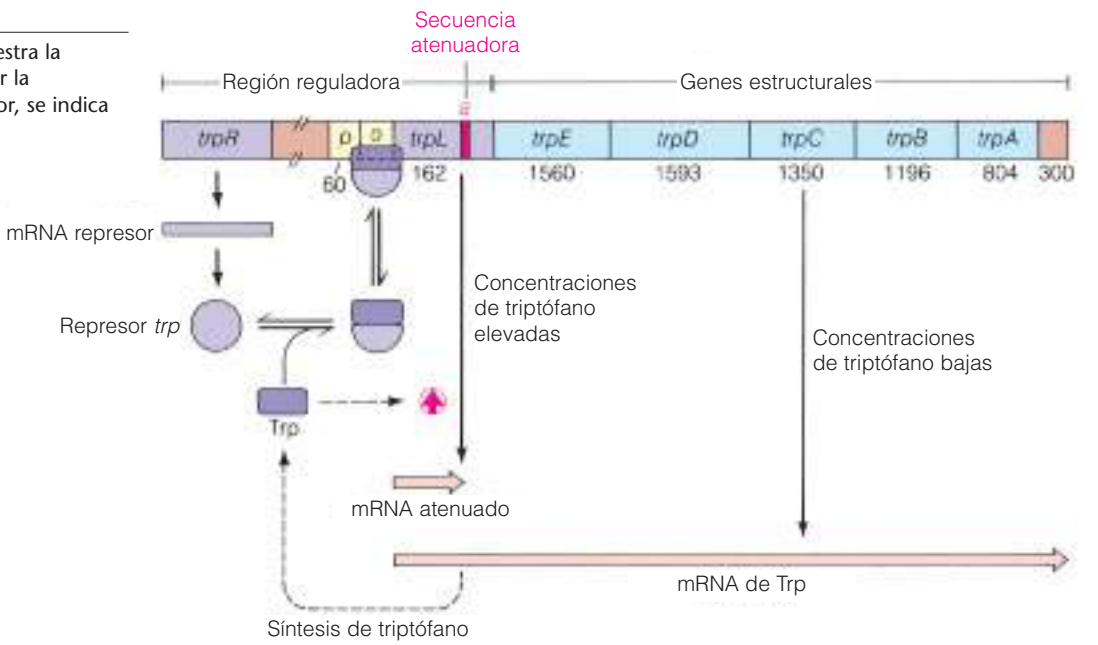


FIGURA **26.33**

Operón *trp*. En la figura se muestra la regulación por el represor *trp* y por la atenuación. *trpa*, el lugar atenuador, se indica en rojo.

y *lac* (Figura 26.34); la unión de triptófano a esta proteína reorienta las hélices para activar la unión al DNA. Es de destacar que este modelo no presenta contactos directos entre residuos de las hélices de reconocimiento y bases específicas del DNA. Se ha propuesto que las moléculas de agua unidas establecen contactos con especificidad de secuencia entre los aminoácidos de la hélice de reconocimiento y los nucleótidos del operador.

El operón *trp* tiene una característica reguladora adicional, que actualmente se sabe que interviene en el control de numerosos operones biosintéticos. Charles Yanofsky observó que las actividades de las enzimas *trp* variaban en un margen de 600 veces en distintas condiciones fisiológicas, más de lo que podía explicar un mecanismo represor-operador por sí solo. El análisis reveló un segundo mecanismo, denominado *atenuación*, que comporta una terminación temprana de la transcripción del operón *trp* en condiciones de abundancia de triptófano. Obsérvese en la Figura 26.33 la secuencia de 162 nucleótidos denominada *trpL*, la región líder del *trp*. Un lugar denominado *a*, el atenuador, está situado a 133 nucleótidos del extremo 5′ de la secuencia *trpL*. Cuando las concentraciones de triptófano son altas, la transcripción termina en *a*, para dar lugar a un transcrito atenuado de 133 nucleótidos, en vez del mRNA completo del *trp* de 7000 nucleótidos. Los genes estructurales no se transcriben, por lo que no se sintetiza triptófano.

Un elemento crucial para comprender el mecanismo de la atenuación es la presencia de cuatro secuencias de oligonucleótidos en la región líder del *trp*, que son capaces del apareamiento de bases en estructuras de bucle troncal en el transcrito de RNA (Figura 26.35). En la conformación más estable (Figura 26.36a), la región 1 se aparea con la 2, y la región 3 con la 4, para dar dos bucles troncales. La estructura 3-4, que va seguida de ocho U, es un terminador eficaz de la transcripción, ya que se parece a la estructura del terminador independiente del factor, que se muestra en la Figura 26.15.

Cuando las concentraciones de triptófano son bajas (Figura 26.36b), la formación del bucle troncal 3-4 se inhibe, y la terminación no se produce en el lugar de atenuación. Obsérvese que la región 1 contiene dos codones de triptófano (véase la Figura 26.35). En los procariotas, la traducción está acoplada a la

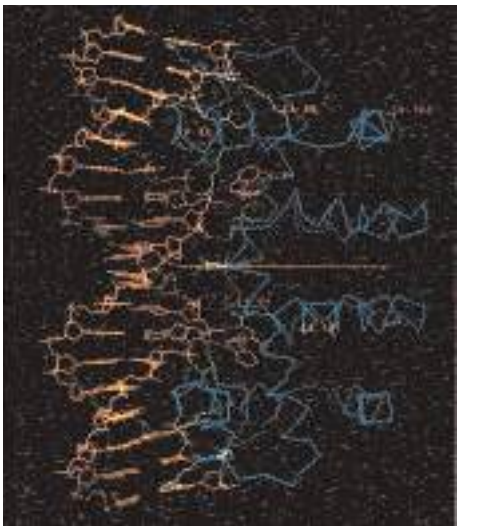


FIGURA **26.34**

Modelo del complejo represor-operador *trp*. El DNA se indica de color dorado, el rastro de carbono α del armazón del represor se indica en azul, y las cadenas laterales que contactan con el operador se muestran de color verde. El triptófano ligado se indica de color rojo.

Cortesía de P. B. Sigler de Z. Otwinowski et al., *Nature* (1988) 335:321-443, Macmillan Magazines, Inc.

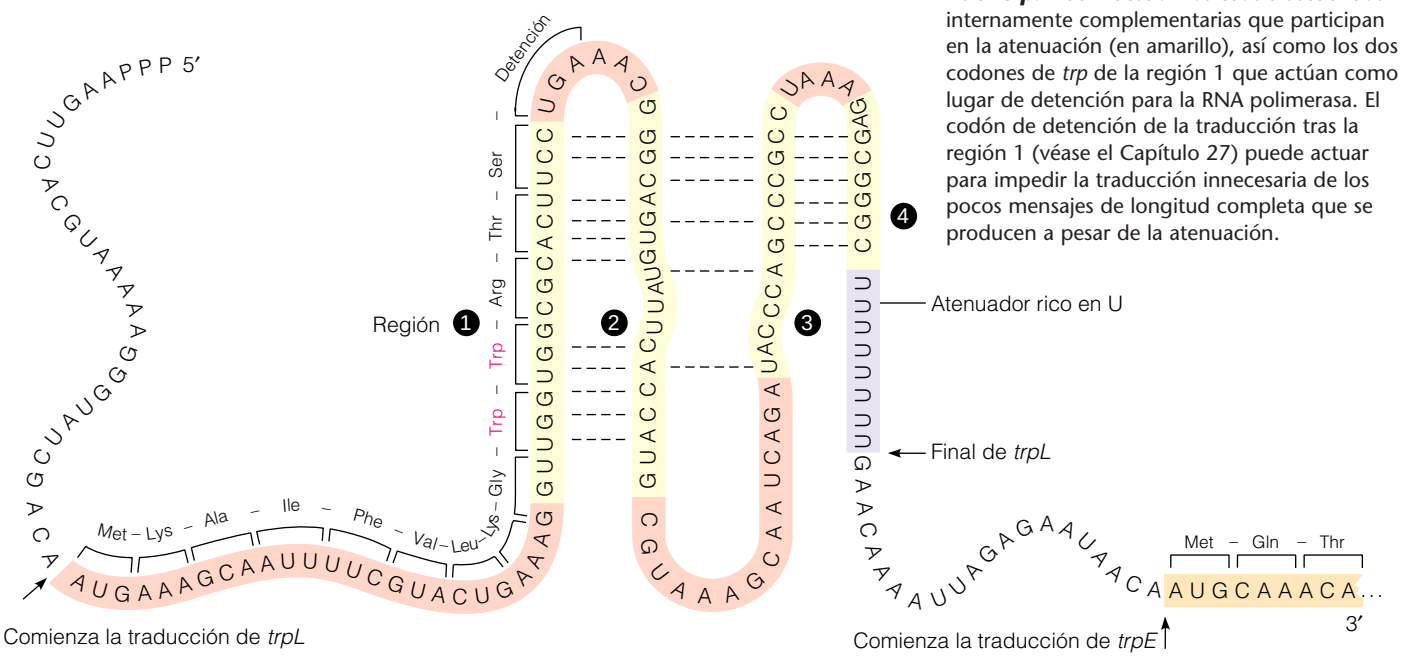
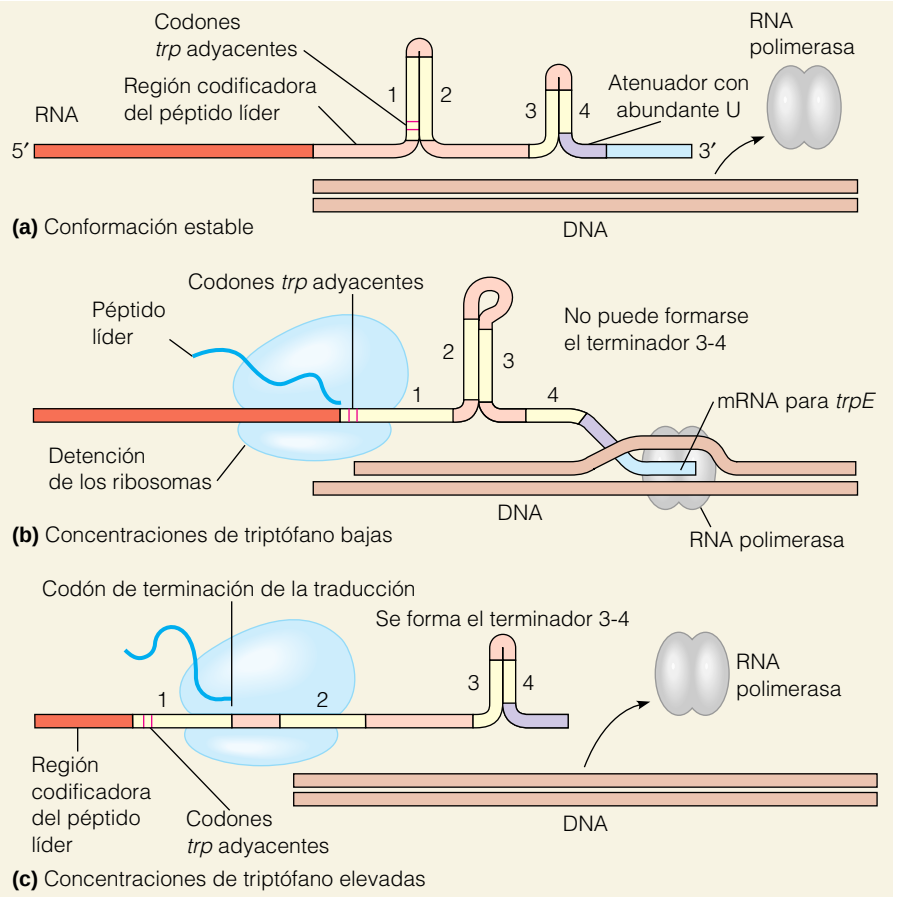


FIGURA **26.35**

Secuencia de bases del RNA de la región líder *trp*. Se muestran las cuatro secuencias internamente complementarias que participan en la atenuación (en amarillo), así como los dos codones de *trp* de la región 1 que actúan como lugar de detención para la RNA polimerasa. El codón de detención de la traducción tras la región 1 (véase el Capítulo 27) puede actuar para impedir la traducción innecesaria de los pocos mensajes de longitud completa que se producen a pesar de la atenuación.

FIGURA **26.36**

Mecanismo de atenuación en el operón *trp*. **(a)** Conformación más estable del mRNA líder. **(b)** Conformación del mRNA líder a concentraciones bajas de triptófano. **(c)** Conformación del mRNA líder a concentraciones elevadas de triptófano.



transcripción, por lo que un ribosoma puede comenzar a traducir un mensaje a partir de su extremo 5′ mientras que el mensaje está siendo sintetizado aún en su extremo 3′. En este caso, el ribosoma se detiene al llegar a los dos codones del triptófano, puesto que no hay suficiente triptofanil-tRNA para traducirlos. La presencia del ribosoma voluminoso impide el apareamiento de bases de la región 1 con la 2, con lo que esta última queda libre para formar un apareamiento de bases con la 3. Cuando la región 3 deja de estar disponible para formar pares de bases con la 4, no puede formarse el bucle troncal 3-4 terminador de la transcripción, y se sintetiza todo el mensaje. Y a la inversa, cuando el triptófano es abundante (Figura 26.36c), el ribosoma no se detiene, con lo que ocluye la región 2 y permite que se forme la estructura de bucle troncal 3-4, que da lugar a la terminación de la transcripción en el lado 3′ de 3-4.

Ni el sistema *trpR* ni el atenuador son simplemente sistemas de activación-desactivación. Ambos responden de una forma graduada a la concentración intracelular de triptófano. A pesar de que ambos sistemas se controlan por la misma señal, la acción de dos sistemas de control diferenciados amplía notablemente la gama de posibles velocidades de transcripción del operón *trp*, proporcionando la máxima eficacia a la regulación de estos genes. A una concentración baja de triptófano, la interacción represor-operador es el mecanismo principal de regulación, mientras que los efectos de la atenuación son más importantes a concentraciones moderadas o altas de triptófano.

Aunque el modelo presentado fue propuesto inicialmente tan sólo mediante la inspección de la secuencia líder del *trp*, actualmente está respaldado por otros tipos de pruebas. Una confirmación importante es la que se basa en la

existencia en otros operones controlados por atenuación de "secuencias de detención", secuencias en las que el movimiento de un ribosoma se inhibe a una concentración baja del producto del operón. Entre ellos se encuentran los operones bacterianos para la síntesis de leucina, con cuatro codones de leucina adyacentes en la secuencia líder, y de histidina, con siete.

Se ha descrito en *Bacillus subtilis* el control de la transcripción a través de un mecanismo terminación-antiterminación bastante diferente en la región líder. La síntesis de las aminoacil-tRNA sintetasas está controlada por el nivel de aminoacilación del tRNA conocido. Por ejemplo, en las células que carecen de tirosina, la síntesis de tirosil-tRNA sintetasa se activa por un mecanismo antiterminación que permite que se produzca la transcripción pasado un lugar potencial de terminación en una región líder. En cambio, la terminación se produce de forma eficaz cuando la mayor parte del tRNA adecuado está cargado con tirosina y no existe necesidad de sintetizar más aminoacil-tRNA sintetasa. El mecanismo implica una estructura secundaria compleja de la secuencia líder hacia arriba para *tyrS*, el gen estructural de la tirosil-tRNA sintetasa. Como se muestra en la Figura 26.37, el $tRNA^{Tyr}$ descargado puede estabilizar una estructura antiterminadora en el RNA líder, por medio de interacciones de apareamiento de bases entre el anticodón y el mRNA, así como el extremo 3′ del tRNA descargado. Estas últimas interacciones están impedidas cuando el extremo 3′ del tRNA está aminoacilado. De esta forma, se produce la lectura completa y el gen se transcribe. En cambio, el tRNA aminoacilado no puede interaccionar de la misma forma y esto permite al líder formar un terminador, que impide la transcripción del gen.

La atenuación es un mecanismo de regulación en el que el posicionamiento del ribosoma sobre un mRNA determina si la transcripción de un operón terminará antes de que se inicie la transcripción de los genes estructurales.

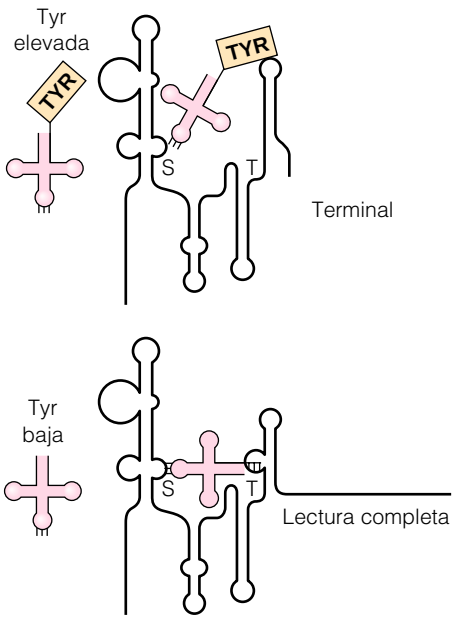


FIGURA **26.37**

Modelo de la inducción del gen *tyrS* de *B. subtilis* por el $tRNA^{Tyr}$ descargado. La lectura completa que conduce a la expresión génica está favorecida cuando $tRNA^{Tyr}$ está descargado, como se describe en el texto.

Cortesía de T. M. Henkin, *Mol. Microbiol.* (1994) 13:381-387. © 1994 Blackwell Science, Ltd.

OTRAS FORMAS DE REGULACIÓN

Los análisis bioquímicos de los sistemas de regulación *lac*, fago λ, *trp* y SOS han confirmado los aspectos centrales planteados por Jacob y Monod, es decir, que la expresión de los genes se regula a nivel de la transcripción y que las interacciones proteína específica-DNA controlan la velocidad de la transcripción, fundamentalmente mediante la regulación de la iniciación de la misma. Estos análisis han revelado también diversas variaciones importantes de ese tema común, como el control positivo de la iniciación, los operadores y promotores intercalados, la unión de dos proteínas al mismo lugar, los operones múltiples controlados por el mismo represor, la inducción del doblado del DNA mediante proteínas reguladoras, y la terminación temprana como mecanismo regulador. Así pues, parece claro que el modo de regulación represor-operador está lejos de ser monolítico. Describiremos brevemente otros dos operones bien estudiados que presentan otras características.

El operón galactosa

El **operón galactosa** (Figura 26.38) controla la utilización de la galactosa, uno de los productos de la degradación de la lactosa producida por las enzimas del operón *lac*. El operón *gal* se regula negativamente por un represor de una forma comparable a la regulación de *lac*, excepto que el gen del represor (*galR*) no está ligado a los genes estructurales. El aspecto novedoso de *gal* radica en la existencia de promotores solapados (S1 y S2), que dan lugar a transcritos que se inician con tan sólo cinco nucleótidos de separación. La transcripción a partir del punto inicial denominado S1 se activa por el catabolito. In vivo, S1 no se manifiesta cuando hay glucosa, e in vitro, debe estar presente el complejo cAMP-CRP para que se inicie la transcripción a partir de este promotor. El otro promotor, S2, se utiliza cuando hay glucosa. Los detalles de esta doble regulación no están claros, pero es significativo que la galactosa tenga un destino biosintético

El operón galactosa se transcribe a partir de dos promotores solapados, lo que proporciona diversas señales reguladoras.

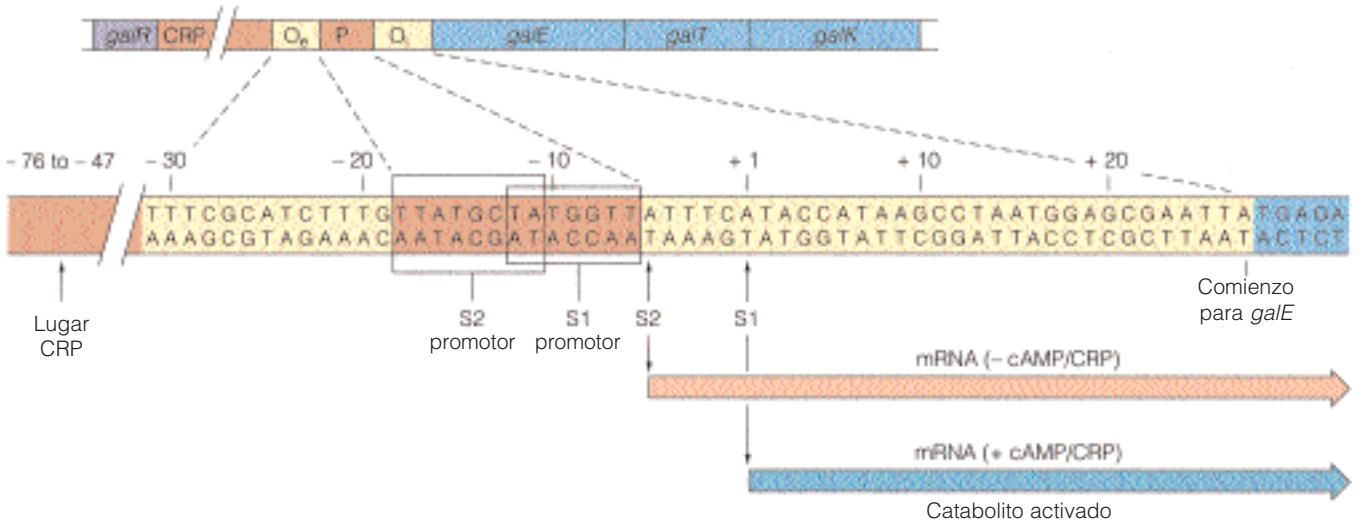


FIGURA **26.38**

Mapa del operón *gal* de *E. coli* y secuencia de nucleótidos de la región reguladora. Se indican de color marrón las regiones –10 de los dos promotores solapados. El lugar de inicio de la transcripción de cada promotor se indica con una flecha. *galR* = gen represor, *galE* = gen de la epimerasa, *galT* = gen de la transferasa y *galK* = gen de la quinasa.

además de su función como sustrato energético. La UDP-galactosa se emplea en la síntesis de los lipopolisacáridos de la pared celular. Es posible que el segundo promotor se encargue de garantizar la disponibilidad de UDP-galactosa a pesar de que la célula esté utilizando glucosa como su fuente de energía principal.

El operón arabinosa

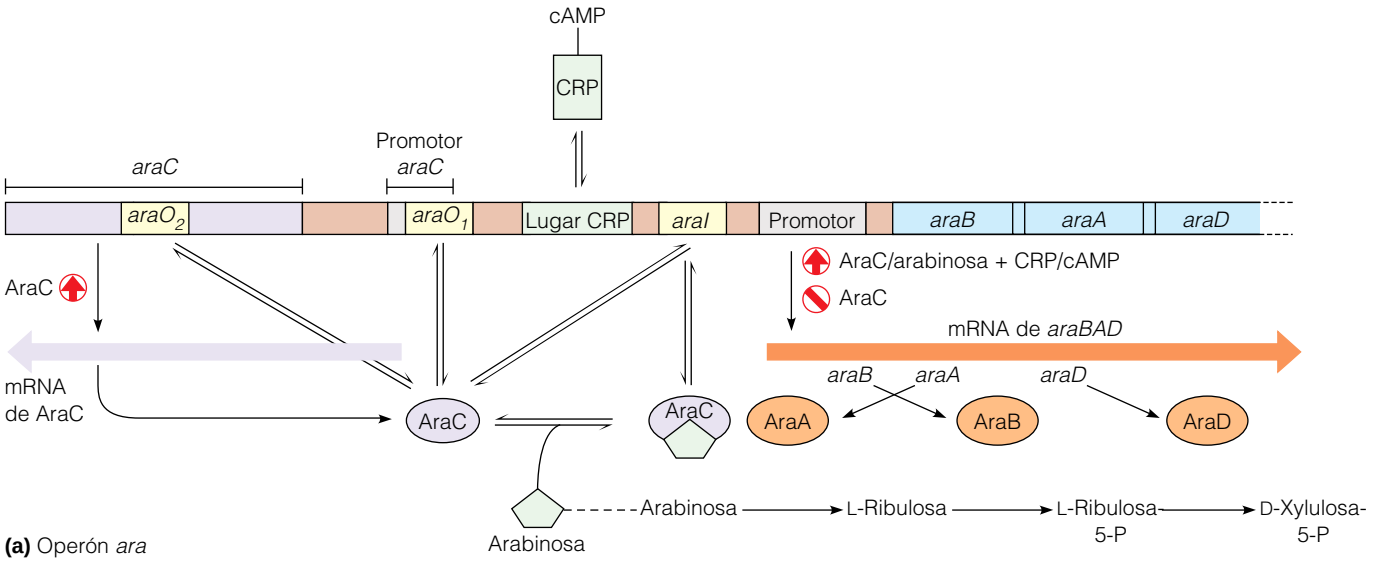
El **operón arabinosa** presenta otra característica de regulación poco habitual: la acción de una sola proteína como regulador de la transcripción tanto positivo como negativo en función de la unión de determinados ligandos (Figura 26.39). Los tres genes estructurales de este operón, *araB*, *araA* y *araD*, codifican enzimas que convierten la arabinosa en xilulosa-5-fosfato, un intermediario de la ruta de las pentosas fosfato (véase la página 573). El gen *araC* codifica una proteína reguladora que se une a la arabinosa, el inductor del operón. La unión del complejo AraC-arabinosa a un lugar denominado *araI* activa la transcripción de *araBAD*, pero sólo cuando el complejo cAMP-CRP está unido en un lugar adyacente. Así pues, mientras que el operón *lac* requiere la unión de una proteína y la disociación de otra para alcanzar su máxima transcripción, el operón *ara* requiere que se unan dos proteínas en lugares adyacentes.

Cuando las concentraciones de arabinosa son bajas (Figura 26.39a), la proteína AraC actúa como represor y se une en dos lugares operadores, $araO_1$ y $araO_2$, así como al *araI*, formando una estructura de bucle. La unión al $araO_1$ inhibe la transcripción del propio gen *araC*. En consecuencia, el *araC* se autorregula a nivel de su propia transcripción. Las moléculas de AraC unidas al $araO_2$ y al *araI* interaccionan entre sí para formar un bucle de DNA. Esta estructura causa la represión de los genes *araBAD*. El empleo de la misma proteína como elemento de control positivo y negativo es poco común, pero no carece de precedentes. Recuérdese que el represor cI de λ puede activar o inhibir su propia síntesis, en función de los lugares del operador a los que se una.

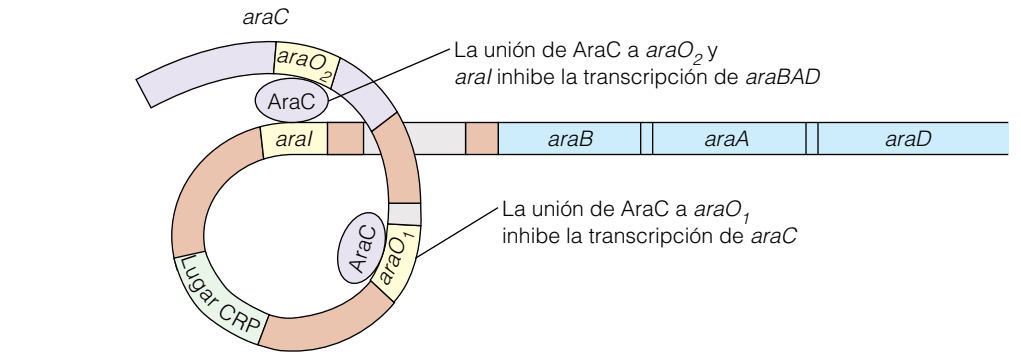
El operón arabinosa se controla por una proteína que puede actuar como un regulador de la transcripción positivo o negativo, en función de si está unida o no a ella la arabinosa.

Control mediante RNA antisentido

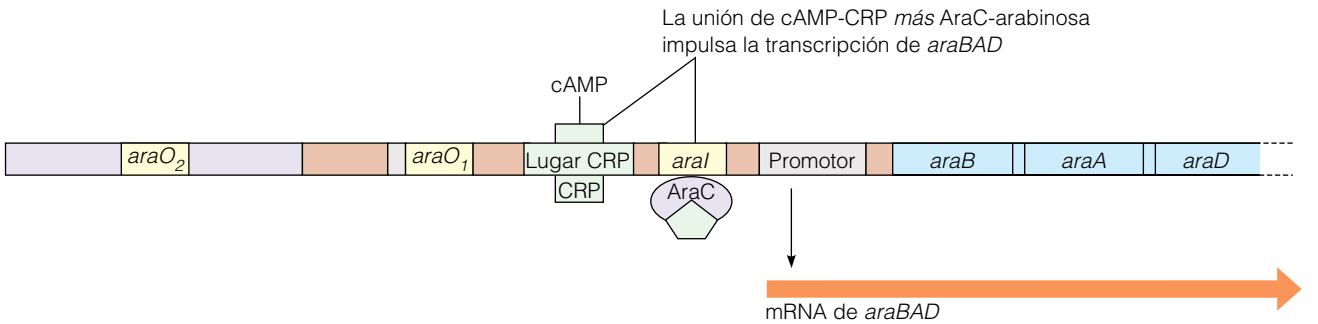
Para no llegar a la conclusión de que toda la regulación de la transcripción procariota es simplemente una cuestión de represores, operadores y activadores de la transcripción, mencionaremos otros dos mecanismos de regulación. Aunque es más un regulador de la traducción que de la transcripción, el **RNA antisentido** controla la expresión de varios genes procariotas y eucariotas. El RNA antisentido es el producto de la transcripción de la cadena del DNA con



(a) Operón *ara*



(b) Regulación negativa a concentraciones de arabinosa bajas



(c) Regulación positiva a concentraciones de arabinosa elevadas

FIGURA **26.39**

Operón *ara* de *E. coli*. **(a)** Visión general del operón y de sus elementos reguladores. **(b)** La AraC es un regulador negativo de la transcripción a concentraciones bajas de arabinosa. La unión de AraC al lugar $araO_1$ inhibe la transcripción de *araC* y proporciona, por tanto, un control de retroacción respecto a las concentraciones de AraC. La unión de AraC al $araO_2$ y al *araI* crea un bucle de DNA e inhibe la transcripción de *araBAD*, con lo que regula negativamente la utilización de arabinosa. **(c)** El complejo AraC-arabinosa es un regulador positivo de la transcripción a concentraciones elevadas de arabinosa. Las concentraciones elevadas de arabinosa impulsan la formación del complejo. Si hay CRP-cAMP unido al lugar CRP, la unión del complejo AraC-arabinosa al *araI* impulsa la transcripción de *araBAD*, con lo que facilita la utilización de arabinosa mediante las acciones de las enzimas AraB, AraA y AraD.

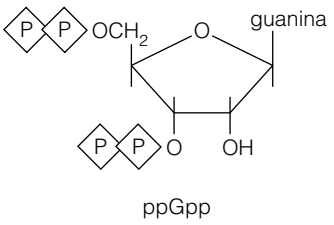
sentido, la cadena que no codifica la proteína. Cabe suponer que este RNA puede aparearse con una especie de mRNA, con lo que se inhibe la traducción de esa especie.

Un buen ejemplo de la regulación antisentido es la de los genes *ompC* y *ompF*, que codifican las proteínas de la membrana externa de *E. coli*. Estos genes están osmorregulados: las células responden al crecimiento en un medio de osmolaridad elevada desconectando la síntesis de la proteína OmpF y activando la síntesis de OmpC, con lo que la cantidad total de proteína se mantiene constante. El mecanismo propuesto para la desconexión del gen *ompF* es el que se muestra en la Figura 26.40. La osmolaridad elevada desencadena de algún modo la síntesis de un RNA antisentido, que es el producto del gen *micF*. Este RNA es complementario en parte de las secuencias del extremo 5′ del mRNA de *ompF*. El RNA de *micF* inactiva el mensaje *ompF*, probablemente alineándose con él y, de esta manera, formando in vivo un RNA de doble cadena. Las secuencias de iniciación de la traducción del mRNA de OmpF, que deben ser de una sola cadena para dirigir la traducción, se incluyen en esta doble hélice. Esto explica probablemente el bloqueo de la traducción del mensaje.

Otro gen regulado mediante el RNA antisentido es el *crp*, que es el gen estructural de la proteína receptora de cAMP. Además, el transposón Tn10 utiliza un mecanismo antisentido para regular la cantidad de su transposasa. Un enfoque prometedor en el campo de la quimioterapia es la producción de oligonucleótidos antisentido o de derivados modificados químicamente, que puedan introducirse en células humanas e inactivar determinados genes diana alineándose con un gen o mRNA y formando una estructura de doble cadena. Este enfoque está siendo investigado intensamente para el posible tratamiento de las enfermedades víricas y neoplásicas.

La respuesta estricta

El último mecanismo de control que presentamos, la **respuesta estricta**, se descubrió hace más de tres décadas, pero aún no se conoce con detalle. La síntesis de los RNA ribosómicos y de transferencia se inhibe en las bacterias cuando se bloquea la síntesis de proteínas por la falta de aminoácidos. Evidentemente, esta inhibición impide la producción innecesaria de la maquinaria de traducción cuando la síntesis proteica está bloqueada. Cuando no hay aminoácidos, un nucleótido regulador, **guanosina 3′,5′-tetrafosfato** (ppGpp), se acumula e inhibe de algún modo la síntesis de rRNA y tRNA. Una clase de mutantes, denominados *relajados*, no acumulan ppGpp en estas condiciones y no presentan la respuesta estricta; es decir, la ausencia de aminoácidos no produce la inhibición de la síntesis de rRNA o tRNA. No se conoce la acción del ppGpp en el control de la transcripción del gen del rRNA. Sin embargo, fenómenos como la transcripción ribosómica y la maduración del rRNA se conocen razonablemente bien, como veremos en el apartado siguiente.

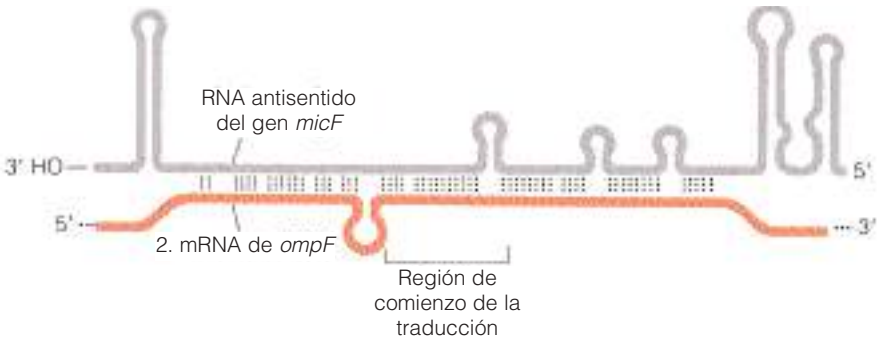


ppGpp

Guanosina 3′,5′-tetrafosfato

FIGURA **26.40**

Inactivación del mRNA de *ompF* mediante el apareamiento con un RNA antisentido del gen *micF*. Un cambio de osmolaridad estimula la transcripción del gen *micF*. El transcrito es en gran parte complementario de una región del RNA de *ompF* que incluye el lugar de inicio de la transcripción. Los bucles de horquilla situados dentro de las secuencias permiten la formación de pares de bases entre regiones complementarias de los dos mRNA, y de esta forma se impide que ambos transcritos actúen como moldes para la síntesis proteica.



Procesamiento posterior a la transcripción

RECAMBIO DEL mRNA

Un aspecto importante del metabolismo del RNA mensajero en los eucariotas es el de los fenómenos que se producen *después* de la transcripción, y que son necesarios para que los mensajes pasen del núcleo a sus lugares de uso en el citosol. Comentaremos estos fenómenos en el Capítulo 28. En los procariotas en cambio, los mRNA se utilizan directamente en la síntesis proteica. De hecho, como hemos indicado al considerar la atenuación, un mRNA en formación actúa como molde para la traducción, mientras todavía se encuentra en el proceso de síntesis.

El principal fenómeno posterior a la transcripción en el metabolismo de los mRNA procariotas es su propia degradación, que en la mayor parte de los casos es muy rápida. Hay algunos mRNA bacterianos, en especial los que codifican las proteínas de la membrana externa, que son de larga duración; sin embargo, la mayoría de los mensajes bacterianos tienen una semivida de tan sólo 2 ó 3 minutos. Este breve período de vida hace que los genes que se expresan deban transcribirse continuamente y que la mayor parte de las moléculas de mRNA sólo se traduzcan unas pocas veces. Aunque esto puede parecer un derroche de energía, concuerda con el estilo de vida de los procariotas, que necesitan adaptarse con rapidez a los cambios ambientales. Hemos indicado antes la ventaja selectiva de las bacterias que son capaces de expresar los genes de la utilización de la lactosa tan sólo cuando está presente un inductor. Por el mismo motivo, sería un derroche inútil el que la célula continuara produciendo estas proteínas una vez agotada la lactosa del medio. La rápida degradación del mRNA del *lac* garantiza que la síntesis derrochadora de energía de estas proteínas cesará en cuanto desaparezca la necesidad de las proteínas.

Aunque conocemos la inestabilidad del mRNA bacteriano desde hace más de tres décadas, todavía es sorprendentemente escaso nuestro conocimiento sobre la ruta de degradación. Es probable que existan mecanismos solapantes, con hidrólisis mediante nucleasas y fosforólisis mediante la polinucleótido fosforilasa. Sabemos que la degradación comienza a partir del extremo 5′, lo cual es importante, ya que la traducción comienza también en el extremo 5′. Si la degradación empezara en el extremo 3′, un ribosoma que empezara a actuar en el extremo 5′ podría no llegar nunca a un extremo 3′ intacto. Existen razones para pensar que la degradación del mRNA se inicia a veces con la acción de la ribonucleasa III, una enzima específica para el RNA de doble cadena, que podría romper las estructuras de bucle troncal y crear lugares para el ataque exonucleolítico. La RNasa III interviene de hecho en la maduración de ciertos mRNA de fagos cuando sufren el procesamiento posterior a la transcripción, pero no se sabe que esta intervención se produzca en los mRNA bacterianos.

PROCESAMIENTO POSTERIOR A LA TRANSCRIPCIÓN EN LA SÍNTESIS DE rRNA Y tRNA

Tanto los RNA ribosómicos como los RNA de transferencia se sintetizan en forma de transcritos de mayor tamaño (pre-rRNA y pre-tRNA, respectivamente), que luego sufren una ruptura en sus dos extremos, para dar lugar a los RNA maduros. La cantidad total de DNA que codifica estos RNA es de menos del 1% del genoma de *E. coli*, pero dada la inestabilidad del mRNA (que está codificado por el 99% restante), el rRNA y el tRNA constituyen alrededor del 98% del RNA total de una célula bacteriana. Es importante señalar también que la transcripción de los genes de los rRNA es muy eficaz cuando las células crecen rápidamente.

Las concentraciones intracelulares de ribonucleósidos trifosfato son aquí elementos importantes de control; el ATP, cuya concentración es elevada en las células que crecen rápidamente, activa la transcripción de los genes de los rRNA estabilizando los complejos promotor abierto relevantes.

Procesamiento del rRNA

El genoma de *E. coli* contiene siete operones diferentes para especies de rRNA. Cada uno de ellos codifica, en un solo transcrito, secuencias para una copia de cada uno de los rRNA de 16S, 23S y 5S (Figura 26.41). Dado que las tres especies se utilizan en cantidades iguales, es evidente la lógica que subyace en esta organización. Menos fácil de explicar es el hecho de que cada transcrito incluya también secuencias para una a cuatro moléculas de tRNA. Dado que los rRNA y los tRNA se utilizan en la síntesis proteica, las secuencias intercaladas de rRNA y tRNA pueden representar una forma de coordinar las velocidades de síntesis de estos RNA, pero no se han descubierto aún los mecanismos específicos.

El transcrito inicial de cada operón de rRNA es una molécula de RNA 30S de vida corta, que se muestra en la Figura 26.41. La acumulación anormal de esta especie en las cepas bacterianas con un déficit de RNasa III fue lo primero que sugirió una función de esta enzima en el procesamiento del rRNA. De hecho, un corte de la doble cadena en cada una de las dos regiones de bucle troncal gigantes libera los precursores de los rRNA 16S y 23S, y es probable que ocurra igual para el rRNA 5S. Los pasos posteriores de maduración requieren la presencia de proteínas ribosómicas concretas, que empiezan a ensamblarse en los RNA precursores mientras la transcripción continúa aún realizándose. Las secuencias de tRNA incluidas se procesan para dar los tRNA maduros, siguiendo las mismas rutas que se emplean para otras especies de tRNA.

Procesamiento del tRNA

Aparte de los tRNA incluidos en los transcritos de pre-rRNA, los demás tRNA se sintetizan en transcritos que contienen de uno a siete tRNA cada uno, rodeados todos ellos por secuencias de flanqueo largas. Los pasos de maduración se resumen en la Figura 26.42, utilizando como ejemplo el caso bien estudiado de la especie tRNA de tirosina de *E. coli* ($tRNA^{Tyr}$). En este caso, la maduración comienza (paso 1) con una endonucleasa que rompe en una estructura de bucle troncal en el lado 3′ de la secuencia del tRNA. Ello va seguido de la acción de la **ribonucleasa D** (paso 2), que lleva a cabo la ruptura exonucleolítica hasta un punto, a dos nucleótidos de la secuencia CCA en el extremo 3′. A continuación (paso 3), se crea el extremo 5′ por la acción de la **ribonucleasa P**, que deja un fosfato en la G del extremo 5′. Esta enzima crea una terminación 5′ en todas las

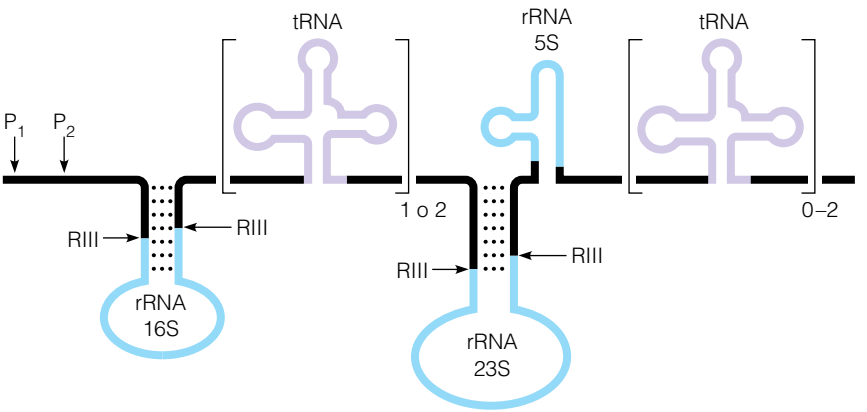


FIGURA **26.41**

Estructura del pre-rRNA 30S de *E. coli*. Se muestran las secuencias complementarias de los dos lugares promotores (P_1 y P_2), los lugares de ruptura de la RNasa III (RIII) que liberan las especies 16S y 23S, y las localizaciones de las secuencias de tRNA incluidas en el transcrito.

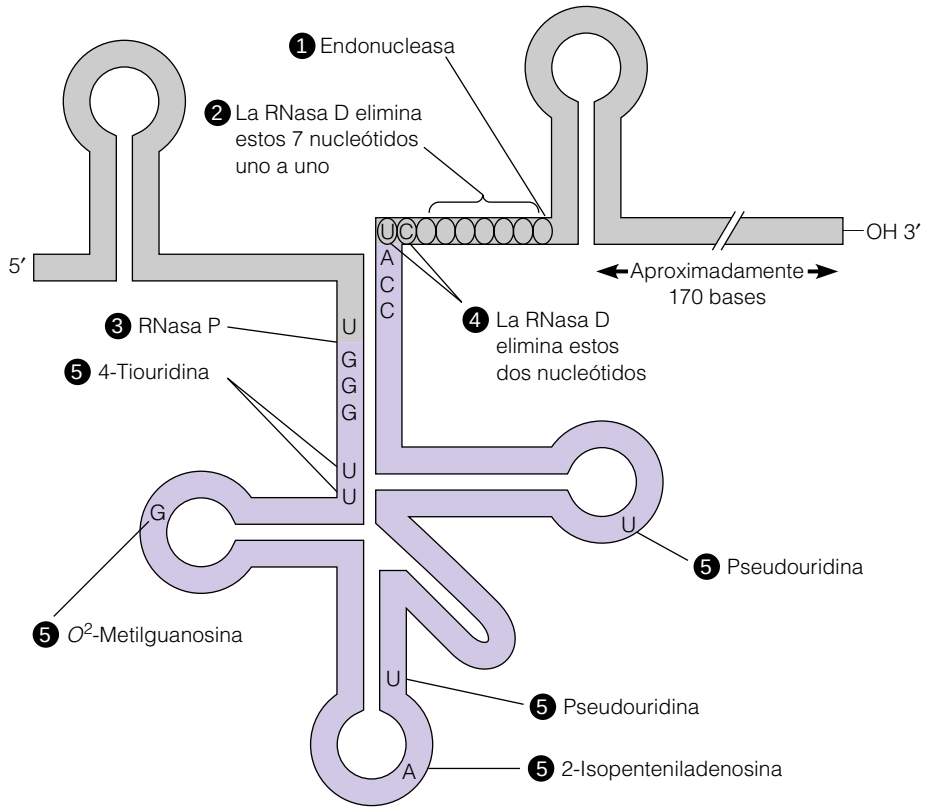


FIGURA **26.42**

Pasos en la modificación (1-4) que ocurren en la maduración del $tRNA^{Tyr}$ de *E. coli* a partir de su transcrito y bases modificadas (5) que se ven en el tRNA maduro. La secuencia de tRNA se indica de color morado.

moléculas de tRNA. No está claro qué características estructurales son reconocidas por la RNasa P, ya que en los lugares de ruptura se encuentran diferentes secuencias. La ribonucleasa P es una enzima sorprendente formada por una molécula de RNA de 377 nucleótidos y una molécula proteica de un M_r de alrededor de 20 000. Ambos componentes son necesarios para la actividad catalítica total, pero en condiciones no fisiológicas, la molécula de RNA sola es capaz de catalizar una ruptura exacta. Así pues, la ribonucleasa P es una ribozima, un miembro de la clase de enzimas de RNA que se han presentado en el Capítulo 11.

Una vez creado el extremo 5′ adecuado, la ribonucleasa D elimina los dos nucleótidos restantes del extremo 3′ (paso 4). En el caso de que se produzca un "recorte" excesivo por un control defectuoso de la actividad de la RNasa D, hay una enzima (CCA nucleotidil transferasa) que restablece el extremo CCA de cualquier tRNA de una forma no transcriptiva. Esta enzima reconoce específicamente el extremo 3′ de los tRNA que carecen del extremo CCA, y cataliza las reacciones secuenciales con un CTP, otro CTP y un ATP.

La formación de las bases modificadas (véanse los Capítulos 4 y 27) se produce en la etapa final, con metilaciones, tiolaciones, reducción del uracilo o dihidrouracilo, etcétera. En el ejemplo mostrado, las modificaciones son la formación de dos pseudouridinas, una 2-isopenteniladenosina, una O^2-metilguanosina, y una 4-tiouridina (paso 5). Se desconocen las funciones de la mayor parte de estas modificaciones, ya que muchos tRNA que carecen de estas modificaciones son totalmente activos in vitro.

Un proceso posterior a la transcripción adicional, denominado corte y empalme de intrones, está limitado casi exclusivamente a los eucariotas (aunque el corte y empalme de intrones está bien definido en unos pocos genes de los bacteriófagos). Por tanto, se pospone el estudio de este proceso hasta el Capítulo

Los transcritos bacterianos sufren un procesamiento posterior a la transcripción, que comporta la ruptura tanto endonucleolítica como exonucleolítica.

28. Otra modificación importante, descrita recientemente en eucariotas, es la aminoacilación dentro del núcleo. Es, evidentemente, un proceso de corrección de errores en el que se permite que salgan del núcleo y actúen en la síntesis de proteínas sólo a los tRNA cargados correctamente.

RESUMEN

Todo el RNA se sintetiza mediante el copiado, basado en un molde, de una cadena de DNA dentro de un gen catalizado por la RNA polimerasa. Las RNA polimerasas utilizan 5′-ribonucleósidos trifosfato como sustratos, y transcriben en la dirección 5′→3′. La selección de la cadena y el desenrollamiento y nuevo enrollamiento de la doble cadena lo realiza la enzima. La RNA polimerasa se une a un lugar promotor, mediante la formación de contactos específicos DNA-proteína, en los que interviene fundamentalmente la subunidad σ de la enzima. La mayoría de las iniciaciones de la transcripción son abortivas, pero tras una iniciación productiva, σ se disocia y se lleva a cabo la elongación por la RNA polimerasa bacteriana mediante la polimerasa central $\alpha_2\beta\beta'$. La transcripción es muy procesativa y termina mediante secuencias de DNA específicas, a veces con la participación de la proteína ρ. Una sola RNA polimerasa sintetiza todos los RNA procariotas, mientras que las células eucariotas contienen tres RNA polimerasas diferentes.

La transcripción está regulada por las acciones negativas y positivas de proteínas de unión al DNA con especificidad de lugar, denominadas represores y activadores. Los represores se unen a lugares operadores y bloquean la iniciación de la transcripción; los activadores se unen al DNA y estimulan la iniciación. Las afinidades de estas proteínas por el DNA están influidas por la unión de ligandos de bajo peso molecular que pueden actuar como inductores o correpresores. La mayor parte de las proteínas reguladoras de los genes procariotas se unen al DNA a través de una hélice α que se encuentra dentro del surco principal y que forma contactos específicos entre aminoácidos de la proteína y bases del DNA. Esta hélice forma parte del motivo estructural hélice-vuelta-hélice, en el que la segunda hélice establece interacciones sin especificidad de secuencia con el armazón azúcar-fosfato. Otro mecanismo regulador importante en los procariotas es la atenuación, en la que el posicionamiento de un ribosoma en traducción sobre un mRNA en formación determina si la síntesis de ese mRNA terminará o no antes de que se haya iniciado la transcripción de los genes estructurales del operón.

El procesado posterior a la transcripción implica la ruptura del transcrito primario, la modificación de bases (en la síntesis de los tRNA), la adición de nucleótidos no transcriptiva y (en unos *pocos* casos) el corte y empalme de intrones.

BIBLIOGRAFÍA

Mecanismo de la transcripción

Bustamante, C., M. Guthold, X. Zhu y G. Yang (1999) Facilitated target location on DNA by individual *Escherichia coli* RNA polymerase molecules observed with the scanning force microscope operating in liquid. *J. Biol. Chem.* 274:16665-16668. La visualización directa de las moléculas señala cómo se mueve la RNA polimerasa a lo largo del DNA hacia los promotores.

Cook, D. N., D. Ma, N. G. Pon y J. E. Hearst (1992) Dynamics of DNA supercoiling by transcription in *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10603-10607. Se explora la cuestión no resuelta de si el acto de la transcripción per se superenrolla el DNA molde.

deHaseth, P. L., M. L. Zupancic y M. T. Record, Jr. (1998) RNA polymerase-promoter interactions: The comings and goings of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 180:3019-3025. Una revisión corta, con buena bibliografía, de la iniciación de la RNA polimerasa.

Gelles, J. y R. Landick (1998) RNA polymerase as a molecular motor. *Cell* 93:13-16. Una mini-revisión reciente que resume los cami-

nos para comprender las propiedades mecanoquímicas de la RNA polimerasa.

Lisser, S. y H. Margalit (1993) Compilation of *E. coli* messenger RNA promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 21:1507-1516. Amplía el análisis que se describe en la Figura 26.12, de 114 a 300 promotores secuenciados.

Mooney, R. A. y R. Landick (1999) RNA polymerase unveiled. *Cell* 98:687-690. Un artículo breve de revisión que describe la primera determinación detallada de la estructura de una RNA polimerasa bacteriana y eucariota.

Nudler, E. (1999) Transcription elongation: Structural basis and mechanisms. *J. Mol. Biol.* 288:1-12. Un modelo del complejo de elongación de la transcripción que ayuda a explicar también los mecanismos de la iniciación y la terminación.

Ross, W. et al. (1993) A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the α subunit of RNA polymerase. *Science* 262:1407-1413. Una explicación de la eficacia elevada de la transcripción del gen del rRNA.

Sousa, R., Y. J. Chung, J. P. Rose y B-C. Wang (1993) Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Nature* 364:593-599. El primer análisis estructural de una RNA polimerasa.

Struhl, K. (1999) Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* 98:1-4. Una descripción concisa de las diferencias de la transcripción entre los organismos superiores e inferiores.

Uptain, S. M., C. M. Kane y M. J. Chamberlin (1997) Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 66:117-172. Una revisión completa de un laboratorio líder.

von Hippel, P. H. (1998) An integrated model of the transcription complex in elongation, termination, and editing. *Science* 281:660-665. Revisa los acontecimientos de la transcripción desde una perspectiva en gran parte termodinámica.

Interacciones DNA-proteína y regulación de la transcripción

Albright, R. A. y B. W. Matthews (1998) How Cro and λ-repressor distinguish between operators: The structural basis underlying a genetic switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3431-3436. Análisis estructural de los complejos DNA-proteína que contienen el mismo operador y diferentes represores.

Beamer, L. J. y C. O. Pabo (1992) Refined 1.8 Å crystal structure of the λ repressor-operator complex. *J. Mol. Biol.* 227:177-196. La estructura más detallada descrita para un complejo DNA-proteína.

Busby, S. y R. H. Ebright (1994) Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* 79:743-746. Una mini-revisión actual.

Greenblatt, J., J. R. Nodwell y S. W. Mason (1993) Transcriptional antitermination. *Nature* 364:401-406. Un proceso descubierto en el fago λ, que tiene importancia para la expresión de los genes eucariotas y del VIH.

Harrington, R. E. (1992) DNA curving and bending in protein-DNA recognition. *Mol. Microbiol.* 6:2549-2555. Se está encontrando un número creciente de factores de transcripción que inducen estas alteraciones estructurales del DNA.

Henkin, T. (1994) tRNA-directed transcription termination. *Mol. Microbiol.* 13:381-387. Descripción de una forma nueva de regulación de la transcripción.

Kercher, M. A., P. Lu y M. Lewis (1997) *Lac* repressor-operator complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:76-85. Esta breve revisión tiene 97 referencias bien seleccionadas.

Landick, R. (1999) Shifting RNA polymerase into overdrive. *Science* 284:598-599. Un breve comentario que revisa el trabajo reciente sobre el mecanismo de antiterminación.

Lewis, M., G. Chang, N. C. Horton, M. A. Kercher, H. C. Pace, M. A. Schumacher, R. G. Brennan y P. Lu (1996) Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science* 271:1247-1254. Un logro enorme, dado el tamaño y la importancia de la proteína.

Ptashne, M. (1986) *A Genetic Switch: Gene Control and Phage λ*. Cell Press, Cambridge, Mass. y Blackwell Scientific, Palo Alto, Calif. Un libro conciso, redactado con lucidez y muy bien ilustrado, que describe uno de los sistemas más fructíferos para el análisis de la regulación de la transcripción y de las interacciones DNA-proteína.

Schleif, R. (1992) DNA looping. *Annu. Rev. Biochem.* 61:199-223. La formación de bucles está bien establecida en la regulación del operón arabinosa y en un número cada vez mayor de otros sistemas.

Steitz, T. A. (1990) Structural studies of protein-nucleic acid interaction: The sources of sequence-specific binding. *Q. Rev. Biophys.* 23:205-280. Una revisión muy bien ilustrada, que describe las proteínas con especificidad de lugar que se han estudiado con mayor detalle.

Yanofsky, C. (1988) Transcription attenuation. *J. Biol. Chem.* 263:609-612. Una mini-revisión concisa e informativa a cargo del descubridor de este fenómeno.

Procesamiento posterior a la transcripción

Altman, S., L. Kirsebom y S. Talbot (1993) Recent studies of ribonuclease-P. *FASEB J.* 7:7-14. Un tratamiento sobre una de las ribozimas más interesantes que se conocen.

Apirion, D. y A. Miczak (1993) RNA processing in prokaryotic cells. *BioEssays* 15:113-120. Una revisión breve.

PROBLEMAS

1. Describa un enfoque experimental para determinar la velocidad promedio de crecimiento de la cadena en la transcripción in vivo. La velocidad de crecimiento de la cadena es el número de nucleótidos polimerizados por minuto por cadena de RNA.
2. Describa un enfoque experimental para demostrar la velocidad promedio de crecimiento de la cadena de RNA durante la transcripción de un gen clonado in vitro.
3. Las medidas de las velocidades de crecimiento de la cadena de RNA se ven dificultadas a veces por el fenómeno de las *pausas*, en las que una molécula de RNA polimerasa detiene la transcripción al llegar a determinados lugares, durante intervalos de tiempo que pueden ser de hasta varios minutos. ¿Cómo podría detectarse la pausa?
4. La forma activa del represor de la lactosa se une al operador con una constante de disociación de 10^{-13} para la reacción R + O

$\rightleftharpoons$ RO. Basta la presencia de unas 10 moléculas por célula de *E. coli* para mantener al operón desactivado en ausencia del inductor.

(a) Si la célula promedio de *E. coli* tiene un volumen intracelular de 0.3×10^{-12} mL, calcule la concentración intracelular aproximada del represor.

(b) Si la célula promedio contiene dos copias del operón *lac*, calcule la concentración intracelular aproximada de los operadores.

(c) Calcule la concentración intracelular promedio de los operadores *libres* en estas condiciones.

(d) Explique de qué forma una célula con un cromosoma haploide puede contener un promedio de dos copias del operón *lac*.

5. ¿Es probable que intervenga la atenuación en la regulación de los genes eucariotas? Explique brevemente su respuesta.

6. La RNA polimerasa tiene una K_M más alta para los ribonucleósidos trifosfato en el paso de iniciación de la cadena que en los pasos de elongación. ¿Qué importancia podría tener este hecho en la regulación de la transcripción?

*7. Suponga que desea estudiar la transcripción in vitro de un determinado gen de una molécula de DNA que contiene varios genes y promotores. Sin añadir proteínas reguladoras específicas, ¿de qué manera podría estimular la transcripción de los demás genes a partir del molde de DNA de que dispone? Para conseguir que todos los complejos sean idénticos, le interesará detener todos los fenómenos de transcripción en la misma posición en el DNA molde antes de aislar el complejo. ¿Cómo podría hacerlo?

8. Durante un cierto tiempo no estuvo claro si el represor *lac* inhibe la transcripción del operón *lac* mediante la inhibición de la unión de la RNA polimerasa a su promotor o permitiendo la iniciación de la transcripción pero bloqueando la elongación a partir del lugar de unión del represor. ¿Cómo podrían diferenciarse estas dos posibilidades?

9. El promotor *tac*, un promotor artificial construido a partir de un oligonucleótido sintetizado por medios químicos, se ha introducido en un plásmido. Se trata de un híbrido de los promotores *lac* y *trp*, que contiene la región –35 de uno y la región –10 del otro. Este promotor dirige la iniciación de la transcripción de manera más eficaz que los promotores *trp* o *lac*. ¿Por qué?

10. Un operón *lac* que contiene una mutación se ha clonado en un plásmido, que se ha introducido mediante transformación en una bacteria que contiene el operón *lac* de tipo natural. Los tres genes del operón cromosómico han pasado a no ser inducibles en presencia del plásmido.

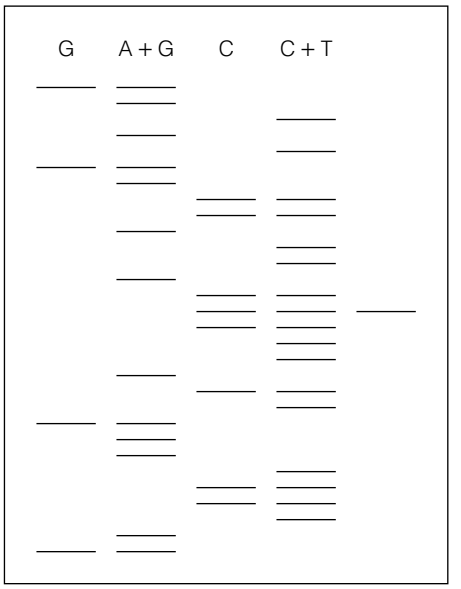
(a) ¿Qué tipo de mutación en el operón del plásmido podría tener este efecto?

(b) Suponga que el resultado de la transformación fuera hacer que tres genes *lac* del plásmido se expresaran de manera constitutiva, a un nivel alto. ¿Qué tipo de mutación génica del plásmido podría tener este efecto?

*11. Varios genes nuevos del regulón SOS se identificaron mediante el empleo ingenioso de fagos "Mud", que son fagos derivados del fago Mu que tienen un gen de la β-galactosidasa sin promotor, insertado en un punto concreto de este genoma del fago. ¿Cómo podrían utilizarse estos fagos para identificar los genes cuya expresión se activa tras la irradiación ultravioleta de las bacterias?

12. ¿Sería de prever que la actinomicina D fuera un inhibidor competitivo de la RNA polimerasa? ¿Y la cordicepina? Explique brevemente sus respuestas.

13. Un fragmento de restricción se sometió a una secuenciación de Maxam-Gilbert, con los resultados que se muestran en las cuatro primeras calles de la autorradiografía. Se realizó la localización en el mapa genético con nucleasa S_1 para un gen cuya transcripción se iniciaba dentro de esta secuencia. El transcrito protegía a un fragmento cuya longitud es la que se muestra en la quinta calle.



(a) Indique la secuencia de nucleótidos de las dos cadenas de DNA y de los primeros nucleótidos del RNA. Identifique todos los extremos 3′ y 5′.

(b) En su estructura, muestre la localización aproximada de la caja de Pribnow (la región –10).

(c) Suponiendo que el fragmento de restricción se creara con una endonucleasa de restricción de tipo II que reconoce un lugar de 6 pares de bases, indique la estructura de ese lugar así como dónde se produce la ruptura.

14. Se crearon formas diploides parciales de *E. coli*, cada una de las cuales contenía un operón lactosa completo en su lugar cromosómico normal y únicamente las secuencias reguladoras (*i*, *p*, *o*) en un plásmido. Prediga el efecto de cada mutación sobre la actividad de la β-galactosidasa antes y después de la adición del inductor. Utilice los símbolos –, +, o ++ para indicar el grado de actividad aproximado.

Mutación	Antes	Después
(a) Ausencia de mutaciones en los genes cromosómicos o del plásmido	_____	_____
(b) Una mutación en el operador del plásmido, que logra abolir su unión al represor	_____	_____
(c) Una mutación en el promotor cromosómico, que reduce 10 veces la afinidad de *p* por la RNA polimerasa	_____	_____

Mutación	Antes	Después
(d) Una mutación del gen *i* en el cromosoma, que logra abolir la unión del producto del gen *i* al inductor	_____	_____
(e) Una mutación del gen *i* del plásmido, que logra abolir la unión del represor al inductor	_____	_____
(f) Una mutación del *o* cromosómico, que logra abolir su unión al represor	_____	_____
(g) Una mutación en el gen de la CRP, que logra abolir su unión al AMP cíclico	_____	_____

*15. ¿Qué tipo de mutación del represor *lac* podría ser constitutiva y *trans*-dominante?

*16. La RNA polimerasa no realiza una corrección de pruebas de su producto polinucleótido, por lo que es una enzima mucho menos exacta que las DNA polimerasas. No obstante, se han descrito formas mutantes de la RNA polimerasa en las que la exactitud de la transcripción es más baja que en el tipo natural. Esta observación implica que la RNA polimerasa dispone de mecanismos de potenciación de la fidelidad, que están alterados en los mutantes. Aparte del proceso que se describe en las páginas 1110-1113, ¿cómo podría actuar un mecanismo de este tipo?

*17. Explique la base de la siguiente afirmación: la transcripción de dos genes en un plásmido puede producirse sin la acción simultánea de una topoisomerasa, pero sólo si los dos genes están orientados en direcciones opuestas.

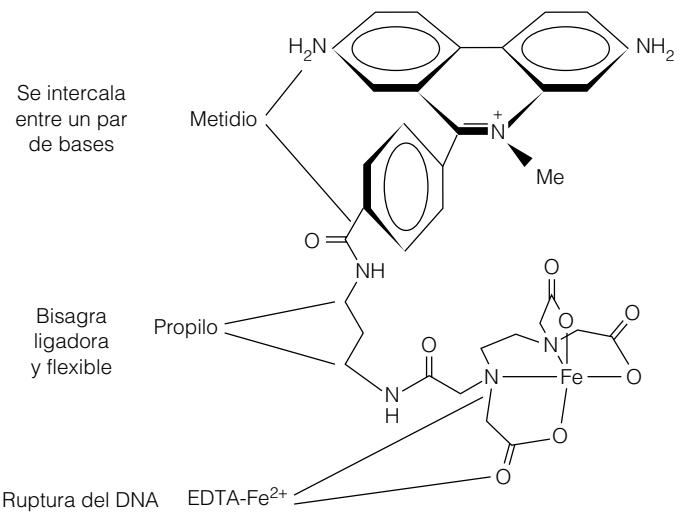
HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 26A

Huellas dactilares: identificación de lugares de unión de proteínas en el DNA

La transcripción se controla en gran parte mediante interacciones de proteínas con lugares específicos en las moléculas de DNA, como los operadores y los promotores. Estos lugares se identificaron inicialmente mediante un análisis genético en el sistema lactosa y en el fago λ. El análisis bioquímico requiere la identificación y determinación de la secuencia de nucleótidos de un determinado lugar, junto con la determinación estructural de los complejos DNA-proteína que se forman. Una técnica denominada de **huellas dactilares**, que generalmente utiliza una protección frente a la ruptura por la DNasa I, se utiliza mucho para la identificación de estos lugares. La determinación de huellas dactilares permite identificar cualquier lugar del DNA que una a una proteína de manera específica, siempre que la proteína se una de manera suficientemente intensa.

El principio del método, que se describe en la Figura 26A.1, es que la unión de una proteína a una secuencia de DNA específica debe proteger al DNA unido a la proteína del ataque de la DNasa I (desoxirribonucleasa pancreática). El investigador utiliza primero γ-[^{32}P]ATP y polinucleótido quinasa de T4 para preparar un fragmento de DNA con el extremo 5′ marcado que contiene un lugar de unión de la proteína. Se mezcla una muestra alícuota del DNA con el extremo marcado con la proteína que se estudia (paso 1) y, a continuación, se incuba con DNasa I en unas condiciones en las que la mayor parte de las cadenas se rompan tan sólo una vez (paso 2). Se incuba otra alícuota con DNasa I en condiciones idénticas, excepto por la ausencia de la proteína (paso 2). A continuación, se analizan las dos mezclas de incubación en calles adyacentes de un gel de secuenciación (paso 3). El resultado es una escalera de fragmentos similar a la que se observa en un gel de secuenciación, excepto porque hay poca especificidad de secuencia; las bandas que aparecen en el gel están espaciadas de manera uniforme a intervalos de un nucleótido, aunque la intensidad del enlace varía considerablemente. Todos los lugares protegidos del ataque de la DNasa por la interacción con la proteína de unión al DNA en estudio, o bien no dan banda, o bien tienen una banda de baja intensidad en la escalera producida por el complejo DNA-proteína, que indica que la ruptura en este lugar ha sido escasa o nula. La región no marcada en el patrón del gel del complejo DNA-proteína (la "huella dactilar") identifica la localización y el tamaño del fragmento en contacto con la proteína de unión al DNA (como la RNA polimerasa).

Algunas mejoras recientes de la tecnología de huellas dactilares utilizan una ruptura con agentes químicos como el **metidiopropil-EDTA-Fe^{2+}** (MPE-Fe^{2+}).



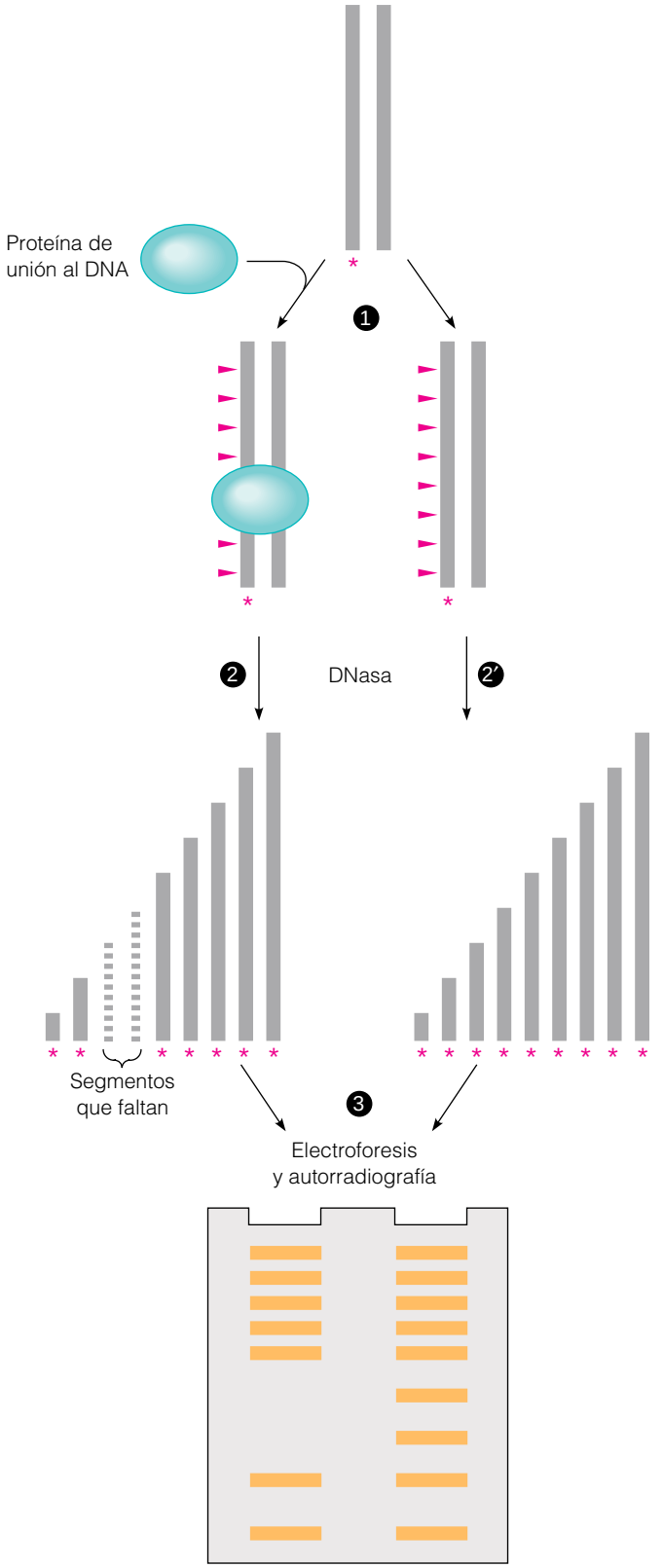


FIGURA **26A.1**
Técnica de huellas dactilares con DNasa I como herramienta para identificar los lugares del DNA que unen proteínas específicas.

Este compuesto se intercala entre las bases del DNA, como lo hace el bromuro de etidio, y cataliza la oxidación que da lugar a la ruptura en un lugar próximo. Dado que existe una cierta selectividad de secuencia en el ataque de la DNasa I y prácticamente ninguna con el MPE-Fe^{2+}, esta última técnica proporciona unas huellas dactilares más nítidas. Una técnica relacionada, que se describe en el apartado de Bibliografía, genera radicales hidroxilo como reactivo de ruptura del DNA activo pero inespecífico.

La técnica de huellas dactilares indica que la RNA polimerasa se une a una región de unos 60 pares de bases de longitud, que se extiende desde unos 40 nucleótidos por encima (en el lado 5′) del lugar de inicio de la transcripción hasta unos 20 nucleótidos por debajo de ese lugar. En otras palabras, el lugar de unión se extiende desde el nucleótido –40 al +20, en donde el molde para el primer nucleótido del transcrito es el +1. Ese primer nucleótido, el extremo 5′ del transcrito, puede identificarse con diversos métodos. El más utilizado es la localización en el mapa genético con la nucleasa S_1, que se describe en Herramientas de la Bioquímica 26B.

Bibliografía

Tullius, T. D., B. A. Dombroski, M. E. A. Churchill y L. Kam (1989) Hydroxyl radical footprinting: A high-resolution method for mapping protein-DNA contacts. En: *Recombinant DNA Methodology*, editado por R. Wu, L. Grossman y K. Moldave, pp. 721-741. Academic Press, San Diego, Calif. Una descripción de la técnica de huellas dactilares mediante radicales hidroxilo, con referencias respecto a los métodos descritos con anterioridad.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 26B

Cartografiado de los puntos de comienzo de la transcripción

Los estudios de la iniciación de la transcripción y de su control requieren métodos para la identificación exacta de los puntos de comienzo de la transcripción, específicamente el nucleótido del DNA molde que codifica el nucleótido 5′ del transcrito. La baja cantidad de mRNA específicos y el elevado recambio metabólico de casi todos los mRNA bacterianos hacen que esta tarea sea un verdadero reto.

Los transcritos de los procariotas tienen siempre un extremo trifosfato 5′ en el primer nucleótido, que puede facilitar su identificación. Dado que esta identificación requiere la purificación del transcrito, generalmente es preferible utilizar métodos menos laboriosos. Uno de ellos, el **cartografiado con nucleasa S_1**, utiliza la enzima de hongos nucleasa S_1, que rompe de manera específica y cuantitativa el DNA y el RNA de una sola cadena (Figura 26B.1). Los materiales necesarios son el gen clonado y un fragmento de restricción que se cree que contiene el molde para el extremo 5′ del transcrito. El fragmento está marcado en el extremo 5′, como en el método de secuenciación de Maxam-Gilbert, y se rompe de manera asimétrica con otra enzima de restricción, de manera que tan sólo se marca la cadena de DNA molde. En la secuenciación de Maxam-Gilbert, el DNA marcado en el extremo 5′ se somete a reactivos químicos que rompen de una forma específica de base. Un reactivo rompe en lugares ocupados por A o G, otro rompe de una forma estrictamente dependiente de G, otro rompe en lugares T y C y otro rompe específicamente en C. De este modo, tratando cuatro alícuotas del mismo DNA con los cuatro reactivos y exponiendo los fragmentos de la ruptura en un gel de secuenciación, se puede leer la secuencia del DNA, como puede verse en la Figura 26B.1. En parte, debido a que la secuenciación de Maxam-Gilbert no es completamente específica de base, se ha sustituido por el análisis de secuencia didesoxi, que utiliza terminadores de cadena replicativos para generar terminales 3′ específicos de base (véase Herramientas de la Bioquímica 25C). Sin embargo, dado que el cartografiado S_1 utiliza un fragmento de DNA marcado en el extremo 5′, es útil utilizar el enfoque de Maxam-Gilbert, que también emplea un fragmento de DNA marcado en el extremo 5′, para localizar de forma precisa el extremo 5′ del transcrito.

A continuación, el fragmento de DNA marcado en el extremo 5′ se desnaturaliza e hibrida con el mRNA, en unas condiciones (concentración elevada de formamida) que favorecen la formación de híbridos DNA-RNA respecto a las

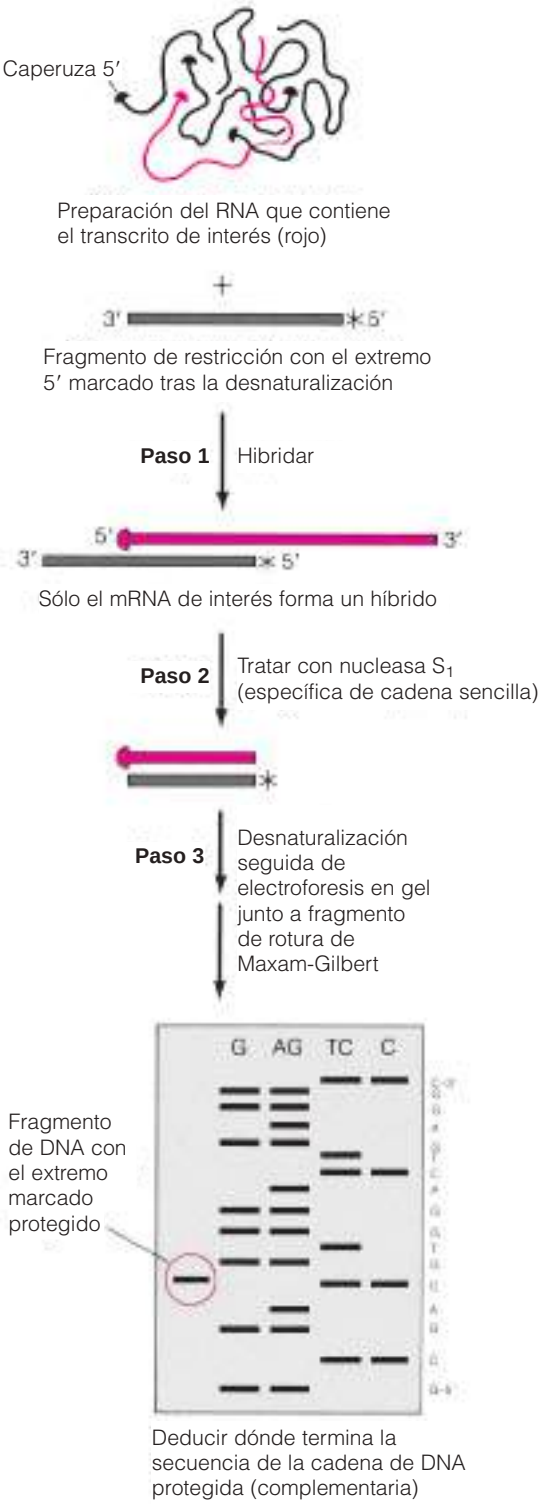
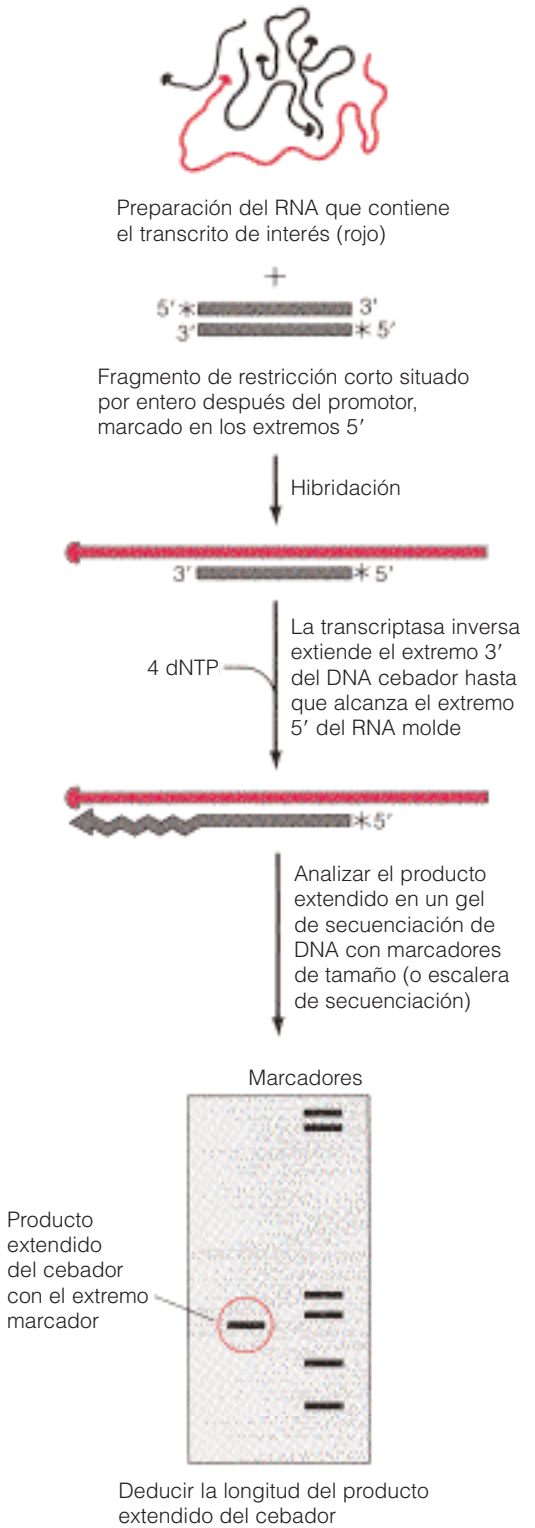


FIGURA **26B.1**

Método de cartografiado con nucleasa S_1 para identificar el extremo 5′ de una molécula de RNA.



dobles cadenas DNA-DNA (Figura 26B.1, paso 1). El único ácido nucleico de doble cadena debe ser, pues, un híbrido DNA-RNA, con extensiones 3′ de una sola cadena a partir del extremo 5′ del transcrito, y del extremo marcado 5′ del fragmento de restricción. El tratamiento con nucleasa S_1 (paso 2) produce una estructura completa de doble cadena, con una cadena de DNA marcada, cuya longitud corresponde exactamente a la distancia desde el extremo 5′ del transcrito, al lugar de restricción relevante. Esta distancia puede identificarse desnaturalizando el híbrido DNA-RNA y analizándolo en un gel de secuenciación, junto con una serie de fragmentos de ruptura de Maxam-Gilbert (paso 3).

Una técnica alternativa, denominada **extensión del cebador**, requiere un fragmento de restricción con el extremo 5′ marcado, cuyo extremo 3′ esté situado más allá del promotor. Este fragmento se hibrida con una preparación de RNA que contenga el mensaje de interés (Figura 26B.2). A continuación, se incuba la mezcla con transcriptasa inversa y desoxirribonucleósidos trifosfato no radiactivos. La extensión a partir del extremo 3′ del fragmento continúa hasta que se alcanza el extremo 5′ del transcrito. La longitud de este fragmento marcado, menos la longitud del cebador original, nos da la distancia entre el extremo 5′ del transcrito y el extremo 3′ del fragmento de restricción utilizado. Este método puede no tener la resolución suficiente para identificar el nucleótido 5′ terminal exacto, pero a menudo da buenos resultados cuando la localización en el mapa con la nucleasa S_1 no resulta satisfactoria.

Ambas técnicas se utilizan mucho para la cuantificación de transcritos de interés, así como para el cartografiado de los extremos 5′ de los transcritos.

Bibliografía

Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. El Capítulo 7 de este manual de métodos de laboratorio describe varias técnicas para el aislamiento y el análisis de RNA.

FIGURA **26B.2**

Método de extensión del cebador para localizar el extremo 5′ de un transcrito. Los marcadores son fragmentos de DNA, como fragmentos de restricción, que sirven como estándares de peso molecular.

CAPÍTULO 27

Descodificación de la información: traducción

En el Capítulo 5 hemos descrito la traducción de una forma muy elemental. Antes de entrar en las complejidades de las reacciones, conviene revisar brevemente este cuadro general. Consulte las Figuras 5.19 y 5.20 (páginas 161, 162).

Visión general de la traducción

Recuérdese que el código genético especifica un triplete de nucleótidos que corresponde a cada residuo de aminoácido. Para conseguir la correspondencia entre los aminoácidos individuales y sus correspondientes tripletes codones, es necesario un conjunto de moléculas *adaptadoras*, cada una de las cuales ha de poder acoplarse a un aminoácido específico y ha de reconocer también el correspondiente codón en el RNA mensajero. Estas moléculas adaptadoras son los *RNA de transferencia* (o tRNA), que se han descrito en el Capítulo 4 (la estructura general de los tRNA se describe en la Figura 4.20). Cada tRNA contiene un triplete de nucleótidos denominado **anticodón**, que es el complementario de un codón en el mRNA para el aminoácido concreto. Así pues, el conjunto de tRNA de una célula constituye una especie de diccionario molecular para la traducción; define las correspondencias entre las palabras del lenguaje de 4 letras de los ácidos nucleicos y las palabras del lenguaje de 20 letras de los aminoácidos. Es necesaria una enzima específica, denominada *aminoacil-tRNA sintetasa,* para realizar la unión entre cada tRNA y el correspondiente aminoácido.

Los RNA de transferencia son las moléculas adaptadoras que hacen corresponder el aminoácido con el codón.

Para traducir un mRNA, debe existir un dispositivo que junte los tRNA cargados con los aminoácidos con el mRNA, estableciendo correspondencias entre tripletes codón y anticodón y uniendo los residuos de aminoácidos en la secuencia correcta. El aparato celular que realiza esta tarea es el *ribosoma*, una partícula formada por RNA y proteínas. Un ribosoma puede unirse al mRNA y "leerlo" al irse moviendo a lo largo del RNA, aceptando los tRNA cargados en el orden dictado por el mensaje y transfiriendo sus residuos de aminoácidos uno a uno a la cadena polipeptídica en crecimiento, en el orden adecuado.

El mensaje del mRNA se lee siempre en la dirección 5′→3′ y la cadena polipeptídica se sintetiza empezando con su residuo N-terminal. La dirección de

El RNA mensajero se lee en la dirección 5′→3′. La síntesis de polipéptidos se inicia en el N-terminal.

la síntesis polipeptídica la estableció Howard Dintzis en 1961. Dintzis aplicó a reticulocitos (células productoras de hemoglobina) un pulso breve de leucina marcada con ^{3}H y aisló las moléculas de hemoglobina completadas en diversos momentos tras el pulso. Después de fragmentar estas moléculas en péptidos con tripsina, comparó la radiactividad de los péptidos de diversos puntos de la cadena. Inmediatamente después de la aplicación del pulso sólo podía aparecer en las cadenas que acababan de completarse; en este momento el marcaje radiactivo sólo se encontraba en los péptidos C-terminales. Después de transcurrido un período de tiempo superior tras el pulso, la radiactividad se encontraba en zonas del polipéptido cada vez más próximas al N-terminal, según las moléculas proteicas continuaban comenzando. Dintzis llegó, pues, a la conclusión de que los aminoácidos se añadían a una cadena polipeptídica empezando por el N-terminal y avanzando hacia el C-terminal.

La imagen sencilla de la traducción que hemos presentado hasta ahora deja muchas preguntas sin responder. ¿Cómo se establece la correspondencia entre tRNA y aminoácidos? ¿Cómo se fija el ribosoma al mRNA y se desplaza a lo largo del mismo? ¿Cómo se inicia y se detiene correctamente la traducción? ¿Cómo se evitan los errores? ¿De dónde procede la energía necesaria para toda esta actividad? Para responder a estas preguntas debemos diseccionar el proceso completo de la traducción, examinando cuidadosamente cada una de sus partes.

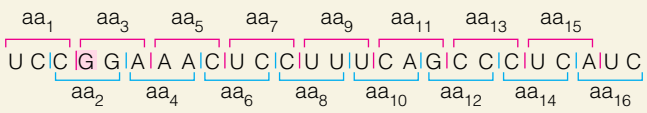
El código genético

El código genético se ha presentado en el Capítulo 5. Describiremos aquí algunos de los experimentos cruciales que se utilizaron para deducirlo y analizaremos algunas de las características más importantes del código. Veremos que el código es *casi* universal en la biología, aunque existen unas pocas excepciones en el uso de los codones.

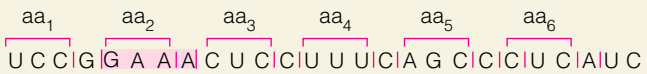
CÓMO SE DESCIFRÓ EL CÓDIGO

Tras el descubrimiento del mRNA (véase el Capítulo 26), la pregunta inmediata fue: ¿cómo se lee? Estaba claro que el mínimo necesario para codificar los 20 aminoácidos era un código de tripletes, pero son posibles muchos tipos de códigos de tripletes. En la Figura 27.1 se muestran algunos de los códigos concebibles. Un *código solapante* como el que se muestra en la Figura 27.1a ahorraría espacio. Sin embargo, esta posibilidad se eliminó al observarse que la mayor parte de las mutaciones producen el cambio de un único aminoácido. Si los codones se solaparan, habría un número significativo de casos en los que están modificados dos residuos adyacentes por la mutación del residuo "solapado". Además, un código solapante produciría regularidades estadísticas entre los residuos de aminoácidos contiguos de las proteínas, es decir, algunos aminoácidos estarían junto a otros con más frecuencia que los demás, y esto no se ha observado nunca. Otra posibilidad era que el código fuera **puntuado**. Esto es, como se muestra en la Figura 27.1b, que alguna base o bases podrían actuar como señales de "espaciado" entre las palabras del código.

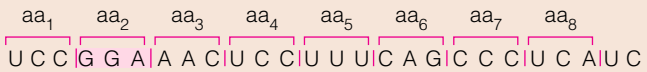
El hecho de que el código no era solapante ni puntuado fue demostrado elegantemente por Francis Crick y Sidney Brenner en 1961. Utilizando unas condiciones que fomentaban las mutaciones de pérdida e inserción en el DNA del bacteriófago T4, demostraron que las inserciones o pérdidas de uno o dos nucleótidos daban lugar a proteínas sin sentido (al haberse desplazado el marco de lectura), mientras que la adición o eliminación de *tres* nucleótidos conducía



(a) Código solapante. Se producirán regularidades estadísticas entre residuos de aminoácidos adyacentes. Las mutaciones puntuales (rojo) podrán modificar dos residuos de aminoácidos.



(b) Código puntuado. Las pérdidas de cuatro nucleótidos (o múltiplos de cuatro) restablecerán el marco de lectura.



(c) Código sin puntuación. Las pérdidas de tres nucleótidos (o múltiplos de tres) restablecerán el marco de lectura. Ésta es la forma real del código.

FIGURA **27.1**

Tres tipos concebibles de códigos genéticos. La investigación inicial sobre la naturaleza del código mostró rápidamente que un código sin solapamiento y sin puntuación **(c)** se ajusta a todas las observaciones experimentales.

siempre a la inserción o pérdida de un residuo de aminoácido. Así pues, el código *debe* estar en tripletes, y el mensaje debe leerse en unidades de tres, sin puntuaciones, a partir de algún punto de comienzo.

Pero, ¿qué codones correspondían a qué aminoácidos? Las primeras respuestas las proporcionaron en 1961 Marshall Nirenberg y sus colaboradores, utilizando un sistema de traducción acelular. Estos investigadores observaron que los extractos de células bacterianas contenían todos los ingredientes necesarios (tRNA, aminoácidos, aminoacil sintetasas y ribosomas) para realizar la síntesis polipeptídica dirigida por un molde polinucleotídico sintético añadido al sistema. Por ejemplo, utilizando ácido poliuridílico, poli(U), como molde se produjo polifenilalanina. Así pues, UUU debe ser un codón de la fenilalanina. De la misma forma se demostró posteriormente que CCC codifica a la prolina y AAA a la lisina.

Utilizando *homopolinucleótidos* (todas las bases iguales) como moldes sólo pudieron averiguarse unas pocas palabras del código. Se descifraron otras muchas más después de que H. G. Khorana ideara métodos para la síntesis de polirribonucleótidos con estructuras diferentes pero repetitivas. En el ejemplo de la Figura 27.2, la secuencia de repetición $(AAG)_n$ producía tres homopolímeros diferentes: polilisina, poliarginina y poliácido glutámico. Este hallazgo no sólo confirmó la importancia del marco de lectura sino que demostraba también que los codones para estos aminoácidos debían ser AAG, AGA y GAA. El experi-

El código genético es un código de tripletes sin solapamiento y sin puntuación.

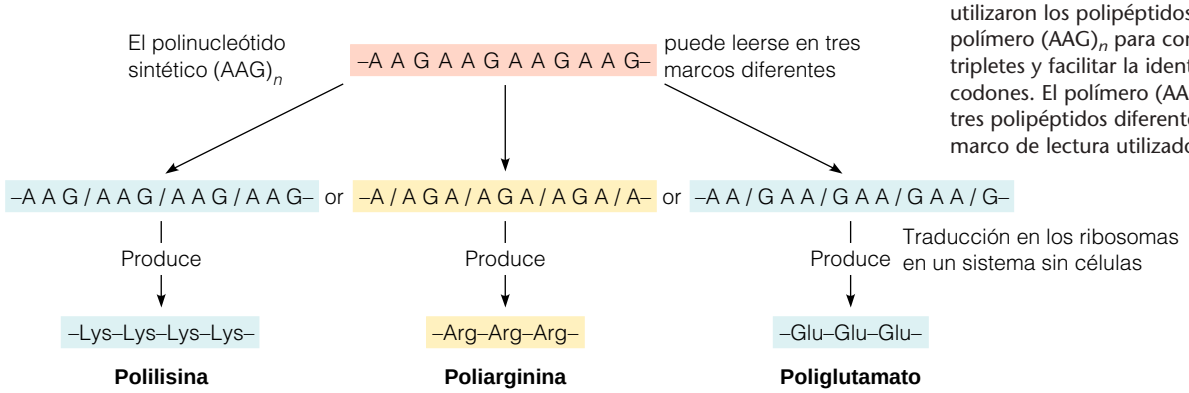


FIGURA **27.2**

Uso de polinucleótidos sintéticos con secuencias repetidas para descifrar el código. Este ejemplo muestra cómo se utilizaron los polipéptidos basados en el polímero $(AAG)_n$ para confirmar el código de tripletes y facilitar la identificación de los codones. El polímero $(AAG)_n$ puede producir tres polipéptidos diferentes, según cuál sea el marco de lectura utilizado.

mento no revelaba qué codón correspondía a qué aminoácido y fueron necesarios nuevos experimentos para discriminar entre las distintas posibilidades. Cuando la unidad de repetición del polinucleótido es un dímero o un tetrámero en vez de un trímero, se forman polipéptidos más complicados, que contienen cada uno varios residuos de aminoácidos en secuencias de repetición (véase el Problema 4). Estos experimentos confirmaron también que el código era de tripletes y que no estaba puntuado.

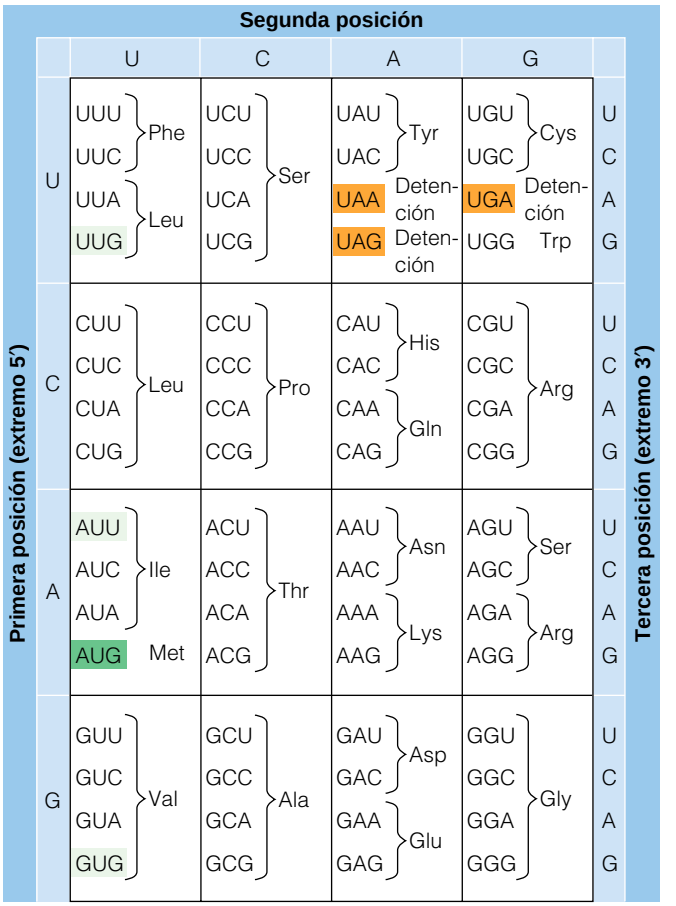
Los experimentos de este tipo identificaron muchas de las palabras del código, pero en 1964, Philip Leder y Marshall Nirenberg idearon un método nuevo y rápido para la asignación de codones que permitió completar el descifrado del código. Nirenberg y Leder encontraron que los tripletes sintéticos podían unirse a los ribosomas y especificaban la unión de tRNA específicos. Así, por ejemplo, UUU y UUC permitían la unión de los tRNA de fenilalanina a los ribosomas, y CCC y CCU permitían la unión de los tRNA de prolina. Esos experimentos proporcionaron pruebas inequívocas de la *redundancia* del código, puesto que se observó que varios codones diferentes correspondían a un mismo aminoácido. Con el empleo combinado de estas técnicas diversas se estableció la totalidad del código genético en unos pocos años de intensa investigación.

CARACTERÍSTICAS DEL CÓDIGO

El código genético que se indica en la Figura 27.3 es *casi* universal, aunque no del todo. Es decir, los mismos codones se utilizan casi siempre para los mismos aminoácidos, tanto en los organismos procariotas como en los eucariotas. Las

FIGURA **27.3**

Código genético (tal como se escribe en el RNA). Se muestra aquí el código genético utilizado en la mayor parte de los organismos. Los codones de terminación de cadena, o de detención, se muestran de color naranja, y el codón de comienzo habitual, AUG, en verde oscuro. Otros codones de comienzo, que rara vez se emplean, se indican en color verde claro. Cuando se emplea el AUG como codón de comienzo, éste codifica *N*-fMet (en los procariotas) o Met (en los eucariotas). En los demás casos codifica Met. Las excepciones a estas asignaciones de codones se indican en la Tabla 27.1.



pocas excepciones que conocemos se indican en la Tabla 27.1. La mayor parte de estas excepciones están limitadas a las mitocondrias y a determinados protozoos. Las demás se producen en determinados organismos que son capaces de traducir codones de la forma habitual y también de una forma no habitual, por ejemplo, el uso ocasional de UGA como codón de la selenocisteína. En estos últimos casos, la lectura de un codón en su sentido no habitual depende del contexto del mensaje circundante, de una forma que todavía no se conoce bien. El hecho de que las bacterias traduzcan con facilidad y correctamente los mRNA producidos por el DNA humano insertado en ellas ilustra la práctica universalidad del código.

¿Por qué se ha mantenido el código genético casi sin alterar a lo largo de un período de evolución tan prolongado? Tal vez se deba simplemente a que las variaciones incluso pequeñas de los codones pudieran resultar devastadoras. Un cambio de un solo codón podría alterar la secuencia de casi cualquier proteína elaborada por el organismo. Algunos de estos cambios hubieran tenido casi con seguridad efectos letales. En consecuencia, se ha opuesto a los cambios de codón la presión selectiva más intensa durante la evolución. Se trata de cambios en las reglas de juego más básicas.

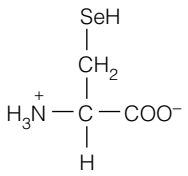
Si examina con detenimiento la tabla del código de la Figura 27.3, observará que, en general, cada aminoácido se caracteriza por las dos primeras letras del codón. Por ejemplo, todos los codones de Pro empiezan con CC y todos los codones de Val empiezan con GU. Así pues, la redundancia se expresa generalmente en la tercera letra, ACU, ACC, ACA y ACG codifican todos treonina. Hemos indicado antes que un solo tRNA puede reconocer varios codones diferentes, hecho éste que se observó poco después de que se tradujera el código. El reconocimiento múltiple implica siempre el residuo 3′ del codón y, por tanto, el residuo 5′ del anticodón.

En 1966, Francis Crick propuso que la base 5′ del anticodón era capaz de "balancearse" en su posición durante la traducción, permitiendo que se formen disposiciones de enlace de hidrógeno alternativas (no de Watson-Crick) con varias bases del codón diferentes. En la Figura 27.4 se presenta un ejemplo. La G

TABLA 27.1 Modificaciones del código genético

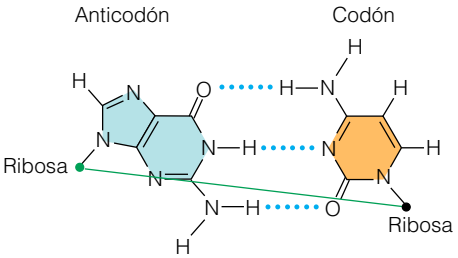
Codón	Habitual	Uso alternativo	Dónde se produce el uso alternativo
AGA AGG	Arg	Detención, Ser	Algunas mitocondrias de animales, algunos protozoos
AUA	Ile	Met	Mitocondrias
CGG	Arg	Trp	Mitocondrias de las plantas
CUU CUC CUA CUG	Leu	Thr	Mitocondrias de las levaduras
AUU GUG UUG	Ile Val Leu	Inicio (*N*-fMet)	Algunos procariotas[a]
UAA UAG	Detención	Glu	Algunos protozoos
UGA	Detención	Trp Selenocisteína	Mitocondrias, micoplasmas *E. coli*[a]

[a] Depende del contexto del mensaje, otros factores.

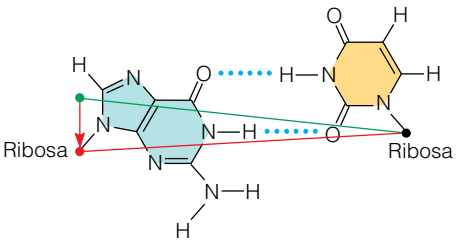


Selenocisteína

El código es casi universal, aunque no completamente.



Guanina–citosina



Guanina–uracilo

FIGURA **27.4**

Hipótesis del balanceo. Como ejemplo, presentamos la forma en que la base G del anticodón puede aparearse con C o con U de un codón. El movimiento ("balanceo") de la base en la posición 5′ del anticodón es necesario para que exista esta capacidad (véase la flecha).

El código es redundante. Varios codones pueden corresponder a un solo aminoácido, a veces mediante un balanceo en la posición 5′ del anticodón.

de la posición 5′ del anticodón puede aparearse con C o con U en el codón, dependiendo de la orientación relativa del par. Teniendo en cuenta las dos posibilidades de apareamiento de bases y la selectividad observada de los tRNA, Crick propuso el conjunto de "reglas de balanceo" que se dan en la Tabla 27.2. Esta hipótesis explica elegantemente la degeneración que se observa con frecuencia en el lugar 3′ del codón. El nucleósido bastante poco corriente *inosina* (I, Figura 22.4) se encuentra en algunos anticodones, en los que muestra capacidad de aparearse con A, U o C.

TABLA 27.2 Capacidades de apareamiento de bases en los pares con balanceo

Base en la Posición 5′ del anticodón		Base en la Posición 3′ del codón
G	se aparea con	C o U
C	se aparea con	G
A	se aparea con	U
U	se aparea con	A o G
I	se aparea con	A, U, o C

Dado que el RNA mensajero es casi invariablemente más largo que el marco de lectura abierto que ha de traducirse, son necesarias señales específicas de inicio y final para que empiece y termine la traducción. En casi todos los organismos se utilizan los codones UAA, UAG y UGA como señales de detención y no codifican aminoácido alguno. Una señal de detención indica que la traducción debe terminar y que el producto polipeptídico ha de liberarse del ribosoma. Evidentemente, tres señales de detención son más de las absolutamente necesarias, por lo que no es de extrañar que se observe que estos codones se utilizan también para designar aminoácidos en algunos organismos (véase la Tabla 27.1).

Aunque la naturaleza ha sido pródiga en la definición de señales de detención, se ha mostrado sorprendentemente escasa en el establecimiento de comienzos. La señal de comienzo comúnmente utilizada en la traducción es AUG, que sirve también como el único codón de la metionina. ¿Cómo sabe, pues, el ribosoma cómo ha de interpretar adecuadamente este triplete de forma que diferencie entre lugares internos y lugares de comienzo? La respuesta es que el extremo 5′ de cualquier mensaje contiene secuencias específicas que garantizan que se fije adecuadamente al ribosoma (véase la página 1165). Cuando se empieza a leer el mensaje el *primer* AUG que se encuentra se interpreta como señal de comienzo y se inicia la traducción. Aunque las células procariotas y eucariotas manejan esta situación de manera algo distinta, la consecuencia es que la *N*-formilmetionina (en los procariotas) o la metionina (en los eucariotas) son siempre el primer aminoácido que se incorpora a una cadena polipeptídica. En consecuencia, todas las proteínas empiezan con *N*-fMet o Met, al menos cuando se sintetizan inicialmente. Sin embargo, en la mayoría de los casos este residuo se desformila o elimina después de la traducción (véase la página 1191). Cualquier AUG que se encuentre después del inicio de la traducción se trata como una señal para incorporar metionina en ese punto de la secuencia. De manera muy ocasional, los códigos GUG (normalmente valina), UUG (normalmente leucina) o AUU (normalmente isoleucina) actúan como codones de comienzo en los procariotas cuando se sitúan cerca del extremo 5′ de un mensaje (véase la Tabla 27.1). Sin embargo, en estos casos codifican *N*-formilmetionina en la primera posición. En otras posiciones estos tripletes se leen como codones normales.

Los mensajeros de los procariotas contienen señales de comienzo y de detención de la traducción, así como una secuencia que alinea el mRNA en el ribosoma.

Principales participantes en la traducción: mRNA, tRNA y ribosomas

ESTRUCTURA DE LOS mRNA DE LOS PROCARIOTAS

Como se ha descrito en el Capítulo 26, los mRNA son productos de una sola cadena de la transcripción del DNA genómico, con unas características especiales que los destinan a unirse a los ribosomas y hacen que actúen de manera adecuada en la traducción. En este capítulo consideramos las propiedades de los

mRNA del tipo de los procariotas, los producidos por las bacterias, los virus que infectan bacterias y las mitocondrias y cloroplastos de las células de los eucariotas. Los mRNA transcritos a partir de los genomas *nucleares* de las células eucariotas y de algunos virus de éstas tienen una estructura algo diferente y se manejan de forma muy distinta. Los describiremos en el Capítulo 28.

Como ejemplo de un RNA mensajero procariota, consideremos el producido por la transcripción del operón *lac*, que se ha analizado con detalle en el Capítulo 26. Como se muestra en la Figura 27.5, el mensaje total tiene una longitud de unos 5300 nucleótidos. Dentro de este mRNA hay tres *marcos de lectura abiertos*, que corresponden a los genes *lac*, *z*, *y*, y *a*. Un marco de lectura abierto es una secuencia de un RNA mensajero flanqueada por codones de comienzo y de detención, que puede traducirse de manera continua. Estos mensajes multigénicos, que se denominan **mensajes policistrónicos**, son frecuentes en los procariotas. Cada marco de lectura abierto tiene sus propias señales de comienzo y detención, y observará que estas señales varían considerablemente. Hay un RNA adicional que no se traduce entre los marcos de lectura y los extremos. Las regiones 5′ de cada señal de comienzo contienen secuencias con abundante A y G, que ayudan a alinear el mRNA en el ribosoma para que la traducción pueda empezar en los puntos adecuados y en el marco de lectura correcto. Estas secuencias de fijación, que se encuentran en todos los mRNA de los procariotas, se denominan *secuencias Shine-Dalgarno*, en honor de J. Shine y L. Dalgarno, que las descubrieron. Una secuencia Shine-Dalgarno puede formar pares de bases con una secuencia contenida en el RNA ribosómico, como se muestra en la Tabla 27.3, para dar lugar a una alineación adecuada para iniciar la traducción. Las distintas secuencias de fijación parecen tener diferentes afinidades por los ribosomas. Por ejemplo, los tres genes del operón *lac* (Figura 27.5) no se traducen en el mismo grado, el *lac z* se traduce con mucha más frecuencia que el *lac y* o el *lac a*.

El mensaje mRNA producido a partir del operón *lac* posee todos los elementos básicos necesarios para su función: secuencias para alinearlo adecuadamente en el ribosoma y secuencias para iniciar y detener la traducción en los puntos adecuados. Muchos mRNA tienen también posibilidades de formar estructuras secundarias y terciarias tridimensionales, que pueden tener alguna

Las secuencias Shine-Dalgarno ayudan a alinearse a los ribosomas sobre los mRNA para comenzar la traducción de forma adecuada.

FIGURA **27.5**

El mRNA del operón *lac*. El mRNA del operón *lac* de *E. coli* tiene unos 5300 nucleótidos de longitud y contiene los marcos de lectura abiertos para los genes *lac z*, *y* y *a*, flanqueados cada uno por secuencias de comienzo, de detención y de Shine-Dalgarno (SD).

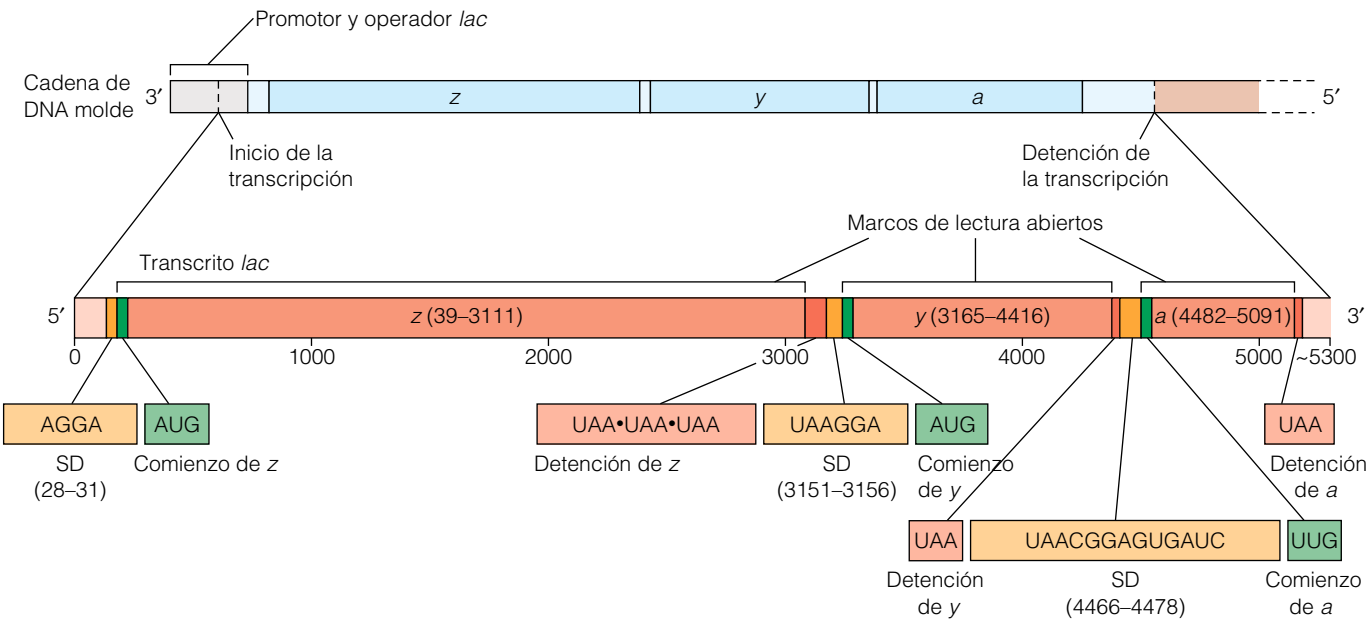


TABLA 27.3 Secuencias Shine-Dalgarno representativas

Mensaje para	Secuencia Shine-Dalgarno
Proteína ribosómica L10	Secuencia SD Inicio 5′ AGGAGCAAAGCUAAUG 3′ mRNA 3′ AUUCCUCCA 5′ Extremo 3′ complementario del RNA ribosómico 16S
E. coli lac z	5′ AGGAAACAGCU AUG 3′ 3′ AUUCCUCCA 5′
Cro del fago λ	5′ UAAGGAGGUUGU AUG 3′ 3′ AUUCCUCCA 5′

función en la regulación de la producción relativa de los diversos productos proteicos. Volveremos sobre este punto más adelante.

ESTRUCTURA DE LOS RNA DE TRANSFERENCIA

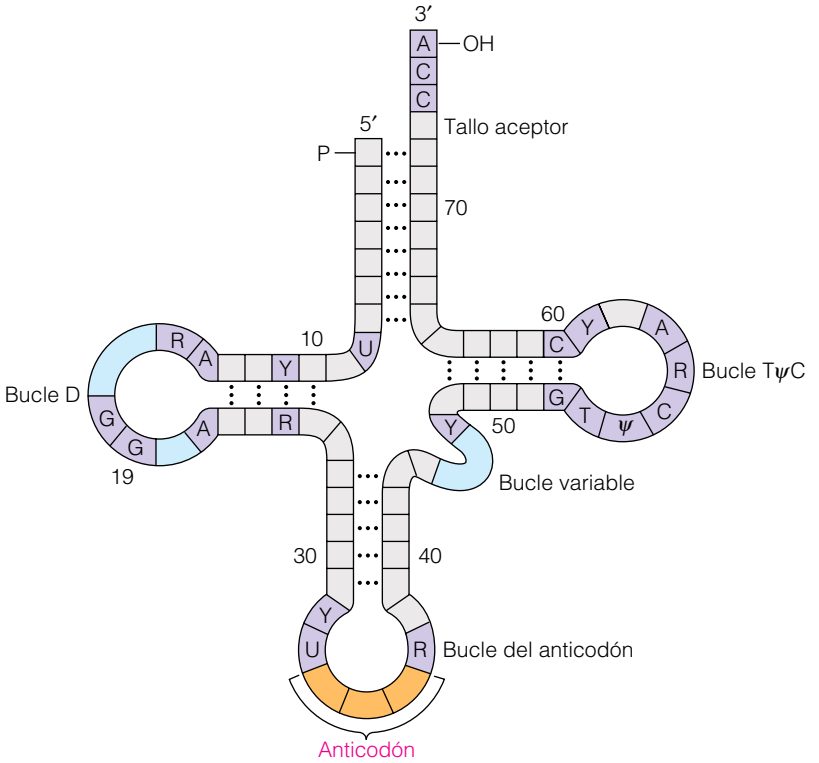
Cualquier célula, procariota o eucariota, contiene una batería de diferentes tipos de moléculas de tRNA, que es suficiente para incorporar los 20 aminoácidos a una proteína. Ello no implica que deba haber tantos tipos de tRNA como codones, puesto que algunos tRNA pueden reconocer más de un codón, cuando la diferencia se encuentra en la tercera posición (3′). Así, por ejemplo, *E. coli* posee unos 40 tRNA diferentes, que bastan y sobran para codificar todos los aminoácidos pero no para los 61 codones de los aminoácidos. El tRNA específico para un aminoácido dado se designa escribiendo el aminoácido como un superíndice, por ejemplo, $tRNA^{Ala}$.

El RNA de transferencia fue la primera secuencia polinucleotídica natural que se determinó, en un estudio precursor en la levadura ($tRNA^{Ala}$) por Robert Holley en 1965. Desde entonces se han secuenciado otros muchos tRNA. Todos ellos tienen la estructura general que se muestra esquemáticamente en la Figura 27.6a y poseen secuencias semejantes de unos 70 a 80 nucleótidos. Sin embargo, existe una considerable variación en los detalles, como indican los ejemplos de la Figura 27.6b y c. Además, los tRNA tienen unas características especiales entre las moléculas de RNA, debido a su elevado contenido de bases poco habituales y modificadas, tres de las cuales se muestran en la Figura 27.7.

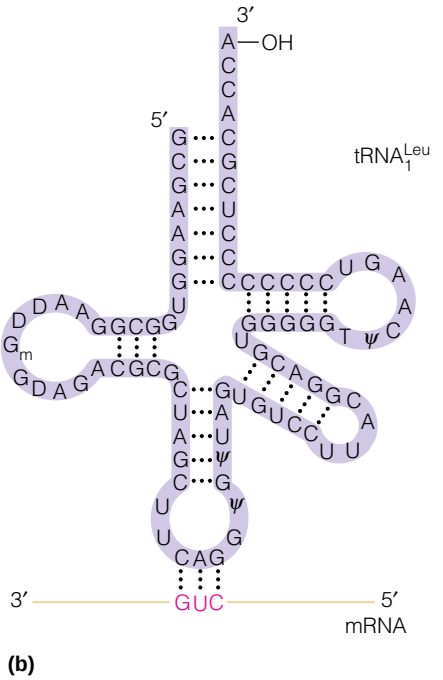
Los *modelos de hoja de trébol* del tipo que se muestra en la Figura 27.6 resultan útiles para mostrar el patrón general de enlaces de hidrógeno y para señalar las partes funcionales del tRNA. El *triplete del anticodón* en el bucle de la parte inferior es complementario del codón del mRNA y formará pares de bases con él. Dado que el codón y el anticodón, cuando se aparean, forman un corto fragmento de RNA de doble cadena, sus direcciones deben ser antiparalelas. En la Figura 27.6 hemos escrito las moléculas de tRNA con sus extremos 5′ hacia la izquierda. En consecuencia, el RNA mensajero, cuando se muestra en esas figuras, se escribe con el extremo 5′ hacia la derecha, en contra del convenio normal.

Todos los tRNA comparten una estructura común general que incluye un bucle del anticodón, que se aparea con los codones, y un tallo aceptor, al que se une el aminoácido.

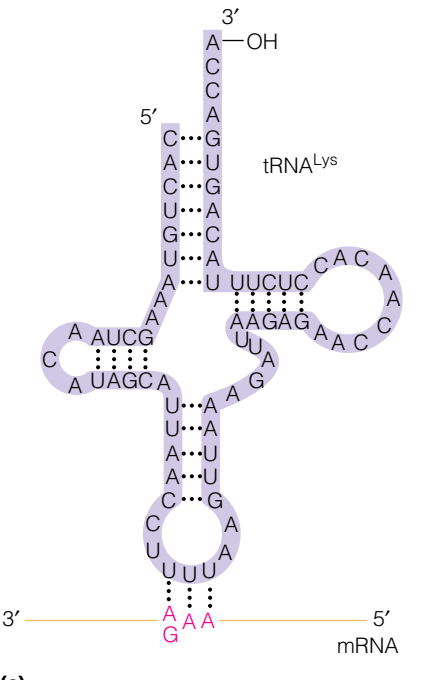
El *tallo aceptor* en la parte superior de la figura de hoja de trébol es el lugar en el que se fijará el aminoácido, en el extremo 3′ del tRNA. Este tallo tiene siempre la secuencia 5′···CCA—OH 3′. Otras características comunes de las moléculas de tRNA son el *bucle D* y el *bucle TψC*, regiones que contienen una



(a)



(b)



(c)

FIGURA **27.6**

Estructura de los tRNA. **(a)** Estructura general de los tRNA. Las posiciones de las bases invariables o que rara vez varían se muestran en morado. Las regiones del bucle D y del bucle variable que pueden contener diferentes números de nucleótidos se muestran en azul. El anticodón se muestra en naranja. **(b)** Un tRNA de leucina de *E. coli*. **(c)** Un tRNA mitocondrial humano de lisina. Códigos de las bases: Y = pirimidina, R = purina, ψ = pseudouridina, T = ribotimidina y D = dihidrouridina (véase la Figura 27.7).

(b, c) Tomado de J. D. Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4.ª ed. (Redwood City, Calif.: Benjamin/Cummings, 1987). © 1987 J. D. Watson.

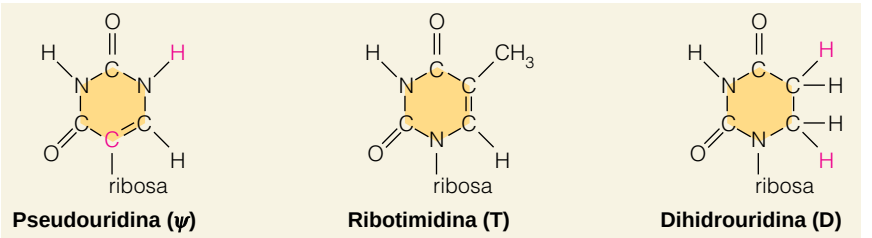


FIGURA **27.7**

Una muestra de las bases modificadas y poco habituales que se encuentran en los tRNA.

parte sustancial de posiciones invariables y que están frecuentemente modificadas o contienen también bases no habituales. El denominado *bucle variable* es ciertamente variable, tanto en su composición de nucleótidos como en su longitud, como indica la Figura 27.6.

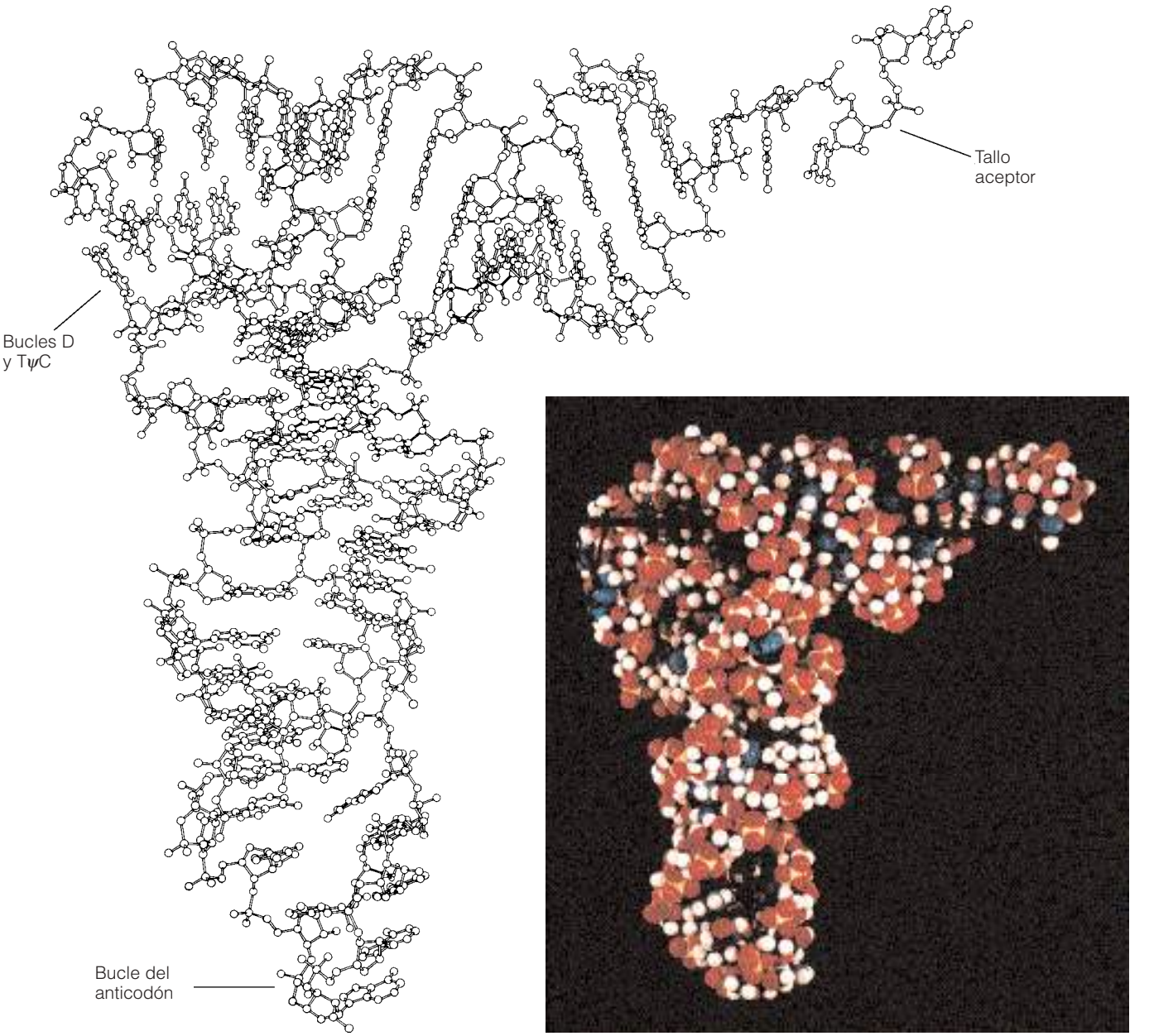
Aunque los modelos de hoja de trébol resultan adecuados para representar la estructura primaria y algunos elementos de la estructura secundaria, no son re-

presentaciones tridimensionales adecuadas de las moléculas de tRNA. Los estudios de difracción de rayos X de las moléculas de tRNA han mostrado que la forma molecular real es bastante compleja, como puede observarse en las Figuras 27.8 y 4.20. Como muestran estas figuras, una molécula de tRNA tiene un aspecto más parecido a una taladradora manual o una pistola de soldadura. El bucle del anticodón se encuentra en la parte inferior del mango y el tallo aceptor está en la punta que trabaja. El bucle D y el bucle TψC están doblados hacia dentro de una forma compleja, cerca de la parte superior del mango, y proporcionan una capacidad máxima de enlaces de hidrógeno y de apilamiento de bases. Algunos de los patrones de enlaces de hidrógeno que son necesarios para producir este plegado son bastante poco habituales (Figura 27.9). Las formas tridimensionales de los tRNA están muy conservadas aunque varíe la estructura primaria. Una explicación probable es que esa conservación sea necesaria para que cada tRNA pueda ajustarse igual de bien en el ribosoma y realizar su función.

FIGURA **27.8**

Modelo del tRNA de la fenilalanina de la levadura establecido mediante estudios de difracción de rayos X. El anticodón se encuentra en la parte inferior, el tallo aceptor 3′ se encuentra en el extremo superior derecho. **(a)** Dibujo que muestra todas las posiciones atómicas. **(b)** Modelo de relleno espacial.

Reproducido con permiso de S.-H. Kim et al., *Science* (1974) 185:435. © 1974 AAAS.



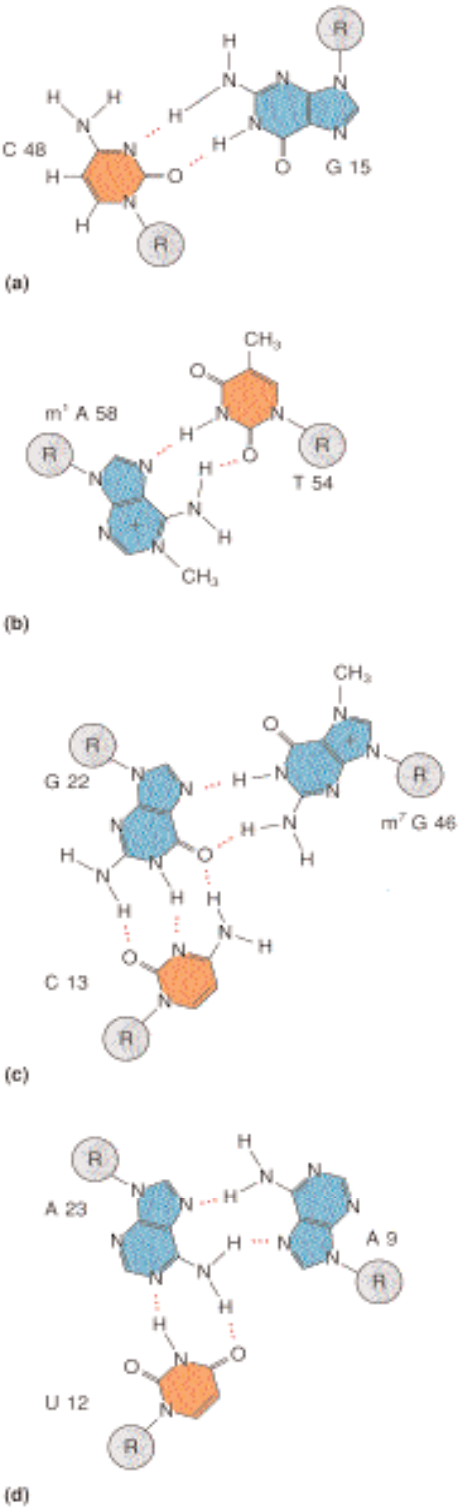


FIGURA **27.9**

Apareamientos de bases poco habituales en el tRNA. Todas corresponden al $tRNA^{Phe}$ de levadura que se muestra en la Figura 27.8. **(a, b)** Algunos apareamientos poco habituales. **(c, d)** Algunos ejemplos de interacciones triples. R indica el residuo ribosilo de la cadena de RNA. Las bases con el prefijo m están metiladas en el átomo de carbono que corresponde al superíndice. Los números que siguen a las letras que designan las bases muestran la posición en la secuencia.

ACOPLAMIENTO DE LOS tRNA A LOS AMINOÁCIDOS Y FORMACIÓN DE LOS tRNA AMINOACILADOS: PRIMER PASO EN LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

Los aminoácidos se unen a los tRNA mediante un enlace covalente entre el carboxilato del aminoácido y un grupo hidroxilo de la ribosa del residuo de adenosina 3′ invariable del tRNA. El aminoácido puede reaccionar con los grupos hidroxilo 2′ o 3′ y al parecer puede ir cambiando entre estos dos lugares. El apareamiento de los residuos de aminoácido correctos con los tRNA se consigue mediante una serie de enzimas denominadas **aminoacil-tRNA sintetasas**. En la bacteria *E. coli* existen 21 sintetasas, cada una de las cuales reconoce a un aminoácido y uno o más tRNA. La lisina es singular ya que tiene dos sintetasas. La reacción que liga a las dos moléculas, como se muestra en la Figura 27.10, se

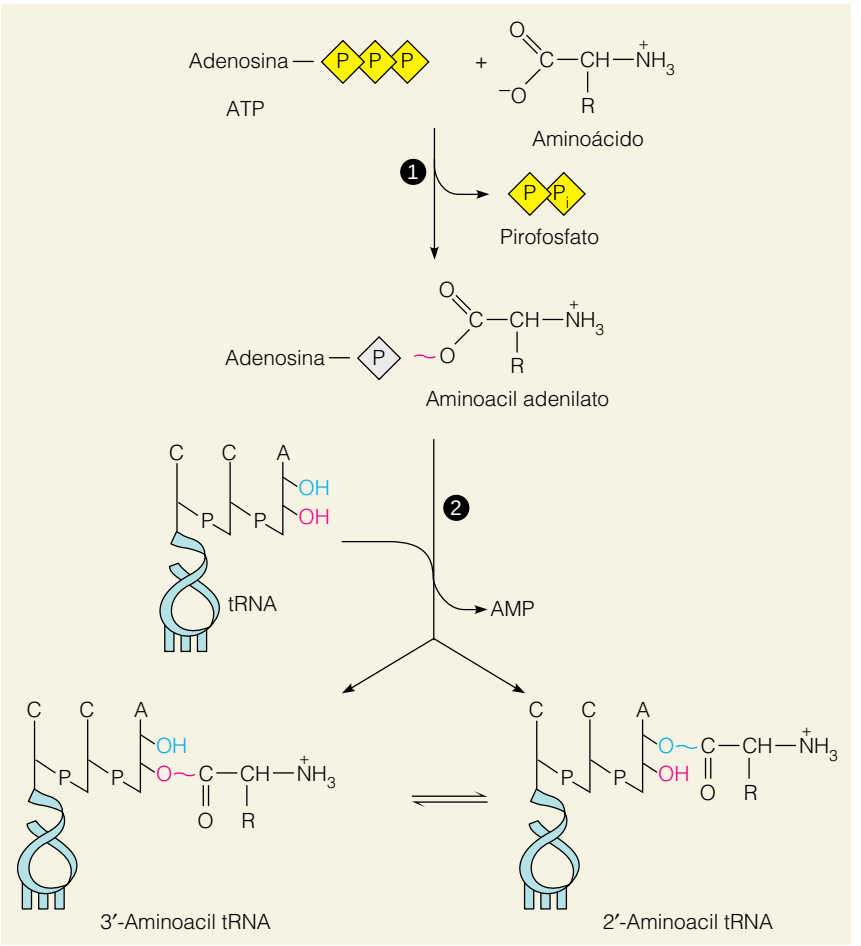


FIGURA **27.10**

Formación de los aminoacil-tRNA por la aminoacil-tRNA sintetasa. En el paso 1 el aminoácido es aceptado por la sintetasa y se adenilila. En el paso 2, el tRNA adecuado es aceptado por la sintetasa y el residuo aminoácido se transfiere al OH 2′ o 3′ del residuo 3′ terminal del tRNA. Todas las reacciones se producen sobre la sintetasa.

Los aminoácidos se acoplan a sus correspondientes tRNA mediante la acción de las aminoacil-tRNA sintetasas.

produce en dos pasos. En primer lugar, el aminoácido, que está unido a la sintetasa, se activa por el ATP para formar un **aminoacil adenilato**. Mientras continúa unido a la enzima este intermediario reacciona con uno de los tRNA correctos para formar el enlace covalente y liberar AMP.

Dado que todas las sintetasas realizan esencialmente la misma función, podría esperarse que todas ellas representaran variaciones secundarias de un tema común. Sin embargo, éste no es el caso ya que hay dos clases generales de aminoacil-tRNA sintetasas (I y II). Sus lugares activos son totalmente diferentes y las clases unen su tRNA conocido en lados opuestos. Además, las enzimas de la clase I tienden a actuar como monómeros, mientras que las enzimas de la clase II actúan como dímeros o tetrámeros. Se desconocen las razones de estas diferencias tan grandes, pero pueden reflejar la utilización de algunos aminoácidos en las proteínas antes que otros en las primeras fases de la evolución de la síntesis de proteínas. Una observación reciente que puede atañer a este problema es que algunos miembros de algunas clases de organismos (por ejemplo, bacterias Gram positivas y arqueobacterias), así como algunos orgánulos utilizan una ruta indirecta de transamidación para cargar algunos tRNA. Por ejemplo, el $tRNA^{Gln}$ se carga primero con Glu, que luego se sustituye por Gln:

$$\text{Glu} + \text{tRNA}^{\text{Gln}} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{glutamil-tRNA sintetasa}} \text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

$$\text{Gln} + \text{Glu-tRNA}^{\text{Gln}} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{Glu-tRNA}^{\text{Glu}}\ \text{amidotransferasa}} \text{Gln-tRNA}^{\text{Gln}} + \text{ADP} + \text{P}_i + \text{Glu}$$

De esta forma, estos organismos no necesitan (aunque pueden tener) una Gln-$tRNA^{Gln}$ sintetasa, como tienen las bacterias Gram negativas y los eucariotas. Se ha sugerido que la glutamina fue uno de los últimos aminoácidos que se añadieron al repertorio proteico y que inicialmente se incorporaba mediante esta ruta.

Cabría esperar que la sintetasa identificara el tRNA correcto mediante su anticodón, pero algunos estudios recientes indican que el proceso de identificación es más complejo y que varios nucleótidos actúan como *elementos de identidad*. En 1988, Ya-Ming Hou y Paul Schimmel demostraron que el cambio de un solo par de bases (entre los residuos 3 y 70 del tallo aceptor) del $tRNA^{Cys}$ o $tRNA^{Phe}$ para pasar al par G-U que se halla en el $tRNA^{Ala}$ hacía que la alanina sintetasa aceptara el $tRNA^{Cys}$ o el $tRNA^{Phe}$ y lo acoplara a la alanina. Otros tRNA parecen reconocerse por sus sintetasas en otras localizaciones distintas (véase la Figura 27.11). No parece haber una regla sencilla, aunque está claro que los elementos identificadores están agrupados en el bucle del anticodón y el tallo aceptor.

Se ha obtenido un mejor conocimiento respecto al reconocimiento de los tRNA por sus sintetasas mediante el análisis de difracción de rayos X de los complejos formados. En la Figura 27.12 se muestra un ejemplo (de un complejo sintetasa de clase I-tRNA). Como se muestra en la figura, el tRNA cruza la proteína, estableciendo diversos contactos específicos, entre los que se encuentran los contactos cruciales en la región del anticodón y en el tallo aceptor. Ambas regiones están distorsionadas en el complejo, de manera que el tallo aceptor se alarga y se inserta en el bolsillo del lugar activo. Este bolsillo está formado por un motivo estructural proteico frecuente, denominado *pliegue del dinucleótido*, que actúa a menudo como zona de unión de nucleótidos. En este caso también une al ATP, necesario para la acilación. Proporciona, además, un lugar de unión para la glutamina. Así pues, los tres participantes en las reacciones están estrechamente agrupados.

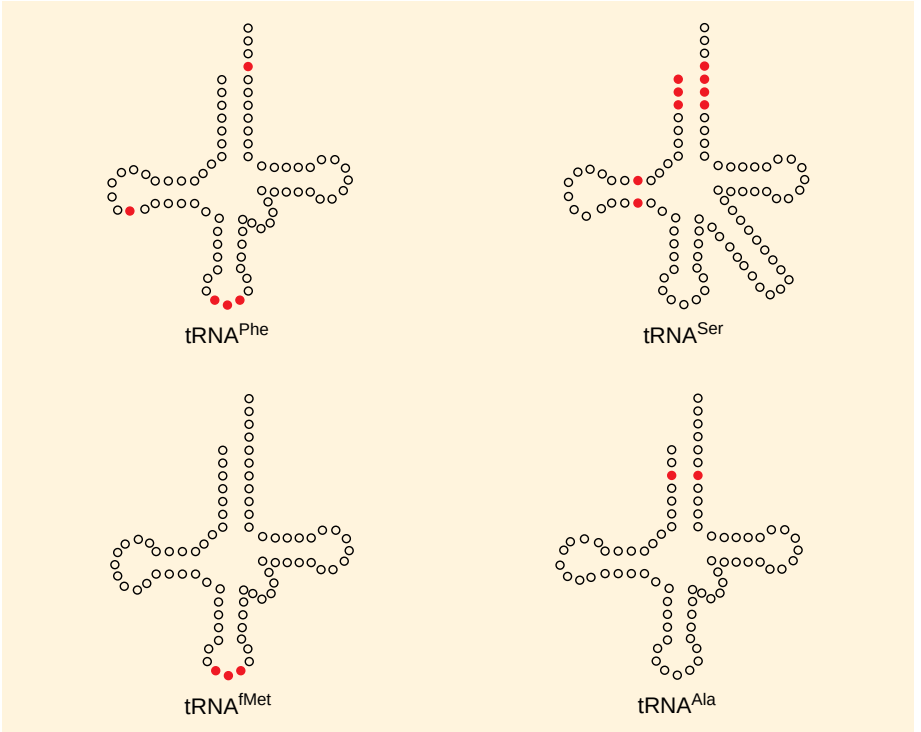


FIGURA **27.11**

Principales "elementos de identidad" en algunos tRNA. Los círculos rojos indican las posiciones en la hoja de trébol que se ha demostrado identifican el tRNA para su sintetasa relacionada.

Adaptado de L. Schulman y J. Abelson, *Science* (1988) 240:1591-1592.

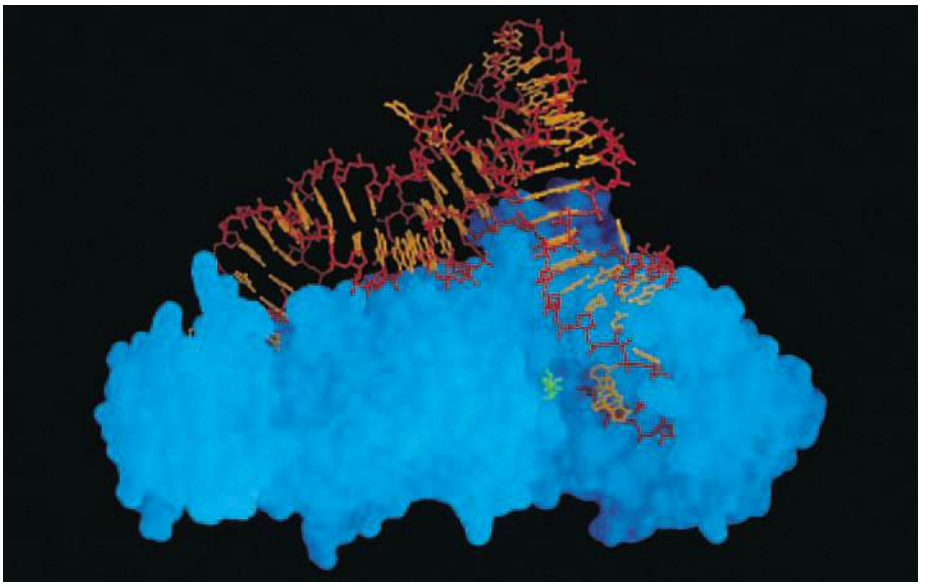


FIGURA **27.12**

Modelo de la glutaminil-tRNA sintetasa de *E. coli* acoplada con su tRNA y el ATP. El tRNA se representa mediante un modelo atómico detallado, la proteína mediante su superficie accesible al disolvente (azul). El ATP (en verde) y el tallo aceptor 3′ del tRNA se ajustan en una hendidura profunda de la sintetasa. Esta hendidura acomodará también al aminoácido. Ésta es una sintetasa monomérica de clase I.

Cortesía de M. A. Rould, J. J. Perona, D. Söll y T. A. Steitz, *Science* (1989) 246:1135-1142. © 1989 AAAS.

Es esencial que el apareamiento del aminoácido y del tRNA sea muy exacto. Una vez fijado el aminoácido a una molécula de tRNA y liberado el tRNA cargado de la enzima, no hay más posibilidades de revisión de posibles errores. Si se ha acoplado el aminoácido erróneo a un tRNA, se incorporará a la proteína según el anticodón del tRNA y dará lugar, por tanto a una proteína "incorrecta". Esos errores serían muy probables cuando las diferencias entre las cadenas laterales de los aminoácidos fueran pequeñas, como entre valina e isoleucina, donde sólo hay la diferencia de un metileno. Se ha calculado que, en esos casos, los errores pueden ser hasta de 1 en 100, una cifra intolerable. Las posibilidades de errores de este tipo se reducen al mínimo mediante una *corrección de prue-*

bas. Una aminoacil sintetasa tiene la capacidad de hidrolizar un apareamiento incorrecto, aun después de que este apareamiento se haya formado en ella. Es como si la enzima volviera a examinar su producto antes de liberarlo. Esta corrección de pruebas que realiza la sintetasa, junto con otras reacciones de corrección de pruebas en los pasos posteriores de la traducción, garantiza una frecuencia global de errores inferior a 1 en 10 000.

EL RIBOSOMA

Hemos descrito ya los dos participantes que deben reunirse para realizar la biosíntesis de proteínas: el mRNA y el conjunto de tRNA cargados con los aminoácidos adecuados. Los actores están, pues, preparados, y lo único que falta es un director adecuado y un escenario en el que puedan desplegarse los acontecimientos. Ambos los proporciona el ribosoma, y la célula característica necesita muchos. Por ejemplo, una célula de *E. coli* contiene unos 15 000 ribosomas, que representan el 25% de la masa seca de la célula. De este modo, las células dedican una gran parte de su energía a la producción de ribosomas y a utilizarlos en la síntesis de proteínas.

Los ribosomas procariotas funcionales son partículas con un coeficiente de sedimentación de 70S y una masa de aproximadamente 2.3×10^6 Da. Están formados por dos subunidades, una partícula 30S y otra 50S, cada una de las cuales es un complejo de RNA ribosómicos específicos (denominados rRNA) y proteínas (Figura 27.13). La subunidad 30S ("pequeña") de un ribosoma de *E. coli* contiene una sola molécula de rRNA 16S (1542 residuos de longitud) y una sola copia de 21 proteínas diferentes, a las que se designa como S1 a S21. La subunidad 50S ("grande") contiene dos moléculas de rRNA, un rRNA 23S y un rRNA 5S (2904 residuos y 120 residuos, respectivamente, en *E. coli*). Además, la subunidad grande posee 31 proteínas diferentes a las que se designa con la letra L, con una copia de cada una de ellas excepto una. Hay cuatro copias de la única proteína denominada L7/L12. Hasta hace poco ha existido cierta confusión con relación al número total de proteínas de la subunidad grande, habiéndose señalado hasta 34. Sin embargo, la eliminación cuidadosa de los resultados que eran artefactos y las duplicaciones muestran que hay sólo 31 tipos diferentes. Todas las proteínas ribosómicas pueden separarse en geles bidimensionales de SDS, como se muestra en la Figura 27.14, y ya se han secuenciado todas. Se conocen actualmente las estructuras tridimensionales de unas 15 proteínas ribosómicas. Todas son pequeñas o formadas por dominios pequeños y muchas tienen secuencias y/o semejanzas estructurales con proteínas de funciones muy diversas.

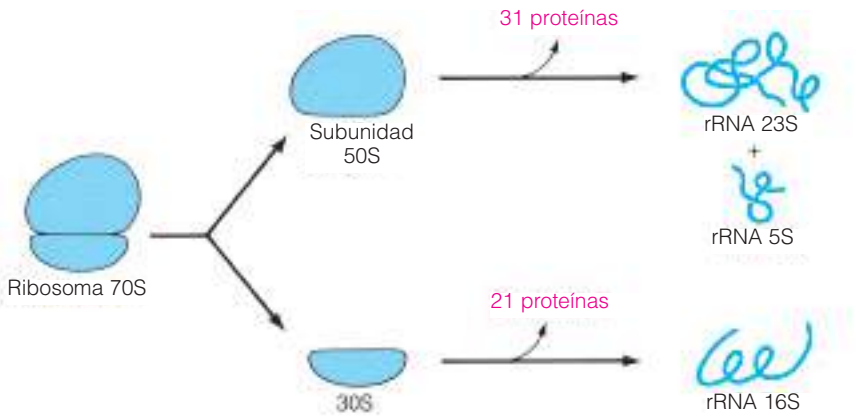
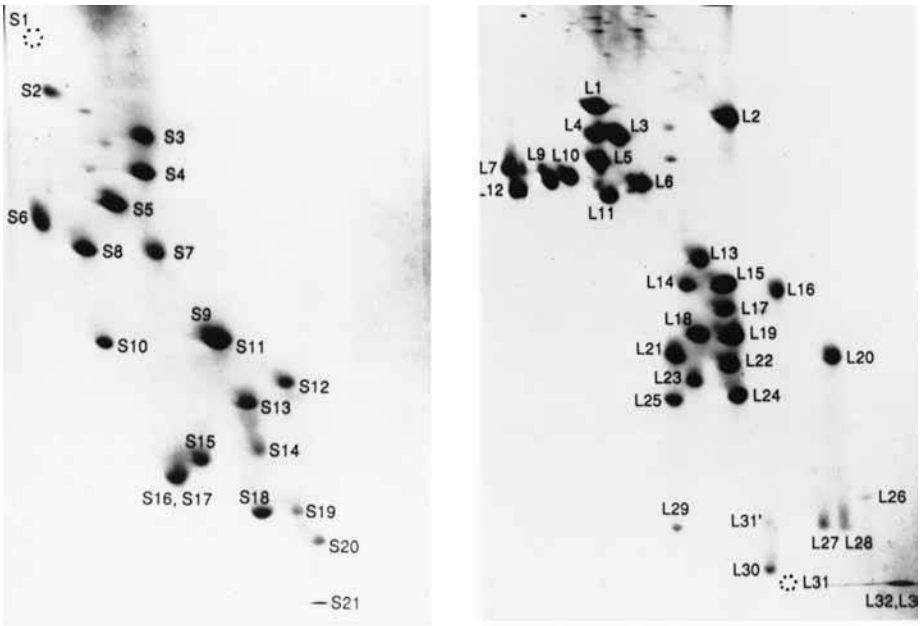


FIGURA **27.13**
Componentes del ribosoma 70S de los procariotas.



(a) **(b)**

FIGURA **27.14**

Electroforesis en gel bidimensional de las proteínas ribosómicas de *E. coli*. **(a)** Proteínas de 30S. **(b)** Proteínas de 50S.

Cortesía de R. Traut.

Un ribosoma procariota funcional, el lugar de la síntesis proteica, contiene unas 50 proteínas y tres moléculas de rRNA diferentes.

Los estudios de secuenciación no muestran homologías significativas entre las distintas proteínas de un ribosoma, pero la comparación de las secuencias entre las proteínas correspondientes en los ribosomas de diferentes organismos revela una considerable conservación evolutiva. Así pues, el ribosoma es un objeto complejo que apareció pronto en la historia de la vida y que ha permanecido relativamente inalterado. Aunque los ribosomas de los eucariotas difieren significativamente de los existentes en los procariotas, la continuidad evolutiva es clara. Las secuencias de muchos RNA ribosómicos (especialmente los de la subunidad pequeña) se han determinado también y nos indican lo mismo. De hecho, dadas sus tasas evolutivas relativamente lentas, los rRNA son útiles como indicadores de la evolución en largas distancias filogenéticas. A partir de ellos hemos averiguado que los eucariotas, las eubacterias y las arqueobacterias representan tres reinos principales de organismos que comparten un antecesor común en el pasado más remoto.

Cuando se examina meticulosamente la secuencia del RNA 16S, se observa que contiene muchas regiones de autocomplementariedad, que son capaces de formar segmentos de doble hélice. Un patrón como el que se muestra en la Figura 27.15 puede parecer demasiado complejo como para ser casi arbitrario, pero la comparación con otras secuencias de RNA 16S de una relación incluso distante demuestra que las regiones que pueden formar doble cadena están muy conservadas. De hecho, la estructura secundaria parece estar mucho más conservada que la estructura primaria, puesto que a menudo se observa que existen mutaciones compensadoras en las regiones de doble hélice, que mantienen el apareamiento de bases. Una ilustración esquemática como la de la Figura 27.15 es análoga a la visualización de hoja de trébol del tRNA (Figura 27.6). El rRNA real está plegado en una estructura tridimensional, de la misma forma que el tRNA. Sin embargo, en el caso de la subunidad ribosómica, la estructura se complica más por la presencia de proteínas ribosómicas unidas al RNA. Estamos empezando a conocer la forma en que las proteínas y el RNA encajan juntos en el ribosoma.

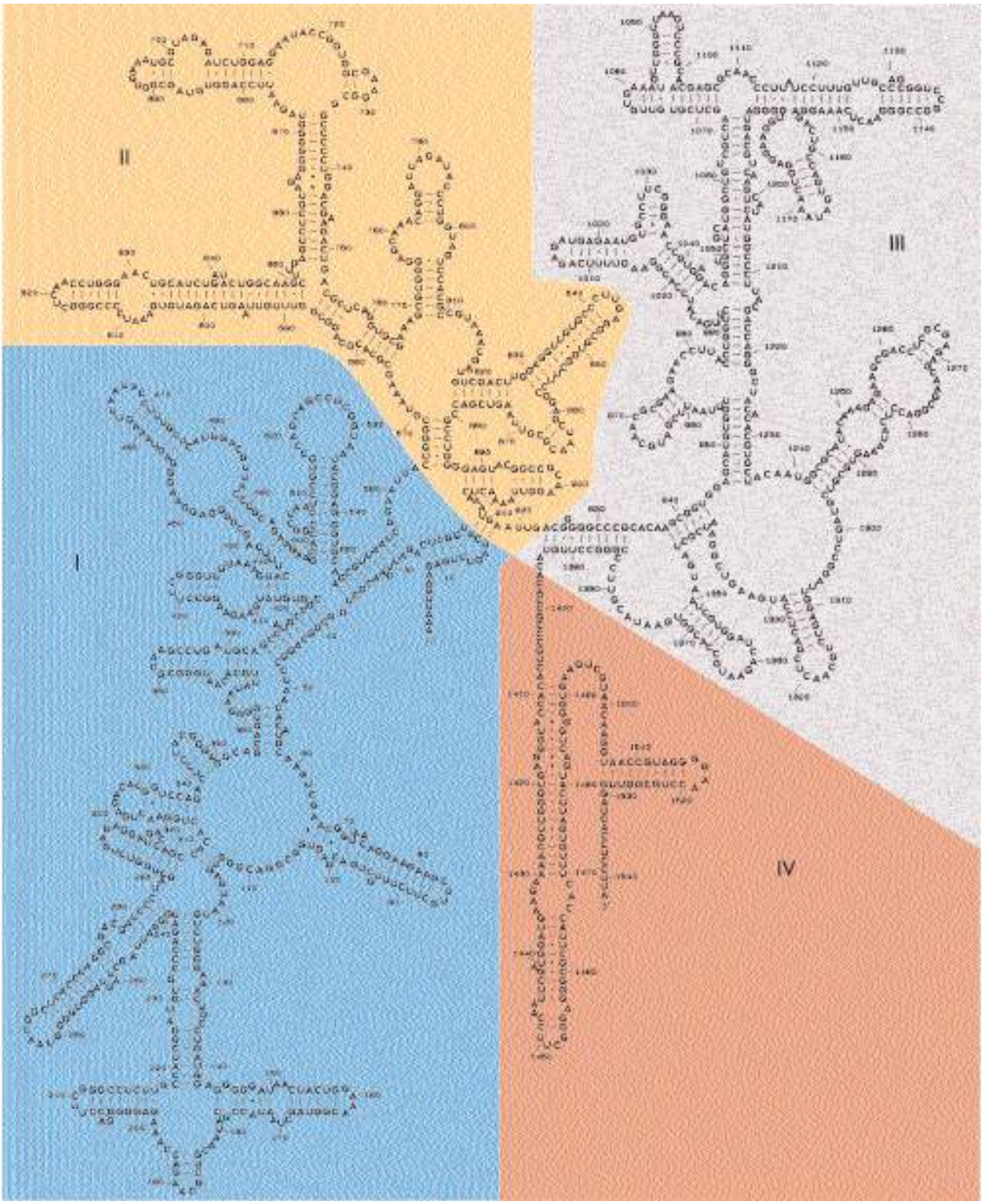


FIGURA **27.15**

Estructura secundaria propuesta para el rRNA 16S de *E. coli*. La secuencia se ha alineado para producir el máximo de apareamientos de bases entre segmentos complementarios. La molécula parece tener cuatro dominios de plegamiento principales (I-IV).

Cortesía de R. Gutell y H. Noller.

Estructura interna del ribosoma

Aunque durante muchos años ha sido posible obtener buenas imágenes de microscopia electrónica de los ribosomas intactos y de sus subunidades, era difícil de conseguir la resolución elevada debido a la necesidad de teñir o sombrear las partículas. No podía esperarse que estas técnicas nos dijeran cómo se encuentran dispuestos dentro del ribosoma las proteínas y el RNA. La difracción de rayos X ha estado impedida hasta hace poco debido a los problemas con la cristalización y debido a la complejidad y la falta de simetría de la estructura.

Con todo, aún los primeros estudios de microscopia electrónica mostraron la topografía general de las subunidades pequeña y grande y cómo encajan juntas para formar las partículas 70S (véase la Figura 27.16). Para avanzar y descubrir la forma en que se colocan las proteínas individuales y los segmentos de RNA plegados, se ha requerido un esfuerzo enorme y diversas técnicas complementarias. Algunas de ellas son técnicas muy potentes que son aplicables a estudios de otros tipos de estructuras macromoleculares complejas. En Herramientas de la Bioquímica 27A describimos brevemente cuatro de estos métodos: *entrecruzamiento*, *microscopia inmunoelectrónica*, *microscopia crioelectrónica* y *dispersión de neutrones de ángulo bajo*. En la Figura 27.17a y b, se dibujan las ideas actuales con relación a la disposición de las proteínas dentro de la subunidad 30S, tal como se deducen de la dispersión de neutrones y el entrecruzamiento proteico. La adición del entrecruzamiento RNA-RNA y del entrecruzamiento RNA-proteína ha proporcionado un modelo auto-consistente de la estructura tridimensional del RNA y sus interacciones con las proteínas, conduciendo al modelo completo que se muestra en la Figura 27.17c.

La aplicación reciente de la microscopia crioelectrónica, junto con la difracción de rayos X de baja resolución, ha comenzado a proporcionar también imágenes detalladas de la topografía de la subunidad 50S de los ribosomas procariotas, consistente con los estudios de dispersión de neutrones y de entrecru-

Las técnicas como el entrecruzamiento, la dispersión de neutrones, la microscopia inmunoelectrónica y la microscopia crioelectrónica han proporcionado un cuadro detallado de la estructura de algunas subunidades ribosómicas.

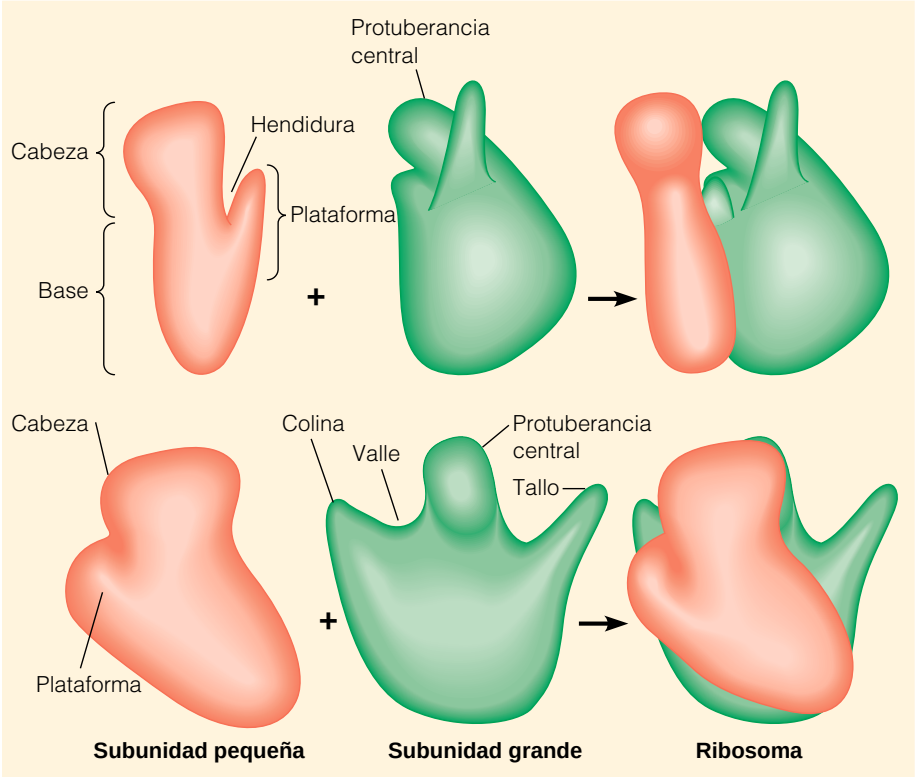


FIGURA **27.16**

Modelos de baja resolución de las subunidades ribosómicas pequeña y grande y su complejo 70S, según se deduce de los primeros estudios de microscopia electrónica. Las características más destacadas, que pueden también observarse en los estudios más recientes de mayor resolución, están indicadas por los nombres unidos.

Cortesía de M. Oaks, A. Scheirman, T. Atha, G. Shankweiler y J. A. Lake, *The Ribosome*, W. E. Hill, A. Dahlberg, R. A. Garret, P. B. Moore, D. Schlessinger y J. R. Warner, eds., p. 181 (Nueva York: American Society of Microbiology Press, 1990).

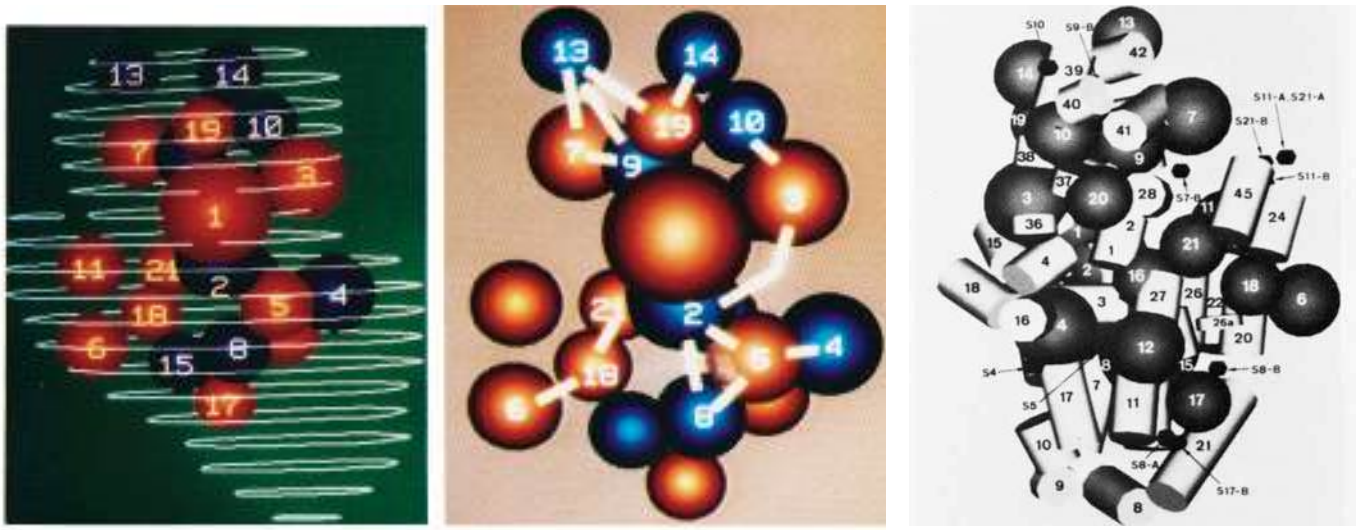


FIGURA **27.17**

Disposición tridimensional de los componentes de la subunidad 30S. **(a)** Disposición de las proteínas tal como se deduce de los experimentos de dispersión de neutrones. Las líneas de contorno muestran la forma global de la partícula. Las regiones que no ocupan las proteínas están rellenas de RNA. **(b)** Patrón de entrecruzamiento. Se reproduce la disposición de las proteínas de (a) con barras entre todos los pares de proteínas que están entrecruzados según han informado dos o más grupos de investigación independientes. Obsérvese que el patrón de entrecruzamiento concuerda bien con los datos de dispersión de neutrones. **(c)** Modelo completo, que muestra la situación del rRNA 16S (cilindros blancos) con relación a las proteínas, según se deduce de los estudios de entrecruzamiento RNA-proteína y RNA-RNA.

(a) Cortesía de P. Moore y V. Ramakrishnan de M. Capel et al., *Science* (1987) 238:1403-1406. © 1987 AAAS, reproducido con premiso; **(b)** reproducido con permiso de M. Capel et al., *Science* (1987) 238:1403-1406. © 1987 AAAS; **(c)** cortesía de E. Schüler y R. Brimacorne, *EMBO J.* (1988) 7:1509-1513. Con permiso de Oxford University Press.

zamiento. En la Figura 27.18 se muestra un ejemplo. Como veremos más tarde, estos estudios de resolución elevada pueden también mostrar dónde se posicionan el mRNA, los tRNA y la cadena polipeptídica en el ribosoma funcionante.

Ensamblaje del ribosoma

Teniendo en cuenta la complejidad de composición y estructura de los ribosomas, resulta sorprendente observar que pueden ensamblarse in vitro a partir de sus componentes. Este impresionante logro, que realizaron por primera vez P. Traub y M. Nomura para la subunidad 30S en 1968, ha resultado muy útil para determinar las funciones y posiciones de los componentes ribosómicos. En la Figura 27.19 se muestra una carta de flujo esquemática del ensamblaje de la subunidad 30S del ribosoma de *E. coli*. El ensamblaje con éxito parece requerir que las proteínas se coloquen en un orden determinado: las primeras proteínas en

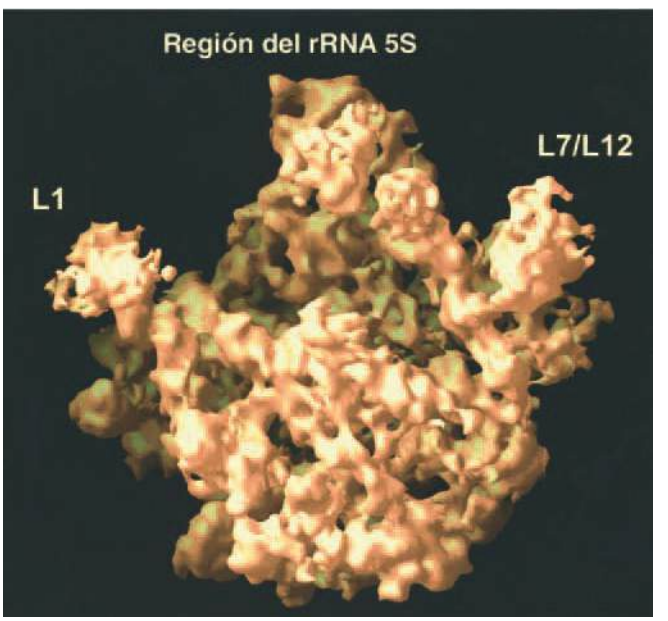


FIGURA **27.18**

Modelo de la subunidad ribosómica grande a una resolución de 0.9 nm, tal como se ha determinado por difracción de rayos X de cristales. La orientación es aproximadamente tal y como se muestra en la Figura 27.16.

Proporcionado por N. Ban, P. Nissen, P. Moore y T. A. Steitz de N. Ban et al., *Cell* (1998) 93:1105-1115. © Cell Press.

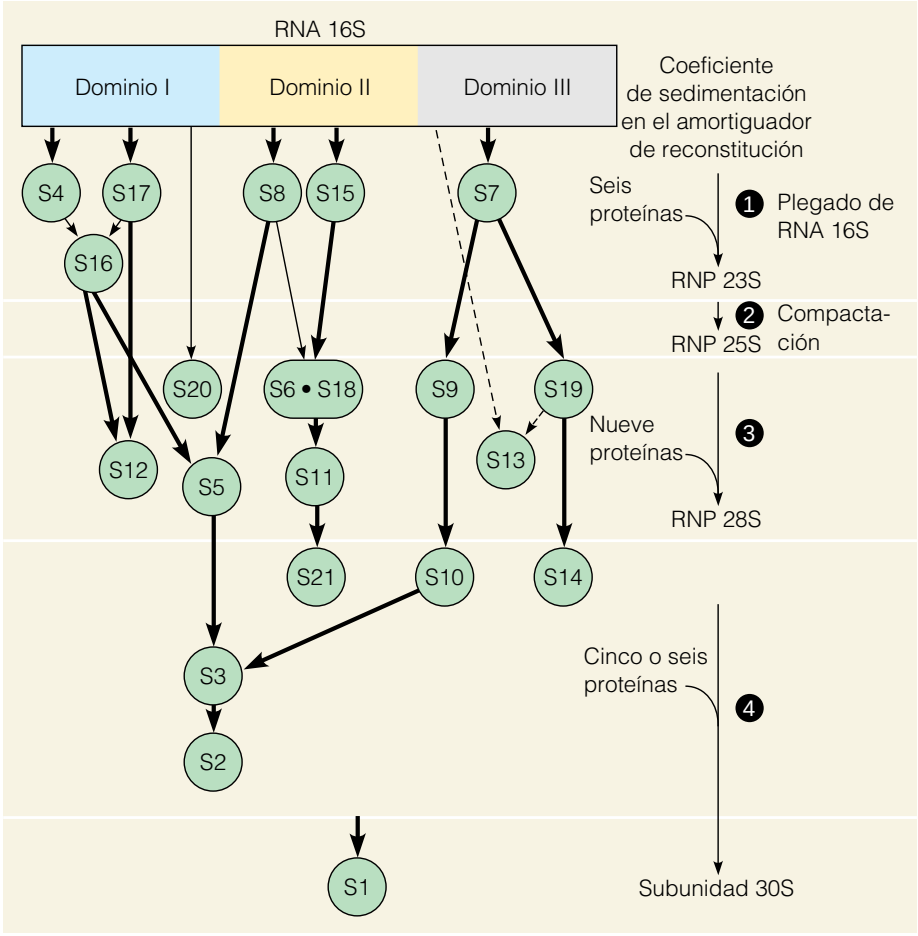


FIGURA **27.19**

Mapa del ensamblaje de la subunidad 30S. El mapa muestra cómo una subunidad ribosómica 30S de *E. coli* puede reensamblarse en el tubo de ensayo a partir de RNA y proteínas (en verde). El orden de adición que se muestra en la figura es importante, puesto que algunas proteínas han de añadirse antes que otras para que el ajuste sea adecuado. Ciertas proteínas unidas inicialmente se asocian con cada uno de los dominios I-III del RNA que se indican en la Figura 27.15. Las flechas entre las proteínas indican la dependencia de la unión; cuanto más gruesa es la flecha, más esenciales son las proteínas previas. Así, por ejemplo, la unión de S3 en el paso 4 requiere que S5 y S10 estén ya unidas. La unión de S1 requiere una estructura ribosómica casi completa, pero resulta difícil establecer exactamente qué proteínas son esenciales. En cualquier caso, su unión completa el ensamblaje y se ha producido una subunidad 30S funcional. La ruta de la derecha muestra el desarrollo estructural de la subunidad. La abreviatura RNP indica partícula ribonucleoproteica.

Adaptado de A. Spirin, *Ribosome Structure and Protein Biosynthesis* (Redwood City, Calif.: Benjamin/Cummings, 1986). © 1986 Benjamin/Cummings Publishing Company.

unirse al RNA parecen ayudar a plegar el RNA de forma que proporcione lugares para las demás. La subunidad 50S también puede ensamblarse in vitro, pero requiere una serie complicada de pasos a distintas temperaturas.

A pesar de su complejidad, al menos algunas subunidades ribosómicas pueden ensamblarse in vitro.

Las subunidades 30S y 50S formadas en estos experimentos de reconstitución in vitro son funcionales y pueden combinarse para formar los ribosomas 70S si se aumenta la concentración de iones divalentes. El equilibrio entre las partículas 30S, 50S y 70S,

$$30S + 50S \rightleftharpoons 70S$$

está desplazado generalmente hacia la derecha al aumentar las concentraciones de Mg^{2+} y hacia la izquierda por las concentraciones elevadas de un catión monovalente como Na^+ o K^+. En las condiciones iónicas que existen en el citosol, una parte considerable de los ribosomas están disociados en las subunidades libres. Son estas subunidades las que entran en la serie de reacciones de la traducción que consideraremos a continuación.

Mecanismos de la traducción

Hemos descrito ya todos los participantes principales del proceso de la traducción: el RNA mensajero, los tRNA cargados y el ribosoma donde se producen los hechos de la traducción real. La traducción de un mensaje puede dividirse en tres fases: *iniciación*, *elongación* y *terminación*. Describiremos aquí estos pasos en

La traducción implica tres pasos: iniciación, elongación y terminación, cada uno de los cuales se facilita mediante factores proteicos específicos.

la forma en que se producen en los procariotas. Las diferencias importantes, aunque no fundamentales, que existen en las células eucariotas se describirán en el Capítulo 28.

Cada uno de los pasos de la traducción requiere diversas proteínas específicas que interaccionan con los participantes principales que se han indicado antes. Estas proteínas se denominan *factores de iniciación* (IF), *factores de elongación* (EF) y *factores de liberación* (RF). Estos factores, junto con algunas de sus propiedades y funciones, se indican en la Tabla 27.4.

INICIACIÓN

La iniciación de la traducción se muestra en la Figura 27.20. La iniciación da lugar a la formación de un *complejo de iniciación 70S*, que está formado por un ribosoma unido al mRNA y a un *tRNA iniciador* cargado. Primero se unen el mRNA y el tRNA a una subunidad 30S libre, y luego se añade la subunidad 50S para formar el complejo completo. La unión del mRNA y del tRNA iniciador requiere también la unión de los tres **factores de iniciación** (IF1, IF2 e IF3) a una subunidad 30S libre. El orden exacto de unión de estos factores no se conoce aún con certeza. Los factores IF3 e IF1 parecen facilitar la disociación de los ribosomas 70S preexistentes para producir las subunidades 30S libres que son necesarias para la iniciación (Figura 27.20, paso 1). El tercer factor, el IF2, se une portando una molécula de GTP; se cree que acompaña al tRNA iniciador cargado en la unión. El IF2 pertenece a la clase de las *proteínas G*, similar a las descritas en el Capítulo 23. Aproximadamente al mismo tiempo que se une el complejo IF2-tRNA^{fMet}, se une también el mRNA (paso 2). Aunque no está claro aún el orden de estas adiciones, sí se sabe que el IF2-GTP es absolutamente necesario para la unión del primer tRNA. Con la unión del primer tRNA y del mRNA, se ha completado la formación del *complejo de iniciación 30S*. El complejo de iniciación tiene una afinidad elevada por la subunidad 50S y une una del conjunto disponible (paso 3) con la liberación simultánea de IF3.

El tRNA iniciador es especial. Reconoce y se une al codón AUG que normalmente codificaría metionina, pero que realmente lleva una *N*-formilme-

TABLA 27.4 Factores proteicos que intervienen en la traducción en los procariotas

Factor	Número aproximado por ribosoma en la célula	¿Une GTP?	Función
Iniciación			
IF1	1/7	No	Impulsa la disociación de los ribosomas 70S
IF2	1/7	Sí	Ayuda a fijarse al tRNA iniciador
IF3	1/7	No	Similar a IF1
Elongación			
EF-Tu	~10	Sí	Lleva el tRNA al lugar A
EF-Ts	1	Sí	Participa en la recarga de EF-Tu con GTP
EF-G	1	Sí	Falicita la translocación
Terminación			
RF1	1/20	No	Factor de liberación (UAA, UAG)
RF2	1/20	No	Factor de liberación (UAA, UGA)
RF3	?	Sí	Una GTPasa que impulsa la liberación

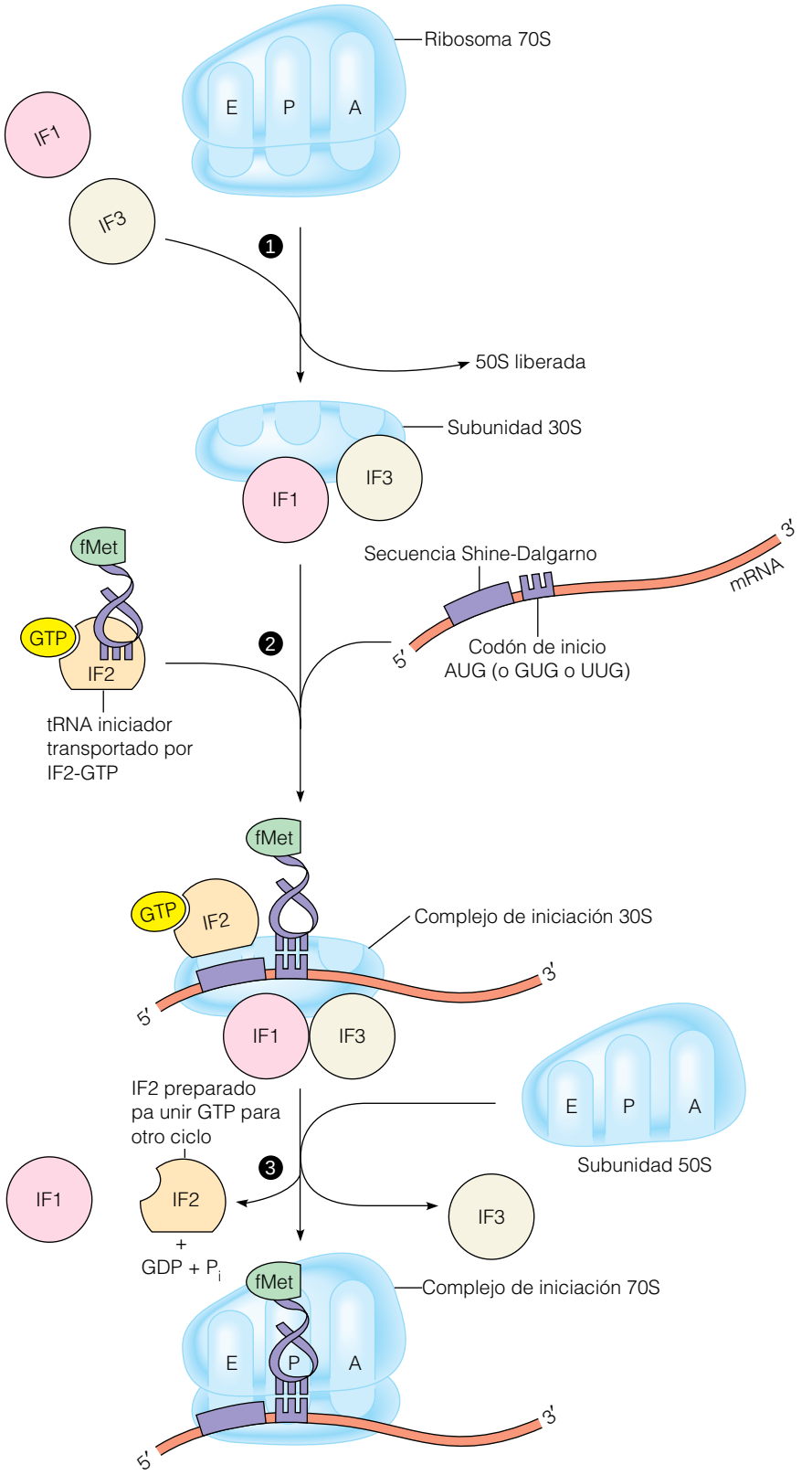


FIGURA **27.20**

Iniciación de la biosíntesis de proteínas en los procariotas. Ciertos detalles del proceso que se describen en el texto no están claros todavía. Así, por ejemplo, no se conoce con exactitud el orden de unión de IF1, IF2, IF3, tRNA y mRNA. Presentamos aquí un modelo actual. E, P y A se denominan, respectivamente, los lugares de unión de salida, del peptidilo y del aminoacilo.

tionina. El grupo formilo se añade *después* de la carga del tRNA, por una enzima (*transformilasa*) que reconoce el $tRNA^{fMet}$ específico y transfiere un grupo formilo desde el N^{10}-formiltetrahidrofolato. *Únicamente* el $tRNA^{fMet}$ se acepta para formar el complejo de iniciación; todos los demás tRNA cargados requieren el ribosoma completamente ensamblado. En consecuencia, todas las proteínas procariotas se sintetizan con el mismo residuo N-terminal, la *N*-formilmetionina. En casi todos los casos, el grupo formilo se elimina durante la elongación de la cadena. Para muchas proteínas, la propia metionina se separa también posteriormente.

En la iniciación, la fijación correcta del mRNA al ribosoma se determina mediante la unión de la secuencia Shine-Dalgarno a una secuencia del rRNA 16S del ribosoma.

El mRNA se engancha a la subunidad 30S cerca del extremo 5′ del mensaje, lo cual es adecuado ya que todos los mensajes se traducen en la dirección 5′→3′. Al describir la estructura de los mensajes procariotas característicos, hemos mencionado la presencia de una secuencia de unión específica (la secuencia Shine-Dalgarno) cerca del extremo 5′ de cada mRNA. Cerca del extremo 3′ de un RNA ribosómico 16S existe una secuencia que puede formar pares de bases con estas secuencias del mRNA. La secuencia del rRNA 3′···UCCUCC···5′ se apareará con cualquier secuencia Shine-Dalgarno (por ejemplo, las mostradas en la Tabla 27.3). Estos apareamientos alinean correctamente el mensaje para el comienzo de la traducción. En particular, sitúa el codón iniciador cerca del lugar P, uno de los tres lugares del ribosoma de unión al tRNA (véase más adelante).

La traducción no puede empezar hasta que la subunidad 50S se haya unido al complejo de iniciación 30S. El ribosoma tiene tres lugares para la unión del tRNA, denominados lugar P (peptidilo), lugar A (aminoacilo) y lugar E (salida). Como se ha mencionado antes, el codón iniciador AUG con su $tRNA^{fMet}$ unido se alinea con el lugar P. En este punto, se hidroliza la molécula de GTP transportada por el IF2 y se libera IF2-GDP, P_i e IF1. El complejo de iniciación 70S formado de esta manera está preparado para aceptar un segundo tRNA cargado e iniciar la elongación de la cadena proteica.

Se ha establecido mediante estudios de entrecruzamiento químico y de difracción la situación de los lugares de unión P, A y E para los tRNA. Los estudios de entrecruzamiento muestran que los extremos del anticodón de las moléculas de tRNA contactan con la subunidad 30S, mientras que los extremos aceptores interaccionan específicamente con la subunidad 50S (Figura 27.21). Todas las proteínas ribosómicas que contactan se encuentran en la cavidad entre las subunidades 30S y 50S. Las moléculas de tRNA están orientadas con sus anticodones alcanzando al mRNA en el fondo de la cavidad, cerca de la subunidad 30S y sus extremos aceptores en contacto con la región peptidiltransferasa en la subunidad 50S, cerca de la parte superior de la cavidad.

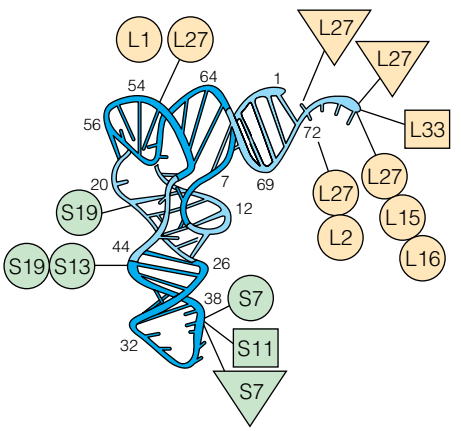


FIGURA **27.21**

Ambiente de los tRNA en el ribosoma tal como se determina por entrecruzamiento. Se muestran los entrecruzamientos desde las posiciones definidas de nucleótidos en el tRNA hacia las proteínas. Las proteínas se entrecruzaron diferencialmente dependiendo de la situación del tRNA (triángulos, lugar A; círculos, lugar P; cuadrados, lugar E; S = subunidad pequeña; L = subunidad grande).

Cortesía de J. Wower et al., *Biochimie* (1994) 76:1235-1246. © (1994) con permiso de Elsevier Science.

ELONGACIÓN

El crecimiento de la cadena polipeptídica en el ribosoma se produce mediante un proceso cíclico. Hasta hace poco, se pensaba que en el proceso intervenían tan sólo dos lugares de unión del tRNA, los lugares P y A. Sin embargo, actualmente está claro que intervienen *tres* lugares. La Figura 27.22 ilustra un solo paso por este ciclo. Imaginemos que se trata del primer paso tras la formación del complejo de iniciación 70S, o de cualquier paso posterior. Todos son iguales hasta que se llega a una señal de terminación.

Al comienzo de cada ciclo, la cadena polipeptídica naciente está enganchada a un tRNA en el lugar P (peptidilo) y los lugares A (aminoacilo) y E (salida) están vacíos. Alineado con el lugar A se encuentra el codón del mRNA correspondiente al *siguiente* aminoácido que se va a incorporar. El tRNA cargado

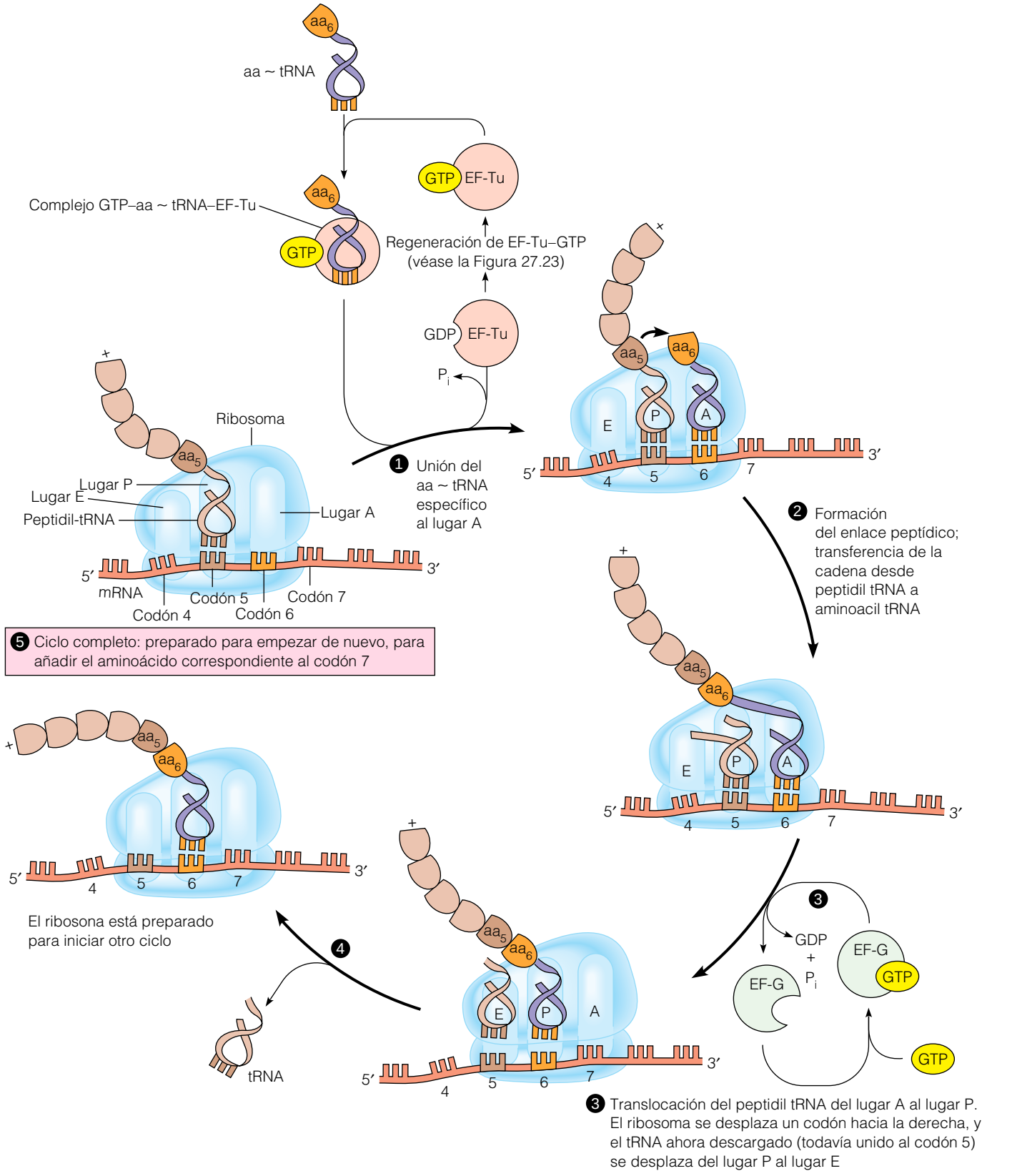


FIGURA **27.22**

Elongación de la cadena en la traducción de los procariotas. El proceso se presenta en forma de ciclo. Después de la translocación (paso 3) y la liberación del tRNA (paso 4), el ribosoma está preparado para aceptar el siguiente aminoacil tRNA (aa~tRNA) y repetir el ciclo. Este ciclo continuará hasta que se llegue a un codón de terminación.

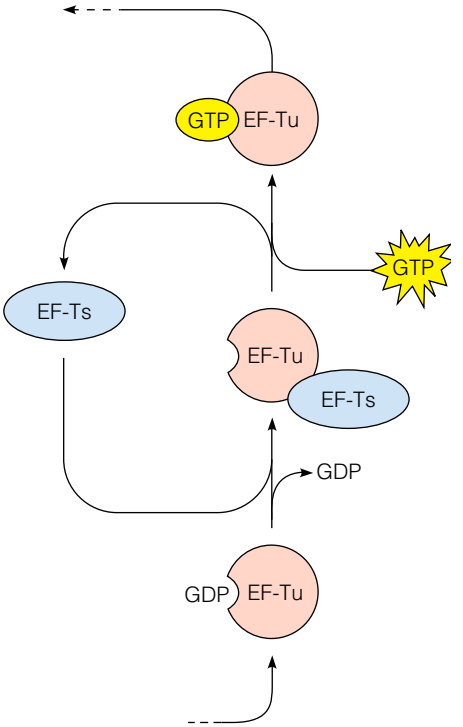
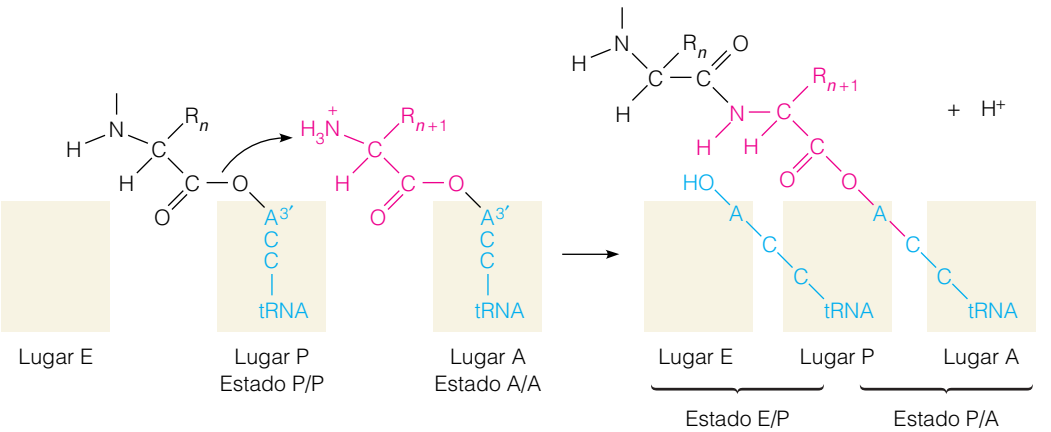


FIGURA **27.23**

Regeneración de EF-Tu-GTP por intercambio Tu-Ts. En esta figura se presentan los detalles del ciclo de regeneración que se muestra en la parte superior de la Figura 27.22. La unión del factor EF-Ts a EF-Tu permite la liberación de GDP y la unión de un nuevo GTP para preparar el EF-Tu para otro ciclo.

(aminoacilado) es escoltado hacia el lugar A en un complejo con una proteína, el **factor de elongación** EF-Tu, que lleva también una molécula de GTP. (Obsérvese aquí el paralelismo con el IF2-GTP.) Cuando el tRNA cargado adecuado se deposita en el lugar A, el GTP se hidroliza, y se libera EF-Tu-GDP (Figura 27.22, paso 1). En este paso se produce la corrección de pruebas. El complejo EF-Tu-GTP se regenera luego por el ciclo subsidiario que se muestra en la Figura 27.23. Una vez en su lugar el tRNA cargado, se realiza una comprobación antes y después de la hidrólisis del GTP y se rechaza si es incorrecto.

El siguiente paso, crucial, es la formación del enlace peptídico (Figura 27.22, paso 2). La cadena polipeptídica que estaba enganchada al tRNA en el lugar P se transfiere ahora al grupo amino del aminoácido transportado por el tRNA del lugar A. Este paso se denomina **transferencia del peptidilo** y lo realiza un complejo enzimático denominado *peptidiltransferasa*, que es parte integrante de la subunidad 50S. Algunos estudios recientes indican que, aunque algunas proteínas ribosómicas pueden formar parte de este complejo enzimático, el RNA ribosómico desempeña él mismo un papel fundamental, actuando como una ribozima (véanse las páginas 441-445). Actualmente se cree que esta transferencia implica un cambio desde los estados simples P y A a estados híbridos, en los cuales los extremos aceptores de las dos moléculas de tRNA se mueven a las posiciones de la izquierda, mientras que los extremos del codón permanecen fijos como antes. Estos estados híbridos están indicados como E/P y P/A:



Esto puede considerarse como la primera mitad del paso de translocación (paso 3 en la Figura 27.22).

Para completar el paso de **translocación**, el extremo del anticodón del tRNA ya descargado en el lugar P se transfiere al lugar E, y el tRNA del lugar A (el tRNA que lleva enganchada ahora la cadena polipeptídica naciente) se desplaza totalmente al lugar P. En el proceso, el ribosoma se desplaza un paso de 3 nucleótidos en la dirección 3′, colocando un nuevo codón adyacente al lugar A que ahora está vacío. Como en la transferencia de peptidilo, este paso requiere un factor proteico (EF-G) unido a GTP y necesita la hidrólisis de GTP. Los estudios cristalográficos recientes descubren un "mimetismo molecular" notable entre EF-G-GTP y el complejo ternario aa-tRNA-EF-Tu-GTP. Como muestra la Figura 27.24, la proteína y el complejo RNA-proteína tienen casi exactamente la

En la elongación, la cadena peptídica en crecimiento en el lugar P se transfiere al aminoacil tRNA recién llegado en el lugar A. La translocación desplaza entonces este tRNA al lugar P, y el tRNA previo al lugar E.

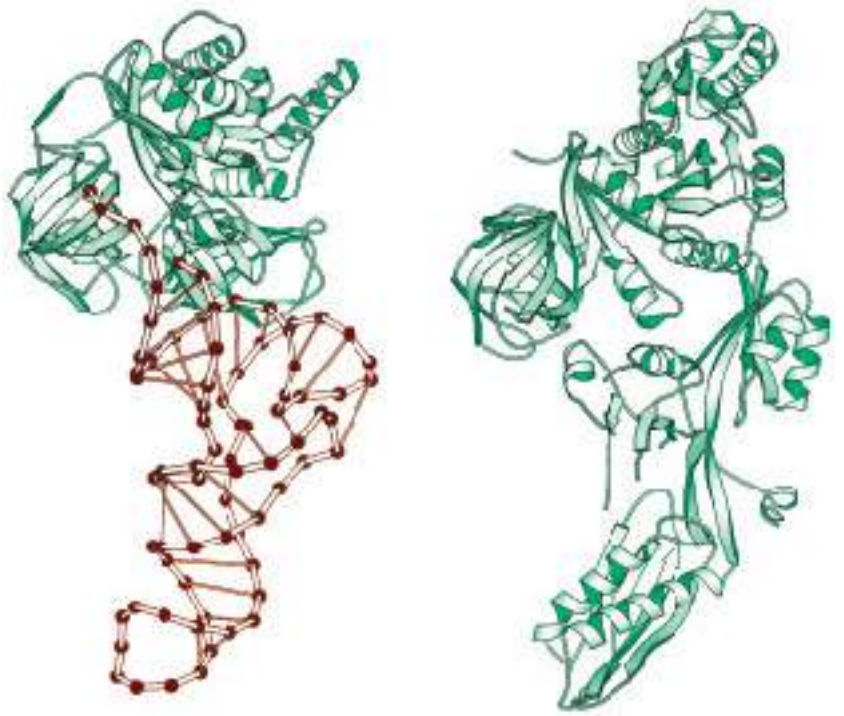
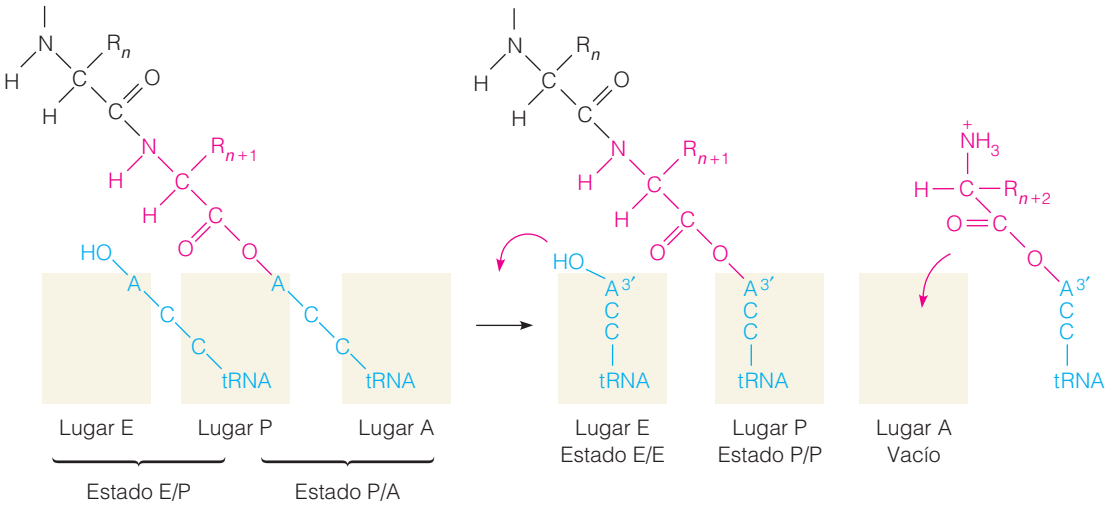


FIGURA **27.24**

Semejanza estructural sorprendente entre el factor de translocación EF-G (derecha) y el complejo ternario aa-tRNA-EF-Tu-GTP (izquierda). La proteína se presenta de color verde y el DNA de color marrón.

Cortesía de J. Nyborg, Universidad de Aarhus, de P. Nissen et al., *Science* (1995) 270:1464-1472, con permiso de *Science*.

misma forma, a pesar de que difieren completamente en su composición y secuencia. Se especula que la razón de esta semejanza es permitir que el EF-G-GTP se mueva temporalmente al lugar A, facilitando el desplazamiento del complejo peptidil-tRNA.



En este punto, los lugares E y P están ocupados, mientras que el lugar A está vacío. Cuando el tRNA antiguo se libera de E (paso 4, Figura 27.22), el lugar A adquiere una afinidad elevada y acepta el aminoacil tRNA que dicta el codón siguiente. Se ha completado entonces un ciclo de elongación. Todo está igual que al comienzo, excepto que ahora:

1. La cadena polipeptídica ha crecido en un residuo.
2. El ribosoma se ha desplazado a lo largo del mRNA en tres residuos de nucleótidos, un codón.
3. Se han hidrolizado, al menos, dos moléculas de GTP.

Todo el proceso se repite una y otra vez hasta llegar a una señal de terminación.

Según se sintetiza la cadena polipeptídica, pasa a través de un túnel en la subunidad 50S y emerge de un agujero cerca del fondo. En la Figura 27.25 se presentan las situaciones aproximadas y los lugares destacados.

TERMINACIÓN

La terminación requiere unos factores de liberación proteicos que reconocen de alguna manera los codones de detención.

La finalización de la síntesis polipeptídica la señala la translocación de uno de los **codones de detención** (UAA, UAG o UGA) al lugar A. Dado que no hay ningún tRNA que reconozca estos codones en circunstancias normales, la terminación de la cadena no implica la unión de un tRNA. En su lugar intervienen en el proceso de terminación unas proteínas denominadas **factores de liberación**. Los tres factores de liberación que se encuentran en los procariotas se indican en la Tabla 27.4. Dos de estos factores pueden unirse al ribosoma cuando un codón de detención ocupa el lugar A: el RF1 reconoce UAA y UAG y el RF2 reconoce UAA y UGA. El tercer factor, RF3, es una GTPasa que parece estimular el proceso de liberación, a través de la unión e hidrólisis del GTP.

Durante mucho tiempo se pensó que el RF1 y el RF2 ocupaban realmente el lugar A y de alguna manera contactaban con el codón de terminación. Sin embargo, es posible que no sea así. De hecho, hay algunos datos que indican que el codón finalizador puede interaccionar también con una secuencia específica del RNA ribosómico, de manera que la función de los factores de liberación sea más indirecta.

En cualquier caso, la secuencia de fenómenos de terminación es la que se muestra en la Figura 27.26. Tras la unión del RF1 o el RF2 al ribosoma, la pep-

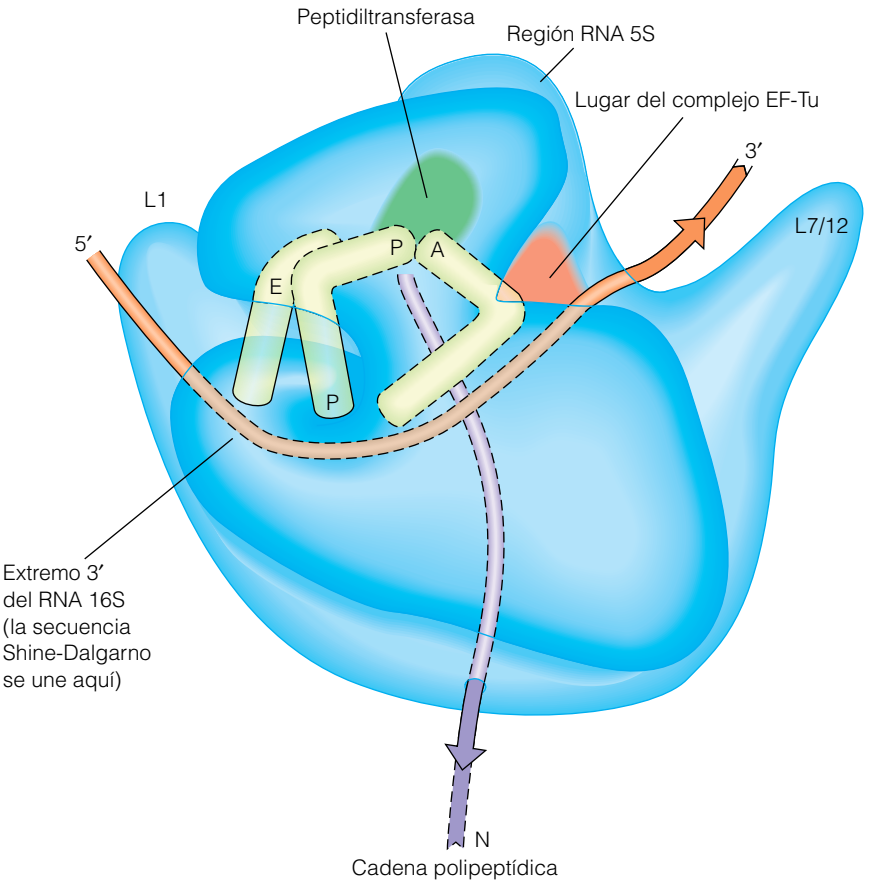


FIGURA **27.25**

Presentación esquemática de las regiones funcionales del ribosoma. Para dibujar la situación de los lugares del tRNA se muestran ocupados los tres lugares, aunque esto no se produce nunca durante la síntesis de proteínas. Esta imagen tiene de frente la subunidad 30S y detrás la 50S.

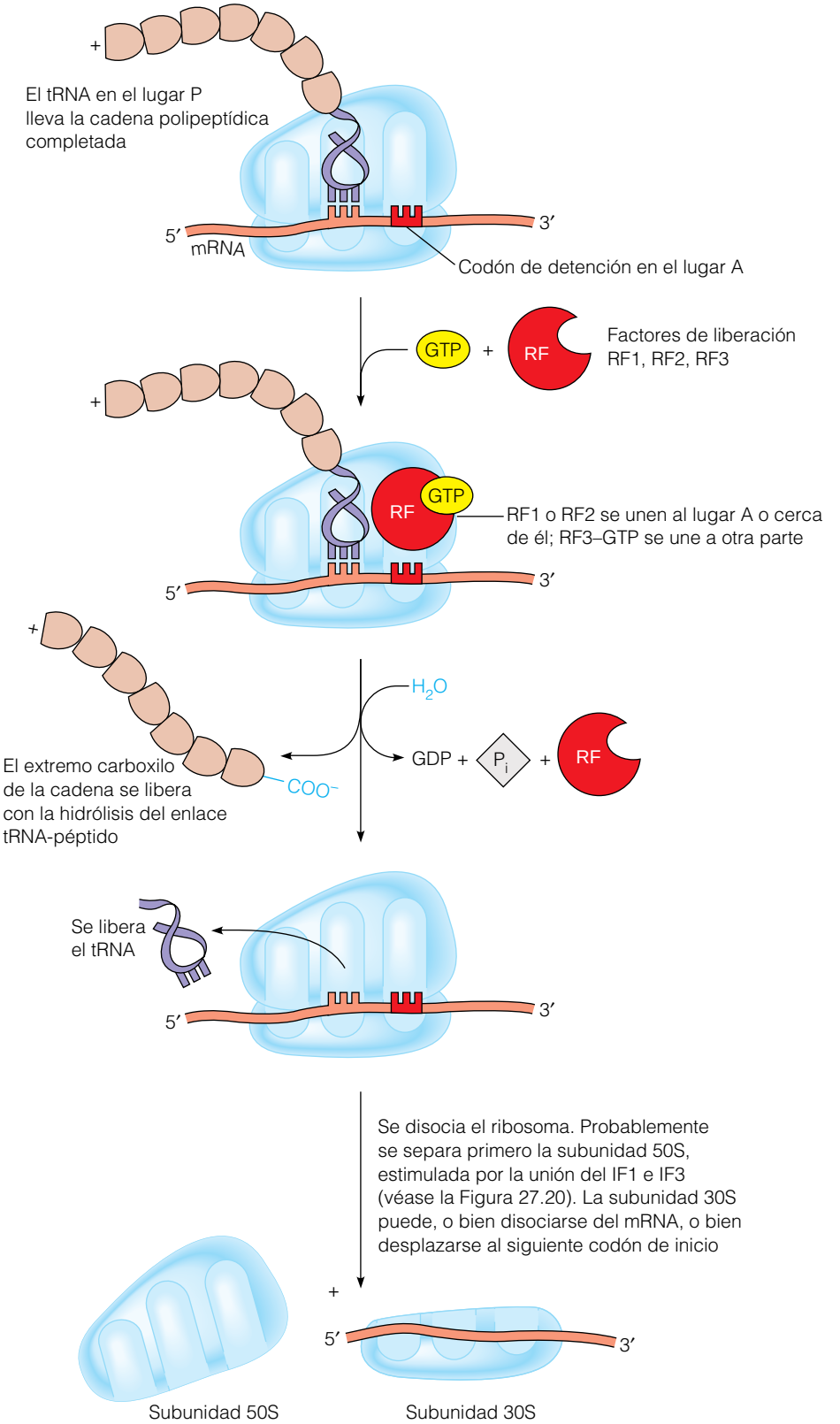


FIGURA **27.26**

Terminación de la traducción en los procariotas. Véase el texto.

tidiltransferasa transfiere el residuo C-terminal de la cadena polipeptídica desde el tRNA del lugar P a una molécula de agua, liberando la cadena peptídica del ribosoma. Los factores RF y el GDP se liberan, seguidos por el tRNA. El ribosoma 70S es ahora inestable. Su inestabilidad se acentúa por la presencia de una proteína denominada *factor de reciclado del ribosoma* y también por los factores de iniciación IF3 e IF1, y el ribosoma se disocia con facilidad en las subunidades 50S y 30S, que están entonces preparadas para un nuevo proceso de traducción.

Cuando las subunidades ribosómicas se separan, la subunidad 30S puede disociarse o no de su mRNA. En algunos casos en los que se están traduciendo mensajes policistrónicos, la subunidad 30S puede deslizarse simplemente a lo largo del mRNA hasta encontrar la siguiente secuencia Shine-Dalgarno y el codón de iniciación y empezar un nuevo proceso de traducción. Si la subunidad 30S sí se disocia del mensaje, pronto se volverá a unir a otro.

SUPRESIÓN DE LAS MUTACIONES

El conocimiento del proceso de terminación ayudó a aclarar algunas observaciones peculiares respecto a las mutaciones sin sentido. Recuérdese del Capítulo 7 que una *mutación sin sentido* es aquella en la que un codón de un aminoácido se ha convertido por una mutación en un codón de detención, de forma que la cadena polipeptídica termina prematuramente. Poco después de que se descubrieran estas mutaciones, se encontró una misteriosa clase de mutaciones aparentes de reversión. No se trataba simplemente de inversiones de las mutaciones sufridas en el gen mutado, sino de mutaciones en *otros* genes que de alguna manera *suprimían* las mutaciones sin sentido. Recuérdese del Capítulo 24 que la supresión se define genéticamente como el restablecimiento de la función de tipo natural mediante una segunda mutación en un lugar diferente. Cuando se produce esta segunda mutación en un gen diferente, el fenómeno se denomina **supresión intergénica**. Al estudiar estas mutaciones supresoras se observó que se encuentran en los genes del tRNA.

Los efectos de las mutaciones sin sentido pueden suprimirse a veces por mutaciones supresoras, en las que el tRNA muta para reconocer un codón de detención e insertar en su lugar un aminoácido.

Consideremos el ejemplo que se muestra en la Figura 27.27. Una mutación sin sentido ha modificado un codón que normalmente especifica el aminoácido tirosina convirtiéndolo en un codón de detención, que hace que se interrumpa la cadena polipeptídica. Sin embargo, si uno de los diversos tRNA de la tirosina sufre una mutación en su región del anticodón de forma que reconozca el codón de detención, la traducción puede continuar a veces de manera normal. Así pues, una mutación que de otro modo podría resultar letal puede suprimirse por un cambio de este tipo y el microorganismo puede sobrevivir. Evidentemente, continuarán existiendo problemas, ya que la presencia de un tRNA mutado de este tipo interferirá con la terminación normal de otras proteínas. La posibilidad de supervivencia depende del hecho de que la mutación supresora afecte generalmente a especies moleculares de tRNA secundarias, poco utilizadas en la traducción normal. Además, estos efectos pueden reducirse al mínimo con la aparición frecuente de dos o más señales de detención diferentes en tándem en los mRNA. Aunque se haya suprimido el primer codón de detención, continúa funcionando el "freno de urgencia".

Las mutaciones supresoras no se limitan en modo alguno a la corrección de las mutaciones sin sentido. Algunos tRNA mutados corrigen las mutaciones de sentido erróneo, y algunos incluso contienen dos o cuatro bases que actúan como el anticodón. Éstos pueden por tanto actuar como **supresores de desplazamiento de marco**.

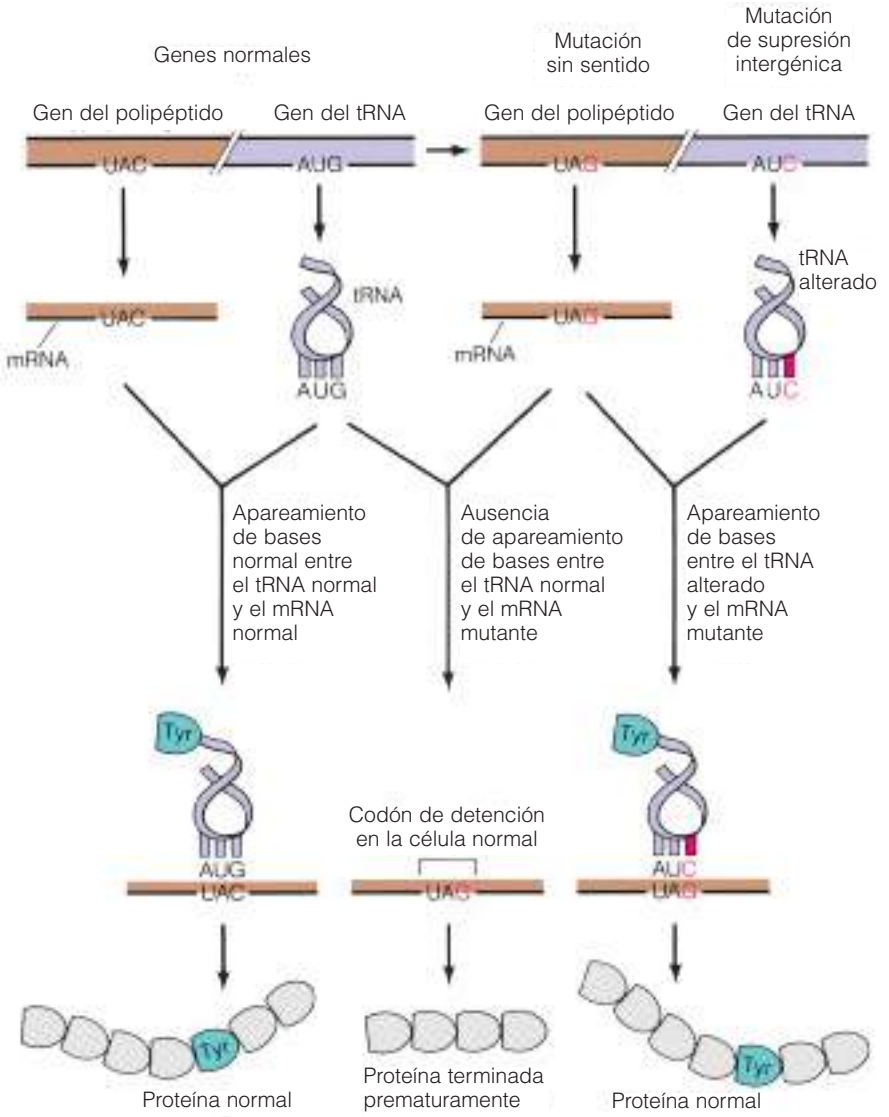


FIGURA **27.27**

Modo en que una mutación de supresión intergénica puede recuperar una mutación sin sentido. Una mutación sin sentido en un gen peptídico cambia un codón correspondiente a un aminoácido por un codón de detención, provocando que la traducción finalice prematuramente. Otra mutación, en un gen de tRNA, puede evitar los efectos de la primera mutación al modificar el anticodón del tRNA de manera que se aparee con el mRNA mutante. En esta situación se produce una proteína normal.

Inhibición de la traducción por antibióticos

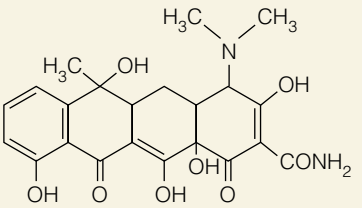
Gran parte de lo que conocemos sobre la traducción lo hemos averiguado en estudios de los **antibióticos** que interfieren en este proceso. Diversos organismos producen sustancias que interfieren en la síntesis proteica de otros organismos. Cuando los organismos diana son las bacterias, estas sustancias actúan como antibióticos.

Hemos descrito ya la acción de algunas clases de antibióticos. En los Capítulos 9 y 16, vimos que las penicilinas inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana, y en el Capítulo 10 consideramos los antibióticos como la gramicidina y la valinomicina que interfieren en el equilibrio iónico a través de las membranas. Las *sulfamidas* (Capítulo 20) son antimetabolitos, y otros antibióticos, como la *rifampicina* y la *estreptolidigina* (Capítulo 26), bloquean la transcripción en los procariotas.

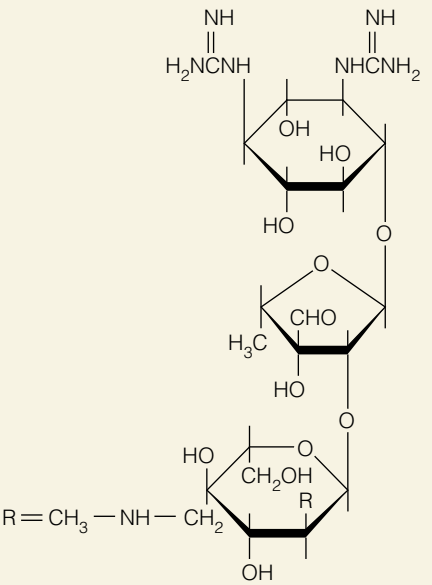
Dado que la traducción es un proceso muy complejo y vital, no parece extraño que constituya un lugar de acción predilecto de los antibióticos. Una gran cantidad de sustancias existentes en la naturaleza interfieren en diversas fa-

Diversos antibióticos importantes actúan inhibiendo la traducción en las células bacterianas.

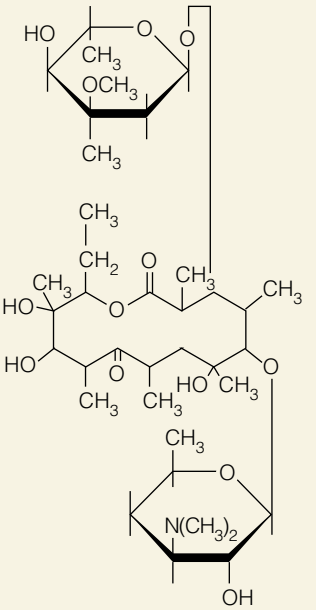
ses de la síntesis proteica. En la Figura 27.28 se indican algunas de las más importantes. Cada una de estas sustancias inhibe la traducción de una forma diferente. Su importancia para la medicina deriva en gran parte del hecho de que la maquinaria de traducción de los eucariotas difiere lo suficiente de la de los procariotas como para que estos antibióticos puedan utilizarse sin peligro en el ser humano. En algunos casos (por ejemplo, las tetraciclinas), los antibióticos



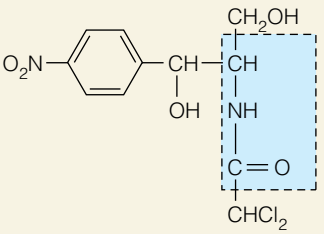
Tetraciclina: Inhibe la unión del aminoacil tRNA al ribosoma y bloquea, por tanto, la continuación de la traducción



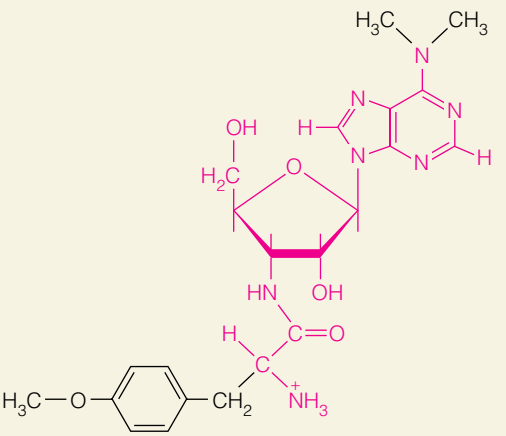
Estreptomicina: Interfiere con el apareamiento normal entre el aminoacil tRNA y los codones del mensaje, causando errores de lectura, y produciendo, por tanto, proteínas aberrantes



Eritromicina: Se une a un lugar específico en el RNA 23S y bloquea la elongación al interferir en el paso de translocación



Choranfenicol: Bloquea la elongación aparentemente actuando como un inhibidor competitivo del complejo peptidiltransferasa. El enlace amida (en azul) se parece a un enlace peptídico



Puromicina: Causa la terminación prematura de la cadena. La parte roja de la molécula se parece al extremo 3′ del tRNA aminoacilado. Entrará en el lugar A y lo transferirá a la cadena en crecimiento, produciendo una liberación prematura de la misma

FIGURA **27.28**

Algunos antibióticos que actúan interfiriendo con la biosíntesis proteica.

que inhibirían también la traducción en los eucariotas les resultan inocuos porque no son capaces de atravesar las membranas celulares de los organismos superiores.

Un problema con el uso terapéutico de los antibióticos es que los microorganismos pueden presentar resistencias a muchos de ellos. Esta resistencia se debe con frecuencia a la adquisición de un "gen de resistencia" concreto. Un ejemplo importante es la resistencia a la *eritromicina*. El lugar de unión de la eritromicina en el ribosoma incluye una región específica del RNA 23S, y la unión del antibiótico puede inhibirse por una enzima que metila un residuo de adenina concreto de esta región. Los biólogos moleculares utilizan la resistencia a la eritromicina para la selección de los clones de bacterias que contienen determinados plásmidos (véase Herramientas de la Bioquímica 25B). La resistencia a la eritromicina puede conferirse a una bacteria mediante la inserción de un gen de resistencia que codifica la metilasa en un plásmido bacteriano. Las bacterias que contienen el plásmido que lleva el gen de la metilasa crecerán en un medio que contenga eritromicina, mientras que las que carezcan del plásmido morirán. Así pues, el crecimiento en un medio así selecciona automáticamente los clones portadores del plásmido.

Velocidades y energética de la traducción

La traducción es un proceso rápido en los procariotas. A 37°C un ribosoma de *E. coli* puede sintetizar una cadena polipeptídica de 300 residuos en unos 20 segundos. Dado que la elongación de la cadena es el paso limitante de la velocidad, esto significa que un solo ribosoma pasa por unos 15 codones, es decir, 45 nucleótidos, cada segundo. Esta velocidad es casi exactamente la misma que atribuimos a la *transcripción* en los procariotas, lo cual indica que el mRNA puede traducirse con la misma rapidez con la que se transcribe. Pero la velocidad que indicamos aquí no explica en modo alguno la velocidad total de la síntesis proteica en la célula, ya que puede haber muchos ribosomas que estén traduciendo simultáneamente un determinado mensaje. De hecho, si lisáramos de forma cuidadosa las células de *E. coli*, observaríamos **polirribosomas** como los que se muestran en la Figura 27.29. Al parecer, en cuanto un ribosoma se mueve dejando libre la región 5′ del mRNA, se engancha otro. En determinadas condiciones puede haber hasta 50 ribosomas empaquetados densamente sobre un mRNA, de manera que uno de ellos finaliza la traducción cada pocos segundos. Dado que cada célula de *E. coli* contiene unos 15 000 ribosomas, todos ellos actuando a plena capacidad son capaces de sintetizar unas 750 moléculas de proteína de 300 residuos cada segundo.

El coste energético de este proceso es elevado. Si examinamos los pasos individuales de la síntesis proteica que se han descrito antes, podemos realizar el siguiente cálculo del presupuesto energético total de la síntesis de una proteína de N residuos:

El *equivalente* de	
$2N$	ATP requeridos para cargar los tRNA, ya que el ATP se degrada a AMP y PP_i, y el PP_i se hidroliza posteriormente.
1	GTP necesario para la iniciación.
N-1	GTP requeridos para formar los N-1 enlaces peptídicos, en el paso de hidrólisis de EF-Tu-GTP.
N-1	GTP necesarios para los N-1 pasos de translocación.
1	GTP requerido para la terminación.
Suma = $4N$	

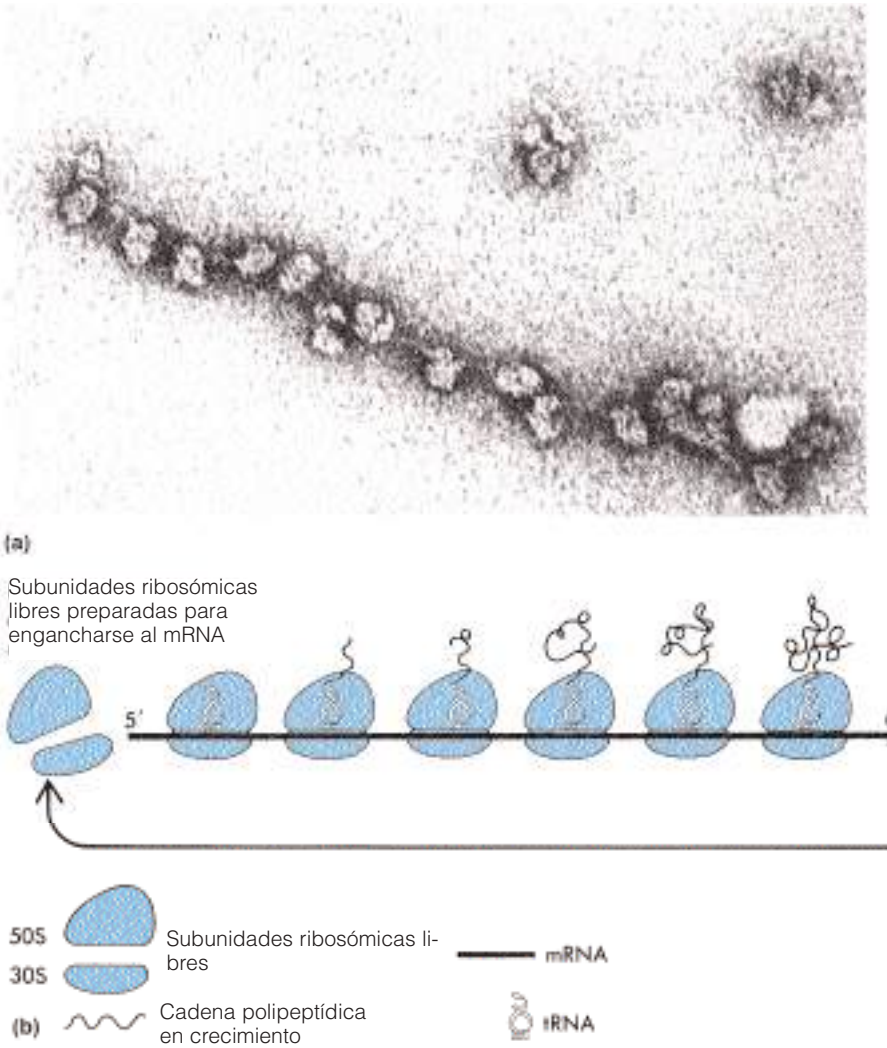


FIGURA **27.29**

Polirribosomas. **(a)** Fotografía de microscopia electrónica en la que se observan los polirribosomas de *E. coli*. Los ribosomas están agrupados densamente sobre una molécula de mRNA. **(b)** Representación esquemática de un polirribosoma como el que se muestra en **(a)**. Cada ribosoma ha de imaginarse moviéndose de izquierda a derecha.

(a) Cortesía de Barbara Hamkalo; **(b)** tomado de J. D. Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4.ª ed. (Redwood City, Calif.: Benjamin/Cummings, 1987). © 1987 J. D. Watson.

La traducción es rápida pero energéticamente cara. Son necesarios aproximadamente cuatro equivalentes de ATP por cada aminoácido añadido.

Así pues, globalmente, deben hidrolizarse unas 4*N* moléculas de fosfato de energía elevada para completar una cadena de *N* unidades. Esto corresponde a un cálculo mínimo, puesto que no tiene en cuenta la energía requerida para formilar la metionina, ni el coste adicional de GTP que puede gastarse en la corrección de pruebas y la sustitución de los tRNA unidos de forma incorrecta. Además, ha habido comunicaciones persistentes, aunque controvertidas, de que deben hidrolizarse *dos* GTP por cada aa-tRNA unido al lugar A. Pero incluso con este cálculo conservador, una proteína característica de 300 residuos tiene un coste para la célula de unos 50 000 kJ de energía libre por mol, si suponemos que la hidrólisis de ATP o de GTP proporciona unos 40 kJ/mol en condiciones celulares. ¡Las proteínas son caras!

Si expresamos los mismos datos en términos de requerimientos energéticos para la síntesis por mol de *enlace peptídico*, obtenemos un coste de aproximadamente 160 kJ/mol. Teniendo en cuenta que el cambio de energía libre que se requiere para formar un enlace peptídico en disoluciones acuosas diluidas es de tan sólo unos +20 kJ/mol, el precio parece excesivo. ¿Por qué no dispone la célula de ningún mecanismo para elaborar enlaces peptídicos a un coste de unas docenas de kilojulios? Ciertamente, el empleo de 40 kJ/mol sería suficiente para hacer que el proceso de síntesis fuera muy favorable, con una constante de equilibrio de alrededor de 3000.

La clave de este gasto energético tan elevado se encuentra en la naturaleza misma de la vida. La célula elabora polipéptidos que tienen una secuencia *definida*. Si se tratara simplemente de unir aminoácidos de forma aleatoria, el coste de energía libre podría ser ciertamente muy inferior. Pero una cadena de 300 residuos, elaborada con 20 tipos de aminoácidos diferentes, puede realizarse de 20^{300} ($\cong 10^{390}$) maneras diferentes, mientras que la célula necesita *una* secuencia específica. En otras palabras, debe pagarse un alto precio de entropía para elaborar secuencias específicas y hacerlo correctamente. Desde el punto de vista del mecanismo, esto significa que cada paso del ensamblaje no sólo debe hacerse con un exceso de energía libre, sino que debe comportar también una *elección* específica. Además, el producto debe verificarse, en determinados puntos críticos, mediante un mecanismo de corrección de pruebas, que tiene también un coste de energía. La traducción de un libro es cara, no sólo porque los traductores han de ser expertos y meticulosos, sino también porque su trabajo ha de revisarse con gran cuidado.

Fases finales de la síntesis proteica: plegado y modificación covalente

La cadena polipeptídica que surge del ribosoma no es una proteína completa funcional. Debe plegarse en su estructura terciaria y puede tener que asociarse con otras subunidades. En algunos casos, deben formarse enlaces disulfuro, y han de producirse otras modificaciones covalentes, como la hidroxilación de determinadas prolinas y lisinas (o cualquiera de las otras modificaciones de aminoácidos que hemos comentado). Además, muchas proteínas sufren luego procesos de ruptura proteolítica específicos para eliminar determinadas partes de la cadena naciente.

PLEGADO DE LA CADENA

La célula no tiene que esperar a que toda la cadena se libere del ribosoma para empezar a realizar los retoques finales. La primera parte de la cadena naciente (unos 30 aminoácidos) está protegida según va pasando a través del túnel en el ribosoma. Sin embargo, los cambios comienzan tan pronto como emerge el extremo N-terminal. Existen datos claros que indican que el plegado para formar la estructura terciaria se inicia durante la traducción y se ha completado casi en su totalidad en el momento en que se libera la cadena. Así por ejemplo, los anticuerpos para la β-galactosidasa de *E. coli*, que reconocen el plegado terciario de la molécula, se unen a los polirribosomas que sintetizan esta proteína. Esta enzima presenta actividad catalítica tan sólo como tetrámero. Se ha demostrado que las cadenas de β-galactosidasa nacientes, aún unidas a los ribosomas, pueden asociarse con subunidades libres para formar un tetrámero funcional. Así pues, incluso la estructura cuaternaria puede establecerse en parte antes de que se haya completado la síntesis.

Este comportamiento no debe resultar extraño si recordamos (de los Capítulos 6 y 7) que la formación de los niveles secundario, terciario y cuaternario de la estructura proteica está favorecido termodinámicamente. Sin embargo, como hemos visto en el Capítulo 6, en algunos casos este plegado espontáneo debe bloquearse o retardarse por proteínas chaperonas.

MODIFICACIÓN COVALENTE

Algunas de las modificaciones covalentes de las cadenas polipeptídicas se producen también durante la traducción. Hemos mencionado antes que el grupo *N*-formilo se elimina de la *N*-fMet inicial en la mayor parte de las proteínas de

La traducción va seguida inmediatamente por diversos tipos de procesamiento proteico, como el plegado de la cadena, la modificación covalente y el transporte dirigido.

los procariotas. Una *desformilasa* especial cataliza esta reacción. En muchos casos, la desformilación parece producirse inmediatamente tras la aparición del N-terminal del ribosoma. La eliminación de la metionina del N-terminal puede ser también un proceso temprano, pero el que se produzca o no depende al parecer del plegado simultáneo a la traducción de la cadena. Presumiblemente, en algunos casos este residuo queda "escondido" y protegido.

Algunas proteínas de los procariotas (y muchos eucariotas) experimentan modificaciones proteolíticas mucho más importantes. Estas proteínas son casi invariablemente las que van a exportarse de la célula o están destinadas a localizaciones de la membrana o de los orgánulos. Dejaremos el análisis del procesado más complicado de las proteínas eucariotas para el Capítulo 28 y nos centraremos aquí en lo que ocurre en los procariotas.

Las proteínas bacterianas destinadas a la secreción (**translocación** a través de la membrana celular) se caracterizan por contener **secuencias señal** o **secuencias líder** muy hidrófobas en las regiones N-terminales. En la Tabla 27.5 se indican algunos ejemplos representativos. Una vez que la proteína ha atravesado la membrana, la secuencia líder se separa en el punto indicado por la flecha en la tabla.

El modelo actualmente aceptado para la translocación en las bacterias es el que se muestra en la Figura 27.30. En muchos casos (aunque no en todos) la proteína que ha de translocarse (la proproteína) forma primero un complejo con una "chaperona" en el citoplasma (la proteína SecB en el ejemplo mostrado). Esta formación del complejo evita el plegado prematuro de la proteína, que impediría su paso a través del poro secretor de la membrana. Este poro está formado por dos tipos de proteínas transmembrana, denominadas SecE y SecY. El poro secretor es también el objetivo de un cuarto componente proteico, el SecA. El SecA es una ATPasa, y tanto la hidrólisis del ATP como el gradiente de potencial electroquímico a través de la membrana facilitan la translocación. Después de translocada la proproteína, se desprende de ella el péptido líder por una proteasa unida a la membrana, y puede plegarse la proteína. El lugar de ruptura, como se muestra en la Tabla 27.5, suele estar entre un aminoácido pequeño (G o A) y uno ácido o básico.

Regulación de la síntesis proteica en los procariotas

En la mayor parte de los organismos, el control global de la biosíntesis proteica se produce fundamentalmente a nivel de la transcripción. Si la necesidad de una proteína disminuye, generalmente tiene un menor coste energético desconectar simplemente la transcripción del gen y no elaborar un mRNA innecesario. Sin embargo, en algunos casos, la regulación se establece a nivel de la traducción, y consideraremos en este apartado algunos ejemplos de los procariotas.

El principal paso de control en la traducción parece ser la iniciación. Esto es lo que podría ser previsible, por dos razones. En primer lugar, es más eficaz blo-

TABLA 27.5 Secuencias señal N-terminales correspondientes a proteínas representativas de los procariotas

Proteína	−20					−15					−10					−5					−1 ↓ +1			
Proteína de unión de leucina	M	K	A	N	A	K	T	I	I	A	G	M	I	A	L	A	I	S	H	T	A	M	A	E E …
Prefosfatasa alcalina			M	K	Q	S	T	I	A	L	A	L	L	P	L	L	F	T	P	V	T	K	A	R T …
Prelipoproteína				M	K	A	T	K	L	V	L	G	A	V	I	L	G	S	T	L	L	A	G	C S …

Nota: Los residuos hidrófobos se indican en rojo. El lugar de ruptura está señalado por la flecha.

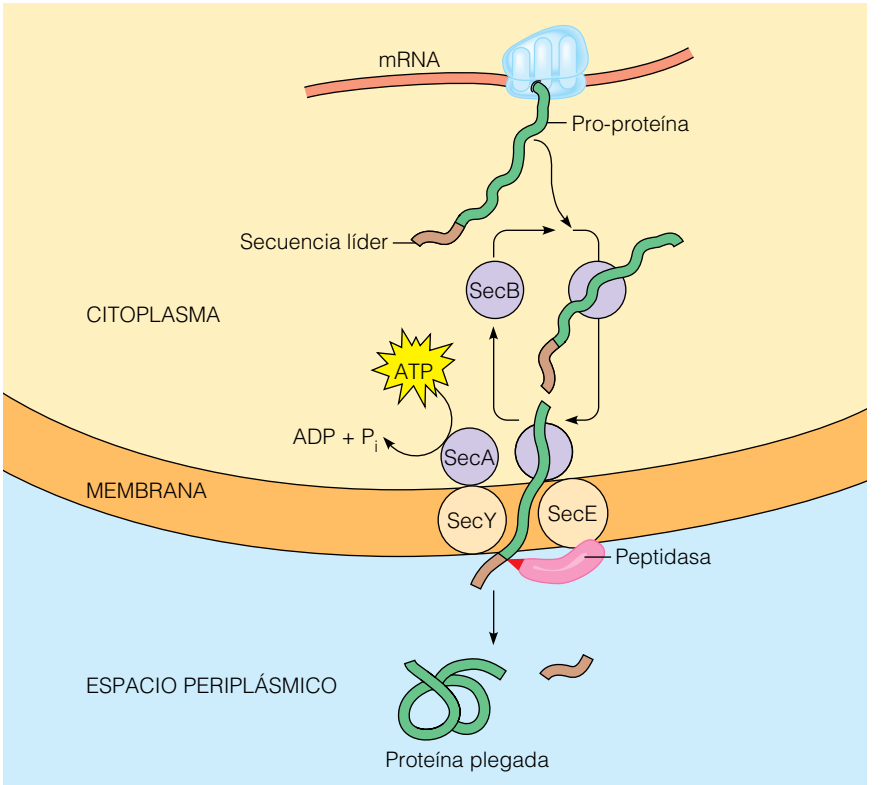


FIGURA **27.30**

Modelo actual para la secreción proteica por los procariotas. La nueva cadena polipeptídica (la pro-proteína) forma complejos con la SecB, que impide el plegado completo durante el transporte a la membrana. En la membrana, una ATPasa, la SecA, facilita la translocación a través de la membrana, con la ayuda de las proteínas de membrana SecE y SecY, que forman un poro de membrana. A continuación, se rompe la secuencia líder, que se separa de la proteína secretada por una peptidasa de membrana.

quear la traducción en su inicio, antes de que haya habido ribosomas dedicados a ella o se haya gastado una energía importante. En segundo lugar, los requerimientos especiales para el ajuste adecuado del mRNA en un ribosoma permiten numerosas formas de bloquear el proceso en este punto. En la actualidad se conocen al menos tres mecanismos mediante los cuales puede controlarse la iniciación de la traducción de determinados mensajes.

1. *La estructura terciaria del mRNA puede impedir su fijación a la subunidad ribosómica 30S.* Este tipo de control parece explicar la regulación de la traducción de diversos mensajes policistrónicos. Un ejemplo es el que se encuentra en el RNA mensajero del bacteriófago MS2, que se muestra en la Figura 27.31. Este mRNA complejo y económico codifica cuatro proteínas esenciales, una de las

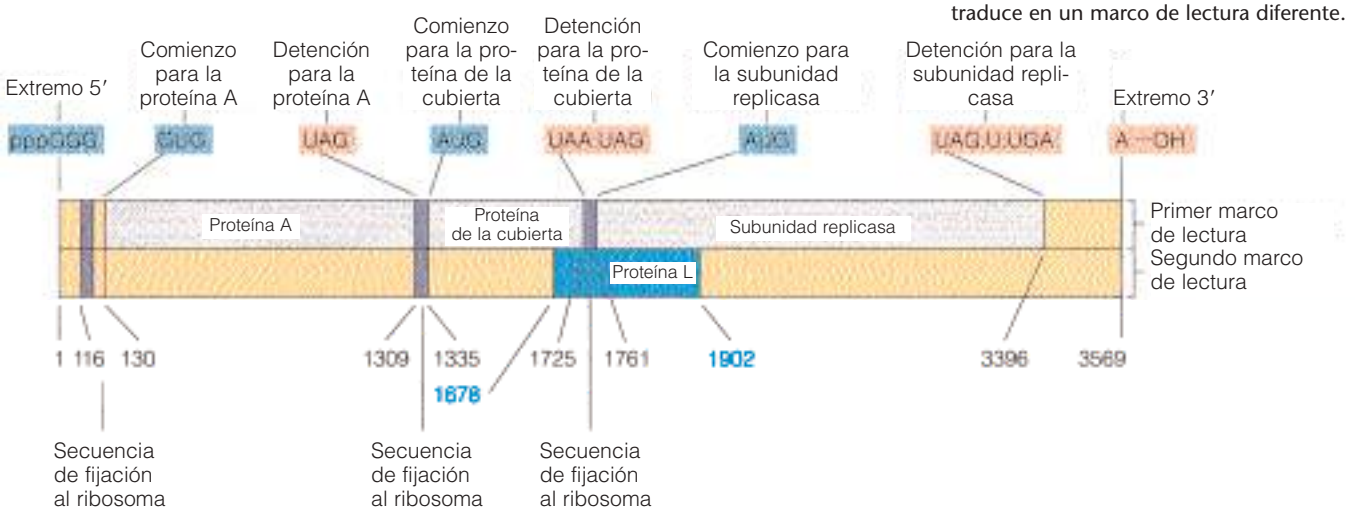


FIGURA **27.31**

RNA del bacteriófago MS2. Esta molécula de RNA sirve de mensaje para las cuatro proteínas que requiere este virus. Las secuencias de codificación para la proteína A, la proteína de la cubierta y la subunidad replicasa se indican en gris. El mensaje de la proteína de lisis (la proteína L, que se indica en azul) se solapa de hecho con los mensajes de la proteína de cubierta y de la replicasa. Se traduce en un marco de lectura diferente.

cuales está codificada mediante un marco de lectura solapado alternado. Consideremos las diferentes exigencias que ha de cumplir la traducción de este mensaje. Para formar nuevos virus, son necesarias *muchas* copias de la proteína de cubierta y un número significativo de subunidades de la replicasa. Pero sólo es necesario por cada virus *una* copia de la proteína A (que se utiliza en el ensamblaje del virus) y sólo una pequeña cantidad de la proteína de lisis (utilizada en la liberación vírica). Si simplemente se tradujera todo el mensaje policistrónico por igual en todas sus partes, ello sería manifiestamente ineficaz. Lo que sucede es lo siguiente. La secuencia de unión del ribosoma en el extremo 5′ del mRNA (que debe iniciar la traducción del mensaje de la proteína A) está bloqueada normalmente por el plegado terciario de la molécula de mRNA. En consecuencia, el ribosoma inicia normalmente la traducción mediante la unión a una secuencia de enganche próxima al lugar de inicio del mensaje de la proteína de cubierta, traduciendo este mensaje de manera eficaz y pasando a veces, pero no siempre, al mensaje de la replicasa. Se sintetiza la replicasa, ésta cataliza la replicación del mRNA del virus. Las copias de las nuevas cadenas que se están transcribiendo no han adoptado aún el plegado de su conformación final. En consecuencia, sus lugares 5′ continúan abiertos para la iniciación y pueden engancharse a ribosomas para traducir la proteína A. Pero esto ocurre una sola vez en la vida de cada mRNA, en el momento de sintetizarse. El mensaje para la proteína de lisis, que se solapa con el mensaje de la proteína de cubierta pero en un marco de lectura diferente, se traduce aparentemente tan sólo de vez en cuando, como consecuencia de un deslizamiento del marco durante la traducción de la proteína de cubierta.

2. *Las proteínas pueden unirse al mRNA, bloqueando la iniciación.* Un ejemplo muy elegante de este tipo de control es el que se encuentra en la síntesis de las propias proteínas ribosómicas. Como se muestra en la Figura 27.32, las proteínas ribosómicas procariotas están codificadas por mensajes policistrónicos. En cada grupo codificado por un mensaje de este tipo hay *una* proteína que es capaz de unirse en el extremo 5′ del mensaje o cerca de él y de bloquear su traducción. Esta unión parece producirse debido a que el mRNA tiene una estructura terciaria semejante a la del lugar de unión normal para esta proteína en el rRNA.

La belleza de este sistema puede observarse comparando la Figura 27.32 con la Figura 27.19. Las proteínas que controlan la síntesis de las proteínas ribosómicas (S4, S7 y S8) son también unas de las primeras en unirse al rRNA en el ensamblaje del ribosoma. Estas proteínas son claves para la construcción del

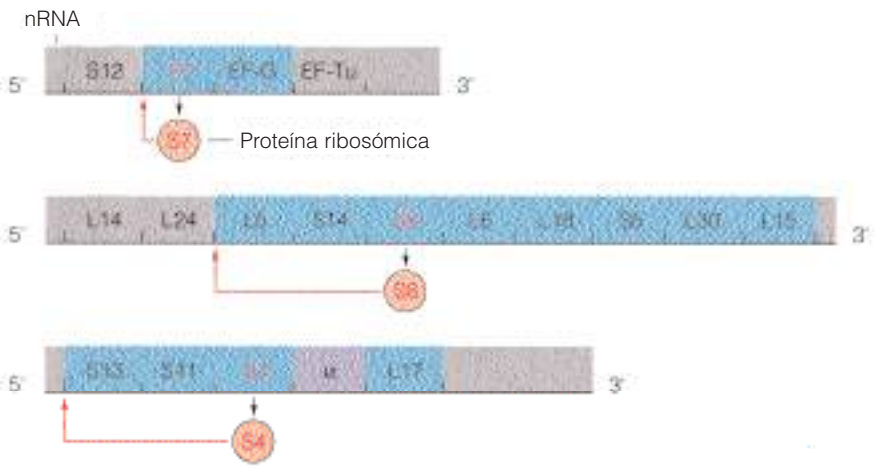


FIGURA **27.32**

Regulación de la síntesis de las proteínas ribosómicas. Se muestran tres ejemplos de mensajes policistrónicos que codifican las proteínas ribosómicas. Obsérvese que estos mRNA contienen también mensajes para el EF-G, el EF-Tu y la subunidad α (púrpura) de la RNA polimerasa. La traducción de cada mensaje policistrónico está controlada por una de las proteínas ribosómicas que codifica, indicada en rojo. La flecha roja indica los lugares de control. El control se extiende *sólo* sobre los cistrones que se muestran de color azul verdoso. En otras palabras, los mensajes de la subunidad α de la RNA polimerasa y del EF-Tu están excluidos de este control.

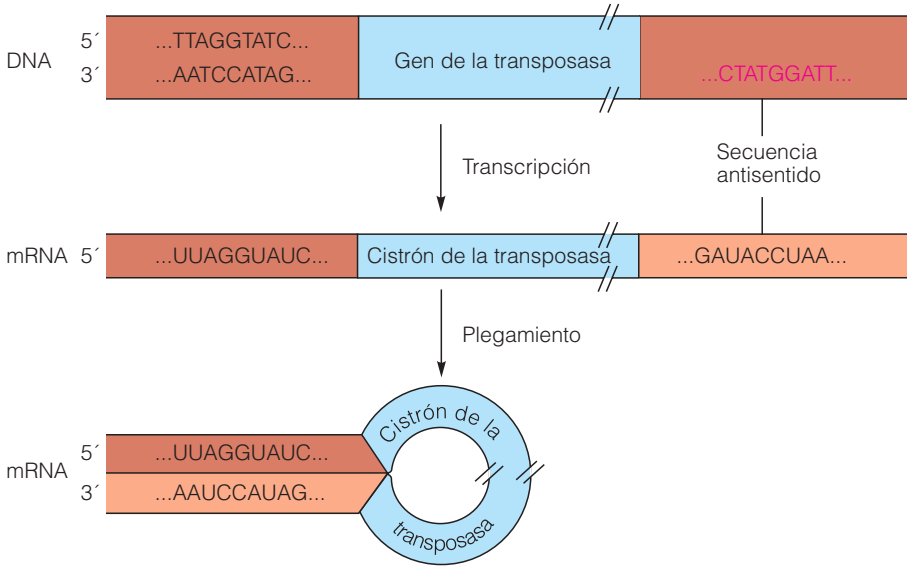
ribosoma, y tienen una afinidad muy alta por los rRNA adecuados. Si el RNA ribosómico es abundante en la célula, lo que señalaría la necesidad de proteínas ribosómicas, las proteínas de "control" se incorporan a los ribosomas y puede tener lugar la síntesis de todas las proteínas ribosómicas. Pero si el rRNA es escaso, las proteínas "control" no utilizadas se unirán a los mRNA adecuados interrumpiendo la síntesis de otras proteínas ribosómicas que en ese momento no son necesarias.

Aunque no es una cuestión de control de la traducción, conviene señalar aquí que la síntesis de rRNA está a su vez bajo control metabólico. En los procariotas, la falta de aminoácidos da lugar a la acumulación de los nucleótidos poco habituales ppGpp y pppGpp (véase la página 1148). Éstos tienen un efecto inhibidor intenso sobre la transcripción del rRNA, y esa inhibición, a su vez, inhibe la síntesis de proteínas ribosómicas. Así pues, las condiciones de inanición inducen un "ajuste de cinturón" general en el aparato biosintético.

3. *El RNA antisentido puede bloquear la iniciación.* En diversas situaciones se sabe que el control de la traducción se afecta por la síntesis de fragmentos de RNA antisentido en otro locus genómico. Estos fragmentos corresponden a la cadena no codificante del DNA y son complementarios del extremo 5′ de un mRNA. Una secuencia antisentido bloquea el lugar de iniciación mediante la formación de una estructura de doble cadena, como se muestra para la traducción del mRNA de la transposasa en la Figura 27.33.

El bloqueo selectivo de la traducción de los mensajes específicos por el RNA antisentido tiene aplicaciones potenciales para el tratamiento de enfermedades y quizás el cáncer. Sin embargo, una dificultad importante en el uso de RNA como fármacos para inactivar genes es el paso de moléculas de RNA pequeñas dentro de las células, ya que las moléculas con carga negativa no atraviesan fácilmente las membranas. Además, una vez dentro de las células, son objeto de degradación enzimática. Esto ha conducido a intentar modificar el RNA para reducir la carga negativa e inhibir la hidrólisis. Algunas de las modificaciones que han probado los biotecnólogos han sido los análogos de los oligonucleótidos con otros enlaces diferentes de los fosfodiéster.

Cuando la traducción está regulada, ello se produce generalmente en la fase de iniciación, a través de la estructura del mRNA o por la unión de proteínas o de RNA antisentido al mRNA.



El apareamiento de bases de la secuencia antisentido con la secuencia líder no codificada bloquea la iniciación e impide la traducción

FIGURA **27.33**

Bloqueo de la iniciación de la traducción por un RNA antisentido. El gen de la transposasa contiene una secuencia antisentido en su extremo 3′. Cuando se transcribe, este segmento antisentido puede plegarse hacia atrás y formar pares de bases que bloquean la iniciación de la traducción.

RESUMEN

El código genético determina la conexión entre la secuencia génica (o el mRNA) y la secuencia proteica. Este código es casi uniforme, aunque no completamente, en todos los seres vivos. Es un código redundante, con múltiples codones para la mayoría de los aminoácidos, e incluye señales de comienzo y de detención.

La traducción de los mRNA en cadenas polipeptídicas se realiza en varios pasos. En primer lugar, deben acoplarse los tRNA adecuados con los correspondientes aminoácidos, utilizando una serie de enzimas denominadas aminoacil-tRNA sintetasas. El lugar en el que se realiza la traducción es el ribosoma, un complejo formado por RNA y proteínas que contiene dos subunidades, cada una de ellas con sus propios componentes de RNA y proteína. La traducción de un mRNA en los ribosomas tiene tres etapas: iniciación, elongación y terminación. Cada etapa requiere determinados factores proteicos además del ribosoma. En la iniciación, el mRNA se fija a la subunidad 30S en el registro adecuado mediante su secuencia Shine-Dalgarno, y el *N*-formilmetionil tRNA iniciador se aparea a su codón AUG en el lugar P. A continuación, se engancha la subunidad 50S. El siguiente tRNA entra en el lugar A y la cadena incipiente se transfiere al mismo. A continuación, el mRNA se transloca de manera que la cadena vuelva a moverse al lugar P, mientras que el tRNA ahora desocupado se desplaza al lugar E y se libera. Estos pasos implican probablemente estados híbridos intermedios.

La cadena continúa alargándose de esta forma hasta llegar a un codón de detención, en el que se unen al ribosoma factores de liberación que facilitan la liberación de la cadena polipeptídica. Todo el proceso de traducción requiere unos 4 equivalentes de ATP por cada aminoácido añadido. Diversos antibióticos ejercen su efecto antibacteriano inhibiendo diversas fases del proceso de traducción. La traducción de algunos mRNA de los procariotas está regulada, generalmente en el paso de iniciación.

A medida que se completa la traducción, se inicia el plegado y la modificación covalente de la cadena polipeptídica. La cadena tal como se sintetiza puede contener una secuencia N-terminal que la marca para la exportación desde el citoplasma.

BIBLIOGRAFÍA

De interés histórico

Brenner, S., F. Jacob y M. Meselson (1961) An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190:576-581. Primeros indicios de la existencia del mRNA.

Crick, F. H. C. (1958) On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 12:138-162. Con gran intuición, Crick prevé la naturaleza esencial del mecanismo de traducción.

Crick, F. H. C. (1966) Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 19:548-555.

Khorana, H. G. (1968) Nucleic acid synthesis in the study of the genetic code. En: *Nobel Lectures, Physiology, and Medicine (1963-1970)*, pp. 341-343. American Elsevier, Nueva York. Explicación realizada por un premio Nobel de cómo se descifró el código.

Traub, P. y M. Nomura (1968) Structure and function of *E. coli* ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59:777-784.

El código

Böck, A., K. Forchhammer, J. Heider, W. Leimfelder, G. Sawers, B. Vepreck y F. Zinoni (1991) Selenocysteine: The 21st amino acid. *Mol. Microbiol.* 5:515-520. Una mini-revisión del descubrimiento de que este aminoácido poco habitual también está codificado.

Eigen, M., B. F. Lindemann, M. Tietze, R. Winkler-Oswatitsch, A. Dress y A. von Haeseler (1989) How old is the genetic code? Statistical geometry of tRNA provides an answer. *Science* 244:673-678.

Fox, T. D. (1987) Natural variation in the genetic code. *Annu. Rev. Genet.* 21:67-91.

RNA mensajero

Bronson, M. J., C. Squires y C. Yanovsky (1973) Nucleotide sequence from tryptophan messenger RNA of *Escherichia coli*: The sequences corresponding to the amino terminal region of the first polypeptide specified by the operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:2335-2339. Un estudio precursor en este campo.

Gesteland, R. F., R. B. Weiss y J. F. Atkins (1992) Recoding: Reprogramming genetic decoding. *Science* 257:1640-1641. Existen señales especiales en algunos mRNA que alteran la lectura del código.

Shine, J. y L. Dalgarno (1974) The 3′-terminal sequence of *E. coli* 16S rRNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:1342-1346.

RNA de transferencia

Hatfield, D. L., B. J. Lee y R. M. Pirtle, eds. (1992) *Transfer RNA in Protein Synthesis*, CRC Press, Boca Raton, Fla. Colección de trabajos sobre diversos aspectos de la función de los tRNA.

Kim, S.-H. (1978) Three-dimensional structure of transfer RNA and its functional implications. *Adv. Enzymol.* 46:279-315.

Söll, D. y V. RajBhandary, eds. (1995) *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function.* ASM Press, Washington, D.C.

Wower, J., K. V. Rosen, S. S. Hixon y R. A. Zimmermann (1994) Recombinant photoreactive tRNA molecules as probes for cross-linking studies. *Biochimie* 76:1235-1246.

Aminoacil-tRNA sintetasas y acoplamiento aa~tRNA

Carter, C. W., Jr. (1993) Cognition, mechanism, and evolutionary relationships in aminoacyl-tRNA synthetases. *Annu. Rev. Biochem.* 62:715-748.

Curnow, A. W., K.-W. Hong, R. Yuan, S.-L. Kim, O. Martins, W. Winkler, T. M. Henkin y D. Söll (1997) Glu-tRNA^{Gln}-amidotransferase: A novel heterotrimeric enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11819-11826. Carga del tRNA^{Gln} con Gln de una forma indirecta.

Giegé, R., M. Sissler y C. Florentz (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res.* 26:5017-5035.

Rould, M. A., J. J. Perona, D. Söll y T. A. Steitz (1989) Structure of *E. coli* glutaminyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Gln} and ATP at 2.8 Å resolution. *Science* 246:1135-1141. Un estudio estructural de gran importancia.

Schulman, L. H. y J. Abelson (1988) Recent excitement in understanding tRNA identity. *Science* 240:1591-1592. Una breve presentación general del problema del reconocimiento del tRNA.

Ribosomas

Ban, N., B. Freeborn, R. Nissen, P. Penczek, R. Grassucci, R. Sweet, J. Frank, P. Moore y T. A. Steitz (1998) A 9 Å resolution x-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit. *Cell* 93:1105-1115.

Hill, W. E., A. Dahlberg, R. A. Garret, P. B. Moore, D. Schlessinger y J. R. Warner, eds. (1990) *The Ribosome.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Mueller, F., H. Stark, M. van Heel, J. Rinke-Appel y R. Brimacombe (1997) A new model for the three dimensional folding of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA. III. The topography of the functional center. *J. Mol. Biol.* 271:566-587. Este artículo y los dos que le preceden en el mismo número ensamblan una gran cantidad de datos, de varias técnicas, en un modelo completo de la subunidad 30S.

Ramakrishnan, V. y S. W. White (1998) Ribosomal protein structures: Insights into the architecture, machinery, and evolution of the ribosome. *Trends Biochem. Sci.* 23:208-212. Un tratamiento completo y actual centrado en las estructuras de las proteínas ribosómicas.

El proceso de la traducción

Burkhardt, N., R. Junemann, C. M. T. Spahus y K. H. Nierhaus (1998) Ribosomal RNA binding sites: Three-site models of translation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33:95-149. Una visión general de lectura fácil de los modelos actuales de la elongación.

Caskey, C. T., W. C. Forrester y W. Tate (1984) Peptide chain termination. En: *Alfred Benzor Symposium*, editado por B. F. C. Clark y H. U. Petersen, Vol. 19, pp. 457-466. Munksgaard, Copenhague.

Gold, L. y G. Stormo (1987) Translational initiation. En: Escherichia coli *and* Salmonella typhimurium: *Cellular and Molecular Biology*, editado por F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H. E. Umbarger, Vol. 2, pp. 1302-1307. American Society for Microbiol., Washington, D.C.

Nissen, P., M. Kjelgaard, S. Thirup, G. Polekhina, L. Resketnikova, B. F. C. Clark y J. Nyborg (1995) Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA^{Phe}, EF-Tu and a GTP analog. *Science* 270:1464-1472. Incluye la comparación con EF-GDP.

Noller, H. F. (1993) tRNA-rRNA interactions and peptidyl transferase. *FASEB J.* 7:87-89. Una breve revisión de la información más reciente acerca de este paso crucial. Incluye pruebas de la función de las ribozimas.

Stark, H., E. V. Orlova, J. Rinke-Appel, N. Jünke, F. Mueller, M. Rodnina, W. Wintermeyer, R. Brimacombe y M. van Heel (1997) Arrangement of tRNAs in pre- and posttranslocational ribosomes, revealed by electron cryomicroscopy. *Cell* 88:19-28. Una utilización elegante del método para seguir los cambios conformacionales.

Yarus, M. y R. Thompson (1983) Precision of protein biosynthesis. En: *Gene Function in Prokaryotes*, editado por J. Beckwith, J. Davies y J. A. Gallant, pp. 23-63. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. Un buen análisis del proceso de corrección de pruebas.

Antibióticos

Cooperman, B. S., M. A. Buck, C. L. Fernandez, C. J. Weitzman y B. F. D. Ghrist (1989) Antibiotic photoaffinity labeling probes of *E. coli* ribosomal structure and function. En: *Photochemical Probes in Biochemistry*, editado por P. E. Nielsen, pp. 123-139. Kluwer, Dordrecht, Holanda. Una revisión del empleo de los antibióticos en el estudio de los ribosomas.

Cundliff, E. (1980) Antibiotics and prokaryotic ribosomes: Action, interaction, and resistance. En: *Ribosomes: Structure, Function, and Genetics*, editado por G. Chambliss et al., pp. 377-412. University Park Press, Baltimore.

Regulación

Campbell, K., G. Stormo y L. Gold (1983) Protein-mediated translational repression. En: *Gene Function in Prokaryotes*, editado por J. Beckwith, J. Davies y J. A. Gallant, pp. 185-210. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Nomura, M., J. Yates, D. Dean y L. Post (1980) Feedback regulation of ribosomal gene expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7084-7088.

Modificación posterior a la traducción

Wickner, W., J. M. Driessen y F.-V. Hartl (1991) The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 60:101-124.

PROBLEMAS

1. El siguiente polinucleótido sintético se sintetiza y utiliza como molde para la síntesis peptídica en un sistema acelular de *E. coli*.

   ···AUAUAUAUAUAU···

   ¿Qué polipéptido es de prever que se produzca? ¿Qué información concreta nos aportaría acerca del código?

2. Si el mismo polinucleótido descrito en el Problema 1 se utiliza con un sistema de síntesis proteica acelular *derivado de mitocondrias*, el producto es

   ···Met–Tyr–Met–Tyr–Met–Tyr···

   ¿Qué información aporta esto acerca de las diferencias entre los códigos mitocondrial y bacteriano?

*3. Cuando se sintetizan polinucleótidos con tripletes de residuos de nucleótidos repetidos, se producirán de uno a tres tipos de cadenas polipeptídicas en la síntesis acelular.
   (a) Explique por qué son posibles esos resultados diferentes.
   (b) Prediga los polipéptidos producidos cuando los siguientes se utilizan en un sistema de *E. coli*: $(GUA)_n$, $(UUA)_n$.

*4. ¿Qué tipo de polinucleótido repetitivo produciría un solo polipéptido con una unidad repetitiva tetrapeptídica?

5. Aunque las secuencias Shine-Dalgarno varían considerablemente en distintos genes, incluyen ejemplos como GAGGGG que podrían servir de código, en este caso para Glu-Gly. ¿Implica esto que la secuencia Glu-Gly no puede producirse nunca en una proteína, puesto que sería interpretada como una secuencia Shine-Dalgarno? Comente su respuesta.

6. Según las reglas de balanceo, ¿qué codones deben reconocerse por los siguientes anticodones? ¿A qué residuos de aminoácidos corresponden?
   (a) 5′···ICC···3′
   (b) 5′···GCU···3′

*7. Al comienzo de la investigación sobre los ribosomas, antes de que se conociera el papel exacto de los mismos, un investigador hizo la siguiente observación. Comprobó que, en experimentos de sedimentación con lisados bacterianos, no sólo sedimentaban partículas 30S, 50S y 70S, sino también algunas partículas de aproximadamente 100S y 130S. Al tratar esta mezcla con EDTA, todo se disociaba en partículas 30S y 50S. Con la adición de iones divalentes, podía volver a obtener partículas 70S, pero nunca partículas 100S o 130S.
   (a) Sugiera a qué podrían corresponder las partículas 100S y 130S teniendo en cuenta el conocimiento actual de la síntesis proteica. ¿Qué descubrimiento importante se le escapó a este investigador?
   (b) ¿Por qué cree que no se producía la reasociación de partículas 100S y 130S?

8. El lugar E puede no necesitar codón de reconocimiento. ¿Por qué?

9. Suponga que el bacteriófago MS2 infectara a una bacteria con déficit del factor de liberación RF1. ¿Qué efecto podría tener sobre la expresión génica de MS2? [Pista: Véase la Figura 27.31.]

10. Suponga que la probabilidad de que se produzca un error en la traducción en cada paso de traducción es un número bajo, δ. Demuestre que la probabilidad, p, de que una determinada molécula proteica, que contenga n residuos, esté completamente libre de errores es de $(1\text{-}\delta)^n$.

11. Suponga que la frecuencia de los errores de traducción, δ, es 1×10^{-4}.
   (a) Calcule la probabilidad de formar una proteína perfecta de 100 residuos.
   (b) Calcule lo mismo para una proteína de 1000 residuos.

*12. Diseñe un experimento, basado en la sedimentación en gradiente de sacarosa (véase Herramientas de la Bioquímica 5A) que le permitiera demostrar que las proteínas se sintetizan en los polirribosomas.

13. Suponiendo que la glucosa se quema a CO_2 como fuente de energía, ¿cuántos residuos de aminoácidos pueden incorporarse a una molécula proteica por cada glucosa consumida por una célula? ¿Es su cálculo un máximo o un mínimo?

14. ¿Por qué cabría prever que una dosis baja de puromicina fuera menos eficaz en la represión del crecimiento bacteriano que un número equivalente de moléculas de eritromicina?

15. La proteína colicina E3 es un inhibidor muy eficaz de la síntesis proteica en los procariotas. Esta proteína es una nucleasa, que ataca específicamente un enlace fosfodiéster cerca del extremo 3′ del RNA 16S. Sugiera un mecanismo para el efecto de la colicina E3 en la traducción.

16. Sugiera formas de modificar el RNA antisentido de forma que estimulen su entrada en las células.

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 27A

Formas de establecer un mapa de estructuras macromoleculares complejas

Al continuar sondeando la estructura de la célula, utilizando técnicas cada vez más detalladas y más discriminantes, se pone de manifiesto que gran parte de la maquinaria celular está organizada en estructuras complicadas que son *ensamblajes* de macromoléculas. El ribosoma, con sus diversos tipos de RNA y muchas clases de proteínas, es un ejemplo excelente. El análisis directo de estas estructuras inmensas y complejas mediante difracción de rayos X es una tarea que se encuentra aún en los límites de nuestras posibilidades, aunque se está realizando un rápido progreso. Pero existen otras formas de poder averiguar la disposición espacial de las diversas partes. Describimos aquí algunos de estos métodos.

Entrecruzamiento químico

Una forma de averiguar la disposición de los componentes de una partícula es observar qué puede unirse fácilmente a qué mediante **entrecruzamientos** químicos. Consideremos una partícula idealizada (como la de la Figura 27A.1) que contiene tres moléculas proteicas. Si disponemos de un reactivo bifuncional (como uno de los que se indican en la Tabla 27A.1) que puede reaccionar con residuos de la cadena lateral para formar enlaces cruzados entre moléculas proteicas, podemos permitirles que reaccionen ligeramente, y extraer luego las proteínas en forma de una mezcla de partículas entrecruzadas. Las parejas ligadas covalentemente que se han formado pueden identificarse de diversas formas. Si disponemos de anticuerpos contra las distintas proteínas, podemos identificar los dímeros que se han formado mediante una técnica de *transferencia Western* (método 1 de la Figura 27A.1; véase también Herramientas de la Bioquímica 7A). Otra posibilidad sería utilizar uno de los entrecruzadores "fragmentables" que se muestran en la Tabla 27A.1, junto con la electroforesis en gel bidimensional (método 2 de la Figura 27A.1). En cualquier si-

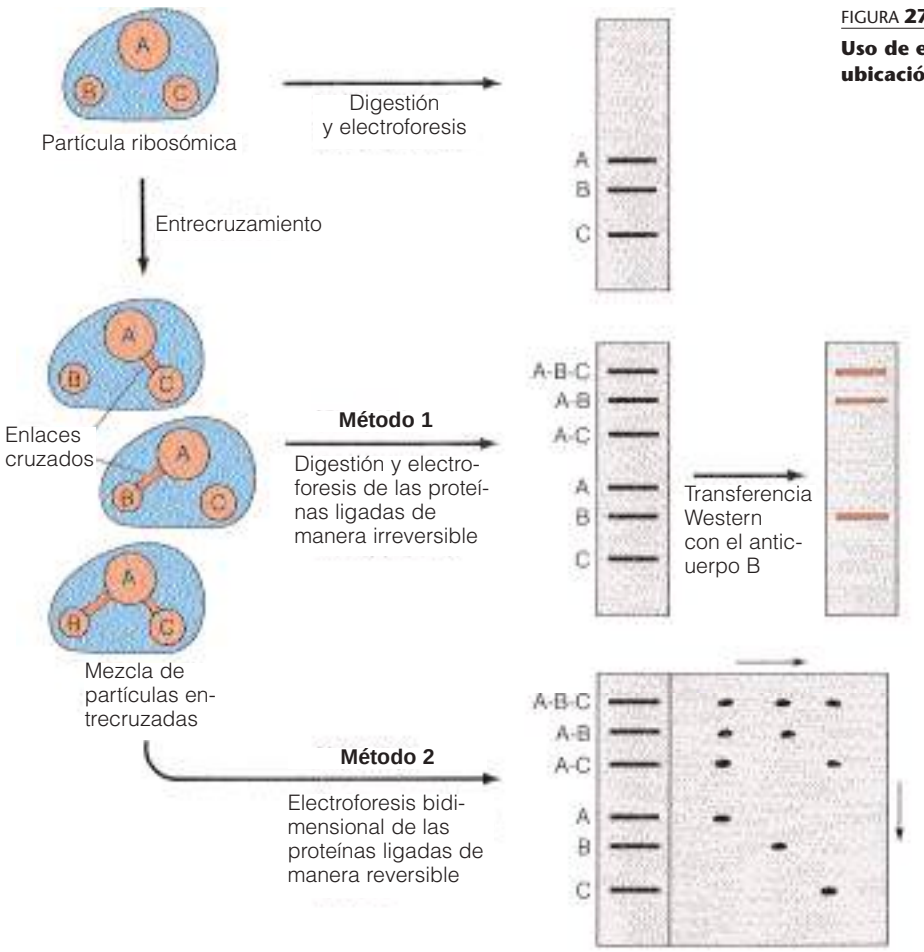
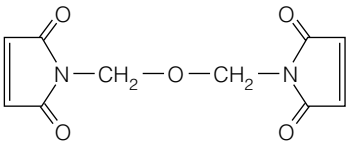
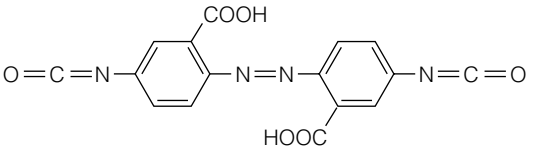
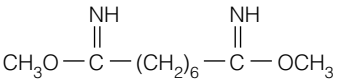
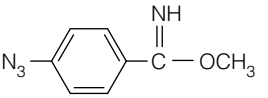
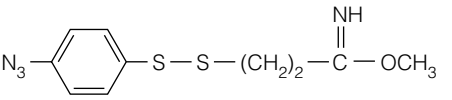


FIGURA **27A.1**

Uso de entrecruzadores químicos para determinar la ubicación de las proteínas en una partícula compleja.

TABLA **27A.1**

ALGUNOS REACTIVOS DE ENTRCRUZAMIENTO PROTEICO

Reactivo	Fórmula	Reacciona fundamentalmente con	¿Fragmentable?
Bis(*N*-maleimidometil) éter		Grupo sulfhidrilo	No
2,2′-Dicarboxi-4,4′-azofenildiisocianato		Grupos amino	Sí, mediante reducción de —N═N—
Dimetil suberimidato		Grupo amino	Sí, mediante amoníaco
Tetranitrometano	$C(NO_2)_4$	Grupos fenólicos (tirosina)	No
Metil-4-azidobenzoimidato[a]		Grupos amino y otros	No
Metil [3-(*p*-azidofenil) ditio]propionimidato[a]		Grupos amino y otros	Sí, mediante reducción de —S—S—

[a] Estos reactivos son fotoactivables. Pueden reaccionar primero, en la oscuridad, a través del grupo imidato de la derecha y acoplarse luego a otro grupo mediante la activación de la azida (N_3) con un destello de luz.

tuación, en el ejemplo sencillo que se muestra, está claro que la proteína A debe estar situada entre la B y la C, puesto que A puede unirse a cualquiera de las demás proteínas, pero B y C no forman dímeros entrecruzados.

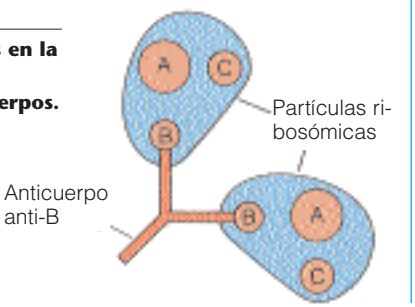
Además de las técnicas de entrecruzamiento proteína-proteína descritas aquí, en la actualidad disponemos de métodos de entrecruzamiento RNA-proteína y RNA-RNA (véase la Bibliografía). Estos métodos han desempeñado una gran parte en la determinación de los modelos ribosómicos detallados que se presentan en este capítulo.

Microscopia inmunoelectrónica

En la **microscopia inmunoelectrónica**, los componentes que se encuentran en la superficie de una partícula pueden localizarse de manera directa con el empleo de anticuerpos preparados contra ellos. Las moléculas de anticuerpos con forma de Y establecen puentes entre dos partículas, conectando puntos en los que los componentes particulares son accesibles a la superficie. En la Figura 27A.2, mostramos la misma partícula idealizada de la Figura 27A.1. El hecho de que la proteína B descanse cerca del extremo señalado de la partícula puede determinarse por la forma en que los anticuerpos anti-B unen dos partículas. Cuando se unen grupos haptenos adecuados en puntos específicos de las moléculas de RNA, puede utilizarse el mismo método para poner de manifiesto cuando estas secuencias de RNA estén próximas a la superficie del ribosoma. Los extremos de los RNA ribosómicos se han localizado de esta forma, al igual que la posición en la que salen los péptidos nacientes del ribosoma (véase la Figura 27A.3).

FIGURA **27A.2**

Localización de las proteínas en la superficie de una partícula mediante la unión de anticuerpos.



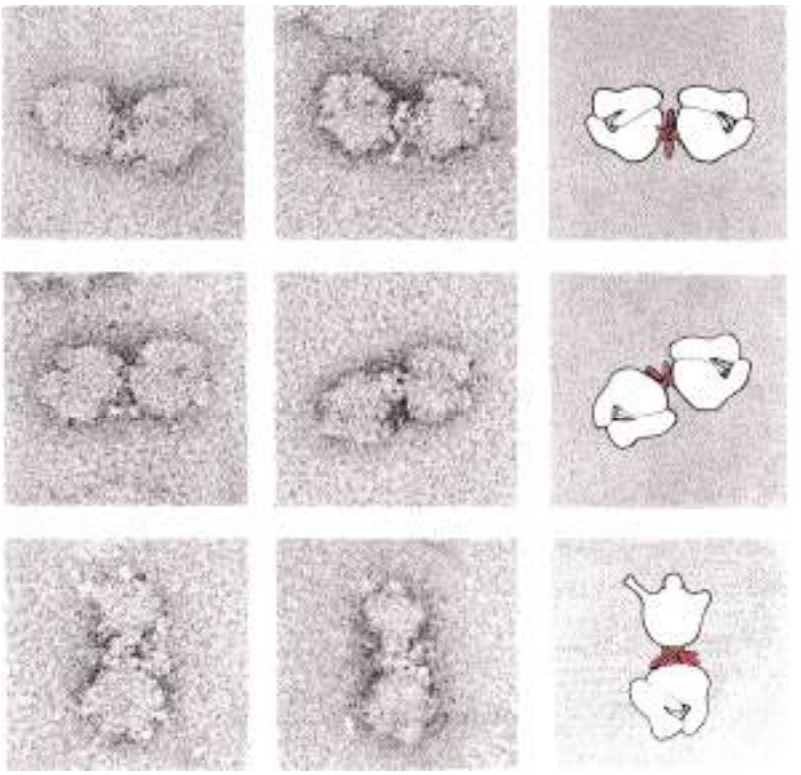


FIGURA **27A.3**

Uso de anticuerpos para detectar el lugar de salida de la cadena polipeptídica del ribosoma. Se utilizaron anticuerpos contra la β-galactosidasa para interactuar con las cadenas de β-galactosidasa en el punto en el que salen de los ribosomas. Se observó que los ribosomas 70S se fijaban a estos anticuerpos en zonas situadas cerca de la parte posterior de la subunidad 50S, en el lugar en el que existe un poro en esta unidad.

Cortesía de C. Bernabeu y J. H. Lake, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982) *79*:3111. © 1982 PNAS.

Microscopia crioelectrónica

Las técnicas convencionales de microscopia electrónica de transmisión (Herramientas de la Bioquímica 1A) tienen varios inconvenientes para el estudio de las estructuras biológicas delicadas. En primer lugar, la necesidad de la deshidratación completa en la cámara de vacío del microscopio puede modificar mucho las estructuras. En segundo lugar, para producir un contraste suficiente, las muestras, tradicionalmente, se han teñido con metales pesados o se han sombreado con metales, produciendo una pérdida de resolución inherente.

Una técnica relativamente reciente que evita todos estos artefactos es la *microscopia crioelectrónica* (o *criomicroscopia electrónica*). La idea es simple: se congela muy rápidamente una muestra en hielo; la congelación es tan rápida que el agua no cristaliza sino que queda *vitrificada*. La muestra puede vitrificarse en los intersticios de una rejilla de microscopia electrónica o vitrificarse en bloque y luego seccionarse para su observación.

Dado que no se usa tinción, el contraste es bajo y se necesitan métodos de amplificación de la imagen. Para las partículas como los ribosomas, esto se consigue combinando la información de varias imágenes difuminadas de partículas en el hielo para conseguir el cuadro. Dado que, en general, se pueden rotar aleatoriamente, debe tenerse en cuenta esta orientación aleatoria en los análisis del ordenador. De hecho, la ventaja es que la imagen final generada puede verse "desde todos los lados" y puede observarse desde cualquier ángulo en la pantalla del ordenador.

Si las partículas (por ejemplo, los virus) tienen elementos de simetría o si se conocen las estructuras de las subunidades, el análisis es más fácil. Pero incluso las partículas irregulares como los ribosomas pueden analizarse con una resolución cercana a 1-2 nm. Finalmente, pero no lo menos importante, la muestra ha permanecido en un ambiente acuoso durante todo el estudio, de forma que el daño de la estructura habrá sido mínimo.

Dispersión de ángulo bajo de rayos X y neutrones

Aunque los estudios de difracción cristalina de partículas enormes como los ribosomas son aún muy difíciles, podemos obtener mucha información mediante el estudio de la *dispersión* de la radiación en soluciones de partículas de este tipo. Cuando las ondas electromagnéticas se dispersan a partir de una partícula de dimensiones mucho mayores que las de la longitud de onda de la radiación, la intensidad de la dispersión depende del ángulo de observación. Como se muestra en la Figura 27A.4, las ondas que se dispersan a partir de regiones diferentes dentro de la partícula a cualquier ángulo distinto de 0° están fuera de fase, con lo que producen una interferencia mutua y una disminución de la intensidad. A ángulos grandes la diferencia de fase aumenta, y produce la cancelación parcial de las ondas dispersadas. Esta interferencia puede utilizarse para medir las dimensiones medias de la partícula. La intensidad de la dispersión a un ángulo θ (I_θ) en comparación con la dispersión a un án-

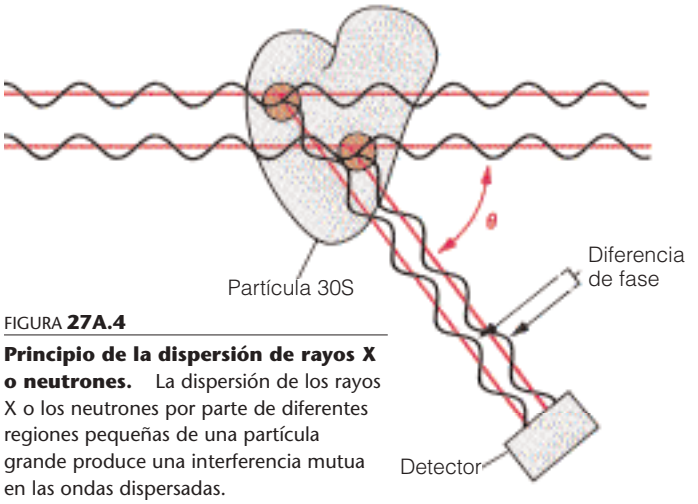


FIGURA **27A.4**

Principio de la dispersión de rayos X o neutrones. La dispersión de los rayos X o los neutrones por parte de diferentes regiones pequeñas de una partícula grande produce una interferencia mutua en las ondas dispersadas.

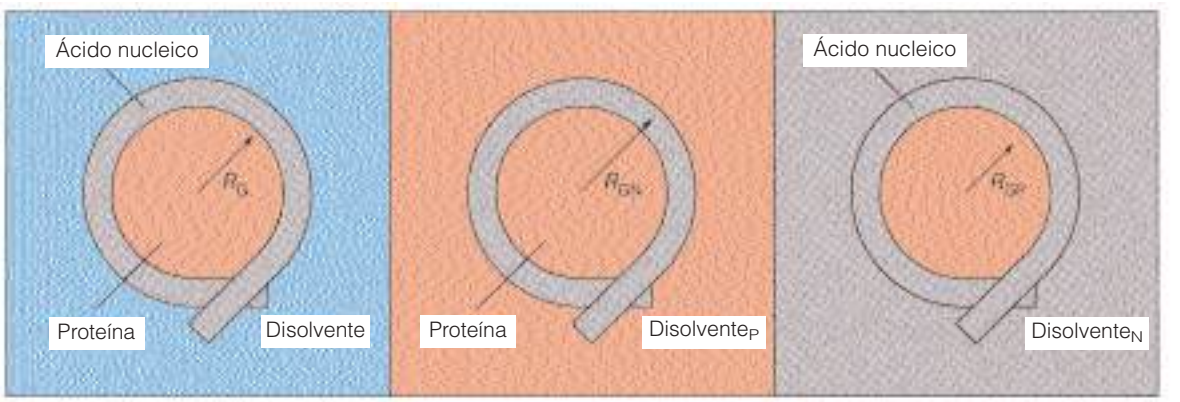
gulo 0 (I_0) viene dada (para ángulos pequeños) por la siguiente fórmula:

$$\frac{I_\theta}{I_0} = e^{-(16\pi^4 R_G^2/3\lambda^4)\text{sen}^2(\theta/2)} \qquad (27A.1)$$

En esta expresión, λ es la longitud de onda de la radiación y R_G es una cantidad denominada *radio de giro*, una especie de dimensión media de la partícula. Según la ecuación (27A.1), un gráfico de $\ln(I_\theta/I_0)$ frente a $\text{sen}^2(\theta/2)$ debiera ser una línea recta a ángulos bajos, con una pendiente inicial de $(-16\pi^4 R_G^2/3\lambda^4)$. Así pues, la medición de la dispersión a ángulos muy bajos aporta una medida del tamaño medio de la partícula. A ángulos mayores, las curvas I_θ/I_0 tienen una forma más compleja, con máximos y mínimos. Estas curvas pueden utilizarse para obtener información adicional acerca de la forma de la partícula y su distribución interna de la materia.

Aunque la dispersión de ángulo bajo de los rayos X ha sido útil para el estudio de partículas en solución, una técnica mucho más potente es la **dispersión de neutrones de ángulo bajo**. Puede parecer extraño a primera vista pensar en los neutrones como una radiación, pero debe recordarse que, según la mecánica cuántica, toda partícula elemental tiene también propiedades de onda. La longitud de onda de una partícula de masa m que se mueve a una velocidad v viene dada por la expresión $\lambda = h/mv$, en donde h es la constante de Planck. Así pues, los "neutrones térmicos" que salen de un reactor nuclear tienen una longitud de onda de unas décimas de nanómetro. Por tanto, tienen la longitud adecuada para el examen de los detalles de la estructura macromolecular. Y lo que es más importante, los neutrones interaccionan fundamentalmente con los núcleos atómicos y, por tanto, se dispersan de forma diferente por los distintos átomos. En consecuencia, los ácidos nucleicos y las proteínas dispersan los neutrones de manera diferente, e incluso el hidrógeno y el deuterio tienen potencias de dispersión diferentes. Dado que el H_2O y el D_2O difieren en la dispersión, es posible utilizar como disolventes mezclas de H_2O/D_2O que correspondan a la potencia de dispersión de neutrones de la parte de ácido nucleico o de la parte de proteína de una partícula nucleoproteica. De esta forma, como se indica en la Figura 27A.5, podemos hacer que el ácido nucleico o la proteína "desaparezcan" confundiéndose con el fondo, para medir el radio de giro del otro componente. En el ejemplo mostrado, el R_G mayor observado para el ácido nucleico, en comparación con la proteína nos indica que el ácido nucleico está concentrado en el exterior de la partícula.

Una variante aún más potente de la misma técnica es la que se ha utilizado para establecer un "mapa" de las distancias existentes entre pares de partículas de proteína en las partículas complejas. Supongamos, como en la Figura 27A.6, que

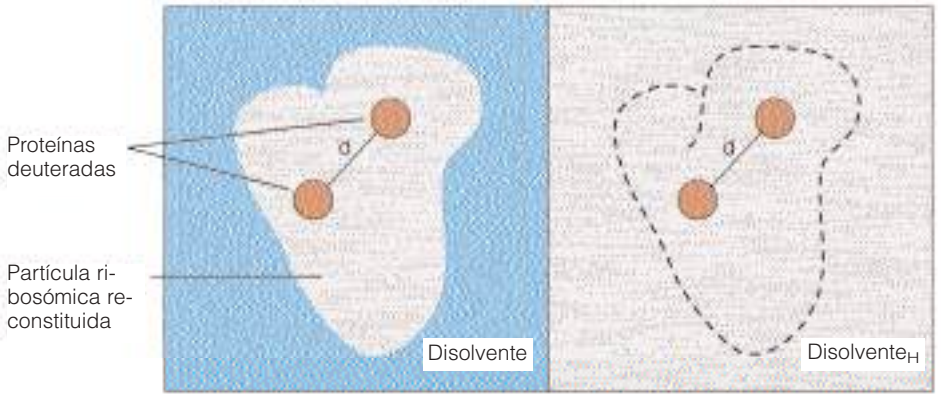


Disolvente$_P$ = disolvente que iguala las propiedades de dispersión de la proteína
Disolvente$_N$ = disolvente que iguala las propiedades de dispersión del ácido nucleico
R_G = radio de giro del complejo ácido nucleico-proteína
R_{GN} = radio de giro del ácido nucleico
R_{GP} = radio de giro de la proteína

FIGURA **27A.5**

Uso de una igualación con disolvente selectiva para mostrar, mediante dispersión de neutrones, que el ácido nucleico se encuentra en la parte externa de una partícula nucleoproteica.

Tomado de K. E. van Holde, W. C. Johnson y P.-S. Ho, *Principles of Physical Biochemistry*, © Prentice-Hall, 1998. Adaptado con permiso de Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, N.J.



Disolvente$_H$ = disolvente que iguala la parte no deuterada de la partícula

FIGURA **27A.6**

Uso de una igualación con disolvente para determinar la distancia entre dos proteínas deuteradas selectivamente en una partícula no deuterada.

tenemos partículas reconstituidas que contienen tan sólo dos proteínas (de entre las muchas de la partícula) que se han preparado a partir de bacterias a las que se ha proporcionado deuterio. Estas dos proteínas estarán intensamente deuteradas y tendrán una potencia de dispersión de neutrones muy distinta de la del resto de la partícula. Si se mezcla ahora el disolvente H_2O/D_2O de manera que iguale el fondo medio de la porción no deuterada de la partícula, las dos proteínas deuteradas contrastarán claramente. El patrón de dispersión de neutrones obtenido estará dominado por la interferencia en la dispersión entre estas dos proteínas y puede utilizarse para medir su separación. Además, el método permite la medida del radio de giro de una determinada proteína *in situ*.

Aunque la dispersión de neutrones puede aportar mucha información útil, no es una técnica que pueda utilizar el bioquímico medio en el laboratorio. Tan sólo unos pocos lugares del mundo disponen de reactores de investigación grandes que permiten realizar estudios de dispersión de neutrones.

Bibliografía

Boublik, M. (1990) Electron microscopy of ribosomes. En: *Ribosomes and Protein Synthesis: A Practical Approach*, editado por G. Spedding, pp. 273-296. Oxford University Press, Oxford.

Brimacombe, R., B. Greuer, H. Gulle, M. Kasak, P. Mitchell, M. Oswald, K. Stade y W. Stiege (1990) New techniques for the analysis of intra-RNA and RNA-protein cross-linking data from ribosomes. En: *Ribosomes and Protein Synthesis: A Practical Approach*, editado por G. Spedding, pp. 131-159. Oxford University Press, Oxford.

Das, M. y C. F. Fox (1979) Chemical cross-linking in biology. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 8:165-193.

Ruiz, T., I. Erk y J. Repault (1994) Electron cryo-microscopy of vitrified biological specimens: Toward high spatial and temporal resolution. *Biol. Cell* 80:203-210.

Serdyuk, I. N., M. Y. Pavlov, I. N. Rublevskaya, G. Zaccai, R. Leberman y Y. M. Ostenavitch (1990) New possibilities for neutron scattering in the study of RNA-protein interactions. En: *The Ribosome*, editado por W. Hill et al., pp. 194-202. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

CAPÍTULO 28

Los genes eucariotas y su expresión

HASTA AHORA, LA MAYOR PARTE DE LO TRATADO SOBRE LA CODIFICACIÓN, el copiado y la expresión de la información genética ha utilizado ejemplos de los organismos procariotas. Hay dos razones para esta elección. En primer lugar, la mayor parte de nuestros conocimientos fundamentales sobre los procesos de replicación, transcripción y traducción se obtuvo inicialmente a partir de los estudios de bacterias y virus. En segundo lugar, los procesos correspondientes de los eucariotas son casi invariablemente más complicados, y los estilos de vida más complejos de los organismos eucariotas requieren que los genomas sean mucho mayores.

Las bacterias y los virus no necesitan cantidades enormes de información genética. Un virus tan sólo necesita un genoma mínimo para garantizar su propia replicación, ya que toma prestada mucha de la información genética que lleva su hospedador específico. Una bacteria como *E. coli* es autónoma, pero sólo lleva la información genética necesaria para que ella y sus descendientes funcionen como organismos unicelulares en ambientes muy limitados. De hecho, los procariotas utilizan su DNA de la manera más eficaz posible, reduciendo al mínimo el tiempo necesario para la replicación.

Los organismos eucariotas han de hacer frente a problemas muy diferentes. En los eucariotas superiores, todo el programa genético para el desarrollo de un organismo *multicelular* completo debe estar presente en la célula original, el óvulo fertilizado. En estos organismos, no todas las células se desarrollan igual. Por el contrario, las células iniciales del embrión en desarrollo se *diferencian* para producir todos los tejidos diferentes del adulto, y estos tejidos especializados deben estar correctamente interrelacionados y situados, y funcionar de manera concertada. La enorme cantidad de información necesaria para dirigir este desarrollo se transporta en el genoma.

Consideraremos en primer lugar la enorme cantidad de información almacenada en un DNA eucariota característico y la forma en que se organiza y replica. Describimos a continuación cómo se expresa esta información a nivel del mRNA y de las proteínas.

La mayor parte de los eucariotas necesitan, y tienen, genomas mucho mayores que los procariotas.

El genoma eucariota

TAMAÑO DEL GENOMA

Dado que el DNA de los eucariotas superiores debe codificar todas las proteínas especializadas que se encuentran en los diferentes tejidos, cabría esperar que estos organismos contuvieran una cantidad de DNA considerablemente superior a la que se encuentra en un procariota característico, como *E. coli*. Lo que resulta sorprendente es la cantidad mucho mayor de DNA que realmente existe. Como muestra la Figura 28.1, la mayor parte de las células eucariotas contienen una cantidad de DNA que es de 100 a 10 000 veces la de *E. coli*. En algunos casos, este factor se aproxima a 100 000. Las únicas excepciones se encuentran entre los hongos inferiores, como las levaduras y *Neurospora*, que no presentan la compleja diferenciación tisular que se observa en las plantas superiores y los animales. Las profundas diferencias entre las necesidades genómicas de los organismos unicelulares y multicelulares se hacen evidentes al progresar en los esfuerzos de secuenciación. Se ha secuenciado el genoma completo de la levadura. Contiene 12.07×10^6 pb, sólo 2.5 veces el tamaño del genoma de *E. coli* y menos del 2% del tamaño del genoma humano. Sin embargo, la levadura es un eucariota verdadero. A medida que avanzamos en el reino eucariota, se produce un aumento aproximadamente progresivo del tamaño del genoma. Son necesarios al menos 10^8 pb para describir un insecto y alrededor de 10^9 pb para describir un mamífero.

Sin embargo, no existe una correlación *simple* entre la cantidad de DNA de una planta o un animal y la complejidad del organismo. Un anfibio no es, ciertamente, más complejo que un ser humano, pero algunos anfibios tienen genomas más de 50 veces mayores que el genoma humano. El hecho de que el genoma humano deba codificar muchas más proteínas que una célula bacteriana (tal vez 20 veces más) no puede explicar el que el tamaño sea 1000 veces superior. Por lo tanto, en los eucariotas debe existir una gran cantidad de DNA que no codifica proteínas. ¿A qué corresponde este otro DNA? En los apartados siguientes describiremos varios tipos de secuencias características de los eucariotas.

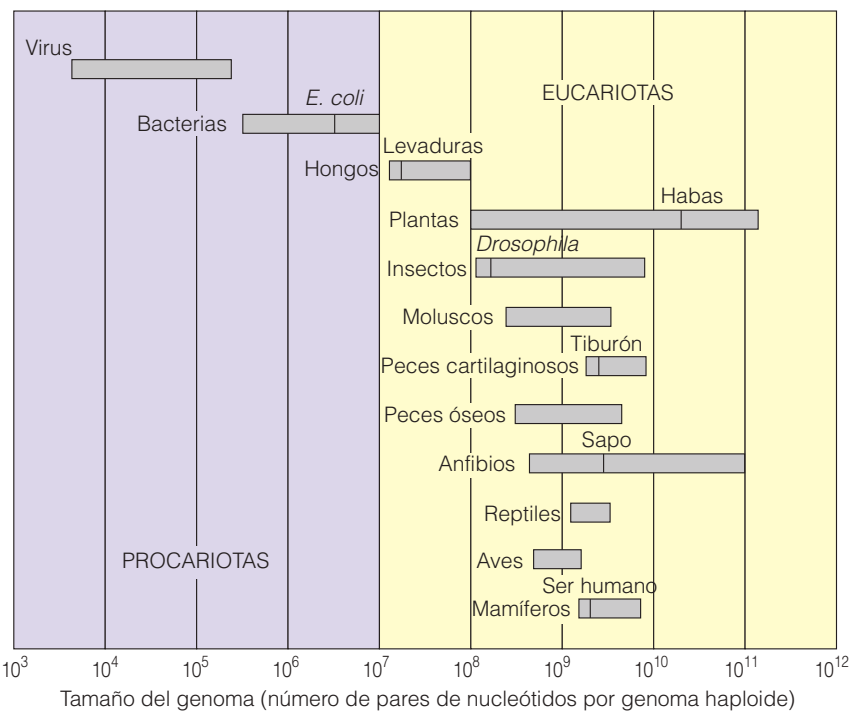


FIGURA **28.1**

Tamaño del genoma. Las barras indican los límites de los tamaños genómicos haploides de diferentes clases de organismos. Algunos organismos específicos están marcados con líneas verticales. Obsérvese que muchos organismos tienen genomas más grandes que el del ser humano. La escala del tamaño genómico es logarítmica.

SECUENCIAS REPETITIVAS

Parte de la variación de tamaño del genoma proviene de las cantidades variables de DNA no codificante de los genomas de los eucariotas. Las primeras pistas de esto llegaron en 1970, cuando R. Britten y D. E. Kohne idearon una técnica para analizar la cinética de la reasociación del DNA. En este método, el DNA total de un organismo se corta en porciones de aproximadamente 300 pb, se calienta para separar las cadenas y, a continuación, se enfría para permitir que el DNA se reasocie. Cualquier secuencia que esté presente en múltiples copias se reasociará rápidamente, y las secuencias que son menos abundantes se reasociarán más lentamente. Cuando Britten y Kohne utilizaron este método para estudiar el DNA bovino, les sorprendió encontrar que casi la mitad del DNA se reasociaba de manera mucho más rápida de lo esperado para segmentos con una sola copia en el genoma grande (Figura 28.2). Para explicar esta rápida reasociación, se vieron forzados a llegar a la sorprendente conclusión de que algunas secuencias del DNA están repetidas hasta 10^5 o 10^6 veces en cada célula. Mientras que el DNA de *E. coli* está en su práctica totalidad en una copia única, sólo aproximadamente la mitad del DNA de los mamíferos y alrededor de una tercera parte del DNA de las plantas tienen esta característica.

DNA satélite

Un análisis detallado ha permitido clasificar estas secuencias de DNA reiterativas en varios grupos. Un tipo es el de las repeticiones en tándem múltiples, en segmentos largos de DNA, de secuencias simples muy cortas como $(ATAACT)_n$. Este DNA puede separarse de la porción principal del DNA mediante sedimentación de equilibrio en gradientes de densidad (véanse las páginas 108-110, Capítulo 4). Las secuencias de DNA repetitivas con abundancia de AT (como la que acabamos de mencionar) tienen una densidad menor que el DNA de composición media, y las secuencias con abundancia de GC son más densas. Así pues, en un experimento en gradiente de densidad, los fragmentos de secuencias simples reiterativas forman bandas satélites alrededor de la banda principal de DNA (Figura 28.3). Dado este patrón de formación de bandas, las agrupaciones de secuencias repetidas se denominan **DNA satélites**. En los eucariotas superiores, el DNA satélite suele constituir entre un 10 y un 20% del genoma total.

Las secuencias de DNA repetitivas en los genomas eucariotas comprenden DNA satélites y secuencias duplicadas dispersas.

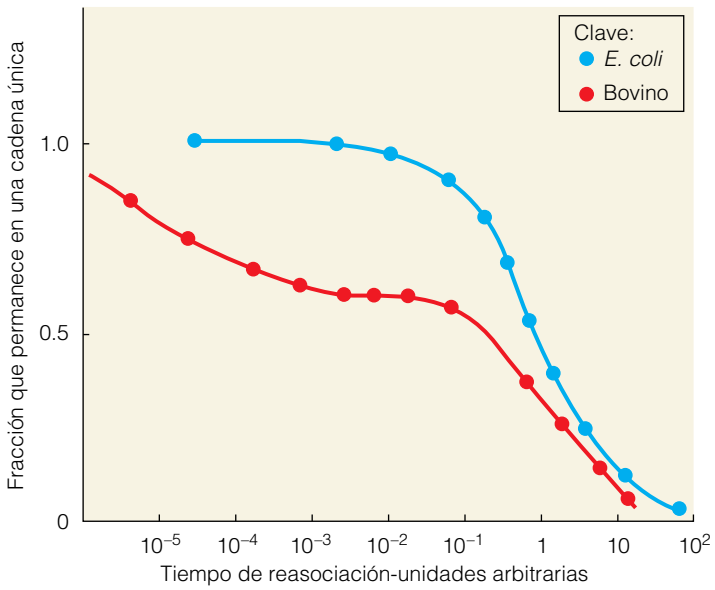


FIGURA **28.2**

Comparación de la cinética de reasociación del DNA de *E. coli* y de bovino. El eje de abscisas corresponde al tiempo de reasociación, corregido para la diferencia de tamaño entre los genomas de *E. coli* y bovino. La curva para *E. coli* corresponde a la prevista para una serie de genes con una sola copia en un genoma del tamaño del de *E. coli* (4.67×10^6 pb). La curva para el DNA bovino presenta dos pasos de reasociación. El paso lento corresponde al DNA de una sola copia (secuencias no repetidas). El otro corresponde a un DNA de reasociación rápida formado por secuencias repetidas. Muchas clases de DNA repetido están representadas en esta fase de la reasociación.

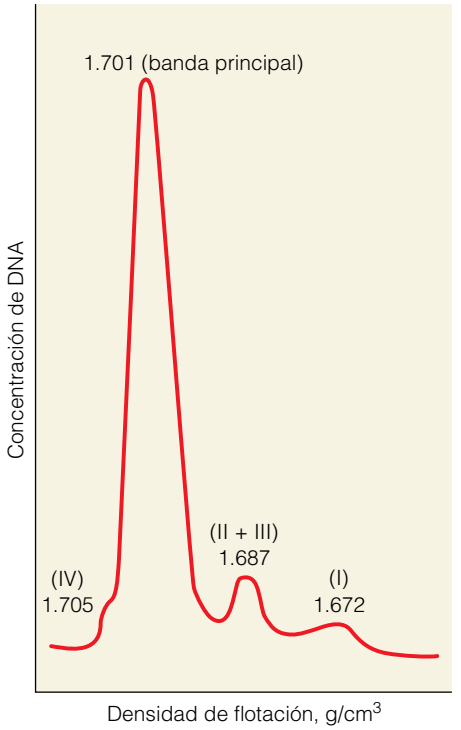


FIGURA **28.3**

DNA satélite. La sedimentación en gradiente de densidad de equilibrio del DNA total de *Drosophila* separa las bandas satélites, que rodean a la banda principal. Corresponden a fracciones de DNA repetitivo con diferentes composiciones de bases.

Adaptado de S. A. Endow, M. L. Polan y J. G. Gall, *J. Mol. Biol.* (1975) 96:675.

Se desconoce la función (si la tienen) de muchas secuencias repetidas.

¿Qué función tienen estas secuencias de DNA muy reiterativas? No codifican proteínas, y muchas de ellas ni siquiera se transcriben a un RNA. Como mínimo, algunas de ellas parecen desempeñar una función estructural. Así, por ejemplo, se ha observado que algunas secuencias reiteradas están muy concentradas cerca de los **centrómeros** de los cromosomas, que son las regiones en las que se pegan las cromátidas hermanas. Pueden actuar como lugares de unión para las proteínas que se pegan a las fibras del huso en la mitosis. (Véanse las secciones posteriores de este capítulo para una consideración de la estructura física de los cromosomas y del proceso de mitosis.)

Duplicaciones de genes funcionales

Existen otras muchas clases de secuencias de DNA con diversos grados de repetición. Algunas de estas secuencias son duplicaciones de genes funcionales, y en muchos casos la repetitividad parece desempeñar un papel útil, al permitir una elevada producción de transcritos de los que hay una gran necesidad. Como ejemplos de ello cabe citar los genes de los RNA ribosómicos, de los que puede haber hasta varios miles de copias, y los genes del tRNA, de los que con frecuencia pueden encontrarse centenares de copias de cada tipo. La continua necesidad que tiene la célula de grandes cantidades de ribosomas y de tRNA para la traducción se satisface mediante múltiples copias de estos genes. Lo mismo ocurre con los genes correspondientes a algunas proteínas muy utilizadas, como las histonas que se unen al DNA eucariota para formar la estructura de la cromatina (véanse las páginas 1213-1214). Como hemos señalado en el Capítulo 25, incluso los genes de los que normalmente existe una sola copia a veces se amplifican, en respuesta a las tensiones ambientales o bien como parte del desarrollo embrionario.

Elementos *Alu*

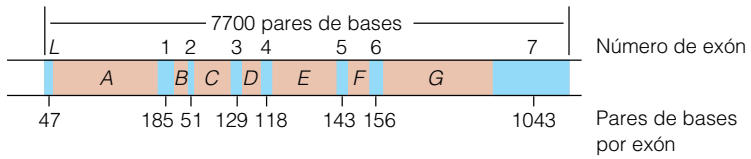
Existen otros tipos de secuencias de DNA repetidas que no codifican proteínas, y cuya función real continúa siendo un misterio. Estas secuencias se encuentran a menudo dispersas por todo el genoma, en vez de estar agrupadas como los DNA satélites. Algunas de estas secuencias pueden corresponder a elementos de control de algún tipo, cuyas funciones no se conocen aún. Una de las más frecuentes de estas familias en los mamíferos son los denominados **elementos *Alu***. Estas secuencias, de las que existen centenares de miles de copias en el genoma humano, tienen una longitud de unos 300 pb. Su nombre refleja la frecuente existencia de un único lugar para la endonucleasa de restricción *Alu*I en la mayor parte de los componentes de esta familia. Las secuencias *Alu* pueden transcribirse (de manera poco eficaz) a RNA, aunque no se traducen.

La función de un gran número de secuencias *Alu* continúa siendo desconocida, aunque algunas de ellas pueden contener orígenes para la replicación del DNA. También es concebible que muchas de estas secuencias repetitivas no tengan una función útil. Es posible que se encuentren en el genoma simplemente como "parásitos moleculares". Se ha propuesto una forma en que pudieran diseminarse estas secuencias por el genoma, basándose en la observación de que las secuencias *Alu* están flanqueadas por oligonucleótidos repetidos cortos, que se parecen a los de los transposones (véase el Capítulo 25). Según este concepto, las secuencias *Alu*, como otros elementos genéticos móviles, pueden insertarse en diversos lugares del genoma en forma de copias efectuadas mediante la transcriptasa inversa del RNA, que se transcribe a partir de ellos. Algunos estudios recientes sugieren que las secuencias *Alu* pueden proceder de un RNA pequeño (RNA 7SL) que participa en el transporte de proteínas a través de las membranas. Consideraremos este RNA en la página 1246.

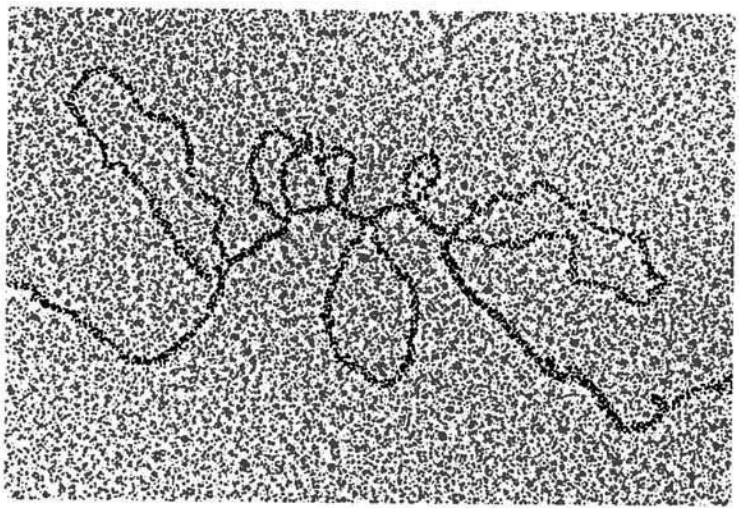
INTRONES

Un segundo motivo del gran tamaño de los genomas eucariotas es que la mayor parte de los genes eucariotas están interrumpidos por intrones. En el Capítulo 7 hemos presentado el concepto de intrones y exones, y hemos señalado, como ejemplo, que el gen de la β-globina está formado por tres exones interrumpidos por dos intrones no codificantes. Este tipo de estructura es frecuente en los eucariotas y a menudo es más extrema de lo que se observa en el ejemplo de la hemoglobina. Consideremos el gen de la ovoalbúmina que se muestra en la Figura 28.4a. Este gen codifica una proteína de 386 aminoácidos, que podría codificarse con un mensaje de 1158 nucleótidos. Sin embargo, el gen

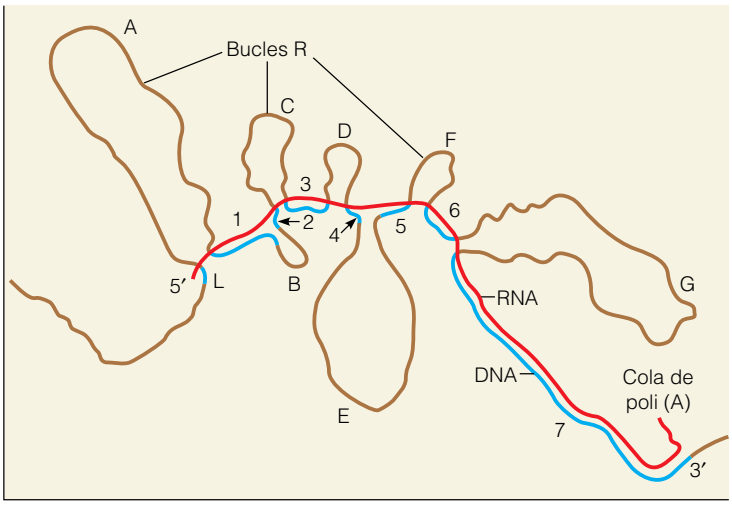
La mayoría de los genes eucariotas contienen intrones.



(a)



(b)



(c)

FIGURA **28.4**

Estructura exón-intrón del gen de la ovoalbúmina del pollo. **(a)** Mapa del gen de 7700 pb, en el que se muestran los exones 1-7 y una secuencia líder no traducida (en azul) y los intrones A-G (en marrón). **(b)** Fotografía de microscopia electrónica de un híbrido formado entre el DNA genómico y el mRNA de la ovoalbúmina. **(c)** Diagrama en el que se observa la forma en que las regiones intrónicas forman bucles externos en los bucles R en un híbrido de este tipo. El RNA se indica en rojo, los exones del DNA en azul, y los intrones del DNA en marrón.

(b) Cortesía de P. Chambon, *Sci. Am.* (1981) 245:60-70. © 1981 Scientific American, Inc. Reservados todos los derechos.

de la ovoalbúmina tiene en total unos 7700 pares de bases, y contiene ocho exones intercalados con siete intrones. La diferencia entre el gen de la ovoalbúmina y su mRNA se pone claramente de manifiesto cuando se examinan moléculas híbridas DNA-RNA con el microscopio electrónico (Figura 28.4b y c). El DNA genómico se aparea con el mRNA a lo largo de los exones, pero los intrones forman bucles externos, que se denominan **bucles R**.

Algunos estudios recientes de secuenciación han demostrado que los intrones están presentes en la mayor parte de los genes estructurales eucariotas y con frecuencia superan a los exones en su longitud total. Es interesante señalar que algunos de los eucariotas inferiores, como las levaduras, tienen muchos menos intrones, y su tamaño genómico es, por tanto, inferior. Como ocurre con los procariotas, que tienen también pocos intrones, este menor tamaño del genoma de las levaduras refleja probablemente una necesidad de mayor eficacia en la replicación celular.

Como se ha mencionado en el Capítulo 7, no se conoce aún por completo la función de los intrones. Parece probable que actúen como loci para la recombinación genética, permitiendo que se intercambien partes funcionales de las proteínas en la evolución. Estos loci permiten también a algunos eucariotas elaborar variantes de una proteína a partir de un solo gen, mediante el corte y empalme de diferentes exones. Este método de corte y empalme alternativo, que se expone más adelante en este capítulo, es una forma más eficaz de almacenar la información que el disponer de todo un gen para cada variante de la proteína.

FAMILIAS GÉNICAS

Variantes múltiples de un gen

A pesar del método de corte y empalme alternativo, en muchos casos se encuentran variantes completas de genes para el mismo tipo de proteína, que se expresan en tejidos diferentes en fases diferentes del desarrollo. Hemos encontrado un ejemplo en el Capítulo 7, en el que se han descrito las globinas embrionarias (ζ y ε), fetales (α y γ) y del adulto (α, β, y δ) de los mamíferos. Para cada una de estas proteínas existe un gen completo en cada célula del mamífero.

En la Figura 7.23 se muestran las agrupaciones de genes de las clases α y β de las hemoglobinas en el ser humano. Cada uno de estos genes tiene el tipo de estructura exón-intrón que se muestra en la Figura 7.20. Además, los propios genes están separados por largos tramos de DNA que no se transcriben. Algunas partes de estas regiones interpuestas deben contener señales de control, ya que la expresión de los genes de la globina está sometida a una regulación compleja y sutil. En primer lugar, aunque se encuentran agrupaciones de genes de globina en todas las células humanas, *sólo* se expresan en las *células eritropoyéticas*, células que dan lugar a los glóbulos rojos. Además, como hemos visto en el Capítulo 7, la expresión de cada variante está limitada de manera estricta a determinadas fases del desarrollo. Así, por ejemplo, en la fase embrionaria inicial, sólo se transcriben los genes ζ y ε, y todos los demás genes de la globina están desactivados. A medida que avanza el desarrollo, la transcripción pasa primero a los genes α y γ fetales, y aproximadamente en el momento del nacimiento, empieza a dominar la variante β del adulto y cesa la transcripción de γ (véase la Figura 7.22). Este tipo de regulación del desarrollo es propia de los eucariotas, y ningún organismo procariota tiene necesidad de un mecanismo de este tipo. El empleo de múltiples variantes génicas resulta caro en términos de DNA: el genoma humano dedica unos 100 000 pb del DNA tan sólo a la producción de las diferentes variantes de la hemoglobina.

Existen otras muchas familias génicas. Algunas de ellas, como los grupos de genes que codifican variantes de las histonas, parecen desempeñar un papel en el desarrollo, bastante similar al de la familia de los genes de la globina. Otras, como los genes de las inmunoglobulinas, parecen existir en múltiples formas para satisfacer una multiplicidad de necesidades diferentes pero similares. En cada caso, parece probable que los componentes de una determinada familia génica hayan evolucionado mediante duplicaciones sucesivas de un gen ancestral original.

Al expandirse nuestro conocimiento detallado de muchos genomas diferentes, se ha hecho obvio que el concepto de "familias de genes" tiene un sentido más amplio que el utilizado anteriormente. Deducimos, a partir de las homologías de secuencia y estructura, que muchos genes que habíamos pensado que no estaban relacionados pertenecen a familias amplias, que probablemente descienden de un antecesor común. Puede ser que todos los genes que existen desciendan de un número relativamente pequeño (¿varios cientos?) suficiente para realizar las necesidades de un organismo ancestral muy primitivo.

Pseudogenes

Las familias génicas incluyen a menudo entre sus miembros uno o varios **pseudogenes** o genes no funcionales. Los pseudogenes pueden reconocerse porque poseen una semejanza de secuencia muy fuerte con los genes funcionantes, de los que indudablemente derivan, tal vez a través de un mecanismo de transcriptasa inversa, como se ha propuesto para los elementos *Alu* (véase la página 1208). Sin embargo, no se transcriben, ya que algún elemento necesario para la transcripción (a menudo una región de control flanqueante o promotor) falta o es defectuosa. Como sus secuencias no se expresan, los pseudogenes no están ya bajo el control selectivo fuerte de la evolución. En cierto sentido, no importa lo que les ocurra, y como consecuencia de ello pueden acumular mutaciones que sufrirían una selección en contra si se dieran en los genes funcionales. Este fenómeno plantea al menos la posibilidad de que puedan aparecer genes nuevos a partir de pseudogenes que pasen a ser de nuevo transcribibles. En la Figura 7.23 pueden verse ejemplos de pseudogenes, que muestran la disposición de las variantes del gen de la α y β globina en el DNA humano.

En resumen, encontramos que diversas explicaciones muy diferentes se combinan para explicar el gran tamaño de los genomas de los organismos eucariotas. Al mismo tiempo, continúa siendo difícil justificar las variaciones extremas de la cantidad de DNA que se observan, a veces incluso entre organismo muy relacionadas. Así, por ejemplo, dentro del grupo de los anfibios, hay una diferencia del orden de más de 100 veces, en el tamaño de los genomas. La función de esta enorme variación, en el caso de que la tenga, no está clara aún, y ello sugiere que todavía no conocemos algunos aspectos fundamentales del genoma eucariota.

Organización física del DNA eucariota: núcleo, cromosomas y cromatina

CROMOSOMAS

Casi todo el DNA de un organismo procariota característico como *E. coli* está contenido en una única molécula grande de DNA circular, con una pequeña fracción en pequeños plásmidos. Este "cromosoma procariota" está superenrollado, forma complejos con las proteínas y se encuentra libre en el citosol, aunque pegado en uno o varios puntos a la membrana celular. Esta estructura suele denominarse **nucleoide bacteriano**.

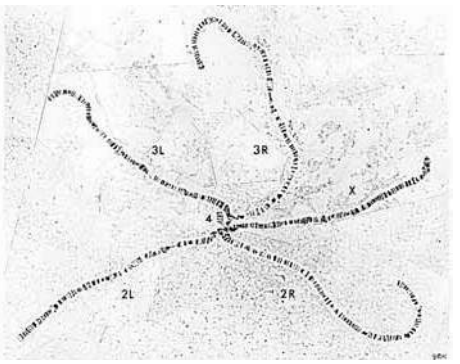


FIGURA **28.5**

Cromosomas politénicos de las células de la glándula salival de *Drosophila*, en metafase. Los cuatro cromosomas están unidos en sus centrómeros.

Tomado de G. Lefevre, Jr., en *The Genetics and Biology of Drosophila*, editado por M. Ashburner y E. Novitski, Vol. 1A (Londres: Academic Press, 1976).

Los múltiples cromosomas eucariotas se encuentran dentro del núcleo, excepto durante la mitosis, en la que la envoltura nuclear se desintegra.

La situación en los eucariotas es bastante diferente. El genoma celular característico está dividido en varios o muchos cromosomas eucariotas, cada uno de los cuales contiene una sola molécula de DNA lineal muy grande. Aunque su tamaño varía enormemente en los distintos organismos, e incluso entre diferentes cromosomas de una misma especie, estas moléculas de DNA suelen tener una longitud del orden de 10^7 a 10^9 pb.

Distintas especies eucariotas contienen un número muy diverso de cromosomas *distinguibles*, desde 1 (en una hormiga de Australia) hasta 190 (en una especie de mariposa). Mientras que la mayor parte de los procariotas son *haploides*, es decir, contienen tan sólo una copia de su cromosoma, la mayor parte de las células eucariotas son *diploides*, es decir, tienen dos copias de cada cromosoma. Así, por ejemplo, el genoma humano está formado por 23 cromosomas diferentes, por lo que las células humanas diploides normales tienen un número total de cromosomas de 46. Algunas células eucariotas son muy *poliploides*, y contienen muchas copias de cada cromosoma. Algunos ejemplos bien estudiados son los de las células de las glándulas salivales de las moscas de la fruta. Los cromosomas *politénicos* de estas células poliploides proporcionan una forma notable de visualizar la linealidad de las disposiciones de los genes, como se muestra en la Figura 28.5. En un cromosoma politénico, múltiples copias del DNA, y sus proteínas asociadas, se disponen unas al lado de las otras en un registro exacto. La disposición lineal de las bandas de tinción clara y oscura puede correlacionarse con la disposición lineal de los genes en el cromosoma.

A diferencia del cromosoma procariota (nucleoide), los cromosomas de los eucariotas no se encuentran normalmente libres en el citoplasma. Cuando las células no se están dividiendo, los cromosomas están segregados dentro del núcleo (Figura 28.6), formando una masa enmarañada de fibras de un complejo DNA-proteína denominado **cromatina**. La *envoltura nuclear* está perforada por **poros nucleares**, que permiten el paso de moléculas muy grandes como las proteínas y algunas moléculas pequeñas de RNA que entran y salen del núcleo.

Los poros nucleares son realmente complejos con múltiples subunidades que proporcionan aperturas de unos 9 nm de diámetro, que permiten la difusión libre de moléculas pequeñas (entre ellas, algunas proteínas pequeñas) entre el núcleo y el citoplasma. Sin embargo, el complejo del poro participa también en el transporte selectivo de proteínas más grandes y RNA mensajero. En este proceso, actúan dos clases completas de proteínas asistentes, denominadas **exportinas** e **importinas**. Sin embargo, la traducción de las proteínas en los eucariotas se produce fuera del núcleo, por lo que la transcripción y la traducción no pueden acoplarse de manera directa, como ocurre en los procariotas. Así pues, el RNA mensajero debe salir del núcleo para la traducción. Como veremos más adelante, se produce un considerable procesamiento del mRNA antes de esta salida. Durante la *mitosis* (separación de los cromosomas hijos tras la replicación del DNA), se degrada la envoltura nuclear y los cromosomas diploides se condensan en estructuras compactas como las que se muestran en la Figura 28.7.

La enorme cantidad de DNA de las células eucariotas plantea algunos problemas graves. En primer lugar, la cuestión de la *compactación*. El contenido de DNA diploide de una célula humana es de unos 8×10^9 pb, que corresponden a una longitud total de casi 3 metros. De algún modo, todo este DNA debe quedar empaquetado dentro de un núcleo con un diámetro de 10 μm (10^{-5} m). En segundo lugar está el problema de la *transcripción selectiva*. En una célula eucariota diferenciada característica, tan sólo se transcribe una pequeña fracción del DNA (5-10%). Como hemos visto, gran parte del DNA no se transcribe. Muchos genes que sí se transcriben lo hacen únicamente en determinadas líneas celulares de ciertos tejidos, y a menudo tan sólo en circunstancias especiales.

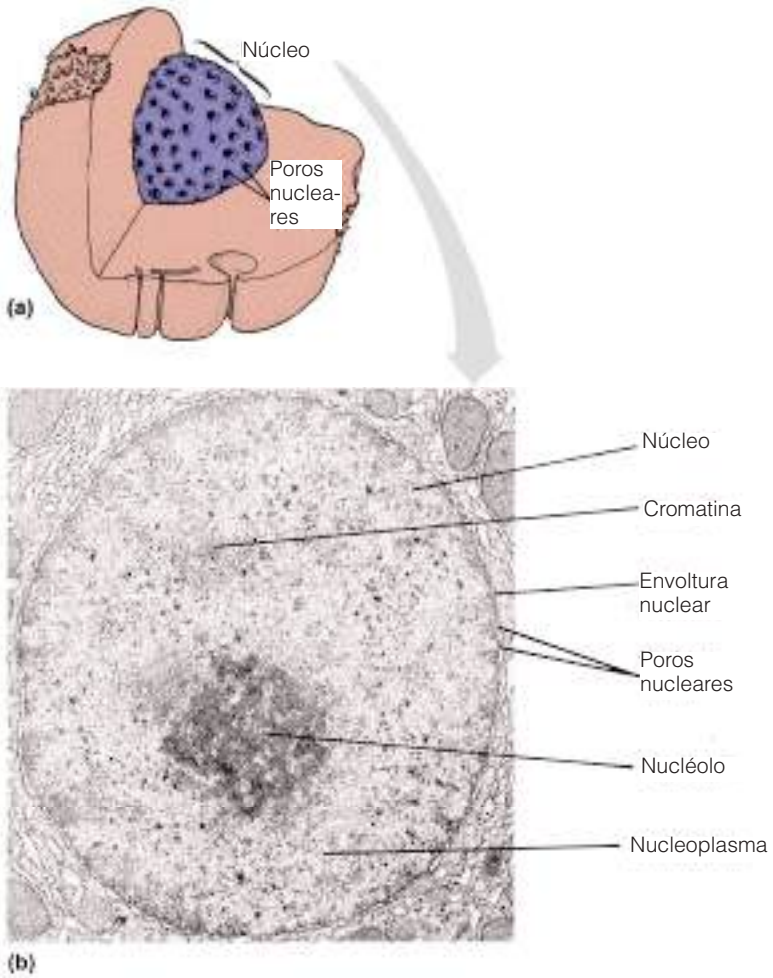


FIGURA **28.6**

El núcleo. **(a)** Corte esquemático de una célula animal característica, en la que se muestra la posición y el tamaño relativo del núcleo. **(b)** Fotografía de microscopia electrónica de un corte de un núcleo de hígado de rata.

(b) Cortesía de R. Rodwald, Universidad de Virginia/BPS.

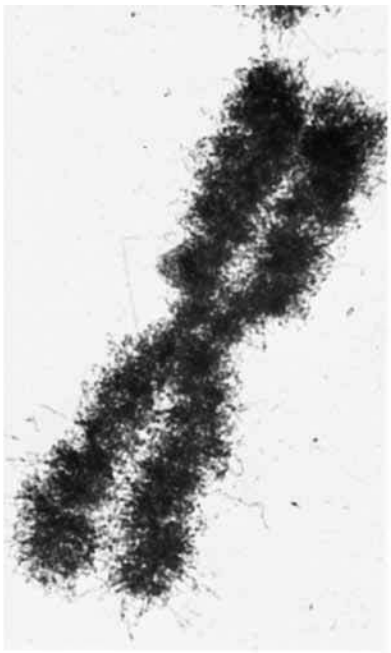


FIGURA **28.7**

Cromosoma mitótico. Imagen de microscopia electrónica de un cromosoma humano durante la metafase de la mitosis. Se aprecia claramente la constricción en el centrómero y la división longitudinal en dos cromátidas hermanas. La superficie, de aspecto velloso, está formada por bucles de cromatina muy enrollada.

Cortesía de G. F. Bahr, Armed Forces Institute of Pathology.

Para mantener y regular estos programas tan complejos de transcripción selectiva, la accesibilidad del DNA a las RNA polimerasas debe estar bajo un estricto control. Tanto la compactación como el control de la expresión de los genes en los eucariotas se consiguen haciendo que el DNA forme complejos con una serie de proteínas especiales para dar lugar al complejo proteína-DNA denominado cromatina.

CROMATINA

La cromatina de los eucariotas está compuesta por DNA que forma complejos con histonas y proteínas no histonas.

Las proteínas de unión al DNA de la cromatina son de dos clases. La clase principal, las **histonas**, comprende cinco tipos de proteínas, cuyas propiedades se indican en la Tabla 28.1. Todas las histonas son proteínas pequeñas, muy básicas, con gran cantidad de lisina y arginina. Algunas de ellas han mantenido una secuencia de aminoácidos notablemente bien conservada a lo largo de la evolución. Así, por ejemplo, la histona H4 presenta tan sólo dos sustituciones entre el ser humano y los guisantes, y tan sólo ocho sustituciones entre el ser humano y la levadura. Todas las H4 conocidas contienen exactamente 102 residuos de aminoácidos. Las histonas son los bloques de construcción básicos de la estructura de la cromatina. Los nucleoides de las células procariotas contienen también proteínas asociadas al DNA, pero estas proteínas son muy diferentes de las histonas y no parecen formar una estructura comparable a la cromatina. Así pues, una estructura de cromatina que contiene histonas es una característica

TABLA 28.1 Propiedades de los principales tipos de histona

Tipo de histona	Peso molecular	Número de residuos de aminoácidos	% molar Lys	% molar Arg	Función
H1	22 500	244	29.5	1.3	Asociada al DNA ligador; facilita la formación de estructuras de orden superior
H2A	13 960	129	10.9	9.3	Dos de cada una van a formar el centro octamérico de histonas del nucleosoma
H2B	13 774	125	16.0	6.4	
H3	15 273	135	9.6	13.3	
H4	11 236	102	10.8	13.7	

Nota: Todos los datos corresponden a las histonas del timo de ternera, excepto para la H1, que corresponde al conejo.



FIGURA **28.8**

Tipo de pruebas que sugirieron inicialmente una estructura repetitiva de la cromatina. En este gel, las tres columnas de la derecha corresponden a fragmentos de DNA obtenidos después de tres digestiones sucesivas, cada vez más largas, de la cromatina de eritrocitos de pollo mediante la nucleasa microcócica. La columna de la izquierda contiene los fragmentos de restricción del DNA como marcadores de tamaño.

Cortesía de K. van Holde.

La estructura básica de repetición de la cromatina es el nucleosoma, en el que hay casi dos vueltas de DNA que envuelven a un octámero de histonas.

propia de los eucariotas. En todos los tipos de núcleos eucariotas están presentes las histonas en una cantidad de alrededor de 1 gramo por gramo de DNA, y las histonas H2A, H2B, H3 y H4 se encuentran siempre en cantidades equimolares.

Las histonas están acompañadas por un grupo mucho más diverso de proteínas de unión al DNA, a las que se da el nombre bastante poco imaginativo de **proteínas cromosómicas no histonas**. La cantidad total de estas últimas proteínas varía mucho de un tipo celular a otro, entre 0.05 y 1 gramo por gramo de DNA. Comprenden una enorme variedad de proteínas, como las polimerasas y otras enzimas nucleares, las proteínas receptoras hormonales y las proteínas reguladoras de muchos tipos. En geles bidimensionales es posible contar aproximadamente 1000 proteínas cromosómicas no histonas diferentes en un núcleo eucariota característico.

La asociación de las proteínas con el DNA eucariota se conoce desde hace tiempo. Ya en 1888, el químico alemán Albrecht Kossel aisló las histonas de los núcleos y las identificó como las sustancias básicas que se unían a los ácidos nucleicos. De hecho, las histonas fueron la primera clase de proteínas que se identificó. Sin embargo, la función exacta de las histonas no se descubrió hasta aproximadamente el año 1974. Entonces, la investigación realizada en diversos laboratorios puso de manifiesto que estas proteínas se combinan de una forma específica para formar un elemento de repetición de la estructura de la cromatina, el **nucleosoma**.

EL NUCLEOSOMA

Si el DNA desnudo (es decir, el DNA que no está unido a proteínas) se digiere parcialmente con una endonucleasa inespecífica, como la nucleasa microcócica, que corta las dobles cadenas de manera casi aleatoria, se obtiene una amplia gama de fragmentos de polinucleótidos. Pero a comienzos de los años 1970, investigadores de diversos laboratorios observaron que si se realizaba el mismo experimento con la cromatina, o incluso con núcleos enteros (en los que la nucleasa puede penetrar con facilidad a través de los poros nucleares), el DNA se rompía de una forma bastante específica y no aleatoria. En un gel de poliacrilamida, el DNA de la cromatina digerida por la nucleasa producía una serie de bandas que eran múltiplos de aproximadamente 200 pares de bases (Figura 28.8). Esto indicaba que la nucleasa podía acceder con facilidad al DNA tan sólo en puntos con un espaciamiento regular. Aproximadamente, al mismo tiempo que se hacían estas observaciones, otros laboratorios obtuvieron fotografías de microscopia electrónica de fibras de cromatina extendidas, que revelaron un patrón de "cuentas" regular en la estructura de la cromatina, con una cuenta cada

200 pb aproximadamente (Figura 28.9). Otros investigadores observaron que si la digestión de la cromatina con la nucleasa era continuada, se iba haciendo más lenta y casi se detenía cuando se había consumido alrededor de un 30% del DNA. El resto del DNA protegido se encontraba presente en unas partículas correspondientes a las cuentas observadas en las fotografías de microscopia electrónica. Estas partículas, denominadas nucleosomas (o más exactamente, *partículas centrales nucleosómicas*), tenían una composición simple y definida, que se mantiene prácticamente invariable en todo el reino eucariota. Siempre contienen 146 pb de DNA, que envuelven a un octámero de moléculas de histona, dos de cada H2A, H2B, H3 y H4. Esta composición explica las cantidades equivalentes de estas histonas que hay en la cromatina. Tanto los nucleosomas como los centros de histonas nucleosómicos se han cristalizado, y los estudios de difracción de rayos X, junto con los experimentos de entrecruzamiento químico, han revelado la estructura que se muestra en la Figura 28.10. El DNA se encuentra sobre la superficie del octámero y realiza aproximadamente 1.7 vueltas de superhélice a izquierdas alrededor de él. La estructura del octámero proporciona una "rampa" helicoidal a izquierdas sobre la que se une el DNA. Los datos de resolución elevada de los que se dispone en la actualidad sobre el octá-

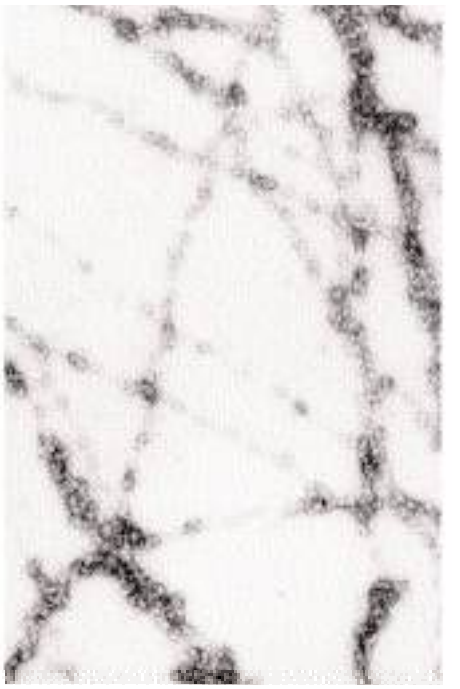
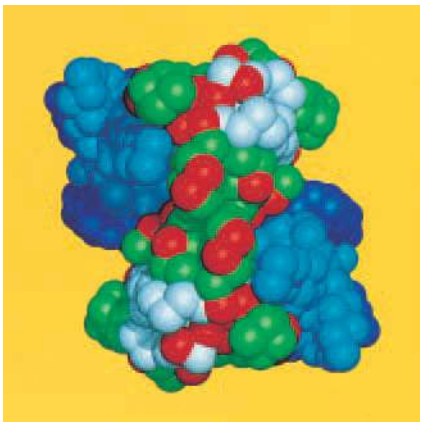


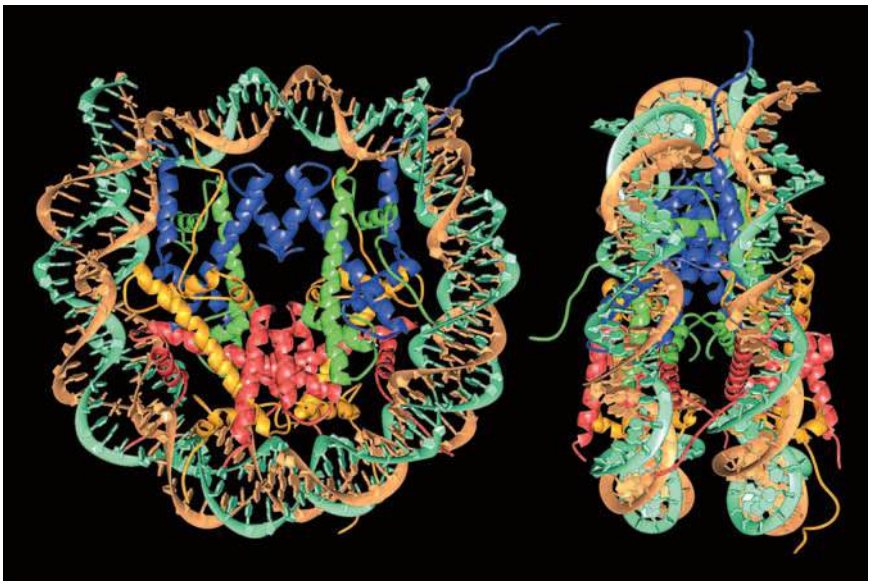
FIGURA **28.9**

Estructura de fibras con cuentas de la cromatina. Fotografía de microscopia electrónica de la cromatina dispersada sobre una rejilla a baja fuerza iónica y con tinción negativa. La diseminación en estas condiciones desenreda y extiende algunas de las fibras de cromatina condensadas que muestran los nucleosomas con un espaciamiento regular. Ésta fue una de las primeras fotografías obtenidas en las que se observó esta estructura.

Cortesía de C. L. F. Woodcock, Universidad de Massachusetts, Amherst.



(a)



(b)

FIGURA **28.10**

Estructura de la partícula central del nucleosoma según muestra la difracción de rayos X. **(a)** Centro del octámero de histonas. H3 se indica en verde, H4 en blanco, H2A en azul claro y H2B en azul oscuro. Los residuos de lisina y arginina del tetrámero $(H3/H4)_2$ se muestran en rojo. **(b)** Modelo de resolución elevada (2.8 Å) de la partícula central del nucleosoma. Se muestran dos proyecciones perpendiculares al eje binario. Las histonas se identifican de la forma siguiente: H3 = azul, H4 = verde, H2A = amarillo, H2B = rojo. Las colas N-terminales de las histonas no están totalmente resueltas.

(a) Cortesía de G. Arents y E. N. Moudrianakis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 90:10489; proporcionado por E. N. Moudrianakis; **(b)** cortesía de T. J. Richmond de K. Luger et al., *Nature* (1997) 389:251-260. © 1997 Macmillan Magazines, Ltd.

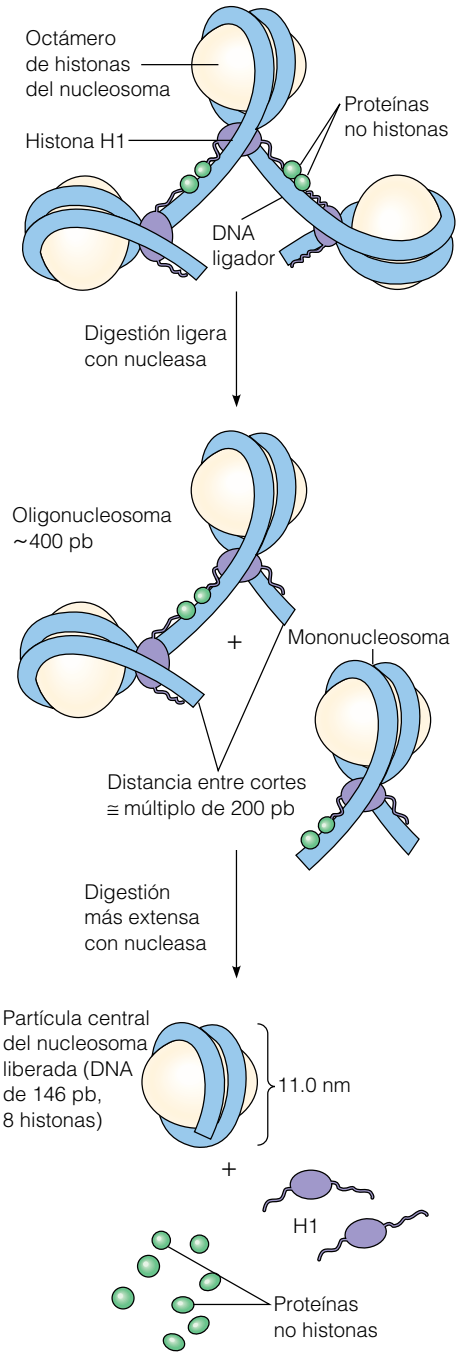


FIGURA **28.11**

Elementos de la estructura de la cromatina. En la parte superior se presenta el concepto actual de la estructura extendida de una fibra de cromatina. La digestión ligera con nucleasa libera primero mononucleosomas y oligonucleosomas. A continuación, con la posterior digestión del DNA ligador, se liberan las proteínas no histonas y la H1, para dar la partícula central, cuya estructura se muestra en la Figura 28.10.

mero de histonas revelan una estructura común de las histonas, el *plegado de histona*, que no era evidente por las secuencias y sugiere un antecesor primitivo común de estas proteínas.

Aunque el nucleosoma en sí es una estructura casi invariable en los eucariotas, la forma en que se espacian los nucleosomas a lo largo del DNA varía considerablemente en los distintos organismos, e incluso entre tejidos del mismo organismo. La longitud del DNA entre los nucleosomas puede variar entre unos 20 pb y más de 100 pb. No se conoce aún exactamente qué es lo que determina la disposición de los nucleosomas a lo largo del DNA. Sin embargo, en la actualidad está claro que al menos algunos nucleosomas ocupan posiciones definidas. Las implicaciones de este hallazgo se considerarán más adelante. El DNA internucleosómico o *ligador*, está ocupado por las histonas de tipo H1 (con abundante lisina) y por proteínas no histonas. En la Figura 28.11 se muestra una visión general de los elementos fundamentales de la estructura de la cromatina.

ESTRUCTURA DE ORDEN SUPERIOR DE LA CROMATINA EN EL NÚCLEO

La envoltura del DNA sobre los centros de las histonas para formar los nucleosomas proporciona parte de la compactación necesaria para encajar al DNA eucariota en el núcleo, ya que la cadena se acorta en varias veces su longitud. Sin embargo, es evidente que gran parte de la cromatina del núcleo está todavía más compactada. El siguiente paso de la compactación se basa en el plegamiento de la fibra con cuentas en una fibra más gruesa, como la que se muestra en la Figura 28.12. Estas fibras tienen unos 30 nm de diámetro y pueden plegarse aún más sobre sí mismas para formar las fibras de cromatina más gruesas que se ven tanto en los cromosomas en metafase (véase la Figura 28.7) como en los núcleos de las células que no se están dividiendo (interfase) (véase la Figura 28.6).

Se están obteniendo datos relativos a la forma en que se organiza la fibra de cromatina, tanto en la cromatina en metafase como en interfase. La tinción con colorantes de los cromosomas en metafase de un organismo determinado proporciona un patrón de bandas reproducible (véase la Figura 28.5). Los métodos de *hibridación in situ*, en los que se localizan secuencias específicas en los cromosomas mediante la hibridación con un ácido nucleico radiactivo complementario y se visualizan luego mediante autorradiografía, muestran que las secuencias de DNA concretas están situadas siempre en los mismos lugares en los cromosomas específicos. Dado que el DNA de un cromosoma eucariota es una cadena continua larga, esto implica que debe haber algún tipo de plegamiento regular para mantener este orden. Los datos obtenidos recientemente indican de qué forma puede producirse este plegamiento. Si los cromosomas en metafase se tratan con polianiones como el sulfato de dextrano, que separan las histonas y las proteínas no histonas con uniones laxas, las cadenas de DNA aparecen en forma de bucles enormes que salen de un *andamiaje* de proteínas unidas estrechamente. En la Figura 1.5 se presenta una fotografía de microscopia electrónica de esta estructura. Los diversos bucles tienen distintos tamaños, pero pueden alcanzar hasta 100 000 pb de longitud, es decir, aproximadamente el tamaño de la agrupación del gen de la β-globina, por ejemplo. En un cromosoma promedio existen aproximadamente 1000 bucles de este tipo.

También existen datos que indican la presencia de un andamiaje similar, pero más difuso, en el núcleo en interfase. La eliminación en los núcleos intactos de las histonas y de las proteínas no histonas unidas de forma débil, mediante la aplicación de concentraciones salinas altas o de detergentes, junto con la di-

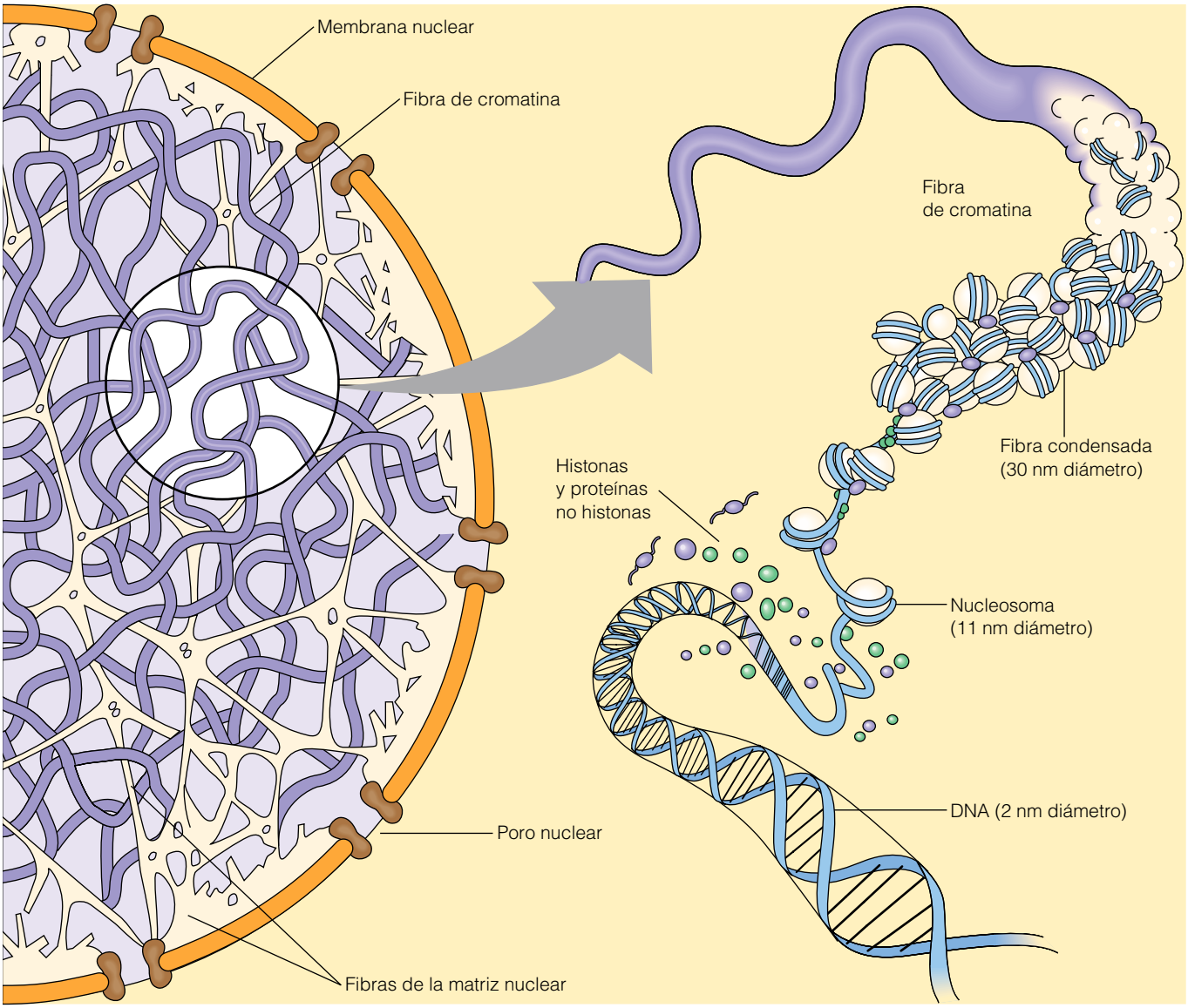


FIGURA **28.12**

Niveles de la estructura de la cromatina. A la izquierda se presenta una imagen esquemática de una parte del núcleo, con fibras de cromatina parcialmente condensadas. Una imagen más ampliada (a la derecha) muestra una fibra de cromatina en la que parte está en forma condensada (30 nm), y parte está abierta para la transcripción.

La fibra formada por los nucleosomas está plegada in vivo para formar una estructura de la cromatina de orden superior.

gestión de la mayor parte del DNA mediante nucleasas, deja una estructura proteica que se ha denominado **andamiaje nuclear** o **matriz nuclear** (Figura 28.12). Esta estructura incluye la envoltura laminar que recubre la parte interna de la membrana nuclear, junto con una red de fibras finas que parecen extenderse por todo el núcleo. Cuando la disección química se realiza de manera cuidadosa, utilizando el detergente específico diyodosalicilato de litio, para eliminar las histonas y la mayor parte de las demás proteínas, las conexiones del DNA a la matriz nuclear no se alteran. La ruptura del DNA con endonucleasas de restricción da lugar a unos fragmentos específicos de DNA pegados a la matriz nuclear. Estos fragmentos están espaciados a intervalos bastante largos en el genoma, y contienen *regiones de fijación a la matriz* (*MAR, matrix attachment regions*). Al parecer, a menudo hay grupos de genes que se expresan de manera coordinada que se encuentran entre las MAR adyacentes, como se muestra en la Figura 28.13 para los grupos de genes repetidos de las histonas en *Drosophila*.

Las proteínas que forman el andamiaje a partir del cual se extienden los bucles incluyen algunas proteínas interesantes, como las topoisomerasas. Se ha

Los bucles de la cromatina, que frecuentemente contienen agrupaciones de genes individuales, están fijados a la matriz nuclear.

planteado la hipótesis de que las moléculas de la topoisomerasa situadas en la base de un bucle pudieran producir cambios del superenrollamiento de ese bucle determinado. Estos cambios de superenrollamiento se añadirían al enrollamiento impuesto por los nucleosomas. Los cambios del superenrollamiento pueden intervenir en la condensación del cromosoma y parecen ser esenciales durante la replicación y la transcripción. Parece probable que la estructura de la cromatina sea dinámica, con cambios locales a medida que el DNA se replica o se transcribe.

Aunque no se ha establecido aún con certeza, es posible que al menos ciertas partes de las estructuras de bucles y andamiaje sean idénticas en la cromatina de la metafase y la interfase. De ser así, proporcionaría parte del mecanismo necesario para el "mantenimiento de la pista" de la estructura de la cromatina a través de divisiones celulares sucesivas. Además, en la actualidad parece probable que esta estructura de bucle pueda desempeñar algún papel en el control de la expresión de grupos de genes relacionados funcionalmente.

La perspectiva actual es que algunos dominios de bucles, los que corresponden a los genes no transcritos de una determinada célula, pueden estar enrollados permanentemente en fibras de 30 nm, y tal vez supercompactados, para formar enrollamientos de un orden incluso superior. Estas regiones podrían corresponder a las regiones muy condensadas de la **heterocromatina** que los citólogos han identificado desde hace mucho tiempo. Las regiones de la cromatina más abiertas, denominadas **eucromatina**, pueden corresponder, pues, a dominios relajados en los que puede producirse la transcripción. Sin embargo, como veremos más adelante, la regulación de la transcripción es seguramente más sutil y compleja que lo que un modelo tan simple pudiera implicar.

Partiendo de estas bases en cuanto a la organización y arquitectura del genoma eucariota, pasaremos ahora a sus principales funciones: replicación y transcripción.

Ciclo celular y replicación del DNA en los eucariotas

CICLO CELULAR

Los procesos mediante los cuales las células se dividen y el DNA se replica son algo más complicados en los eucariotas que en los procariotas. Como hemos mencionado en el Capítulo 24, la replicación del DNA en las bacterias es un proceso casi continuo, al menos durante la fase de crecimiento exponencial. Las células somáticas de los eucariotas se dividen, en cambio, de manera mucho menos frecuente, y algunas de ellas, en determinados tipos de tejidos maduros, no se dividen nunca. Las células que se están dividiendo en los tejidos en crecimiento presentan un *ciclo celular* bien definido, que casi siempre está separado en varias fases diferenciadas, como se muestra en la Figura 28.14. Sigamos a una célula eucariota característica a lo largo de un ciclo. Podemos empezar arbitrariamente en lo que se denomina *fase G1* (o fase del primer hueco), tras la divi-

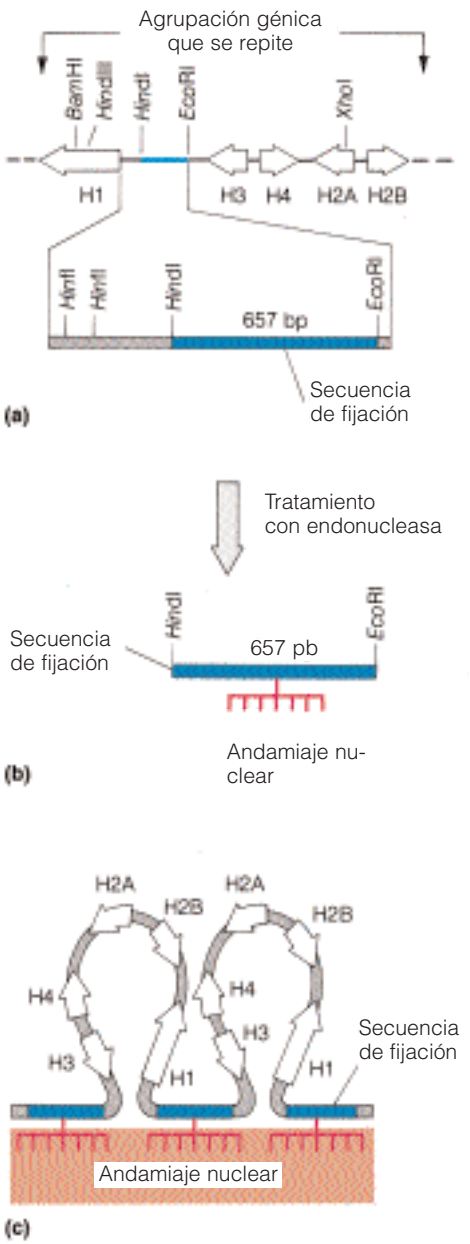


FIGURA **28.13**

Fijación de las agrupaciones de genes a la matriz nuclear. **(a)** Mapa de la agrupación de genes repetidos de las histonas de *Drosophila*, donde cada flecha blanca corresponde a un gen de histona (las puntas de flecha indican la dirección de la transcripción). Se muestran también diversos lugares de restricción. **(b)** Si se extraen los núcleos de *Drosophila* con diyodosalicilato de litio, para eliminar las proteínas de forma cuidadosa, y se aplica luego una digestión con una serie de las endonucleasas de restricción que se muestran, *solamente* los fragmentos de DNA *Hin*dI-*Eco*RI de 657 pb quedan unidos a la matriz. **(c)** La interpretación es que las agrupaciones de genes se encuentran en bucles individuales, cuyas bases están unidas a la matriz.

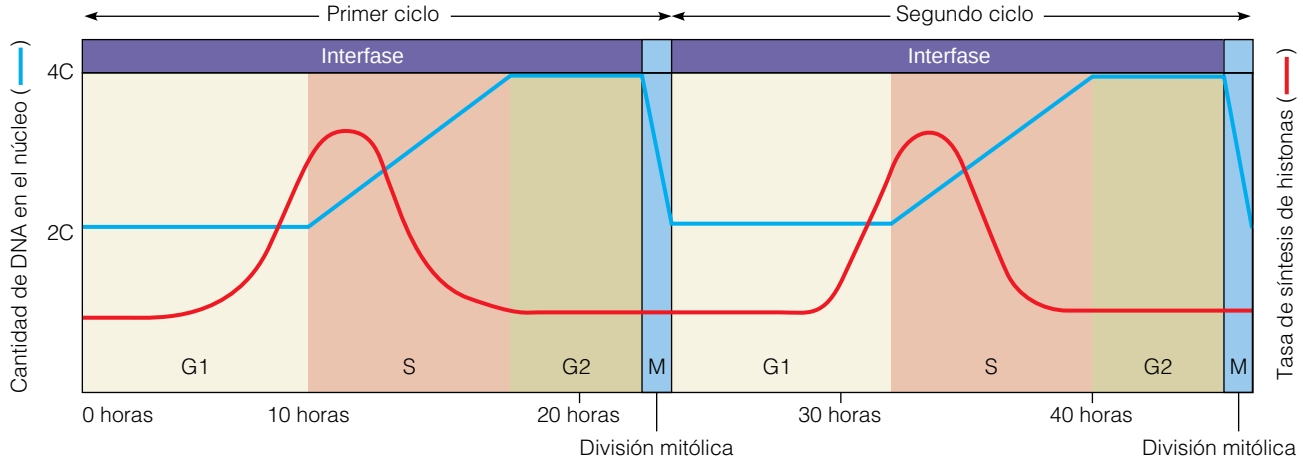


FIGURA **28.14**

Ciclo celular eucariota. Cambios de la cantidad de DNA (línea azul) y tasa de síntesis de las histonas (línea roja) a lo largo del tiempo, durante dos ciclos celulares. El contenido de DNA se mide en unidades del genoma haploide (C). La escala temporal es característica de muchas células eucariotas.

sión celular. En este punto, la célula contiene dos copias de cada cromosoma, el estado diploide normal de una célula eucariota. Este estado se indica en la Figura 28.14 mediante un contenido de DNA de 2C, es decir, el doble de la cantidad haploide. En un momento tardío de la fase G1, se desencadena el compromiso para dividirse de un modo todavía desconocido. Dado que la división requerirá en primer lugar que se duplique el contenido de DNA, y el nuevo DNA necesitará nuevas histonas para formar la cromatina, la síntesis de histonas es uno de los primeros indicios de una replicación incipiente del DNA (véase la Figura 28.14).

La célula entra entonces en la fase de síntesis o *fase S*. Durante la misma, el DNA se replica y las histonas y las proteínas no histonas se depositan sobre las moléculas hijas de DNA para reproducir las estructuras de la cromatina.

Cuando se ha completado la replicación, la célula pasa a lo que se llama la fase del segundo hueco o *fase G2*. En este momento tiene un contenido de DNA de cuatro veces la cantidad haploide (4C). En la mayor parte de las células eucariotas, el tiempo total necesario para las fases G1, S y G2 será de muchas horas. Durante todo este período, que se denomina **interfase**, la cromatina está dispersa por todo el núcleo y ocupada activamente en la transcripción.

Al final de la fase G2, la célula está preparada para iniciar el proceso denominado *mitosis*, durante el cual se divide. La mitosis es un proceso de varias etapas, y se ha subdividido, con fines descriptivos, en las fases que se indican en la Figura 28.15. En la *profase*, los cromosomas replicados se condensan en las estructuras cromosómicas características de la *metafase*, que tan a menudo se muestran (véase la Figura 28.7). La membrana nuclear se desintegra y se forma el *huso mitótico*. El huso está formado por microtúbulos contráctiles que traccionan los pares de cromátidas separándolas, de manera que cada una de las células hijas reciba un conjunto idéntico de cromosomas. En la *telofase*, la membrana nuclear vuelve a formarse alrededor de cada núcleo hijo, y la célula se divide. Esta división celular se denomina **citocinesis**. Tras la división, los cromosomas de las células hijas se descondensan, y comienza una nueva fase G1.

En muchos tejidos de los organismos superiores, la fase G1 se prolonga mucho una vez completado el crecimiento y la diferenciación tisular. Los ejemplos más extremos son los de las células nerviosas totalmente diferenciadas, la mayor parte de las cuales no vuelven a dividirse en los organismos maduros. Estas células que no se dividen se mantienen detenidas permanentemente en la fase G1, que se denomina fase G_0. En cambio, algunas células primordiales especializadas, como las que se encuentran en la médula ósea y en el epitelio in-

La célula eucariota pasa por un ciclo con las siguientes fases: G1, S, G2 y mitosis.

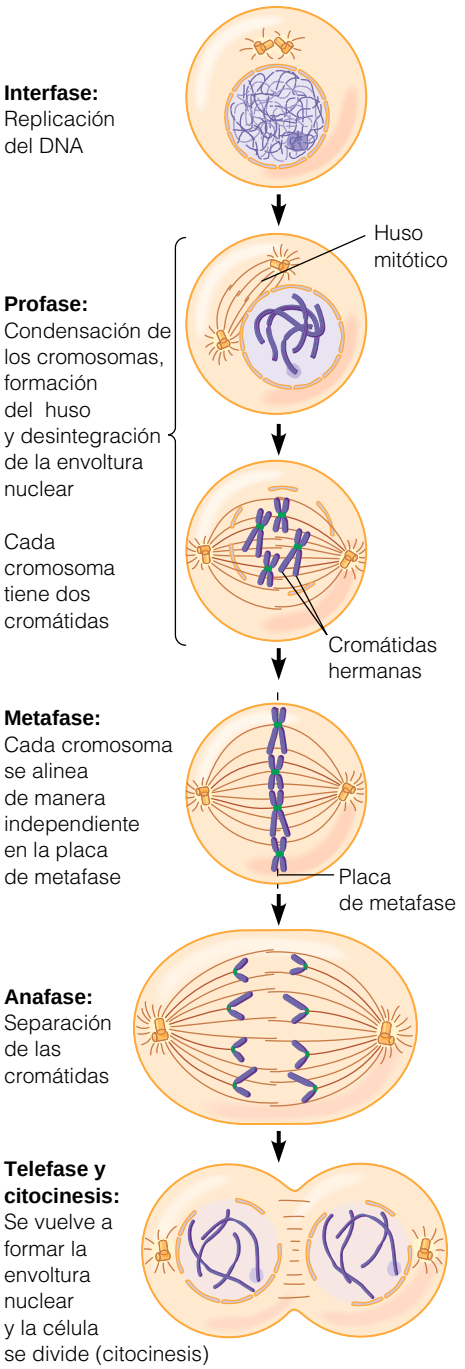


FIGURA **28.15**

Mitosis. La célula que entra en la ruta era inicialmente diploide. Ha sufrido una replicación del DNA y ahora se encuentra en la fase G2, con un contenido de DNA de 4C. Una vez completado el proceso, cada célula hija tendrá 2C.

testinal, sufren divisiones continuas durante toda la vida del organismo. Estas células primordiales proporcionan continuamente nuevas células diferenciadas para reemplazar a las que se pierden o sufren daños.

Sólo estamos empezando a entender los acontecimientos químicos que desencadenan las fases sucesivas del ciclo celular. El proceso clave parece ser la fosforilación de varias proteínas nucleares (entre ellas la histona H1) y las enzimas clave son un grupo de quinasas. La primera de éstas que se descubrió fue la quinasa cdc2 de levaduras, una serina/treonina quinasa de 34 kDa. Su activación requería la asociación con pequeñas proteínas específicas denominadas **ciclinas**; en las levaduras, una ciclina activa la cdc2 al comienzo de la fase S y otra la reactiva al comienzo de la mitosis. En los eucariotas superiores, el patrón es semejante pero más complejo: existen varias *quinasas dependientes de las ciclinas* y varias ciclinas para asociarse con ellas. Cada transición del ciclo celular parece tener como desencadenante un complejo ciclina/quinasa distintivo. En la Figura 28.16 se muestra una visión algo más simplificada de las funciones de estas proteínas en las células de mamíferos. La quinasa CDK2 dependiente de ciclina participa en la entrada en la fase S y la cdc2, con las ciclinas A y B, regula la mitosis. La cdc2 se fosforila a la entrada de G2, pero debe desfosforilarse para que comience la mitosis.

Estos desencadenantes del ciclo celular están ellos mismos bajo un control estricto. La síntesis de las ciclinas está, al menos en parte, determinada por hormonas de proliferación. Por otro lado, el daño del DNA o la detención de las horquillas de replicación impide la desfosforilación de la propia cdc2 y esto bloquea la mitosis. En otras palabras, si no está libre la maquinaria para replicar el DNA, la célula no tratará de dividirse. Éste es un *punto de control* del ciclo celular. Otro se produce en respuesta a la acumulación de la proteína p53 cuando el DNA está dañado (véase el Capítulo 25). La p53 activa la transcripción del gen *pic1*, cuyo producto se une a las CDK, bloqueando la célula en G1 y conduciendo con frecuencia a la apoptosis de la célula (véase la página 1251). Las mutaciones del gen de la p53 se han implicado en el *síndrome de Li-Fraumeni* que lleva una predisposición al cáncer de mama precoz. Si p53 no es capaz de actuar, las células potencialmente cancerosas con lesiones en el DNA serán capaces de replicarse.

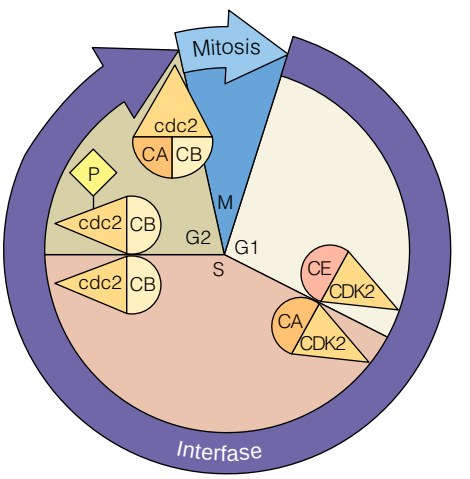


FIGURA **28.16**

Funciones de las quinasas y las ciclinas en la regulación del ciclo celular. En esta figura, algo simplificada, se indica la participación de CDK2 y las ciclinas E y A (CE, CA) para desencadenar la fase S, la función de cdc2 y su fosforilación en la frontera S/G2, y la participación de las ciclinas A (CA) y B (CB) en la entrada en la mitosis.

FENÓMENOS MOLECULARES DURANTE LA REPLICACIÓN DE LA CROMATINA

Replicación del DNA

Consideraremos ahora detalladamente los fenómenos moleculares que se producen durante la fase S del ciclo celular. Los mecanismos básicos de la replicación del DNA son muy similares en los eucariotas y los procariotas. Como se señaló en el Capítulo 24, la enzimología no es fundamentalmente diferente. En ambos casos, la replicación es semiconservativa, y se produce de manera continua en una cadena y discontinua en la otra. Como en los procariotas, la replicación eucariota en el brazo retrógrado comporta el ensamblaje de moléculas cebadoras cortas de RNA, la elongación a partir de los cebadores mediante una DNA polimerasa y la unión de los fragmentos de Okazaki. Una diferencia importante en la replicación del DNA eucariota y procariota es el tamaño de los fragmentos de Okazaki. En los eucariotas son mucho más pequeños, de tan sólo unas 135 bases, aproximadamente el tamaño del DNA de un nucleosoma. Como se señaló en el Capítulo 24, las células eucariotas contienen cinco DNA polimerasas. Tres de ellas, polimerasas α, δ y ε, se utilizan durante la replicación de la fase S. (Véanse las propiedades de las DNA polimerasas de eucariotas y procariotas en las Tablas 24.2 y 24.3.) Como en los procariotas, el complejo de replicación contiene también otras proteínas, como las helicasas y diversas proteínas accesorias denominadas *factores de replicación.*

Ensamblaje de los nucleosomas

La replicación del genoma nuclear en los eucariotas comporta algunos problemas especiales. El primero de ellos es consecuencia de la estructura nucleosómica de la cromatina. La maquinaria de replicación debe actuar a través de esta estructura compleja, que se desmonta y luego se reconstruye en las moléculas de DNA hijas. Al parecer, la disposición de los nucleosomas en la cromatina y la colocación de las proteínas no histonas dista mucho de ser aleatoria. Así pues, no sólo debe copiarse de manera fidedigna el DNA, sino que es preciso que se regenere también una estructura completa de la cromatina muy organizada.

Aunque todavía es mucho lo que no conocemos acerca de la replicación de la cromatina, disponemos ya de alguna información relativa al ensamblaje de los nucleosomas en las cadenas hijas. Como indica la Figura 28.17, parece probable que los nucleosomas de la cadena de cromatina original se desensamblen por delante de la horquilla de replicación y luego se reensamblen en una u otra de las cadenas hijas. En los nuevos nucleosomas se utilizan tanto histonas preexistentes como histonas de nueva síntesis, y los datos existentes actualmente indican que ambas se depositan de manera aleatoria en las nuevas cadenas hijas. Se produce una mezcla de histonas nuevas y antiguas en octámeros en las cadenas hijas, pero esta mezcla no es totalmente aleatoria: los tetrámeros $(H3/H4)_2$ tienden a mantenerse inalterados, al igual que los dímeros H2A/H2B. Esto es lo que podría esperarse de los estudios in vitro: los tetrámeros $(H3/H4)_2$ y los dímeros H2A/H2B son estables cuando se liberan de los nucleosomas, pero los octámeros no.

En la replicación de la cromatina, las histonas antiguas y nuevas se distribuyen en las dos dobles cadenas hijas.

No se ha resuelto aún la cuestión, mucho más importante, de cómo se restablece la disposición precisa de los nucleosomas y las proteínas no histonas tras la replicación. De hecho, es probable que se produzcan cambios de esta disposición en algunos casos. Estos cambios explicarían la observación de que la diferenciación de las células en el desarrollo embrionario se produce generalmente en el momento de la división celular. Sin embargo, estos cambios deben estar *programados*, por lo que su existencia sólo hace el problema aún más complejo.

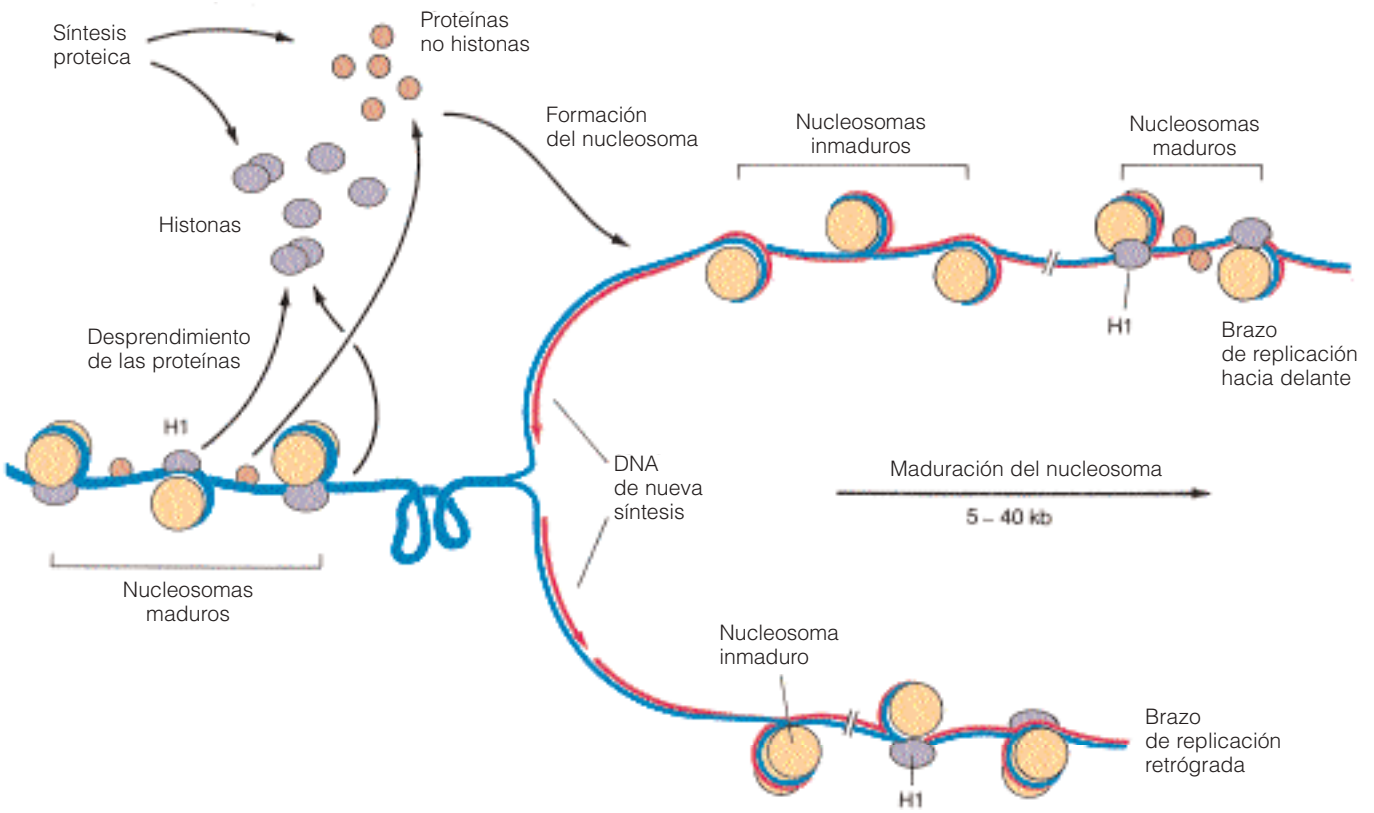


FIGURA **28.17**

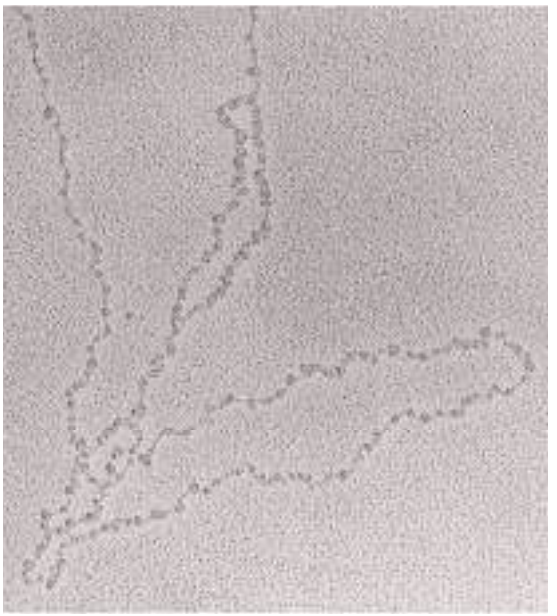
Modelo de la replicación de la cromatina. Los nucleosomas del DNA original se disocian a medida que la horquilla de replicación se aproxima a ellos y se vuelven a formar en las moléculas hijas recién sintetizadas. Es poco lo que se conoce de este proceso, excepto que se utilizan tanto histonas antiguas como nuevas. La estructura de la cromatina madura lentamente, la organización completa no parece haberse establecido hasta que la horquilla está muchas kilobases más adelante. La figura no incluye la polimerasa y las proteínas accesorias que deben estar presentes en la horquilla de replicación.

Orígenes de replicación

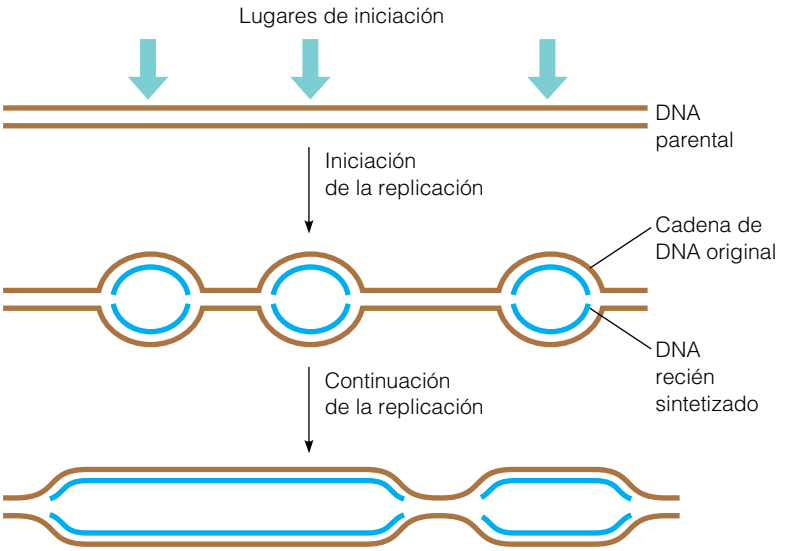
Tal vez estas complicaciones al tratar con el componente proteico de la cromatina expliquen el hecho de que la velocidad de movimiento de una horquilla de replicación sea unas 10 veces más lenta en los eucariotas que en los procariotas. (Véase la Tabla 24.1 para los datos comparativos al respecto.) Esta velocidad lenta del movimiento de la horquilla, con unos 100 nucleótidos/segundo, combinada con el enorme tamaño de los genomas eucariotas, plantea el segundo problema grave que se encuentra en la replicación eucariota. Un cromosoma característico de un mamífero contiene aproximadamente 10^8 pares de bases. Si tuviera que replicarse a partir de *un solo* origen (como ocurre en el cromosoma de *E. coli*), a esta velocidad lenta, sería necesaria casi una semana. En su lugar, la replicación del DNA en las células eucariotas se completa de forma característica en 8-12 horas.

El problema se resuelve disponiendo de *muchos* orígenes de replicación, hasta varios miles en cada cromosoma. La replicación se produce bidireccionalmente a partir de estos orígenes, creando las "burbujas" de replicación que se muestran en la Figura 28.18. Estas burbujas crecen de manera independiente hasta que finalmente se fusionan y se ha copiado todo el cromosoma. No todas las regiones del DNA inician la replicación en el mismo momento de la fase S. Existe, más bien, una tendencia a que las regiones activas en la transcripción se repliquen antes, mientras que las regiones inactivas se replican más tarde. No se conoce el motivo de este hecho, aunque podría deberse simplemente a que las regiones activas en cuanto a la transcripción sean más abiertas y accesibles a los posibles factores proteicos que inician el proceso de replicación.

La naturaleza exacta de los orígenes de replicación es todavía algo oscura, pero se han obtenido algunas pistas útiles en los estudios realizados en levaduras. Se han identificado secuencias que son esenciales para la replicación de los



(a)



(b)

FIGURA **28.18**

Replicación del DNA en los eucariotas. **(a)** Fotografía de microscopia electrónica de la cromatina de *Drosophila* en replicación, en la que se observan dos burbujas de replicación. Los puntos sobre las fibras son nucleosomas. **(b)** Imagen esquemática de la replicación de los eucariotas.

(a) Cortesía de S. L. McKnight y O. L. Miller, Jr.

plásmidos en las células de levadura; se las denomina *secuencias de replicación autónoma* (*ARS: autonomously replicating sequences*). Las ARS tienen una longitud característica de varios cientos de pares de bases, con subsecuencias que transportan copias de la siguiente secuencia de consenso de 11 pb, denominada ACS

5′ TTTTATATTTT 3′

que se requiere necesariamente para la función. Las ARS de levaduras contienen también otros elementos que tienen una importancia significativa para la replicación. Existen elementos con abundante A/T que presumiblemente impulsan el desenrollamiento y lugares de unión de complejos proteicos, entre ellos el *factor de unión al origen* que tiene seis polipéptidos, necesario para la iniciación de la replicación.

Probablemente, tiene un significado aún mayor la presencia de secuencias que tienen gran afinidad por la matriz nuclear. Su importancia la incrementan los estudios recientes de células de ratón que descubren la situación de "factorías de replicación" separadas en puntos específicos dentro del núcleo. El DNA recién sintetizado está marcado de forma preferente con nucleótidos modificados, que serán reconocidos por anticuerpos específicos con marcaje fluorescente. La microscopia confocal de elevada resolución descubre "islas" de replicación de DNA dentro del núcleo, diferentes de las islas de transcripción separadas. El modelo que emerge sugiere que los complejos de la maquinaria de polimerización están trabados a la matriz nuclear en puntos determinados y pueden "enrollar" grandes bucles de DNA a través de los cuales se replican. De acuerdo con este modelo, se mueve el DNA, no la maquinaria.

Telómeros

En el Capítulo 24 nos hemos referido al problema que comporta la replicación de cromosomas lineales: ¿cómo completar la cadena retardada? La escisión del cebador dejaría necesariamente un hueco que no podría llenar la polimerasa, y el cromosoma se acortaría en cada ciclo de replicación.

En los eucariotas, este problema se ha resuelto con la adición de **telómeros** en los extremos de cada cromosoma. El DNA telomérico está formado por se-

La telomerasa añade segmentos cortos de DNA a los extremos de los cromosomas.

TABLA 28.2 Secuencias teloméricas repetidas representativas de diversos organismos

Organismo	Repetición[a]
Tetrahymena thermophila (protista)	TTGGGG
Saccharomyces cerevisiae (levadura)	$T(G)_{2-3}(TG)_{1-6}$[b]
Arabidopsis thaliana (planta)	TTTAGGG
Bombyx mori (gusano de seda)	TTAGG
Ser humano	TTAGGG

[a] Escrita en la dirección 5′→3′.

[b] Las levaduras son atípicas en que tienen repeticiones teloméricas algo variables.

cuencias simples repetidas en tándem como las que se muestran en la Tabla 28.2. Lo habitual es que una tenga abundante G y la otra abundante C. La cadena con abundante G forma un saliente 3′-terminal, que suele tener una longitud de 15 residuos. Estas secuencias se añaden de manera repetida a los extremos 3′ de los DNA cromosómicos mediante enzimas denominadas *telomerasas* (Figura 28.19). Esta elongación deja espacio para que se una un cebador y se inicie la síntesis de la cadena retardada en la otra cadena, manteniendo la longitud aproximada del cromosoma e impidiendo la pérdida de secuencias codificadoras.

Obsérvese que la telomerasa debe añadir nucleótidos sin utilizar un DNA cebador. Ello se consigue probablemente gracias a la existencia, en cada telomerasa, de un oligonucleótido de RNA esencial, que es complementario de la secuencia telomérica que se sintetiza, y así actúa como molde. Se ha propuesto que la telomerasa es un resto de la evolución de una ribozima que anteriormente pudo servir para catalizar la síntesis de DNA, un proceso que fue asumido hace mucho tiempo por polimerasas totalmente proteicas.

En los últimos años, ha quedado claro que los telómeros y la telomerasa pueden tener un significado de gran alcance, además de su función práctica, de evitar el acortamiento de los cromosomas. En primer lugar, es posible que las cadenas con abundante G características de los telómeros puedan ayudar en el apareamiento cromosómico formando estructuras de cuatro cadenas denominadas cuartetos G (véase el margen). Se ha observado muchas veces in vitro con oligo-G una estructura secundaria de este tipo y se sabe que favorece la formación de esas estructuras una proteína específica de unión al telómero.

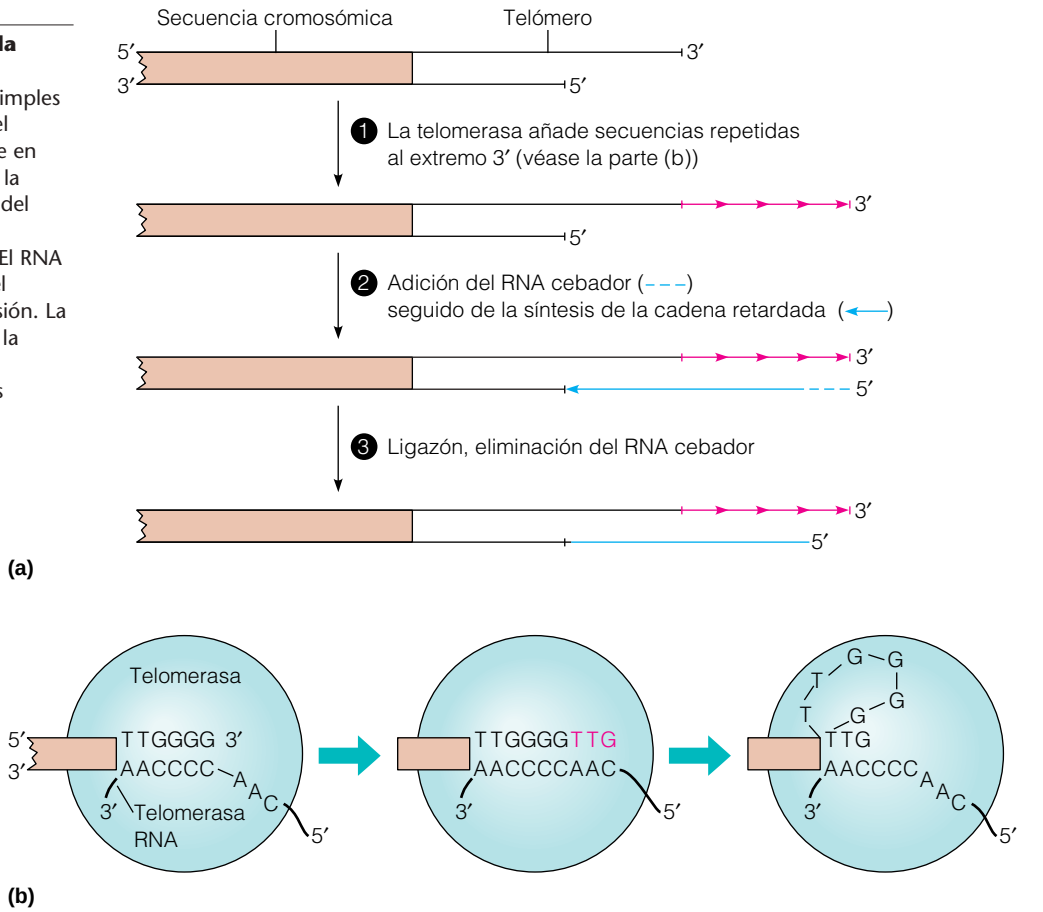


FIGURA **28.19**

Extensión del DNA telomérico por la telomerasa. **(a)** Reacción global. La telomerasa añade secuencias repetidas simples al extremo 3′ del DNA telomérico, por el mecanismo que se muestra parcialmente en (b). La adición de RNA cebador permite la síntesis de la cadena retardada, seguida del ligamiento y la eliminación del RNA. **(b)** Acción propuesta de la telomerasa. El RNA que transporta la telomerasa empareja el extremo 3′ del DNA y permite su extensión. La formación de un bucle de DNA permite la extensión posterior. La disociación de la telomerasa y su RNA continúa tras varias rondas de extensión.

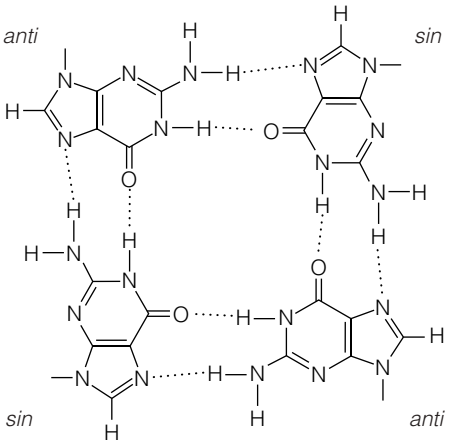
En segundo lugar, parece existir una fuerte relación entre el envejecimiento, la senescencia celular y las concentraciones bajas de telomerasa. Por el contrario, las células en cultivo pueden "inmortalizarse" introduciendo genes activos de la telomerasa. Estas observaciones, junto con el descubrimiento de que las células tumorales malignas tienen de forma invariable concentraciones elevadas de la telomerasa, han estimulado un gran interés en la inhibición de la telomerasa como posible tratamiento del cáncer.

La transcripción y su control en las células eucariotas

En las células eucariotas, la transcripción es un proceso más complejo que en las procariotas. No sólo existe una discriminación mucho mayor de lo que se va a transcribir y lo que no, sino que esta transcripción está programada de manera muy precisa durante el desarrollo y la diferenciación tisular. Además, la maquinaria de la transcripción debe abordar de alguna manera los niveles complicados de la estructura de la cromatina eucariota.

Esta complejidad se refleja en el hecho de que las células eucariotas tienen varias RNA polimerasas diferentes, cada una de las cuales tiene una función especializada. Ya se han mencionado en el Capítulo 26, y se revisan en la Tabla 28.3. Además de las RNA polimerasas especiales que actúan en las mitocondrias y los cloroplastos, hay tres enzimas que transcriben diversas porciones del genoma nuclear.

Cada una de estas RNA polimerasas nucleares es una enzima compleja, que contiene aproximadamente una docena de subunidades. Las enzimas completas son difíciles de aislar en forma pura, y a menudo resulta difícil determinar cuales subunidades son esenciales y para qué fines. Otra característica importante permite diferenciar las RNA polimerasas eucariotas de las procariotas: todas las enzimas eucariotas requieren factores proteicos adicionales (**factores de transcripción**) que se unen a un promotor e inician la transcripción. De hecho, el estudio de los factores de transcripción es una parte importante del estudio de la transcripción eucariota. Como veremos, estos factores parecen desempeñar un papel importante en la determinación de la selectividad de la transcripción de los genes. Consideremos ahora la función de cada una de las tres polimerasas nucleares.



Los eucariotas tienen tres tipos de RNA polimerasas nucleares, cada una de las cuales requiere factores proteicos para iniciar la transcripción.

RNA POLIMERASA I: TRANSCRIPCIÓN DE LOS PRINCIPALES GENES DE RNA RIBOSÓMICO

El ribosoma eucariota contiene cuatro moléculas de rRNA. La subunidad pequeña tiene un rRNA 18S, mientras que la subunidad grande contiene moléculas de rRNA 28S, 5.8S y 5S. De éstas, las 28S, 18S y 5.8S se producen todas a partir de un transcrito inicial pre-rRNA 45S, y la función especial de la RNA polimerasa I (pol I) es la de efectuar esta transcripción.

La pol I transcribe los principales genes ribosómicos, la pol III los genes de RNA pequeño y la pol II los genes estructurales y algunos genes de RNA pequeño.

TABLA 28.3 Propiedades comparativas de las RNA polimerasas eucariotas

Polimerasa	Localización	RNA Sintetizados
I	Núcleo (nucléolo)	Pre-rRNA (excepto 5S)
II	Núcleo	Pre-mRNA, algunos otros RNA nucleares pequeños
III	Núcleo	Pre-tRNA, rRNA 5S, otros RNA pequeños
Mitocondrial[a]	Mitocondria	Mitocondrial
Cloroplástica[a]	Cloroplasto	Cloroplástico

[a] Son muy semejantes a la RNA polimerasa procariota.

Como otras RNA polimerasas de los eucariotas, la RNA polimerasa I es una enzima compleja que contiene 13 subunidades, con un total de 600 000 dalton. Se sabe que necesita al menos dos factores de transcripción; sin embargo, dado que tan sólo se transcribe una clase de gen, no es necesario un dispositivo complejo, que incluya múltiples lugares de regulación y múltiples factores de transcripción, como observamos de manera característica en la transcripción de la pol II.

El nucléolo es el lugar de ensamblaje de la subunidad ribosómica en los eucariotas. El gen del pre-rRNA 45S se encuentra en el nucléolo en forma de copias múltiples dispuestas en tándem, como se muestra en la Figura 28.20a. Después de la transcripción, el pre-rRNA 45S se procesa para dar las moléculas de rRNA 18S, 5.8S y 28S. En este proceso se desechan aproximadamente 6800 nucleótidos. Los rRNA se combinan entonces con el rRNA 5S de otras regiones del núcleo y se sintetizan en el citosol las proteínas ribosómicas. Las subunidades ribosómicas resultantes salen del nucléolo de vuelta al citosol.

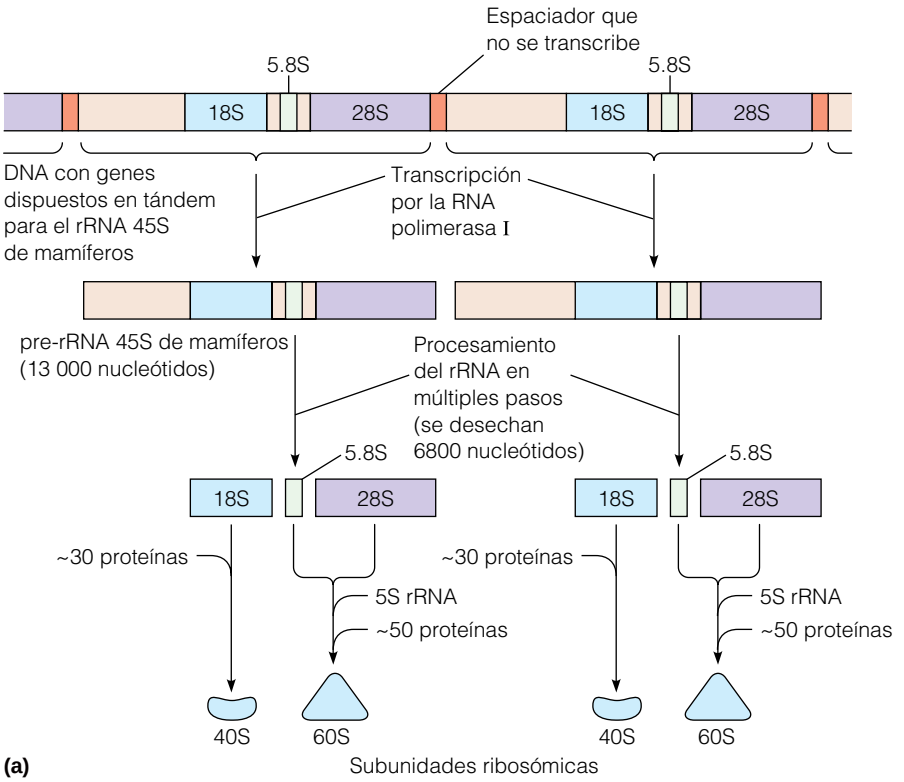
La transcripción de copias en tándem del pre-rRNA 45S puede verse de manera muy vistosa con el microscopio electrónico (Figura 28.20b). La estructura de la cromatina nucleolar ha sido objeto de una cierta controversia, pero parece muy probable que no haya nucleosomas, al menos en las regiones transcritas. Esta ausencia de nucleosomas puede ser una modificación específica de la cromatina para permitir la transcripción rápida y continua de estos genes.

En algunos eucariotas inferiores, como el protozoo *Tetrahymena*, el rRNA 28S contiene un intrón cerca de su extremo 3′. La escisión de este intrón y el empalme del RNA se realizan mediante un proceso peculiar en el que el *propio* RNA actúa como catalizador, a través de la serie de reacciones que se describen en el Capítulo 11 (véase en particular la Figura 11.30). En los eucariotas superiores, poco es lo que se sabe por el momento sobre el mecanismo de procesamiento del rRNA, el ensamblaje de los ribosomas o la coordinación de la síntesis de las proteínas ribosómicas y del RNA ribosómico.

FIGURA **28.20**

Transcripción y procesamiento de los RNA ribosómicos principales en los eucariotas. Los genes se encuentran en copias en tándem, separados por espaciadores que no se transcriben. **(a)** Los transcritos 45S producidos inicialmente se procesan mediante la eliminación de las porciones que se indican de color marrón, para dar los productos 18S, 5.8S y 28S. A continuación, se ensamblan en subunidades ribosómicas, mediante la adición de proteínas. **(b)** Fotografía de microscopia electrónica del rRNA nucleolar extendido mientras se realiza la transcripción. Los genes dispuestos en tándem se transcriben de abajo a arriba.

(b) Cortesía de O. L. Miller, Jr. y B. Beaty.



(a)



(b)

RNA POLIMERASA III: TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES PEQUEÑOS DE RNA

La RNA polimerasa III (pol III) es la mayor y más compleja de las RNA polimerasas de los eucariotas. Tiene 14 subunidades, con un total de 700 000 dalton. Todos los genes que transcribe comparten determinadas características. Son pequeños, no se traducen a proteínas y tienen como característica peculiar que su transcripción está regulada por determinadas secuencias que se encuentran *dentro* de la región transcrita. Los principales objetivos de la pol III son los genes de todos los tRNA y los del RNA ribosómico 5S. Al igual que los genes ribosómicos principales, que se han descrito en el apartado anterior, estos genes pequeños están presentes en múltiples copias, aunque generalmente no se agrupan en disposiciones en tándem, ni se localizan en una región concreta del núcleo. Lo habitual es que estén diseminados por todo el genoma y por diversas partes del núcleo.

De todos los genes transcritos por la pol III, los que se han estudiado con mayor detalle son los del RNA ribosómico 5S. Los experimentos in vitro han demostrado que son necesarios al menos tres factores proteicos además de la polimerasa III para la expresión de los genes del rRNA 5S. Dos de estos factores de transcripción (TFIIIB y TFIIIC) parecen participar también en la transcripción de los genes de los tRNA, pero uno, denominado TFIIIA, es específico de los genes 5S. La interacción de los tres factores de transcripción, la polimerasa y el gen se muestra en la Figura 28.21. La molécula de TFIIIA contacta con el DNA sobre una longitud de unos 40 pb. El reconocimiento de la secuencia se produce en dos bloques de unos 12 pb cada uno, en ambos lados de la región de contacto, lo cual de alguna manera hace al gen accesible al TFIIIB, TFIIIC y la polimerasa III. El TFIIIA también puede formar un complejo con el RNA 5S. Esta tendencia limita la producción de RNA 5S cuando hay un exceso de producto, al eliminar el TFIIIA de su disponibilidad para unirse al DNA.

El TFIIIA es un ejemplo de un tipo abundante de proteínas de unión al DNA, en la que unos *dedos de zinc* de unión de metales contactan con la secuencia de DNA y la identifican (Figura 28.22). En la actualidad se conocen muchas proteínas con dedos de zinc, y se han estudiado las estructuras cristalinas de algunos de sus complejos con el DNA. Los dedos encajan en los surcos principales del DNA, al igual que las hélices en las proteínas de hélice-vuelta-hélice y las de cremallera de leucina (Figura 28.23; véase también el Capítulo 26).

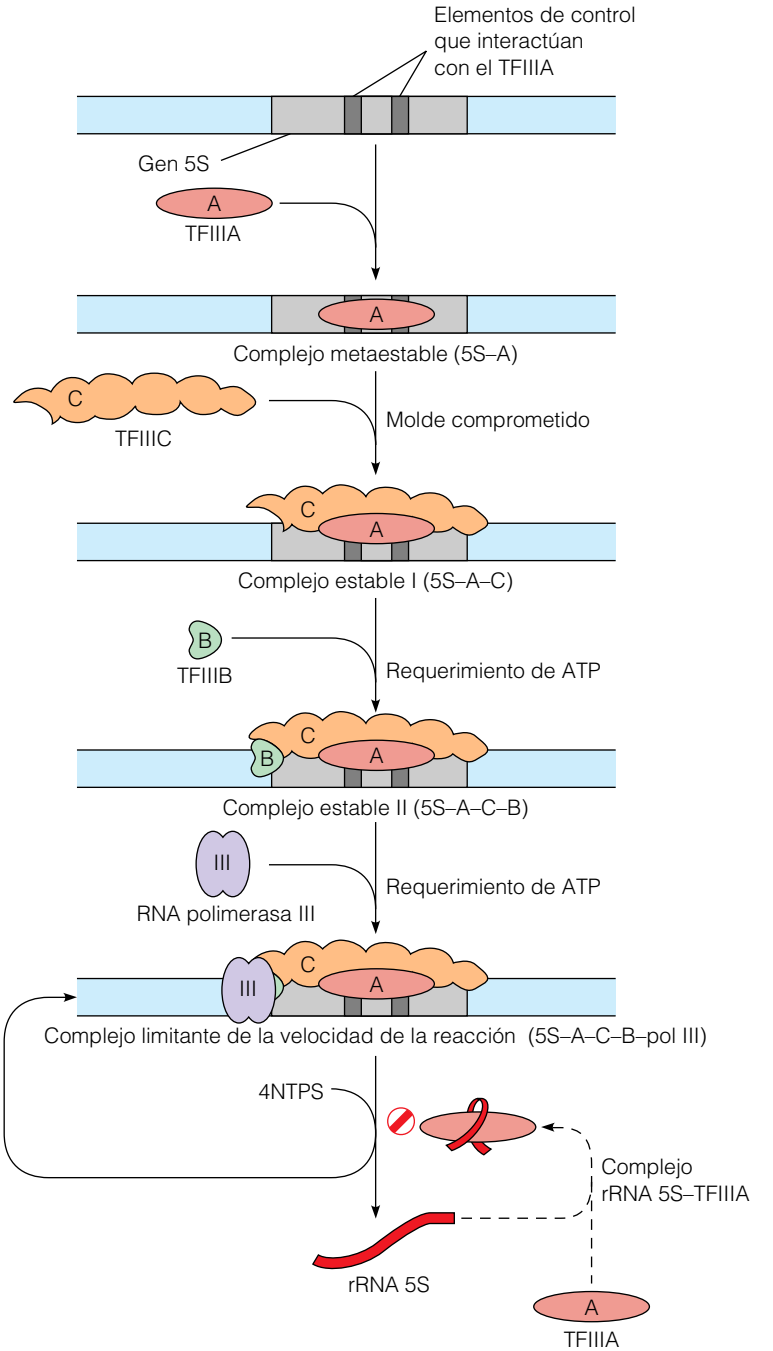
Mientras que el TFIIIA es un monómero y el TFIIIB es un dímero, el TFIIIC es un complejo enorme, formado por seis cadenas polipeptídicas y que cubre todo el gen del rRNA 5S o del tRNA. No está claro de qué modo la polimerasa consigue transcribir repetidamente a través de este complejo proteico. No obstante, una vez fijada la pol III, puede producir múltiples transcritos antes de disociarse.

En secciones posteriores, encontraremos diversos factores de transcripción para el control de la expresión de los genes eucariotas que son por completo dependientes de la interacción específica de lugar con el DNA. Un factor de transcripción característico contiene un dominio de unión al DNA y uno o más dominios reguladores, que pueden interaccionar con otras proteínas nucleares para conducir las señales reguladoras.

Además de las proteínas con dedos de zinc, se conocen otras dos clases fundamentales de factores de transcripción, que se dibujan de forma esquemática en la Figura 28.23b y c. En las proteínas hélice-vuelta-hélice, una hélice α (denominada hélice de reconocimiento) descansa en el surco principal del DNA, estableciendo sus cadenas laterales contactos específicos con las bases del DNA.

FIGURA **28.21**

Preparación de un gen de rRNA 5S para la transcripción. Al menos los tres factores proteicos que se muestran junto con la RNA polimerasa III, deben ensamblarse en el gen antes de que pueda producirse la transcripción. El TFIIIA debe unirse al gen antes de que puedan unirse los factores TFIIIC y TFIIIB. Una vez formado el complejo II estable, se reciclará con pol III para producir muchas copias de RNA. Un exceso de rRNA 5S formará un complejo con el TFIIIA, inhibiendo la ulterior transcripción.



Una clase bastante diferente de proteínas de unión al DNA son las denominadas proteínas con cremalleras de leucina, que son dímeros, unidos en una estructura de ovillo enrollado mediante interacciones hidrófobas. Exhiben de forma característica un patrón regular (periodicidad de 7 pliegues) de leucina o de otros residuos hidrófobos en las regiones de cola helicoidales, lo cual favorece las interacciones hidrófobas lado con lado. Las regiones N-terminal son hélices de reconocimiento que descansan en surcos principales adyacentes. La característica distintiva de las proteínas con cremallera de leucina es que pueden formar dímeros homólogos o heterólogos, permitiendo así muchos apareamientos combinatorios entre los factores de transcripción.

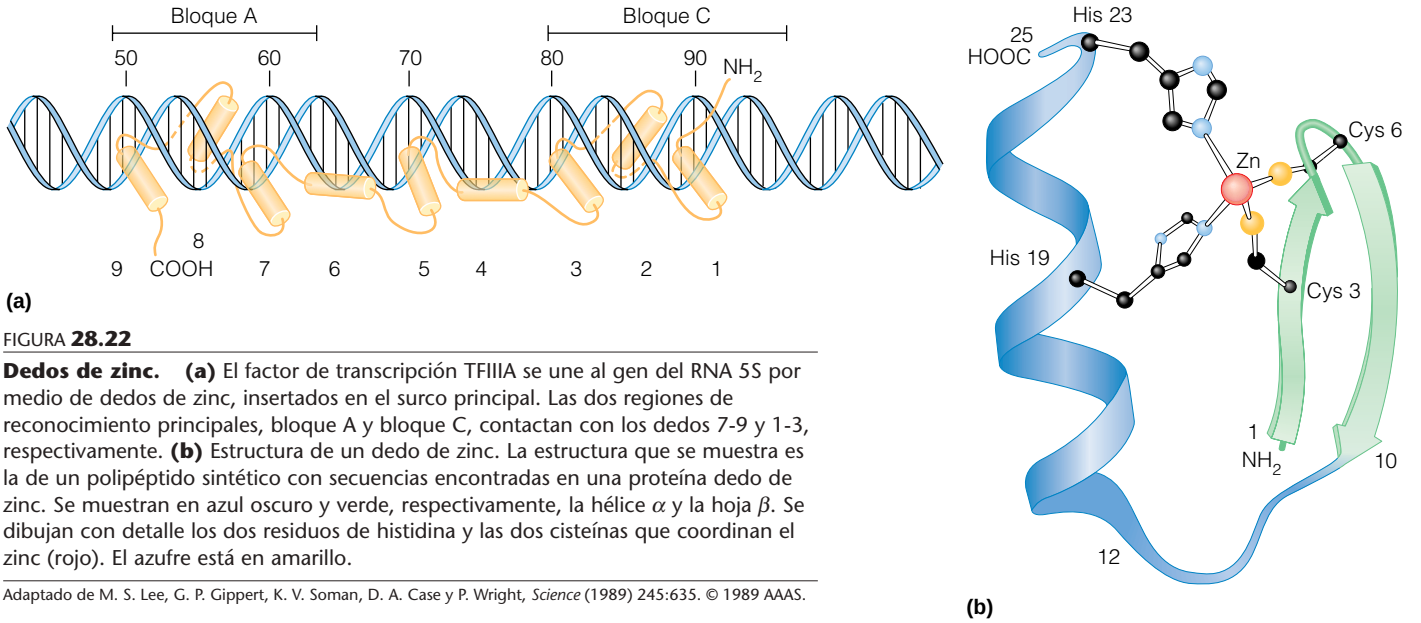


FIGURA **28.22**

Dedos de zinc. **(a)** El factor de transcripción TFIIIA se une al gen del RNA 5S por medio de dedos de zinc, insertados en el surco principal. Las dos regiones de reconocimiento principales, bloque A y bloque C, contactan con los dedos 7-9 y 1-3, respectivamente. **(b)** Estructura de un dedo de zinc. La estructura que se muestra es la de un polipéptido sintético con secuencias encontradas en una proteína dedo de zinc. Se muestran en azul oscuro y verde, respectivamente, la hélice α y la hoja β. Se dibujan con detalle los dos residuos de histidina y las dos cisteínas que coordinan el zinc (rojo). El azufre está en amarillo.

Adaptado de M. S. Lee, G. P. Gippert, K. V. Soman, D. A. Case y P. Wright, *Science* (1989) 245:635. © 1989 AAAS.

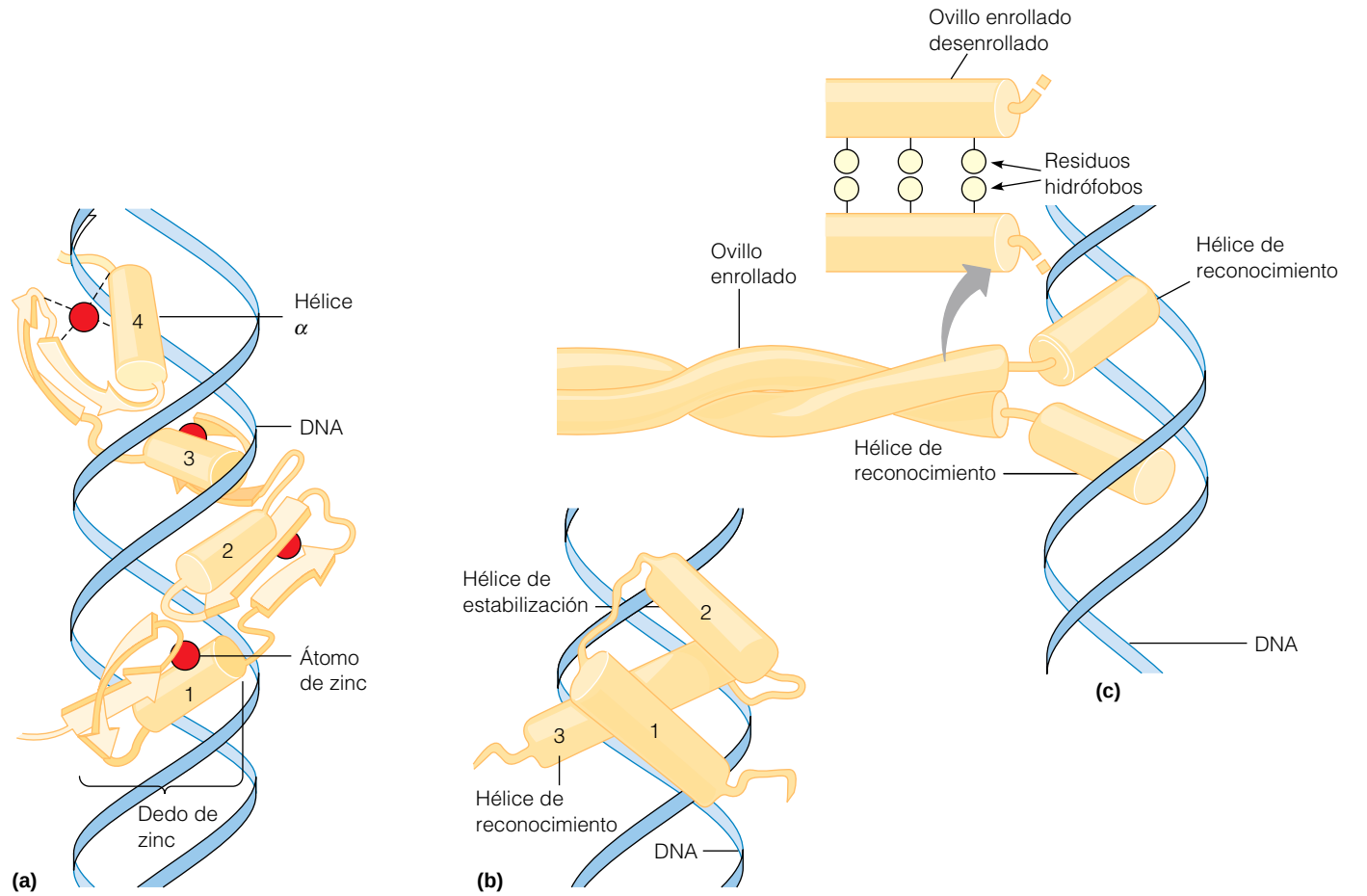


FIGURA **28.23**

Estructuras de los tres tipos comunes de motivos de unión al DNA de los factores de transcripción eucariotas. **(a)** Motivo dedo de zinc, en el que se observa la forma en que los dedos se acoplan a lo largo del surco principal. **(b)** Motivo hélice-vuelta-hélice. Obsérvese que la hélice-vuelta-hélice se adapta al surco principal del DNA de una forma semejante a la de un dedo de zinc. **(c)** Proteína con cremallera de leucina. Los ovillos enrollados se mantienen unidos mediante residuos de leucina con interdigitación. En sus extremos, presentan un par de hélices de reconocimiento para los surcos principales del DNA.

RNA POLIMERASA II: TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES ESTRUCTURALES

Todos los genes estructurales (los que codifican productos proteicos) de la célula eucariota se transcriben por la polimerasa II. Esta enzima transcribe también algunos de los RNA nucleares pequeños que intervienen en el proceso de corte y empalme (véase la página 1236). Al igual que otras RNA polimerasas, la pol II es una enzima compleja con múltiples subunidades. Sin embargo, ni siquiera sus 12 subunidades son suficientes para permitir que la pol II inicie la transcripción en un promotor eucariota. Para formar el complejo mínimo capaz de producir la iniciación, se necesitan al menos cinco factores proteicos adicionales, como se muestra en la Figura 28.24 y se enumera en la Tabla 28.4. No se conoce con certeza el orden de adición, pero comienza, en el ejemplo que se muestra, con la unión a la *caja TATA*, la señal de iniciación más habitual (de-

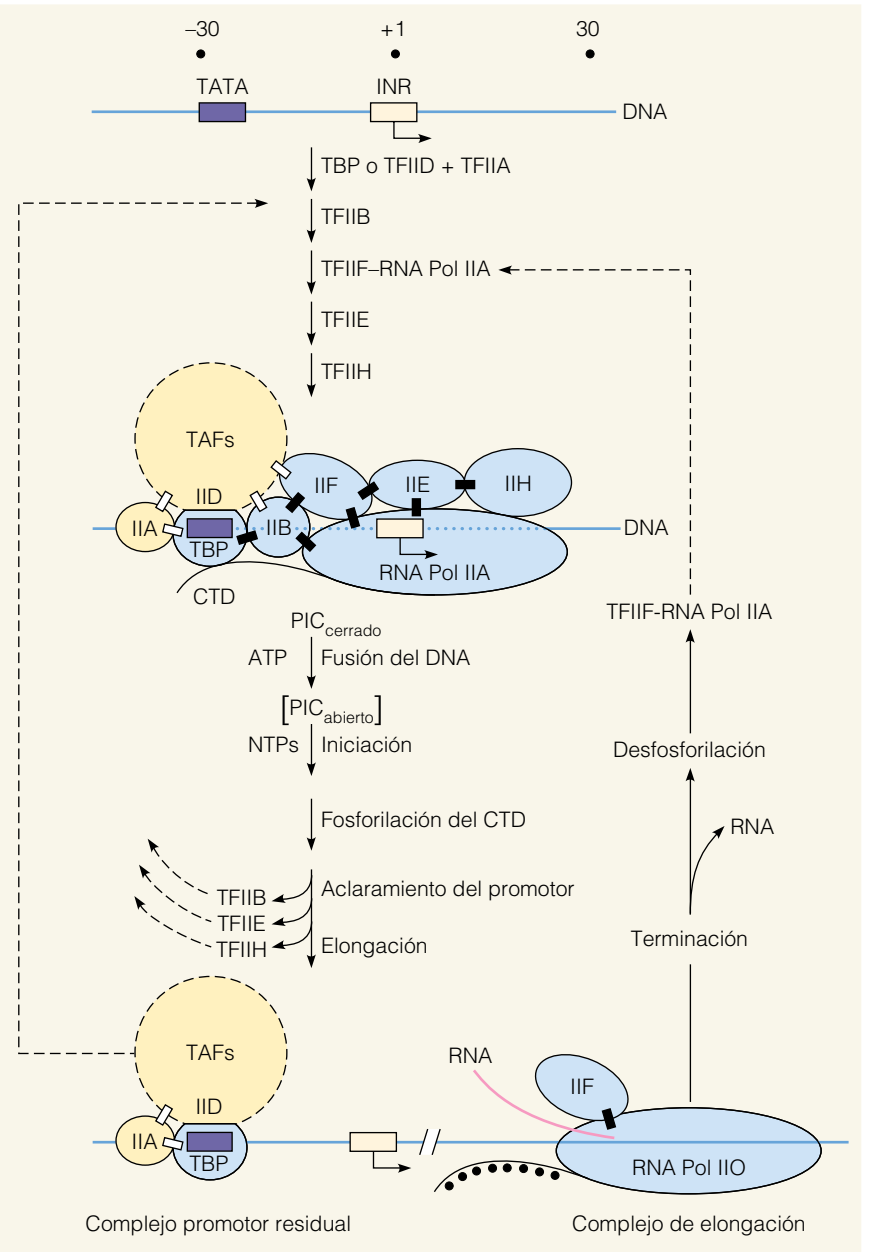


FIGURA **28.24**

Modelo de la formación del complejo mínimo de preiniciación (PIC) para la pol II sobre un promotor TATA. En la situación más sencilla, inicia la secuencia la unión de la proteína de unión a TATA (TBP). Alternativamente, in vivo se utiliza TFIID que incluye tanto la TBP como los factores asociados (TAF). Esto dará lugar a la unión del TFIIA. La serie de puntos indica la fosforilación del dominio C-terminal (CTD) de la pol II. La fosforilación es necesaria para la liberación de la enzima del lugar de iniciación.

Cortesía de R. G. Roeder, *Trends Biochem. Sci.* (1996) 21:327-335. © 1996 con permiso de Elsevier Science.

TABLA 28.4 Factores generales de iniciación de la transcripción de las células humanas[a,b]

Factor	Número de Subunidades	Peso molecular (kDa)	Función
TFIID — TBP	1	38	Reconocimiento del centro del promotor (TATA); reclutamiento de TFIIB
TFIID — TAFs	12	15–250	Reconocimiento del centro del promotor (elementos no-TATA); funciones reguladoras positivas y negativas
TFIIA	3	12, 19, 35	Estabilización de la unión de TBP; estabilización de las interacciones TAF-DNA; funciones antirrepresoras
TFIIB	1	35	Reclutamiento de RNA pol II-TFIIF; selección del lugar de comienzo por la RNA pol II
TFIIF	2	30, 74	Direccionamiento de la pol II al promotor; desestabilización de las interacciones inespecíficas RNA pol II-DNA
RNA pol II	12	10–220	Funciones catalíticas en la síntesis de RNA; reclutamiento de TFIIE
TFIIE	2	34, 57	Reclutamiento de TFIIH; modulación de las actividades helicasa, ATPasa y quinasa de TFIIH; potenciación directa de la fusión del promotor (?)
TFIIH	9	35–89	Fusión del promotor utilizando la actividad helicasa; depuración del promotor (?) por la actividad CTD quinasa

[a] La composición de subunidades y los tamaños de los polipéptidos son los descritos para los factores humanos, pero se han identificado en la rata, *Drosophila* y levaduras homólogas de casi todos.

[b] Abreviaturas utilizadas: CTD, dominio carboxi-terminal de la pol II; RNA pol II, RNA polimerasa II; TAF, factores asociados a las proteínas de unión a TATA; TBP, proteína de unión a TATA.

Fuente: Tomado de R. G. Roeder, *Trends Biochem. Sci.* (1996) 21:327-335. © 1996 con permiso de Elsevier Science.

nominada por una secuencia común), que se encuentra aproximadamente 20 ó 30 pb por encima del lugar de comienzo. El propio lugar de comienzo implica una región con abundantes pirimidinas, denominada *Inr*. Obsérvese que la unidad *mínima* implica a la proteína de unión a TATA (TBP), mientras que in vivo la formación del complejo probablemente utiliza siempre el TFIID, una estructura con múltiples subunidades que incorpora la proteína de unión a TATA y los *factores asociados de unión a TATA* (TAF). Los TAF interaccionan con *factores de activación* asociados con lugares hacia arriba en los genes específicos, proporcionando por ello comunicación para la regulación de los genes. Se ha deducido recientemente a partir de estudios de difracción y de modelado la estructura del complejo que contiene el lugar TATA, TBP, TFIIB y TFIIA. Una característica notable que emerge es el pliegue pronunciado inducido en el DNA alrededor del lugar TATA (Figura 28.25).

Una secuencia de DNA que una un factor de transcripción se denomina *elemento de control*. La función del elemento de control de la TATA parece ser la de fijar el punto de comienzo de la transcripción. Pero los promotores de la Pol II eucariota contienen elementos de control mucho más complejos y diversos, algunos de los cuales se indican en la Tabla 28.5. Recuérdese que la pol II transcribe genes estructurales: los genes de las proteínas. Dado que la transcripción de estos genes debe tener una especificidad tisular y una especificidad de desarrollo, requiere un alto grado de regulación. En algunos casos, la transcripción debe responder también a moléculas de señal especiales como las hormonas. Es frecuente observar, por encima de la caja TATA, secuencias promotoras que unen diversos *factores que actúan en trans*. Éstos son proteínas sintetizadas en otros genes que potencian o reprimen la transcripción del gen en cuestión. En la Figura 28.26 se muestran algunos ejemplos de organizaciones del promotor características. Los elementos de control que se muestran son los elementos generales citados en la Tabla 28.5.

A menudo, la unión de los factores que actúan en *trans* a secuencias muy alejadas del propio promotor, hasta varios kilopares de bases puede influir en la transcripción. Estas secuencias se denominan **potenciadoras**, y su modo de ac-

La transcripción puede modificarse mediante la unión de factores que actúan en *trans*, ya sea en el promotor, ya sea en los potenciadores situados a distancia.

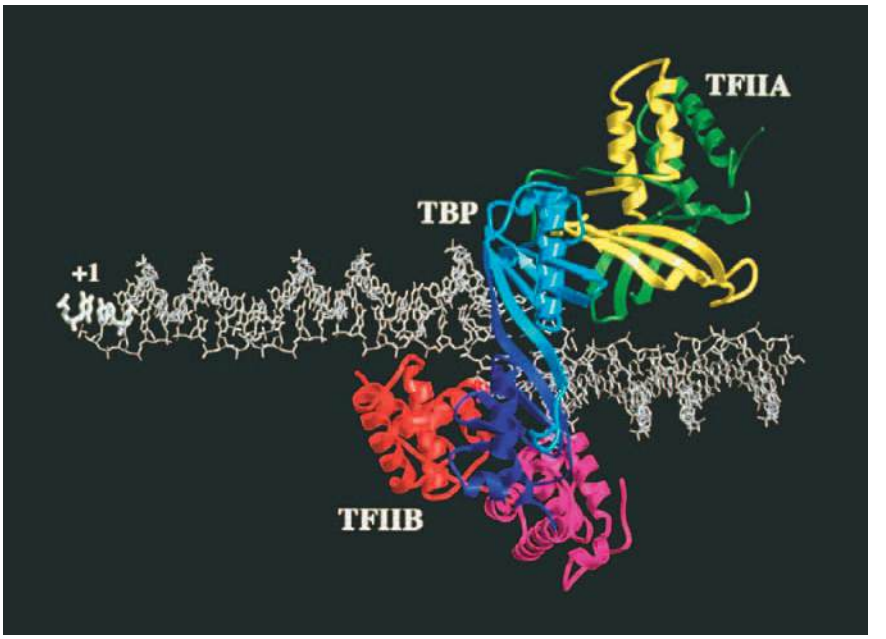


FIGURA **28.25**

Modelo del complejo promotor TFIIA-TBP-TFIIB ensamblado mediante ordenador de acuerdo con las estructuras cristalinas de los complejos TBP-TFIIB-TATA y TFIIA-TBP-TATA. Los dominios repetidos amino y carboxilo terminales de la TBP se muestran en azul y morado, respectivamente; los dominios repetidos amino y carboxilo terminales del TFIIB central se muestran en rojo y magenta, respectivamente; y porciones de las subunidades grande y pequeña de la TFIIA de levaduras se muestran en verde y amarillo, respectivamente. El lugar de comienzo de la transcripción (+1) se indica en blanco. La proyección del complejo es desde la parte superior, mostrando la TBP descansando a caballo del elemento TATA distorsionado y adyacentes, pero desplazados lateralmente, segmentos de DNA hacia arriba y hacia abajo (en forma B estándar) que se extienden, respectivamente, hacia la izquierda y por debajo del plano de la figura y hacia la derecha y por debajo del plano de la figura.

Tomado de S. K. Burley, *Trends Biochem. Sci.* (1996) 21:327, fig. 2, con permiso de Elsevier Science.

ción parece implicar la formación de bucles de DNA, tal vez a través de la acción de los nucleosomas, lo que puede hacer que las proteínas unidas al potenciador entren en contacto directo con las proteínas unidas al promotor. Algunos de los factores de transcripción que se muestran en la Tabla 28.5 pueden unirse tanto a las regiones promotoras como a las potenciadoras. Actualmente está claro que las proteínas TAF, que se muestran en la Figura 28.24, pueden actuar como intermediarias entre el activador o el represor unidos al potenciador y al complejo de transcripción central (véase la Figura 28.27).

Los factores que actúan en *trans* tienden a ser de un número de clases reducido, cada una de ellas definida por el tipo de dominio estructural que interacciona con el DNA. En la Figura 28.23 se presentan esquemas de tres de los tipos mejor conocidos.

ESTRUCTURA DE LA CROMATINA Y TRANSCRIPCIÓN

La interrelación compleja de los factores de transcripción y las polimerasas que hemos descrito se produce no sólo en el DNA desnudo, sino también en la cromatina. La estructura de la cromatina plantea dos problemas importantes:

TABLA **28.5 Algunos elementos importantes de control de la pol II y sus correspondientes factores de transcripción**

Nombre de la secuencia	Secuencia de consenso	Factor(es) de transcripción	Comentario
Algunos elementos promotores y potenciadores generales			
Caja TATA	TATAAAA	TBP, TFIID	Éste es el elemento promotor central más común
Caja CAAT	GGCCAATCT	CP1	Elemento común hacia arriba
Caja GC	GGGCGG	SP1	Se encuentra a menudo en los promotores sin TATA
Octámero	ATTTGCAT	Oct1, Oct2	Oct1 y Oct2 contienen dominios homeo
Algunos elementos promotores y potenciadores especiales			
HSE	CNNGAANNTCCNNG	Factor del choque térmico	Interviene en la respuesta al choque térmico
GRE	TGGTACAAATGTTCT	Receptor de glucocorticoides	Une proteínas a las hormonas glucocorticoides
TRE	CAGGGACGTGACCGCA	Receptor tiroideo	Une proteínas a las hormonas tiroideas

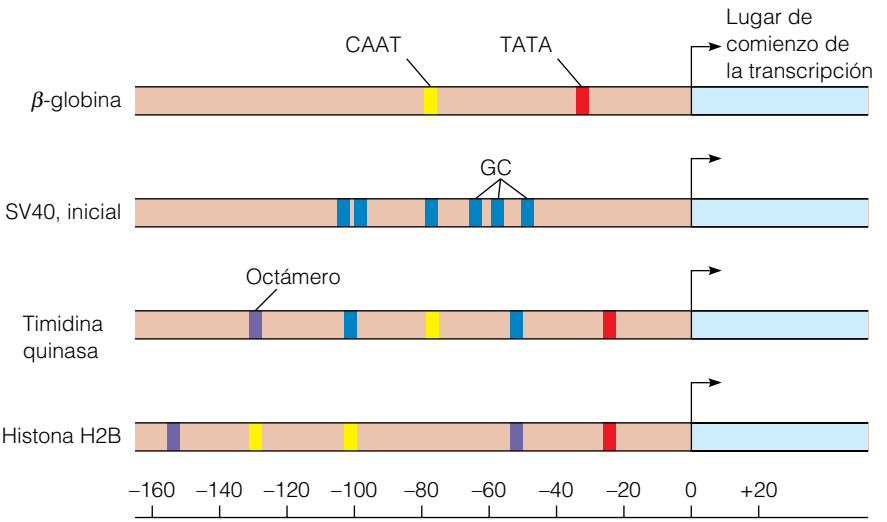


FIGURA **28.26**

Estructuras de algunos promotores eucariotas característicos. Las cajas de color indican diferentes elementos reguladores: TATA = rojo, GC = azul, CAAT = amarillo y octámero = morado.

Adaptado en parte de B. Lewin, *Genes IV* (Oxford: Oxford University Press, 1990).

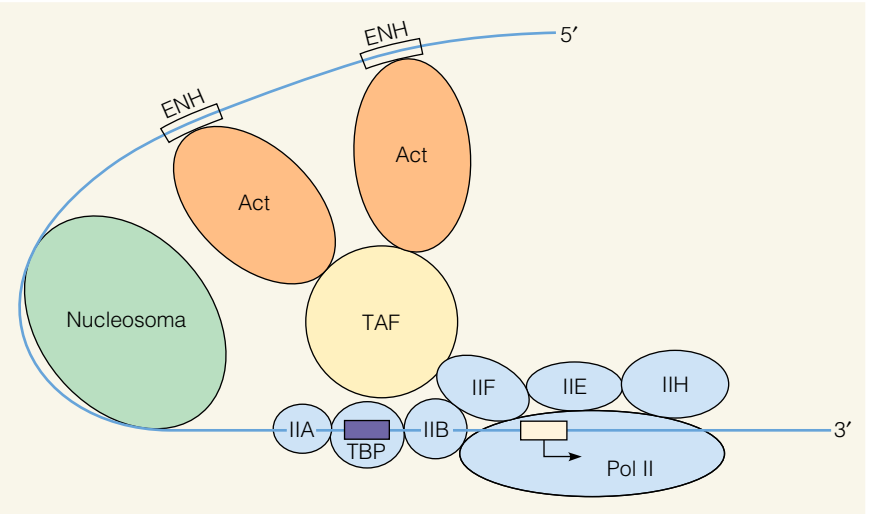


FIGURA **28.27**

Representación esquemática de cómo los bucles de DNA (quizás a través de los nucleosomas) pueden poner a las proteínas activadoras (o represoras) unidas al potenciador en contacto con las TAF asociadas con el complejo central.

(1) ¿Cómo pueden unirse los factores de transcripción y el complejo de iniciación al DNA en presencia de los nucleosomas? (2) ¿Cómo puede pasar la polimerasa que realiza una transcripción activa a través de una formación de nucleosomas? Todo esto ha sido un área de gran interés investigador. Presentaremos los puntos de vista actuales respecto al primer problema con algunos ejemplos, y comentaremos luego brevemente el segundo problema.

El problema de la iniciación

Consideremos, a título de ejemplo, los genes de la β-globina humana, que se han descrito en el Capítulo 7. Aunque se encuentran en todas las células humanas, estos genes se expresan *solamente* en las células eritroides y en una secuencia del desarrollo fija. En las células embrionarias que no han iniciado aún la síntesis de ninguna globina, la cromatina de la agrupación de genes de la β-globina tiene un aspecto muy similar al de cualquier otra célula del embrión y está densamente cubierta por nucleosomas. Pero cuando la diferenciación de estas células las compromete en la síntesis de globina, todo el dominio de la β-globina sufre cambios en la estructura de la cromatina. Uno de los cambios es la aparición de *lugares hipersensibles*, que son regiones especialmente vulnerables a la digestión

Los lugares hipersensibles a la nucleasa alteran la cromatina para permitir la iniciación.

producida por las nucleasas. En las fases iniciales del desarrollo de los embriones humanos, estos lugares aparecen en las regiones de flanqueo 5′ de los genes embrionarios, que son los primeros en transcribirse. Posteriormente, los lugares hipersensibles se desplazan a los flancos 5′ de los genes del adulto. Actualmente está claro que muchos de estos lugares corresponden a regiones de una longitud de unas pocas decenas o centenas de pares de bases en las que se han eliminado o "remodelado" los nucleosomas para hacer más accesible el DNA contenido aquí. Proporcionan puntos en los que pueden acceder a los promotores y potenciadores los factores de transcripción y otras proteínas que actúan en *trans*, lo cual permite la iniciación y estimulación de la transcripción.

¿Cómo se establecen los lugares hipersensibles en los genes que antes no respondían? En algunos casos, entre ellos el de los genes de la globina, parece que la estructura de la cromatina se reordena en el momento de la replicación. En otros casos, hay factores proteicos que parecen ser capaces de interferir en la estructura de la cromatina en loci específicos, abriendo lugares hipersensibles.

Se encuentran ejemplos especialmente interesantes de este tipo en la regulación hormonal de la transcripción. Un caso bien estudiado es el de los genes de las proteínas de la clara de huevo de gallina, ovoalbúmina, ovomucoide y lisozima. La transcripción de estos genes se produce tan sólo en las células tubulares del oviducto de la gallina. Incluso en los animales inmaduros, el dominio genómico que contiene el gen de la ovoalbúmina parece tener una estructura de la cromatina algo diferente en estas células del oviducto en comparación con las de otros tejidos. Pero tan sólo con la estimulación por parte de la hormona sexual estrógeno (al llegar a la maduración sexual del animal o tras la administración de la hormona) comienza la transcripción de los genes de la ovoalbúmina. En presencia de estrógenos se abren lugares hipersensibles específicos en el lado 5′ de algunos de los genes de las proteínas de la clara de huevo. Al retirar la hormona administrada a un animal inmaduro, se produce una pérdida de los lugares hipersensibles y un cese inmediato de la transcripción de los genes.

Existen otros muchos ejemplos de control hormonal de la transcripción. En todos los casos, las células diana contienen proteínas específicas que son *receptores hormonales*. Cuando estas proteínas unen la hormona, pasan a ser capaces de interactuar con lugares específicos del DNA o con proteínas reguladoras no histonas unidas a esos lugares. Así pues, puede realizarse una regulación tanto positiva como negativa. En algunos casos, el receptor hormonal actúa como factor regulador positivo, por ejemplo, uniéndose a un elemento potenciador. En otros casos, el receptor hormonal puede interaccionar con una proteína represora para aumentar o aliviar la represión. Algunos datos recientes sugieren que este último modelo puede describir la respuesta de las células del oviducto de la gallina a los estrógenos.

Remodelado de la cromatina

¿Cómo se generan los lugares hipersensibles? y ¿cómo se altera la estructura de la cromatina para hacer accesible el DNA? Sólo recientemente han empezado a encajar las piezas para responder a estas preguntas. En primer lugar, ha estado el descubrimiento, primero en levaduras y posteriormente en los eucariotas superiores, de los **factores de remodelado de la cromatina,** que son proteínas que hacen posible a las regiones promotoras aceptar la maquinaria compleja y abultada que se representa en la Figura 28.24. El complejo SWI/SNF de las levaduras y el complejo NURF de *Drosophila* son probablemente los mejor estudiados; de forma significativa, ambos requieren la hidrólisis de ATP para realizar su tarea. No está claro qué es lo que hacen exactamente esos factores. Parece que no eliminan los nucleosomas sino que, de alguna forma, los "abren".

Otro papel quizás de igual importancia es el que desempeñan las acetiltransferasas y desacetilasas de las histonas. Se sabe desde hace tiempo que las histonas del centro del nucleosoma se acetilan en residuos específicos de lisina en las colas N-terminales (véase la Figura 28.28). Además, se han relacionado los niveles elevados de acetilación con una actividad transcripcional elevada y viceversa. Lo que es nuevo es el descubrimiento de que varias proteínas reclutadas hacia el complejo de iniciación por activadores y las TAF (y algunas de estas mismas proteínas) tienen actividad de acetilación de histonas. Actualmente, se piensa que la acetilación de las histonas en los nucleosomas del promotor contribuye al debilitamiento de la estructura de la cromatina en estas regiones. El hecho de que en este proceso participen factores de transcripción específicos puede proporcionar la explicación buscada desde hace tiempo de cómo puede marcarse para su ruptura la cromatina de genes *específicos*.

Elongación de la transcripción

La formación del complejo de preiniciación (Figura 28.24) va seguida, en presencia de ribonucleósidos trifosfato y ATP, por la fusión de una región corta y por la iniciación de la transcripción. La cola C-terminal de la pol II se fosforila intensamente en este punto y comienza la transcripción con una actividad helicasa limpiando el camino.

Se liberan varios de los factores de transcripción centrales y la pol II, junto con el TFIIF, se desplaza a lo largo del DNA. En el lugar de comienzo y preparado para iniciar otra ronda, queda un complejo residual que contiene TBP, TFIIA, TAF y probablemente proteínas activadoras.

En este punto, la polimerasa adquiere también varios *factores de elongación* especiales. Algunos de ellos parecen colaborar con la enzima para atravesar los *lugares de pausa* en el DNA. En los experimentos in vitro que emplean pol II desnuda, la transcripción es relativamente lenta y se interrumpe por pausas frecuentes, especialmente en las regiones con abundante T. El fenómeno parece, en general, ser semejante al descrito en el Capítulo 26 para la transcripción en procariotas. La presencia de factores de elongación ayuda a la enzima a atravesar esos lugares. Los nucleosomas forman obstáculos aún más importantes para la progresión de una polimerasa II a lo largo del DNA. Aunque algunas polimerasas procariotas pueden pasar a través de disposiciones de nucleosomas en estudios in vitro, la pol II queda totalmente bloqueada a no ser que estén presentes proteínas accesorias, entre las que se encuentran los factores de remodelado de los nucleosomas y un factor de elongación específico denominado FACT.

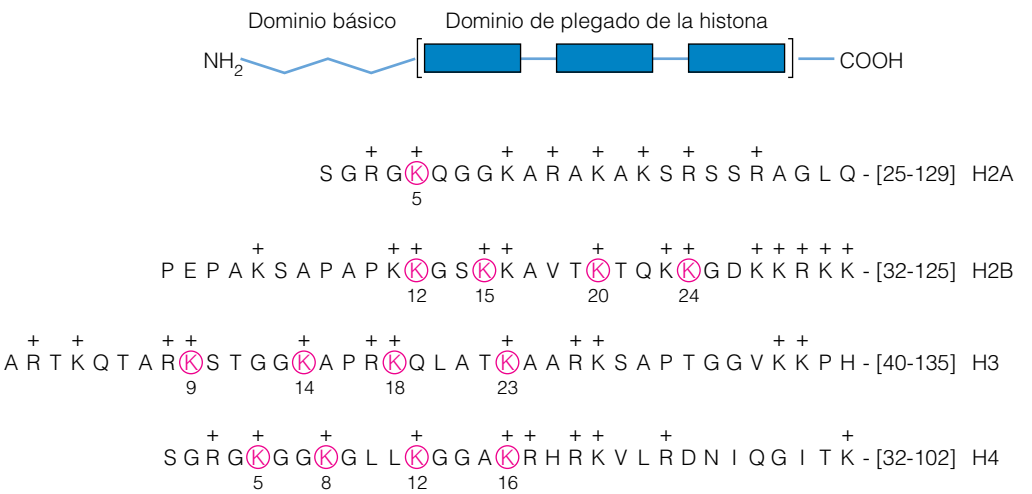


FIGURA **28.28**

Acetilación de las histonas centrales. La estructura general de cada una de las cuatro histonas centrales comporta un dominio helicoidal "plegado de histona" más un dominio desestructurado N-terminal muy básico. La acetilación en los núcleos se produce exclusivamente en los dominios N-terminal, en los lugares muy conservados que se indican en rojo.

Adaptado de J. C. Hansen, C. Tse y A. P. Wolffe, *Biochemistry* (1997) 37:17637-17641. © 1997 American Chemical Society.

La pol II puede transcribir a través de las formaciones de nucleosomas.

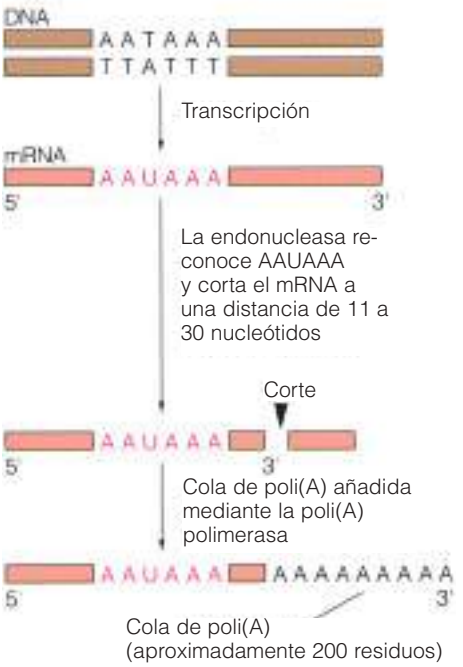


FIGURA **28.29**

Terminación de la transcripción en los eucariotas: adición de colas de poli(A). Hay una secuencia AATAAA cerca del extremo 3′ de la mayor parte de los genes eucariotas. Cuando se transcribe a AAUAAA, proporciona una señal para la ruptura mediante la endonucleasa y la adición de una cola de poli(A).

Es aún un misterio la forma en que la pol II transcribe a través de los nucleosomas. ¿Se despliegan y vuelven a plegar los nucleosomas al pasar la polimerasa? ¿Se desplazan temporalmente? Los datos de que se dispone están a favor de un desplazamiento temporal, pero el tema está lejos de su asentamiento. Un factor que puede participar en ese desplazamiento es la formación de una torsión superhelicoidal positiva más allá de la polimerasa que se desplaza. Una polimerasa que se desplaza a lo largo de un molde helicoidal debe girar continuamente sobre el DNA o formar superenrollamientos positivos más adelante para compensar el desenrollamiento que se está produciendo. Esa torsión tendería a desestabilizar a los nucleosomas ya que contienen DNA enrollado negativamente.

TERMINACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

También la terminación de la transcripción del mRNA es diferente en los eucariotas. Mientras que la RNA polimerasa de los procariotas identifica las señales de terminación, que a veces actúan con la ayuda de la proteína ρ, la polimerasa II eucariota suele continuar transcribiendo más allá del final del gen. Al hacerlo, pasa a través de una o varias señales AATAAA, que se encuentran después del extremo 3′ de la región de codificación (Figura 28.29). El pre-mRNA, que transporta esta señal en forma de AAUAAA, se rompe entonces por una endonucleasa especial, que reconoce la señal y corta en un lugar situado entre 11 y 30 residuos hacia el lado 3′ de la misma. En este punto, se añade una cola de ácido polirribonucleico poli(A), de hasta 200 bases de longitud, mediante una polimerasa especial que no está dirigida por el molde. La función de las colas de poli(A) de los mRNA eucariotas no se conoce. Sabemos que no puede ser esencial para todos los mensajes, ya que algunos mRNA (por ejemplo, la mayoría de los mRNA de las histonas de los eucariotas superiores) no la tienen. Sin embargo, puede estar relacionada con la estabilidad del mensaje, ya que los mensajes que no tienen cola de forma característica poseen vidas mucho menores en el núcleo.

Procesamiento del RNA mensajero eucariota

Existen diferencias significativas en las formas en que se producen y procesan los RNA mensajeros de los genes que codifican las proteínas en las células procariotas y eucariotas. Recuérdese que los mRNA procariotas se sintetizan en el nucleoide bacteriano en contacto directo con el citosol y están disponibles *inmediatamente* para la traducción. Una secuencia de nucleótidos específica en el extremo 5′ reconoce un lugar del RNA ribosómico procariota, permitiendo la unión del ribosoma y la iniciación de la traducción, a menudo incluso antes de que se haya completado la transcripción del mensaje.

En los eucariotas, el mRNA se produce en el núcleo y debe exportarse al citosol para la traducción. Además, el producto inicial de la transcripción (*pre-mRNA*) incluye todos los intrones y muchas regiones de flanqueo; los intrones deben eliminarse antes de que pueda producirse una traducción correcta. Por último, no hay una secuencia de fijación ribosómica como la secuencia Shine-Dalgarno de los procariotas. Por todas estas razones, el mRNA eucariota requiere un procesamiento importante antes de que pueda utilizarse como molde proteico. Este procesamiento se produce mientras el mRNA está todavía en el núcleo.

El procesamiento del mRNA eucariota comporta la formación de la caperuza, el corte y empalme, y la edición.

FORMACIÓN DE LA CAPERUZA

La primera modificación se produce en el extremo 5′ del pre-mRNA. Se añade un residuo de GTP en una orientación *inversa*. Junto con los dos primeros nucleótidos de la cadena, este residuo forma lo que se denomina una *caperuza* (Figura 28.30). La caperuza se completa posteriormente mediante la adición de

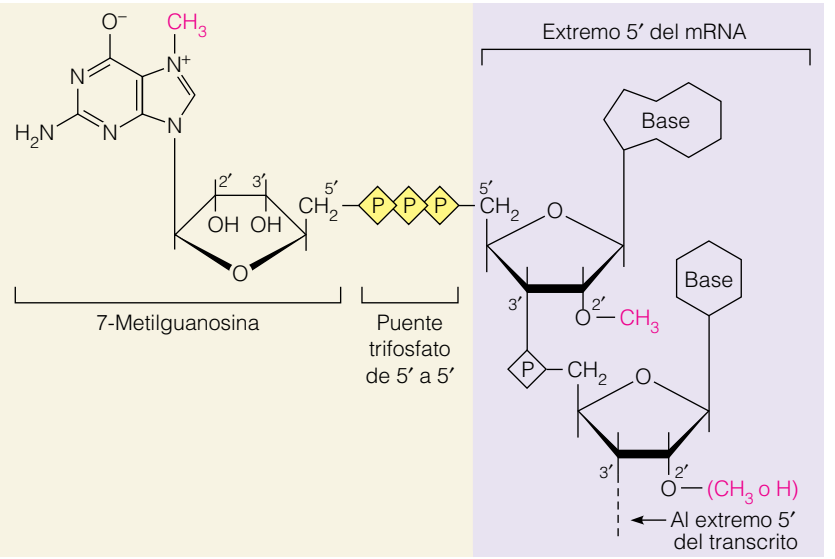


FIGURA **28.30**

Estructura global de un mensaje eucariota totalmente procesado, incluyendo el lugar de la caperuza. Se muestra la estructura detallada de la región 5′ de la caperuza. Los grupos metilo que se añaden se indican de color rojo.

grupos metilo en la posición N-7 de la guanina, y en uno o dos grupos hidroxilo de los nucleótidos de la caperuza. Esta estructura de caperuza servirá para colocar al mRNA en el ribosoma para la traducción.

CORTE Y EMPALME

Tras la formación de la caperuza, el pre-mRNA forma complejos con diversas *partículas ribonucleoproteicas nucleares pequeñas* (*snRNP*), que a su vez están formadas por complejos de *RNA nucleares pequeños* (*snRNA*) y proteínas de corte y empalme especiales. El complejo snRNP-pre-mRNA se denomina **espliceosoma** (*spliceosome*, por *splicing*, que significa corte y empalme), y es aquí donde se produce la parte más fina del procesamiento, el corte y empalme necesario para eliminar los intrones del pre-mRNA. Al formar un espliceosoma, los snRNA reconocen y se unen a lugares de corte y empalme intrón-exón mediante secuencias complementarias (Figura 28.31). En la Tabla 28.6 se muestran

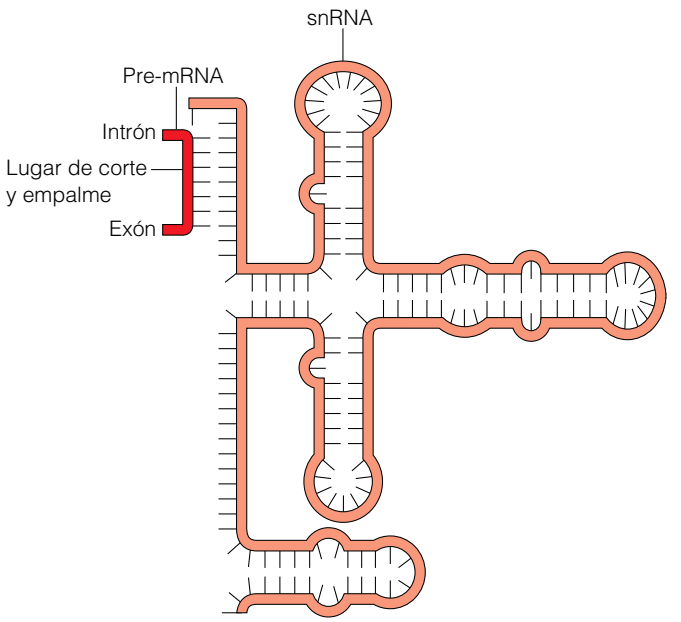


FIGURA **28.31**

Estructura de un RNA nuclear pequeño (snRNA). Se muestra el RNA U1 humano, junto con la región de frontera intrón-exón, a la que se une al formar el espliceosoma.

TABLA 28.6 Secuencias representativas en los lugares de corte y empalme

Proteína, intrón	5′ Lugar de corte y empalme E1 Exón ↓	Intrón	Lugar de corte y empalme E2 ↓ Exón 3′
Ovoalbúmina, intrón 3	···UCAG	GUACAG···UGUAUUCAG	UGUG
β-globina, humana, intrón 1	···CGAG	GUUGGU···CACCCUUAG	GCUG
β-globina, humana, intrón 2	···CAGG	GUGAGU···CCUCCACAG	CUCC
Inmunoglobulina I, L-VI	···UCAG	GUCAGC···UGUUUCGAG	GGGC
Preproinsulina de rata	···CAAG	GUAAGC···CCCUGGCAG	UGGC
Secuencias de consenso[a]	—AG	GURAGY···YYYYY—AG	——

[a] R indica purina e Y indica pirimidina. Los residuos indicados para la secuencia de consenso son los que se encuentran en dos terceras partes, o más, de entre 100 casos analizados. Los residuos que se muestran en rojo se mantienen invariables en todos los casos analizados.

algunas secuencias representativas de los lugares de corte y empalme y las secuencias de consenso comunes a la mayor parte de los intrones. En la Figura 28.32 se muestra una perspectiva esquemática de los aspectos químicos del mecanismo de corte y empalme.

La escisión de un solo intrón comporta el ensamblaje y desensamblaje de un espliceosoma. Todavía no conocemos todos los detalles del proceso de corte y empalme, pero en la Figura 28.33 se muestra un mecanismo molecular razo-

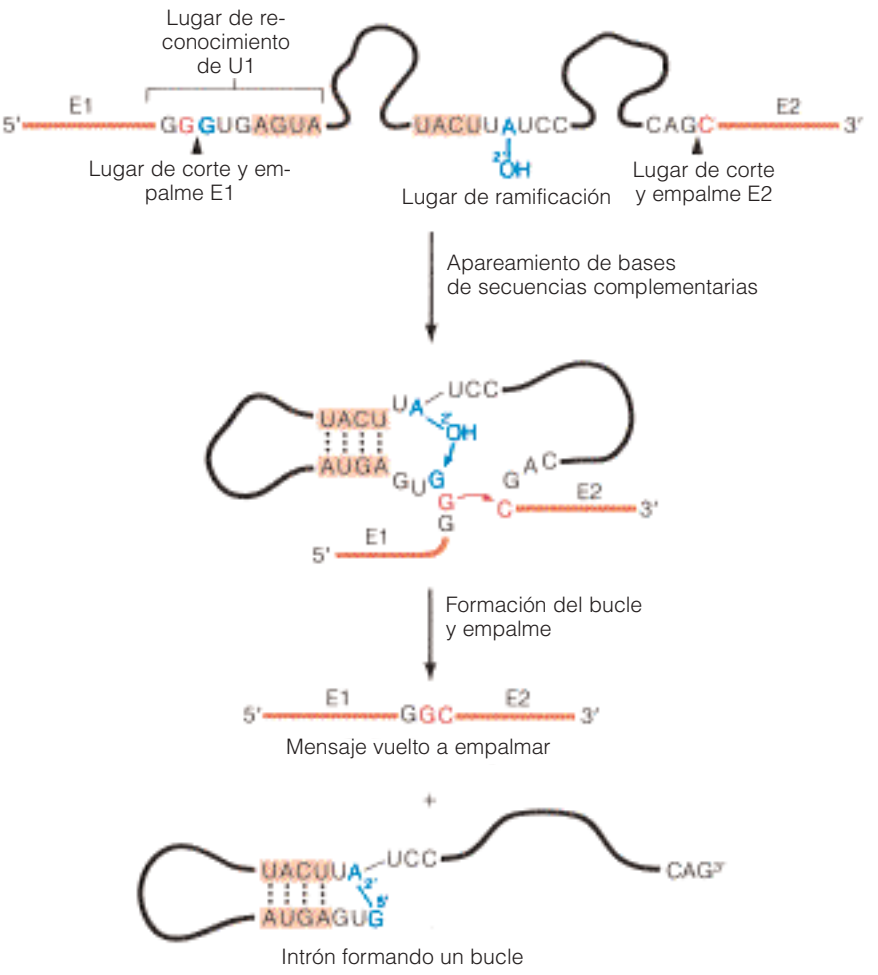


FIGURA **28.32**

Representación esquemática del mecanismo propuesto para el corte y empalme del mRNA. Los exones (E1 y E2) están indicados por líneas rojas, el intrón por una línea negra o la secuencia. El lugar de corte y empalme E1, presumiblemente con la ayuda del RNA pequeño U1, se aparea con una secuencia en la zona de ramificación para formar un bucle. El hidroxilo 2′ del lugar A de la rama reacciona con un residuo G (azul) en el extremo 3′ del exón 1 (el lugar de corte y empalme E1). Esto libera la G adyacente (rojo) para transferirla al extremo 5′ del exón siguiente (E2). Los productos son un mensaje vuelto a empalmar y una estructura de "lazo" de un intrón en bucle que luego se degrada.

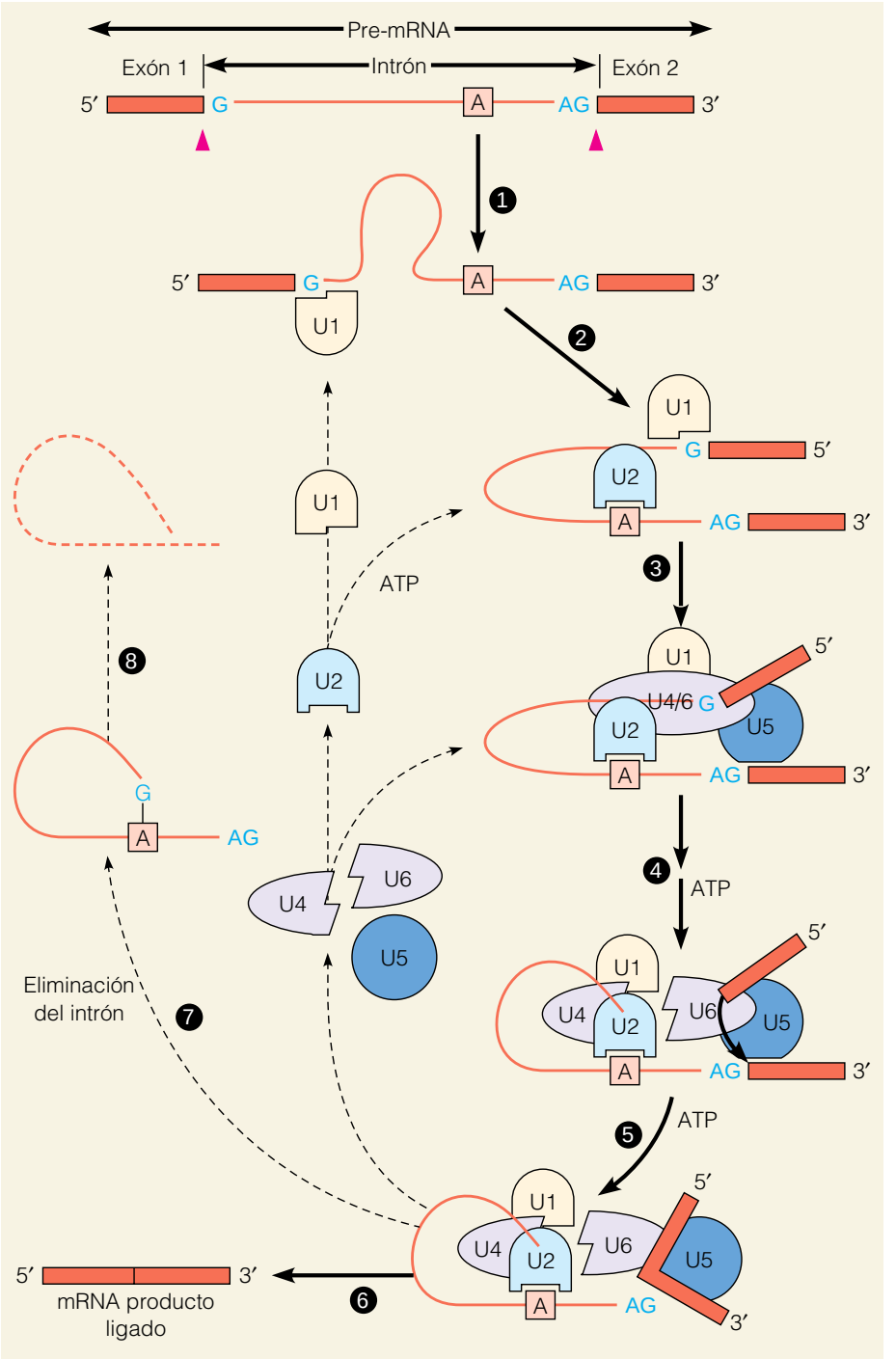


FIGURA **28.33**

Modelo propuesto para el mecanismo de corte y empalme. El pre-mRNA junto con diversas snRNP se ensambla y desensambla en un espliceosoma, que lleva a cabo la reacción de corte y empalme. Las diversas snRNP se denominan U1, U2, etcétera. En el paso 1, se une U1, que junto con la unión de U2 (paso 2) da lugar a una estructura en bucle. A continuación, se unen los factores U4/6 y U5 (paso 3), y se produce la ruptura y transferencia (pasos 4, 5). El espliceosoma se desensambla, liberando el producto ligado (6) y el intrón que forma el bucle (7). Éste se degrada en pequeños oligonucleótidos (paso 8).

nable. La secuencia de reacciones comienza con la unión de la snRNP U1 al lugar G del extremo 5′ del intrón. A continuación, se une la snRNP U2 al lugar de ramificación. Con el ensamblaje continuado del espliceosoma, incluyendo la adición de varias otras snRNP, se forma el bucle de un lazo en el intrón, y se juntan los dos exones. Se ha realizado ya el corte y empalme, y se liberan los productos, un mRNA ligado y un intrón con un bucle. Cuando el espliceosoma se desintegra, se degrada el intrón con el bucle, y el mRNA sale del núcleo. No se conoce aún con certeza cómo sucede esto exactamente, pero puede ser junto con algunas de las proteínas snRNP.

El corte y empalme alternativo permite que un gen especifique varias proteínas.

CORTE Y EMPALME ALTERNATIVO

Uno de los descubrimientos más notable y significativo que se ha realizado en los últimos años es el fenómeno del **corte y empalme alternativo**. Algunos transcritos génicos pueden cortarse y empalmarse de distintas formas, de manera que se incluya o se excluya a determinados exones, en distintos tejidos de un organismo o en diferentes etapas del desarrollo. Hemos mencionado un ejemplo de este fenómeno en el Capítulo 7, en el que señalamos que las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas pueden contener o no un dominio hidrófobo de unión a la membrana.

Un ejemplo más notable de corte y empalme alternativo es el que se muestra en la Figura 28.34. La proteína *α-tropomiosina* se utiliza en distintas clases de sistemas contráctiles de diversos tipos celulares (véase la página 295). Al parecer, la necesidad de dominios funcionales codificados por diferentes exones difiere según el uso concreto de la α-tropomiosina. En lugar de que haya distintos genes que se expresen en los diferentes tejidos, se emplea un solo gen, pero los patrones de corte y empalme específicos de los diferentes tejidos proporcionan diversas α-tropomiosinas. Como se observa en la figura, hay tres posiciones en las que puede optarse por diversas alternativas en cuanto al exón en el que efectuar el proceso de corte y empalme. El elemento 3′ de cada una de estas parejas es el *exón por defecto*, y será el elegido, salvo que una señal celular específica indique lo contrario. Los datos actualmente existentes indican que esta señal es una proteína específica de la célula que interactúa con el espliceosoma, modificando la elección del lugar de aplicación del proceso. La economía del sistema de corte y empalme alternativo, en cuanto al tamaño del genoma, es evidente. En la actualidad se conocen más de 100 ejemplos de genes eucariotas que presentan un corte y empalme alternativo, y es probable que esta lista aumente en el futuro.

EDICIÓN

Recientemente se ha descubierto un tipo de procesamiento del RNA aún más notable, denominado **edición del RNA**, que cambia la secuencia de un mensa-

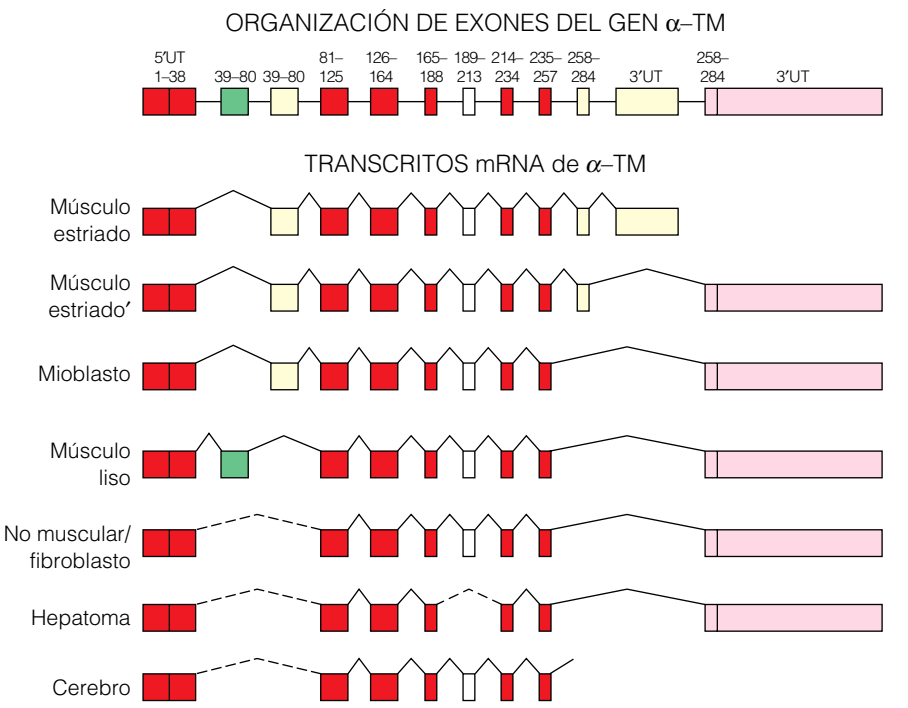


FIGURA **28.34**

Organización del gen de la α-tropomiosina (rata) y siete rutas de corte y empalme alternativas. Los exones (rojo, constitutivos; verde, específicos del músculo liso; amarillo, específicos del músculo estriado; blanco, variables) están indicados con sus aminoácidos codificados (numerados). Se muestran las rutas de corte y empalme documentadas experimentalmente (líneas continuas) y otras (líneas punteadas) inferidas del cartografiado de protección con nucleasas. Los exones liso (SM) y estriado (STR) que codifican los residuos de aminoácidos 39-80 son mutuamente excluyentes y, asimismo, hay exones 3′ terminales alternativos. UT significa regiones no traducidas.

Adaptado de R. E. Breithart et al., *Annu. Rev. Biochem.* (1987) 56:467-495. © 1987 Annual Reviews.

je. La edición se encontró inicialmente en los mRNA mitocondriales de algunos eucariotas unicelulares. Este tipo de edición comporta la inserción o pérdida de residuos de uridina en los mensajes durante los pasos del procesamiento. Al parecer, las inserciones se realizan por medio de un mecanismo de corte y empalme inverso, y tan sólo en determinados puntos. Son necesarios unos RNA pequeños, denominados *RNA guía*, para que el proceso tenga lugar. La función de esta modificación continúa sin estar clara, pero parece tener relación con la regulación de la expresión de los genes. Una clase de edición bastante distinta comporta la desaminación de las adenosinas a inosinas en el mRNA. No se conoce su función pero puede hacer que un mensaje codifique varias proteínas.

Ni el corte y empalme alternativo ni la edición contradicen *formalmente* el concepto básico de que la secuencia de los genes contiene la información de la célula. Después de todo, los lugares en los que se produce el corte y empalme, y la edición, vienen dados ellos mismos por la secuencia de los genes, al igual que las secuencias de los pequeños RNA nucleares y los RNA guía. No obstante, estos fenómenos ponen en duda la idea albergada durante tanto tiempo de que cada secuencia de aminoácidos de una proteína está especificada por una única secuencia de DNA.

Traducción en los eucariotas

COMPARACIÓN CON LOS MECANISMOS DE LOS PROCARIOTAS

El mecanismo para traducir el RNA mensajero en proteínas en las células eucariotas es básicamente el mismo que en los procariotas: el RNA mensajero se lee por los ribosomas. Sin embargo, existen algunas diferencias importantes tanto en los ribosomas como en las características concretas del mecanismo de traducción. Dado que hemos descrito el sistema de traducción procariota con bastante detalle en el Capítulo 27, nos centraremos aquí en las diferencias existentes respecto al mismo.

Ribosomas

El ribosoma y sus subunidades son más grandes en los eucariotas. Las subunidades 40S y 60S se combinan para formar un ribosoma funcional 80S. Esto corresponde a las partículas 30S, 50S y 70S de los procariotas. La subunidad mayor de los eucariotas contiene RNA 28S (26S en las levaduras), 5S y 5.8S; el último de los cuales no tiene equivalente en los procariotas. La subunidad pequeña (40S) tiene un RNA 18S (17S en las levaduras). Las subunidades contienen más proteínas que las correspondientes partículas de los procariotas.

Iniciación

En la Tabla 28.7 se comparan los factores proteicos de la traducción que necesitan los eucariotas con los que requieren los procariotas. La iniciación requiere muchos más factores proteicos en los eucariotas (compárese la Figura 28.35 con la Figura 27.20). Son necesarias al menos 11 proteínas, en vez de 3 como en los procariotas, y algunas de las proteínas eucariotas son estructuras complejas de múltiples subunidades. Algunos de los factores de iniciación se unen a las subunidades ribosómicas y otros al mRNA (véase el lado izquierdo de la Figura 28.35). El principal factor de iniciación, eIF2, forma un complejo con el tRNA (véase el lado derecho de la figura). Este factor se recicla finalmente a través de un intercambio cíclico GDP-GTP denominado ciclo del eIF2, que requiere la presencia del factor eIF2B.

Aunque las proteínas eucariotas se inician igual que sus correspondientes procariotas, con un Met-tRNA especial que lee un codón AUG, la metionina no

En los eucariotas, la iniciación de la traducción es más compleja y requiere más factores proteicos que en los procariotas, y el control de la traducción es más importante.

TABLA 28.7 Comparación de los factores proteicos de la traducción en procariotas y eucariotas

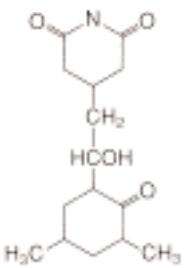
Factor procariota	Factor eucariota	Función
Factores de iniciación		
IF1	eIF1, eIF1A	Preparan al mRNA para un enganche adecuado al ribosoma
IF2	eIF2, eIF2B	Ayudan a unirse al Met-tRNA
IF3	eIF3, eIF4C	Primero para unir y preparar el 40S para los factores siguientes
	eIF4A, eIF4B, eIF4F	Como eIF1, eIF1A
	eIF5	Facilita la disociación de eIF2, eIF3, eIF4C
	eIF6	Facilita la disociación de la subunidad 60S de los ribosomas inactivos
Factores de elongación		
EF-Tu	eEF1α	Aporte de aminoacil tRNA a los ribosomas
EF-Ts	eEF1$\beta\gamma$	Facilita el reciclado del factor anterior
EF-G	eEF2	Factor de translocación
Factores de liberación		
RF1	eRF	Liberación de la cadena polipeptídica completa
RF2		
RF3		

está formilada. El mRNA se alinea correctamente sobre la subunidad 40S mediante la caperuza 5′, en vez de con la secuencia Shine-Dalgarno utilizada por los procariotas. La subunidad ribosómica rastrea entonces el mRNA (mediante un proceso que depende de ATP) hasta llegar al primer AUG. En este punto se liberan los factores de iniciación y la subunidad 60S se une para comenzar la traducción.

Elongación y terminación

El mecanismo de elongación de la cadena parece ser muy semejante en eucariotas y procariotas. Cada uno de los tres factores de elongación (EF-Tu, EF-Ts y EF-G) tiene un equivalente eucariota que desempeña un cometido semejante (véase la Tabla 28.7). La terminación de la cadena eucariota, en contraste con la terminación procariota, requiere sólo un factor proteico, el eRF. Este único factor puede reconocer los tres codones de detención (UAA, UAG y UGA).

INHIBIDORES DE LA TRADUCCIÓN



Cicloheximida

Varios de los inhibidores comunes de la traducción de los procariotas son eficaces también en las células eucariotas. Entre ellos se encuentran la pactamicina, la tetraciclina y la puromicina. También hay inhibidores que *solamente* son eficaces en los eucariotas. Dos de estos importantes productos son la *cicloheximida* y la *toxina diftérica*. La cicloheximida inhibe la actividad peptidiltransferasa de los ribosomas eucariotas y se utiliza a menudo en estudios bioquímicos cuando han de estudiarse los procesos en ausencia de síntesis proteica. La toxina diftérica es una enzima, codificada por un bacteriófago que es lisogénico para la bacteria *Corynebacterium diphtheriae*. Cataliza una reacción en la que el NAD^+ añade un grupo *ADP ribosa* a una histidina especialmente modificada en el factor de translocación eEF2, el equivalente eucariota del EF-G (Figura 28.36). Dado que la toxina es un catalizador, cantidades mínimas de la misma pueden bloquear de manera irreversible la maquinaria de síntesis proteica de una célu-

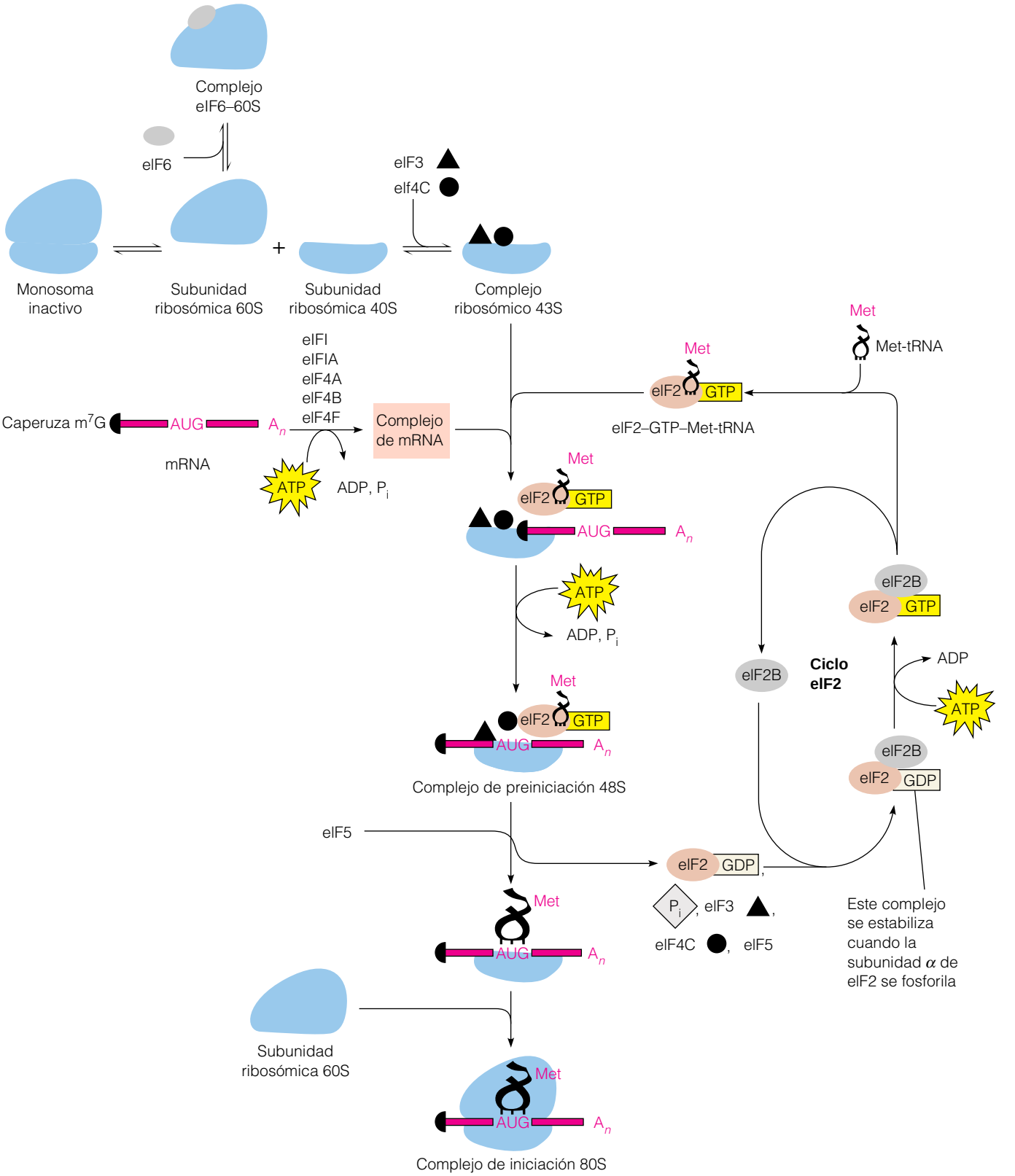


FIGURA **28.35**

Iniciación de la traducción en los eucariotas. Las principales diferencias respecto a la iniciación en los procariotas corresponden a la unión de la caperuza y a la captura del primer AUG.

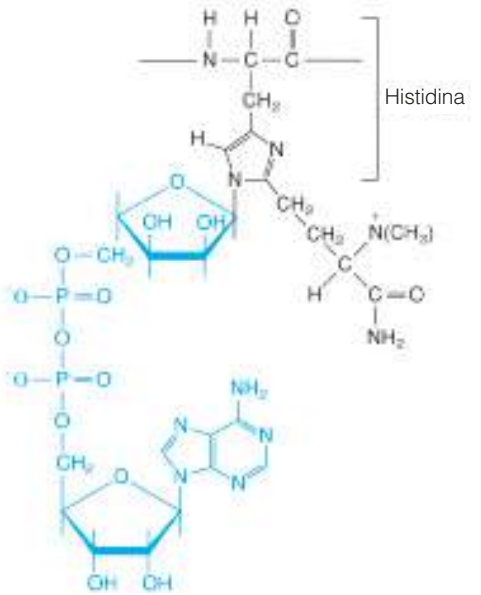


FIGURA **28.36**

Derivado diftamida con ADP ribosilado de la histidina en eEF2. La síntesis de este derivado de una histidina modificada del eEF2 con el uso de NAD^+ está catalizada por la toxina diftérica. El eEF2 se inactiva, y la síntesis proteica queda por tanto bloqueada. La ADP ribosa del NAD^+ se muestra en azul. La diftamida se indica en negro.

la y la toxina diftérica pura es una de las sustancias más mortíferas que se conocen.

CONTROL DE LA TRADUCCIÓN

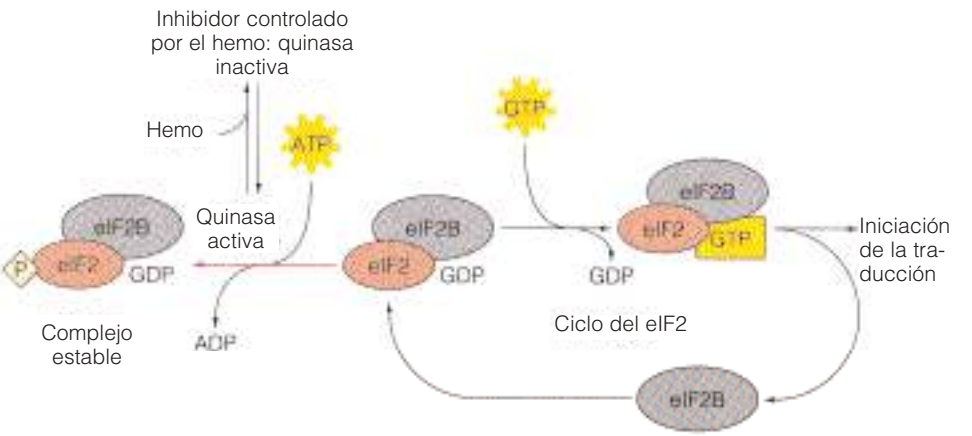
Como se ha indicado en el Capítulo 27, los procariotas no parecen utilizar mucho el control a nivel de la traducción. En cambio, los eucariotas utilizan el control de la traducción de manera mucho mayor. En parte, este control se produce a nivel del mRNA. mRNA específicos pueden secuestrarse mediante la combinación con proteínas de unión al mRNA específicas hasta que son necesarios. Algunos otros mRNA se degradan rápidamente para que no persistan en fases inadecuadas del ciclo celular.

Todavía conocemos poco acerca de los mecanismos concretos de regulación de la traducción, pero hay un ejemplo que ha sido estudiado con bastante detalle, el relativo a la síntesis de hemoglobina en los reticulocitos de los mamíferos. Aunque los eritrocitos inmaduros han perdido ya sus núcleos, conservan todavía reservas suficientes de mRNA para la síntesis amplia de globina, que en este momento constituye su principal función. Sin embargo, esta síntesis carecería de sentido sin un aporte suficiente de hemo para producir las moléculas de hemoglobina funcionales. Los reticulocitos contienen una proteína quinasa denominada *inhibidor controlado por el hemo* (*HCI*) (Figura 28.37). En presencia de concentraciones suficientes de hemo, la quinasa es inactiva, pero si las concentraciones de hemo caen, el HCI se activa, y fosforila de manera específica el factor de iniciación eIF2. Cuando esto ocurre, el complejo formado entre eIF2 y eIF2B en el ciclo eIF2 pasa a ser excepcionalmente estable. El resultado es que todo el eIF2 está amarrado y no puede reciclarse para una nueva iniciación. Así pues, la síntesis proteica se detiene, y no se forma más globina hasta que los aportes de hemo sean de nuevo adecuados.

El efecto de los antivíricos denominados **interferones** es notablemente semejante a la inhibición del hemo. Los interferones son glucoproteínas que producen determinadas células como respuesta a las infecciones víricas. Además de estimular la degradación del mRNA, los interferones inducen la síntesis de una proteína quinasa que fosforila a eIF2, produciendo, igual que lo hace la quinasa controlada por el hemo, un complejo estable eIF2-eIF2B. La pérdida consiguiente de eIF2 libre inhibe la síntesis de proteínas (lo que es más importante, la síntesis de proteínas del virus) en las células infectadas. Dado que algunos cánceres pueden inducirse por *oncogenes* víricos (véase el Capítulo 23), ha habido un interés considerable en la utilización del interferón en la prevención y el tratamiento del cáncer. La fosforilación de varios factores de ini-

FIGURA **28.37**

Regulación de la traducción en las células eritropoyéticas por las concentraciones de hemo. Si las concentraciones de hemo caen, la quinasa controlada por el hemo se activa y fosforila el eIF2 (flecha roja). Esto bloquea la traducción mediante la captura de este factor en un complejo estable con el eIF2B. Cuando las concentraciones de hemo son suficientes, la quinasa se inhibe, y se dispone de eIF2 para la iniciación de la traducción.



ciación parece ser un método general de regulación de la traducción en los eucariotas.

Direccionamiento de las proteínas en los eucariotas

La célula eucariota es una estructura multicompartimental. Cada uno de sus diversos orgánulos requiere unas proteínas diferentes, y tan sólo algunos de ellas se sintetizan dentro de los propios orgánulos. Así, por ejemplo, la mayor parte de las proteínas de las mitocondrias y los cloroplastos están codificadas en el genoma nuclear y se sintetizan en el citoplasma. Deben distinguirse cuidadosamente de las demás proteínas sintetizadas y han de transportarse de manera selectiva a sus orgánulos adecuados. Algunas otras proteínas sintetizadas están destinadas a ser exportadas al exterior de la célula o a su inclusión en vesículas como los lisosomas. La diversidad de destinos de las distintas proteínas implica que debe haber un sistema sofisticado para marcar y clasificar las proteínas recién sintetizadas, y garantizar que vayan a parar a sus lugares adecuados.

PROTEÍNAS SINTETIZADAS EN EL CITOPLASMA

Las proteínas destinadas al citoplasma y las que se incorporan a las mitocondrias, los cloroplastos, o los núcleos se sintetizan en los polirribosomas libres del citoplasma. Las proteínas direccionadas a los orgánulos, tal como se sintetizan inicialmente, contienen secuencias señal específicas en los extremos N-terminal. Estas secuencias probablemente participan en la inserción en las membranas, pero también señalan que estos polipéptidos interaccionarán con una clase distintiva de chaperoninas. Estas chaperonas son miembros de la familia de proteínas de "choque térmico" HSP70 y actúan para asegurar que la proteína recién sintetizada permanece desplegada y es entregada a un lugar receptor en la membrana del orgánulo. A continuación, la proteína desplegada pasa a través de las membranas interior y exterior a través de puertas que contienen proteínas de transporte que discriminan entre las proteínas destinadas a la luz, las membranas o la matriz. Si pasa a la matriz, la proteína puede captarse por chaperoninas del interior del orgánulo para el plegado final. La secuencia de direccionamiento N-terminal también se elimina durante este transporte (véase la Figura 28.38). El modelo que se ha mostrado ha sido derivado especialmente para la importación de proteínas a la matriz mitocondrial, pero es probable que la situación con las proteínas del cloroplasto sea análoga.

Las proteínas destinadas al citoplasma, los núcleos, las mitocondrias y los cloroplastos se sintetizan en el citosol; las destinadas a los orgánulos tienen secuencias de direccionamiento específicas.

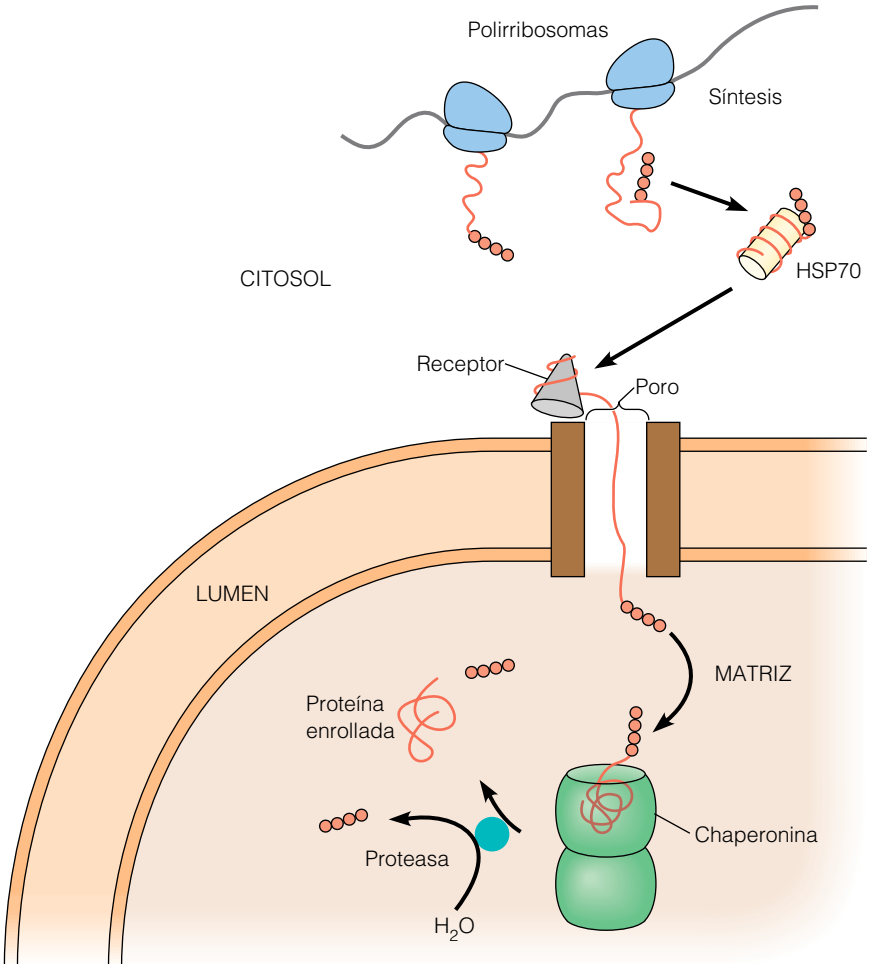
Se cree, en el momento actual, que la situación con las proteínas nucleares es semejante. Las primeras teorías sostenían que estas proteínas difundían simplemente al núcleo a través de los poros nucleares y luego se unían a la cromatina, pero actualmente hay pruebas de secuencias de direccionamiento nuclear que ayudan a algunas proteínas, quizás con otras en remolque, a seleccionar al núcleo como su destino. Además, cada vez está más claro que los poros nucleares son puertas complejas y no canales abiertos.

PROTEÍNAS SINTETIZADAS EN EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO RUGOSO

Las proteínas destinadas a las membranas celulares, los lisosomas o el transporte extracelular, utilizan un sistema de distribución especial. Las estructuras clave de este sistema son el **retículo endoplásmico rugoso** (RER) y el complejo de Golgi (véase también el Capítulo 16). El retículo endoplásmico rugoso es una red de espacios rodeados por membranas dentro del citoplasma. La membrana del RER está intensamente revestida en la superficie externa citosólica por polirri-

FIGURA **28.38**

Representación esquemática de los pasos en la entrega de una proteína, sintetizada en el citosol, a la matriz de un orgánulo. En naranja se indica la secuencia señal y en verde, las chaperonas.



Las proteínas destinadas a las membranas celulares, los lisosomas o a la exportación se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso y posteriormente se modifican y se transportan a través del aparato de Golgi.

bosomas; esta capa es lo que le da a la membrana el aspecto rugoso. El complejo de Golgi se parece al RER en que es un apilamiento de sacos finos unidos a las membranas. Sin embargo, los sacos de Golgi no están conectados entre sí, ni tienen polirribosomas en sus superficies. El papel del complejo de Golgi consiste en actuar como "centro de direccionamiento" para las proteínas que tienen diversos destinos.

Las proteínas que han de dirigirse a sus destinos a través del complejo de Golgi se sintetizan por los polirribosomas asociados con el RER. La síntesis comienza realmente en el citoplasma (Figura 28.39, paso 1). La primera secuencia que se sintetiza es una *secuencia señal* N-terminal, que forma parte de un mecanismo de fijación al RER del ribosoma y de la proteína en formación. Las *partículas de reconocimiento de señal* (*SRP*), que contienen varias proteínas y un RNA pequeño (7SL) (véase la página 1208), reconocen las secuencias señal de las proteínas en formación adecuadas y se unen a ellas al separarse de los ribosomas (paso 2).

La SRP tiene dos funciones. En primer lugar, su unión detiene temporalmente la traducción, por lo que sólo se extiende a partir del ribosoma la secuencia señal N-terminal. Esta pausa impide que se complete la proteína en el lugar inadecuado, es decir, en el citosol, e inhibe también el plegamiento prematuro de la cadena polipeptídica. De esta forma, la SRP está actuando como una clase de chaperona. La segunda función de la SRP es reconocer una **proteína de ensamblaje** en la membrana del RER. La proteína de ensamblaje une el

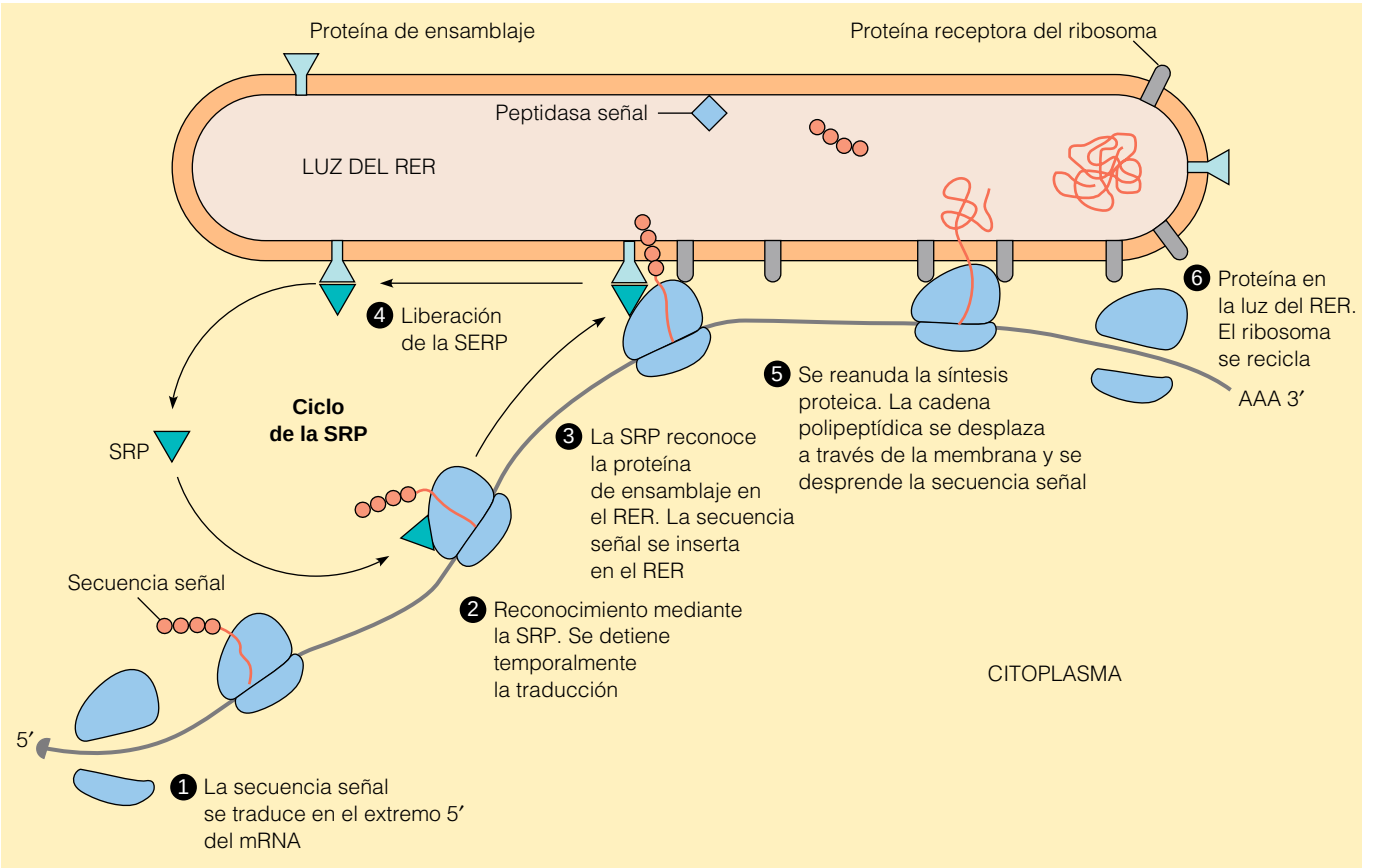


FIGURA **28.39**

Secuencia de acontecimientos en la síntesis de proteínas en el retículo endoplásmico rugoso. La secuencia temporal va de izquierda a derecha.

ribosoma al RER, y la secuencia señal se inserta en la membrana del RER (paso 3). A continuación, se libera la SRP (paso 4), y ello permite que se reanude la traducción (paso 5). La proteína que se está sintetizando es realmente *empujada* a través de la membrana por un proceso dependiente de ATP. Antes de que se complete la traducción, se separan las secuencias señal de algunas proteínas mediante una proteasa asociada al RER. Estas proteínas se liberan a la luz del RER y luego se transportan (paso 6). Las proteínas que permanecerán en el retículo endoplásmico tienen péptidos señal resistentes y de ese modo permanecen ancladas a la membrana del RER.

FUNCIÓN DEL COMPLEJO DE GOLGI

Las proteínas que entran en la luz del RER experimentan las primeras fases de glucosilación en este punto. A continuación, las vesículas que transportan estas proteínas se desprenden del RER y se desplazan hacia el complejo de Golgi (Figura 28.40). Aquí se completan las porciones de hidratos de carbono de las glucoproteínas (véanse las páginas 653-656 en el Capítulo 16 para una información más detallada) y se produce la clasificación final. Los múltiples sacos de membranas que forman el complejo de Golgi constituyen un espacio de múltiples capas para la realización de estos procesos. Las vesículas procedentes del RER entran en la cara *cis* del complejo de Golgi (la más próxima al RER) y se fusionan con la membrana de Golgi. A continuación, las proteínas se llevan a las capas intermedias, nuevamente a través de vesículas. Por último, las vesículas se desprenden de la cara *trans* del complejo de Golgi para formar los lisosomas, peroxisomas o glioxisomas, o para viajar a la membrana plasmática. Todo este transporte de vesículas, desde el RER a la cara *cis* del Golgi, a niveles sucesivos

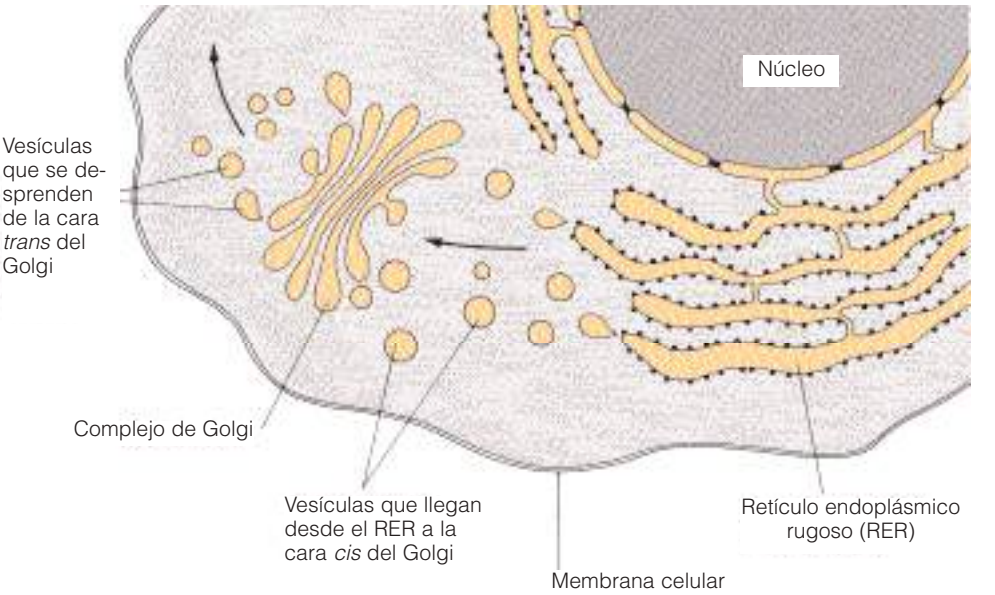


FIGURA **28.40**

Transferencia desde el retículo endoplásmico rugoso (RER) al complejo de Golgi. Obsérvese que las vesículas se desprenden del RER y se desplazan hacia la cara *cis* del Golgi. Las vesículas lisosómicas primarias se desprenden de la porción *trans* del Golgi.

del Golgi y a sus destinos finales, requieren una gran especificidad de direccionamiento. El transporte de vesículas a destinos erróneos produciría un caos celular. Esta clasificación se realiza teniendo cada clase de proteína de carga encerrada en una vesícula marcada por proteínas de la membrana de vesículas específicas. En algunos casos, las membranas objetivo contienen proteínas complementarias que interaccionan con éstas y producen la fusión de la membrana. Estos pares complementarios se denominan *SNARES* (v-SNARES en las vesículas, t-SNARES en las membranas objetivo). La interacción de v-SNARES y t-SNARES específicos, ayudados por proteínas de fusión citosólicas, lleva a la fusión de la vesícula y las membranas objetivo y a la entrega de la carga (véase la Figura 28.41).

El destino de las proteínas: destrucción programada

En el Capítulo 11 hemos señalado que uno de los mecanismos de control de la función enzimática era la degradación selectiva de determinadas enzimas. Sin embargo, no sólo han de destruirse las enzimas de una forma programada. Las proteínas reguladoras que son esenciales en determinadas partes del ciclo celular y nocivas en otras deben eliminarse en determinado momento. Consideremos, por ejemplo, las ciclinas (véase la página 1220), cada una de las cuales debe estar presente sólo en una parte específica del ciclo celular. Las proteínas que han sufrido daños deben eliminarse también. En algunos procesos del desarrollo es necesario eliminar orgánulos completos o incluso células y tejidos enteros.

Las células eucariotas tienen dos métodos distintos de degradación proteica. Los lisosomas contienen entre sus hidrolasas enzimas proteolíticas que degradarán cualquier proteína que sea atrapada por el lisosoma. Paralelamente a este proceso actúa un sistema de degradación citosólica, que necesariamente ha de ser muy selectivo. El peligro intrínseco que comporta la presencia de proteasas inespecíficas perdidas en el citosol es claramente evidente.

EL SISTEMA LISOSÓMICO

Las partículas lisosómicas desprendidas del complejo de Golgi, a las que se denomina **lisosomas primarios**, son bolsas de enzimas de degradación. Los liso-

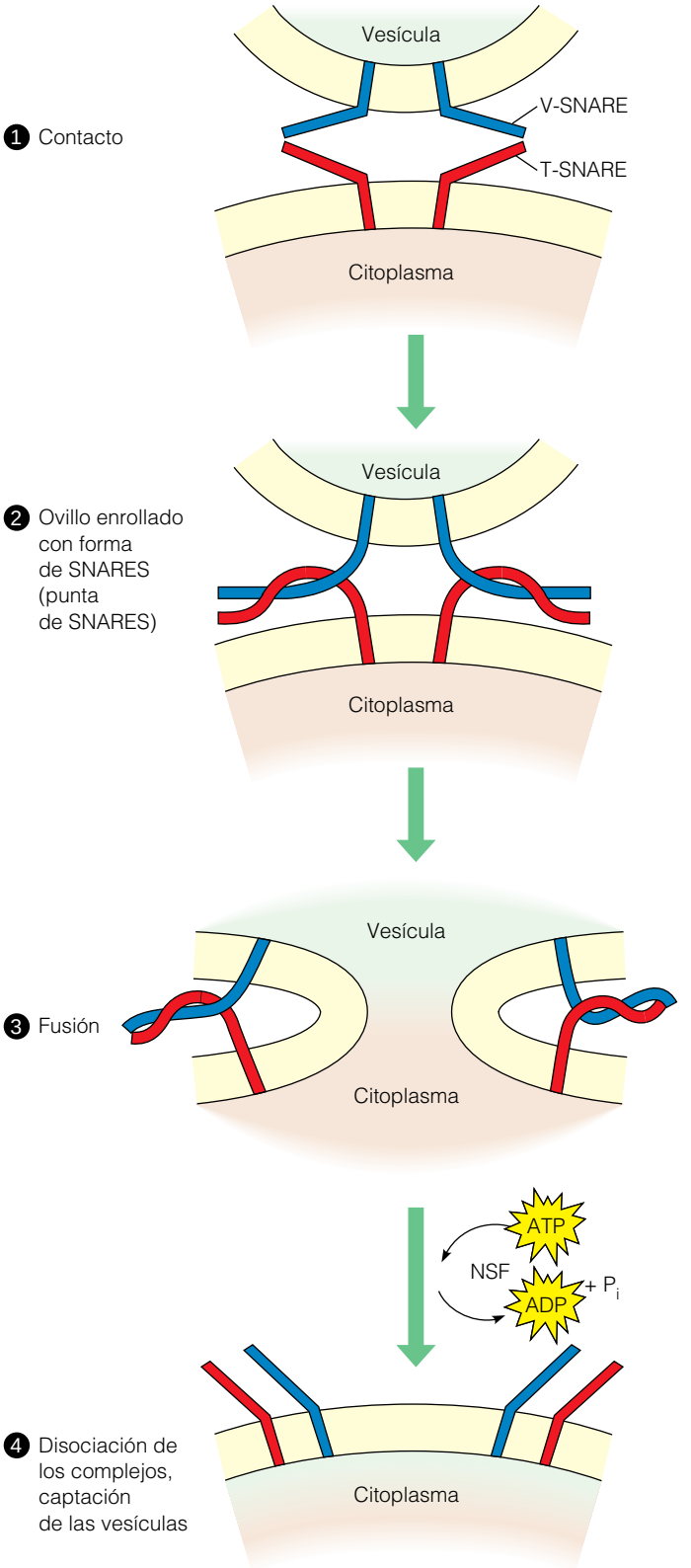


FIGURA **28.41**

Representación esquemática, y en alguna forma hipotética, de la fusión SNARE-pin. La interacción la dictan v-SNARE y t-SNARE específicas, y forman estructuras de ovillo enrollado. Tras la fusión, éstos se rompen por los factores SNAP y NSF, el último en una ATPasa.

somas contienen más de 50 enzimas hidrolíticas diferentes, como proteasas, nucleasas, lipasas y enzimas de degradación de los hidratos de carbono. Los lisosomas desempeñan diversos papeles importantes en el metabolismo celular, tal como se muestra esquemáticamente en la Figura 28.42.

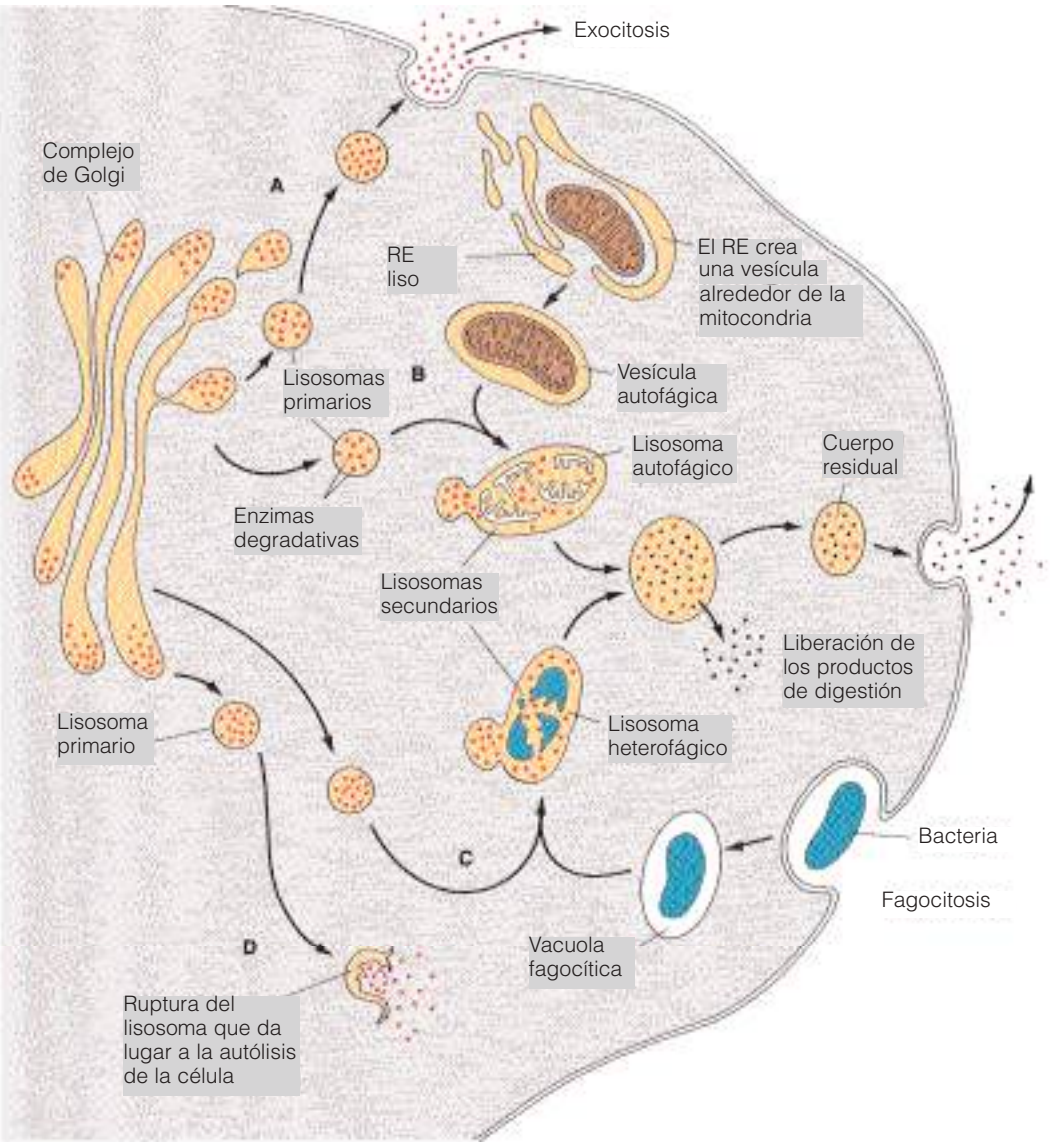


FIGURA **28.42**

Formación de los lisosomas primarios y secundarios, y su función en los procesos digestivos celulares. Los lisosomas primarios que se desprenden del complejo de Golgi pueden seguir varias rutas. **Ruta A:** exocitosis, transporte de las enzimas al exterior de la célula. **Rutas B y C:** fagocitosis, formación de lisosomas fágicos para la digestión de orgánulos (autofagocitosis) o de sustancias ingeridas (heterofagocitosis). **Ruta D:** autólisis-destrucción de la propia célula.

En algunos tipos celulares, como los del páncreas que segregan enzimas degradativas, los lisosomas primarios se desplazan hacia la superficie celular y liberan su contenido al medio exterior (ruta A). Los lisosomas primarios pueden fusionarse con *vesículas autofágicas*, que se forman cuando el RE liso engloba orgánulos destinados a la destrucción (ruta B). La vesícula combinada se denomina *lisosoma autofágico*. En algunos tipos de células, principalmente algunos leucocitos, los lisosomas primarios pueden fusionarse con *vacuolas fagocíticas* que han engullido nutrientes en la superficie celular (ruta C). En estos lisosomas heterofágicos, los nutrientes se digieren y sus aminoácidos, nucleótidos, lípidos y otros constituyentes de peso molecular bajo, se liberan al citosol. El material residual, no digerido, se excreta cuando los lisosomas heterofágicos y los lisosomas autofágicos llegan a la membrana plasmática.

DEGRADACIÓN PROTEICA CITOSÓLICA

A diferencia de las enzimas lisosómicas, que generalmente están secuestradas de una forma segura en sus vesículas, toda actividad proteasa libre en el citosol normal debe estar bajo un estricto control. Debe atacar tan sólo a las proteínas que

es necesario destruir. Puede tratarse de proteínas dañadas, proteínas sintetizadas de forma incorrecta, o proteínas que ya no son necesarias en una determinada fase del ciclo celular. Si recordamos que la hidrólisis de las proteínas es una reacción termodinámicamente favorecida, queda claro que las enzimas que participan en esta degradación citosólica deben ser algo más que simples catalizadores del proceso hidrolítico, puesto que de lo contrario la destrucción sería generalizada. Básicamente debe haber algún medio de distinguir las proteínas que han de ser atacadas de las que no han de serlo.

El principal sistema proteolítico en el citosol utiliza una proteína denominada *ubiquitina* para marcar las proteínas destinadas a la destrucción. La ubiquitina es un polipéptido de 76 residuos, que se encuentra en la práctica totalidad de las células de todos los organismos eucariotas. La ubiquitina se sintetiza bien como un oligómero de fusión cabeza con cola, o fusionado con una proteína ribosómica. Su grupo carboxilo debe liberarse por la hidrólisis de un péptido carboxilo, utilizando una *enzima desubiquitinizante* (paso 1, Figura 28.43). El grupo carboxilo está activado por el acoplamiento tiólico a una *enzima activadora* (Figura 28.43, paso 2) mediante un proceso dependiente de ATP. Las porciones de ubiquitina se transfieren posteriormente a una segunda enzima (paso 3), que las une a los grupos ε-amino de los residuos de lisina de la proteína predeterminada (paso 4).

Algunas proteínas ubiquitinizadas simplemente se marcan para su translocación a lugares celulares específicos y otras se marcan por razones aún desconocidas, pero la mayoría se marcan para la digestión proteolítica en partículas denominadas proteasomas, de las que existen dos tamaños, siendo la partícula de 20S un precursor del proteasoma funcional 26S. Se han determinado, con un elevado nivel de resolución, las estructuras tridimensionales de proteasomas de dos clases de organismos (arqueobacterias y levaduras) (véase la Figura 28.44). La estructura es un barril de 28 subunidades. Estructuralmente, el proteasoma muestra una similitud notable con la chaperonina GroEL (página 213?). Ambas son cilindros de varios niveles con una simetría séptuple. Ambos pueden aceptar una cadena polipeptídica desplegada en su interior hueco pero, mientras que GroEL protege a la cadena polipeptídica, el proteasoma la degrada.

APOPTOSIS

Muchos organismos presentan un proceso de muerte celular programada denominado **apoptosis**. Existen muchas razones para ello: en el embrión que crece, los tejidos presentes en una etapa deben eliminarse según avanza el desarrollo. Un ejemplo es la "membrana" que cada uno de nosotros posee entre los dedos en determinado momento de la vida fetal. En los adultos, las células dañadas, imperfectas o infectadas deben eliminarse para la salud del organismo. Hasta hace poco, los mecanismos de la apoptosis eran totalmente oscuros.

El descubrimiento hace pocos años de una familia de proteasas intracelulares denominadas **caspasas** significaron un indicio importante. Todas las caspasas rompen en el lado carboxilo del aspartato (de aquí c-aspasa). Estas proteínas se sintetizan como precursores inactivos que pueden activarse por una ruptura así. De esta forma, existe la posibilidad de una cascada de caspasas una vez desencadenada la activación. Parece existir un gran número de potenciales

La degradación de las proteínas se produce a través de los lisosomas, vesículas llenas de enzimas hidrolíticas, o intracelularmente, a menudo mediante la unión del marcador ubiquitina y/o un complejo multicatalítico.

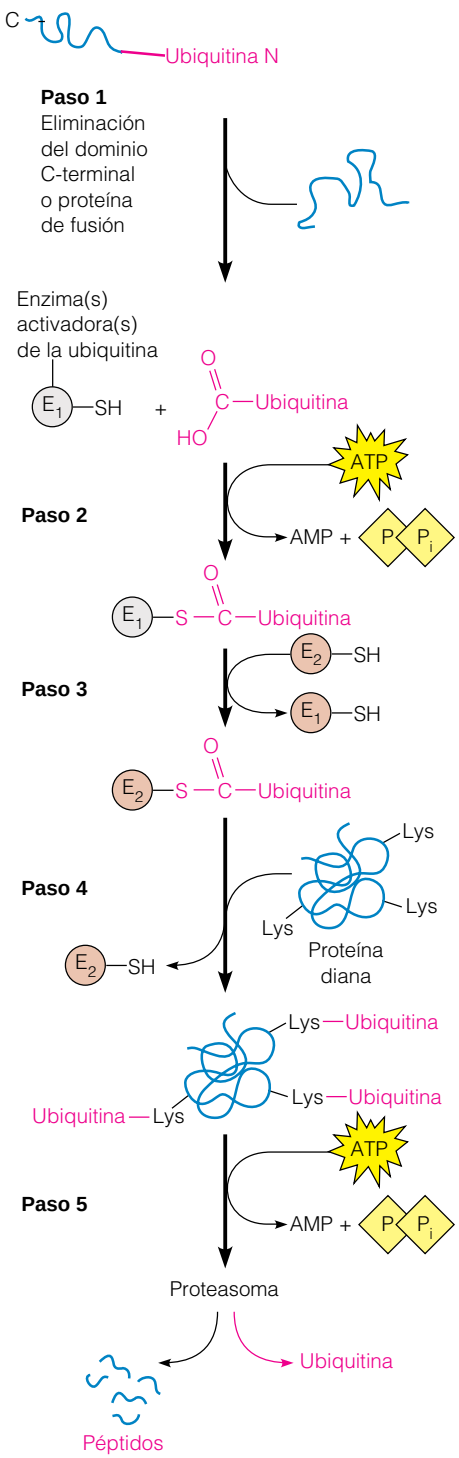


FIGURA **28.43**

Ruta de degradación de la ubiquitinización. La ubiquitina comienza como parte de una proteína de fusión que debe romperse para dar ubiquitina. Posteriormente, ésta se activa mediante tiolación y transferencia, hasta que se engancha a la proteína objetivo, a la que marca para la degradación.

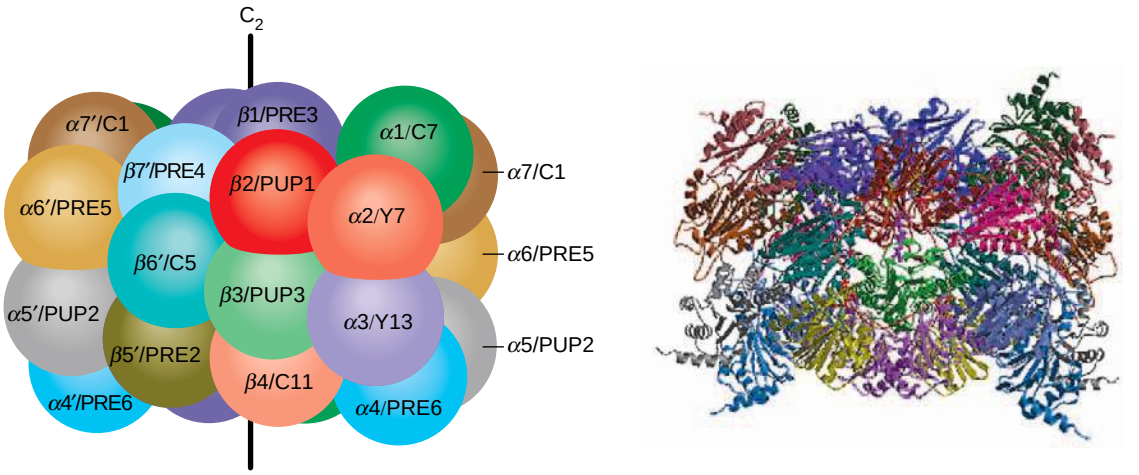


FIGURA **28.44**

Estructura tridimensional del proteasoma 20S de levaduras. **(a)** Representación esquemática que muestra las posiciones de las 28 subunidades (2 de cada uno de 14 tipos). El eje binario se marca como C_2; el eje pseudo séptuple se encuentra aproximadamente perpendicular a éste, en el plano del papel. **(b)** Un modelo molecular detallado.

Cortesía de R. Huber de M. Groll et al., *Nature* (1997) 386:463-471. © 1997 Macmillan Magazines, Ltd.

desencadenantes citoplásmicos, mitocondriales y extracelulares. Curiosamente, entre ellos se encuentra el interferón (véase la página 1224) y el *factor de necrosis tumoral*, una proteína conocida desde hace tiempo que inhibe el crecimiento tumoral mediante la interacción con receptores celulares de superficie.

Una vez iniciada la cascada, la destrucción es completa. Las proteínas que degradan las caspasas son muy variadas, entre ellas proteínas estructurales como la actina y la lamina nuclear, así como factores de transcripción y de corte y empalme. Las nucleasas se activan para digerir el DNA celular. La célula se desintegra en fragmentos que son reconocidos por los fagocitos y destruidos totalmente.

DNA eucariota y desarrollo: un breve ejemplo

A lo largo de este capítulo hemos resaltado que la vida de un organismo eucariota está cuidadosamente programada en su DNA. Ahora sabemos que el DNA eucariota codifica *mucha* más información que una simple receta para una serie de proteínas y ácidos nucleicos especiales. Hay una amplia gama de señales especiales ocultas dentro de los propios genes, señales que determinan de qué forma se cortarán y empalmarán los transcritos, a dónde irán los productos de los genes, e incluso durante cuánto tiempo persistirán. Además, una gran cantidad de información, que generalmente está codificada en las secuencias adyacentes a determinados genes, especifica si ciertos genes han de transcribirse en determinadas células en el curso del desarrollo o en respuesta a tensiones ambientales.

A un nivel superior, deben existir otras instrucciones genéticas que *coordinen* estas instrucciones de la transcripción, ya que el desarrollo de un organismo requiere la diferenciación programada de algunas células, la proliferación de ciertos tejidos y la muerte de algunas células seleccionadas. Estamos empezando tan sólo a vislumbrar cómo puede estar codificada esta información en el genoma. Gran parte de lo que sabemos procede de los estudios del desarrollo de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Los biólogos del desarrollo saben desde hace tiempo que, durante el desarrollo de las larvas de este insecto, hay unos grupos de células que se separan formando unas estructuras en forma de disco a las que se denomina **discos imaginales** (Figura 28.45). Estos grupos de células formarán partes específicas de la mosca adulta. Cuando la larva sufre la metamorfosis, las células de la larva se destruyen mediante autólisis, y cada disco imaginal se desarrolla para dar lugar a una parte diferente del adulto.

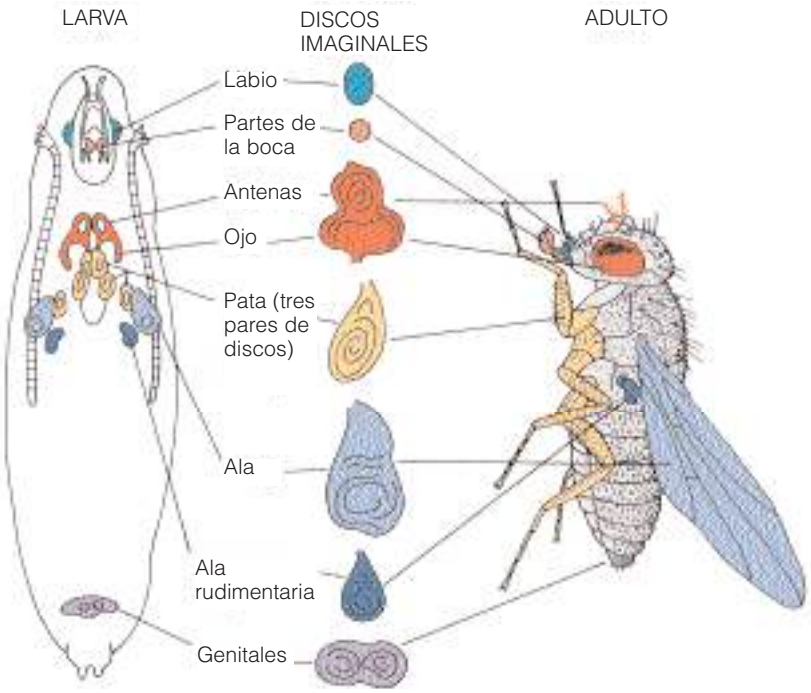


FIGURA **28.45**

Discos imaginales en el desarrollo de *Drosophila*. Cada uno de los discos imaginales que se muestran en la larva se desarrolla para dar lugar a un segmento específico del adulto.

Tomado de J. W. Fristrom, R. Raikow, W. Petri y D. Stewert, *Problems in Biology: RNA in Development*, E. W. Hardy, ed. (Salt Lake City, UT: University of Utah Press). Reproducido con permiso.

Los genetistas que trabajan con *Drosophila* han identificado desde hace tiempo las **mutaciones homeóticas**, mutaciones que entremezclan todo el patrón de desarrollo de formas definidas. Una de ellas, denominada mutación *Antennapedia*, hace que crezcan unas patas perfectamente formadas en zonas próximas al ojo, en las que normalmente se forman las antenas. Otro grupo, denominado mutaciones *bitorácicas*, hace que se produzca un desarrollo anormal de los segmentos torácicos, produciendo, por ejemplo, pares de alas adicionales (Figura 28.46). Algunos estudios recientes de biología molecular han revelado la existencia de agrupaciones amplias de **genes homeóticos** que controlan estos procesos del desarrollo, en los que se producen las mutaciones homeóticas. Es de destacar que un elemento de secuencia común de unos 180 pb se repite muchas veces en estas agrupaciones de genes. Esta secuencia, a la que ahora se denomina *caja homeo*, codifica una secuencia polipeptídica de 60 residuos denominada *dominio homeo*. Las proteínas que contienen este dominio son proteínas nucleares de unión al DNA de la clase hélice-bucle-hélice. Parece probable que actúen como reguladores de la transcripción para un grupo coordinado de proteínas.

Lo más destacable es que la presencia de la caja homeo no se limita tan sólo a los insectos, sino que se encuentra también en otros muchos organismos, como los anfibios y los mamíferos. Las secuencias están notablemente conservadas en este rango filogenético. Este descubrimiento hace pensar en una uniformidad inesperada de los mecanismos del desarrollo en organismos muy distintos.

Esta fascinante historia, que está aún sin desarrollar, constituye un ejemplo notable de lo que se comentaba en el Capítulo 1 de este libro: campos científicos diversos se combinan para aportar nuevas perspectivas en el ámbito de la biología. Los estudios aparentemente no relacionados de la genética, la biología del desarrollo, y la química de las proteínas y los ácidos nucleicos, han convergido en este ejemplo para aportarnos la base del conocimiento bioquímico sobre la forma de regular el desarrollo de un organismo a nivel molecular. Creemos que el futuro de la biología se encuentra en este tipo de exploraciones de campos que se cruzan.



FIGURA **28.46**

Mutación bitorácica de *Drosophila*. **Arriba:** mosca normal. **Abajo:** mutante en la que el segmento torácico que normalmente produce un par de halterios, o alas rudimentarias, se ha transformado en un segmento que produce un par de alas completamente desarrolladas.

Cortesía de E. B. Lewis, *Eukaryotic Development, Part A: Genetic Aspects* (Nueva York: Alan R. Liss, 1982).

Las mutaciones homeóticas que modifican las rutas del desarrollo implican factores proteicos especiales portadores del dominio homeo.

RESUMEN

En general, los genomas de los eucariotas son mucho mayores que los de los procariotas. Este mayor tamaño se debe en parte a las mayores necesidades genéticas y a la presencia de múltiples copias de algunos genes. Pero también hay una gran cantidad de DNA repetitivo cuya función no se conoce, y los genes eucariotas llevan muchos intrones y secuencias reguladoras largas. Los múltiples cromosomas eucariotas se encuentran en el núcleo, en complejos con histonas y proteínas no histonas, para formar la cromatina. La unidad de repetición de la cromatina es el nucleosoma, en el que el DNA se envuelve alrededor de un octámero de histonas. La fibra nucleosómica se enrolla aún más en el núcleo y los bucles de cromatina se unen a la matriz nuclear. El ciclo característico de una célula eucariota consta de las fases G1, S, G2 y M. En la fase S, el DNA se replica, y se copia la estructura de la cromatina. En la fase M (mitosis), la célula se divide.

En los eucariotas, la transcripción es complicada e intervienen en ella tres tipos de RNA polimerasas, cada una de ellas con una función especializada. La polimerasa I transcribe el RNA ribosómico principal, la pol III los RNA pequeños, y la pol II el RNA mensajero. Cada polimerasa requiere diversos factores proteicos que inician la transcripción. La transcripción se modula también por factores que actúan en *trans*, que se unen a promotores y potenciadores. El transcrito terminado se poliadenila en su extremo 3′ y se forma una caperuza en su extremo 5′. Los intrones del pre-mRNA se cortan en partículas denominadas espliceosomas. A veces, se produce un corte y empalme alternativo. La traducción tiene lugar de forma muy parecida a la de los procariotas, pero son necesarios más factores proteicos, y la iniciación y la terminación son los pasos que presentan las principales diferencias.

Las proteínas citosólicas o de los orgánulos se construyen en el citosol. Las proteínas diseñadas para otros objetivos se sintetizan en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso, y se modifican y dirigen a través del aparato de Golgi. La destrucción de las proteínas en las células es también un fenómeno programado, en el que intervienen varias rutas.

No sólo los genes individuales, sino también grupos completos de genes, parecen regularse de manera coordinada en el desarrollo de los organismos superiores.

BIBLIOGRAFÍA

General

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J. D. Watson (1994) *The Molecular Biology of the Cell*, 3.ª ed. Garland, Nueva York. Una fuente contemporánea estupenda de la biología celular.

Conaway, R. C. y J. W. Conaway (1994) *Transcription: Mechanism and Regulation.* Raven Press, Nueva York. Una excelente revisión de las ideas y experimentaciones actuales.

Organización del genoma

Bränden, C.-I., H. Eklund, C. Cambillau y A. J. Pryor (1984) Correlation of exons with structural domains in alcohol dehydrogenase. *EMBO J.* 3:1307-1310. Una perspectiva de la posible relación entre la estructura génica y la estructura proteica.

Goffeau, A. y otros 15 (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274:546-567. La secuencia y estructura genómica del genoma completo de levadura.

Jelineck, W. R. y C. W. Schmid (1982) Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Annu. Rev. Biochem.* 51:813-844.

Sharp, P. A. (1985) On the origin of RNA splicing and introns. *Cell* 42:397-400.

Ullu, E. y C. Tschudi (1984) Alu sequences are processed 7SL RNA pseudogenes. *Nature* 312:171-172.

Cromosomas y núcleo

Kavenoff, R., L. C. Klotz y B. H. Zimm (1974) On the nature of chromosome-size DNA molecules. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38:1-8. La primera medida del tamaño del DNA cromosómico.

Lamond, A. I. y W. C. Earnshaw (1998) Structure and function in the nucleus. *Science* 280:547-563.

Cromatina y nucleosomas

Arents, G., R. W. Burlingame, B.-C. Wang, W. E. Love y E. Moudrianakis (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: A triparticle protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10148-10452. Primer estudio a resolución elevada de la estructura del nucleosoma y primera demostración del plegado terciario del centro de histonas.

Luger, K., A. W. Mädes, R. K. Richmond, D. F. Sargent y T. J. Richmond (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251-260.

van Holde, K. E. (1988) *Chromatin.* Springer-Verlag, Nueva York. Algo antiguo pero bueno como base.

Woodcock, C. L. y R. A. Horowitz (1995) Chromatin organization reviewed. *Trends Cell Biol.* 5:272-277. Una revisión que describe los estudios recientes de la arquitectura de la fibra de cromatina, a la luz de los modelos que se han presentado.

Replicación en eucariotas

Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Froikis, S. E. Holt, C.-P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner y W. E. Wright (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-352. Una presentación con implicaciones importantes en biología y medicina.

Edwards, A. M., A. Bochkarev y L. Frappier (1998) Origin DNA-binding proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8:49-53.

Muniyappa, K. y K. M. Kironmai (1998) Telomere structure, replication, and length maintenance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33:297-336. Una buena revisión actual.

Wei, X., J. Samarabandu, R. S. Devdhar, A. J. Siegel, R. Acharya y R. Berezney (1998) Segregation of transcription and replication sites into higher order domains. *Science* 281:1502-1505. Una visión nueva y sorprendente del procesamiento nuclear.

Regulación de la transcripción

Felsenfeld, G. (1992) Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* 355:219-224.

Karlsson, S. y A. W. Nienhuis (1985) Developmental regulation of human globin genes. *Annu. Rev. Biochem.* 54:1071-1108.

Mizzen, C. A. y C. D. Allis (1998) Linking histone acetylation to transcriptional regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 54:6-20.

Nikolov, D. B., H. Chen, E. D. Halay, A. Hoffmann, R. G. Roeder y S. K. Burley (1996) Crystal structure of a human TATA box-binding protein/TATA element complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:4862-4867.

Nikolov, D. B., S.-H. Hu, J. Liu, A. Gasch, A. Hoffman, M. Horikoski, N.-H. Chua, R. G. Roeder y S. K. Burley (1992) Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature* 360:40-46.

Roeder, R. G. (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 21:327-335. Una excelente revisión; este número de TIBS está totalmente dedicado a la transcripción eucariota y contiene otras revisiones excelentes.

Shilatifard, A. (1998) Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II. *FASEB J.* 12:1437-1446.

Tan, S. y T. J. Richmond (1998) Eukaryotic transcription factors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:41-48. Principalmente con énfasis estructural.

Tsukiyama, T. y C. Wu (1997) Chromatin remodeling and transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7:182-191.

Procesamiento, corte y empalme del mRNA

Breitbart, R. E., A. Andreadis y B. Nadal-Ginard (1987) Alternative splicing: A ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein iso forms from single genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56:467-495.

Hoffman, M. (1991) RNA editing: What's in a mechanism? *Science* 253:136-138.

Patrusky, B. (1992) The intron story. *Mosaic* 23:23-33. Una descripción de fácil lectura sobre el descubrimiento del sistema de corte y empalme alternativo.

Sharp, P. A. (1994) Split genes and RNA splicing. *Cell* 77:805-815.

Traducción en los eucariotas

Kozak, M. (1992) Regulation of translation in eukaryotes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:197-225.

Thach, R. E., ed. (1990) *Translationally Regulated Genes in Higher Eukaryotes.* Karger Press, Farmington, Conn. Una buena colección de artículos sobre diversos aspectos de la regulación a nivel de la traducción.

Trachsel, E., ed. (1991) *Translation in Eukaryotes.* CRC Press, Boca Raton, Fla.

Direccionamiento de las proteínas

Bennett, M. K. (1995) SNAREs and the specificity of transport vesicle targeting. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7:581-586.

Farquhar, M. G. y G. E. Palade (1998) The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell. Biol.* 8:2-10.

Haucke, V. y G. Schatz (1997) Import of proteins into mitochondria and chloroplasts. *Trends Cell. Biol.* 7:103-106. Una descripción clara de las características especiales de este tipo de transporte.

Hendrick, J. P. y F.-U. Hartl (1993) Molecular chaperone functions of heat shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 62:349-384. Cubre una amplia área, incluyendo los papeles de las HSP en la translocación de proteínas.

Lingappa, V. R. (1991) More than just a channel: Provocative new features of protein traffic across the ER membrane. *Cell* 65:527-530.

Weber, J., B. V. Zemelman, J. A. McNew, B. Westermann, M. Gmachi, F. Parlati, T. H. Söllner y J. E. Rothman (1998) SNARE pins: Minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92:759-772.

Degradación proteica y apoptosis

Ciechanover, A. (1987) Regulation of the ubiquitin-mediated proteolytic pathway: Role of the substrate α-NH_2 group and transfer RNA. *J. Cell. Biochem.* 34:81-100.

Goldberg, A. L. (1995) Functions of the proteasome: The lysis at the end of the tunnel. *Science* 268:522-523. Véase también el artícu-

lo siguiente de Weissman et al., en el que se compara el proteasoma con el GroEL.

Groll, M., L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtier, H. P. Bartunik y R. Huber (1997) Structure of the 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386:463-471. Un logro cristalográfico señalado.

Jentsch, S. y H. D. Ulrich (1998) Ubiquitous déjà vu. *Nature* 395:321-322. Un breve resumen de algunos avances importantes recientes de la degradación proteica.

Martins, L. M. y W. C. Earnshaw (1997) Apoptosis: Alive and kicking in 1997. *Trends Cell. Biol.* 7:111-114.

Tan, X. y J. Y. J. Wang (1998) The caspase-RB connection in cell death. *Trends Cell. Biol.* 8:116-120.

Genes homeóticos y caja homeo

Gehring, W. J., M. Affolter y T. Buerglin (1994) Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 63:487-526.

Kessel, M. y P. Gruss (1990) Murine developmental control genes. *Science* 249:373-379.

PROBLEMAS

1. El cromosoma humano promedio contiene aproximadamente 1×10^8 pb de DNA.
   (a) Si cada par de bases tiene una masa de unos 660 dalton, y hay unos 2 g de proteína (histonas y no histonas) por gramo de DNA, ¿cuánto pesa un cromosoma, en gramos?
   (b) Si se extendiera el DNA, ¿qué longitud tendría?
   (c) Un cromosoma real tiene unos 5 μm de longitud. ¿Cuál es la relación de compactación aproximada?
   (d) En el cuerpo humano hay unas 10^{12} células. Teniendo en cuenta que en cada célula hay 46 cromosomas, ¿cuál es la longitud aproximada de *todo* el DNA del cuerpo? Compare esta longitud con la distancia entre la tierra y el sol, que es de aproximadamente 1.5×10^8 km.

*2. Se desea aislar, a partir de cultivos de células de mamíferos, DNA enriquecido en orígenes de replicación, para la posterior clonación y análisis de secuencia. Describa cómo podría haberse realizado utilizando cualquier combinación de técnicas de marcaje de densidad, marcajes radiactivos y sincronización celular, junto con métodos de separación por centrifugación.

3. La formación de los nucleosomas y su envoltura en una fibra de 30 nm proporcionan parte de la compactación del DNA en la cromatina. Si la fibra contiene aproximadamente seis nucleosomas en cada 10 nm de longitud, ¿cuál es la relación de compactación aproximada que se alcanza? Comente la comparación de esa respuesta con la del Problema 1c.

*4. Se pueden "reconstituir" nucleosomas mezclando el DNA y los octámeros de histonas en NaCl 2M y dializando luego para reducir la sal. Cuando se realizaron estos experimentos con el empleo de un fragmento específico de 208 pb del DNA del erizo de mar se obtuvieron los siguientes resultados: la digestión del producto con nucleasa micrococica dio una producción cuantitativa de 146 pb de DNA. Al romper este DNA con una nucleasa de restricción que tiene un único lugar de acción en el fragmento, se obtuvieron varias bandas bien definidas, con los siguientes tamaños: 29 pb, 39 pb, 107 pb, 117 pb. ¿Cómo podrían interpretarse estos datos en cuanto a la situación de los nucleosomas en este DNA?

5. Una muestra de cromatina se digirió parcialmente con la enzima nucleasa estafilocócica. Los fragmentos de DNA obtenidos en esta digestión se purificaron y se analizaron en un gel de poliacrilamida. Se utilizaron como marcadores una serie de fragmentos de restricción de DNA. En la tabla que sigue se indican las distancias de migración. A partir de estos datos, calcule la distancia de repetición de los nucleosomas en la cromatina.

Fragmento de DNA marcador		Fragmento de DNA de la cromatina
Tamaño (pb)	*d* (cm)	*d* (cm)
94	40	30.5
145	34.2	19.2
263	25.2	14.4
498	16.7	11.5
794	11.5	—

*6. La desoxirribonucleasa pancreática I (DNasa I) es una nucleasa que produce mellas de una sola cadena en el DNA de doble cadena. Se ha observado que el tratamiento de partículas centrales nucleosómicas con DNasa I produce un resultado peculiar. Cuando el DNA obtenido en esta digestión se estudia mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes, se observa que los fragmentos de una sola cadena se producen con una periodicidad regular de unas 10 bases. Sugiera una explicación de este resultado en función de la estructura del nucleosoma.

7. Algunos virus, como el SV40, son DNA circulares cerrados que contienen nucleosomas. Si el virus SV40 se trata con topoisomerasa, y se eliminan las histonas, se observa que continúa estando superenrollado. Sin embargo, si se eliminan las histonas *antes* del tratamiento con la topoisomerasa, el DNA está relajado. Explíquelo.

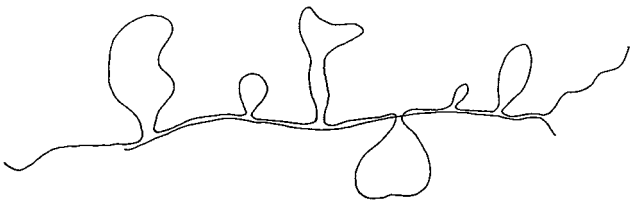
8. (a) ¿Cuánto tiempo sería necesario para replicar el cromosoma humano promedio descrito en el Problema 1 a partir de un único origen de replicación, si una horquilla de replicación se desplaza aproximadamente a 6 kb/min? (Éste es probablemente el límite superior de la velocidad.)
   (b) Los datos existentes sugieren que los orígenes de replicación están separados por unos 100 kb en muchos DNA eucariotas. ¿Cuánto tiempo requerirá, pues la replicación? Compare la respuesta con el hecho de que la fase S de la mayor parte de las células dura varias horas, y sugiera una explicación para la discrepancia.

9. De entre los genes de los eucariotas, los correspondientes a las histonas tienen la peculiaridad de que no poseen intrones, y los mRNA de las histonas no tienen colas poli(A). Además, en casi todos los eucariotas, los genes de las histonas están dispuestos en múltiples dominios en tándem, de manera que cada dominio lleva una copia de cada uno de los cinco genes de las histonas. Sugiera una explicación para estas características en función de las necesidades especiales de la síntesis de histonas.

10. Hace algunos años se sugirió que la función de la cola de poli(A) en un mensaje eucariota podía ser la de "marcar" el mensaje. Es decir, cada vez que se emplea el mensaje, se eliminan uno o varios residuos, y el mensaje se degrada después de que la cola se acorta por debajo de una longitud crítica. Sugiera un experimento para poner a prueba esta hipótesis.

*11. Se ha propuesto que los nucleosomas deben eliminarse para que se produzca la transcripción a través de la cromatina. Sugiera un experimento que pudiera probar esta hipótesis.

12. Se muestra a continuación un bucle R preparado para microscopia electrónica mediante el alineamiento de un RNA mensajero eucariota purificado con DNA de un clon genómico que contiene el gen completo correspondiente al mRNA.



(a) ¿Cuántos exones contiene el gen? ¿Cuántos intrones?

(b) ¿En qué lugar de esta estructura sería de prever encontrar un enlace 5′,5′-internucleótido? ¿Dónde sería de prever encontrar una secuencia de ácido poliadenílico?

13. Sugiera los efectos que pueden tener las siguientes mutaciones (en el caso de que hayan de tener alguno):
(a) Mutación del G 3′ de un intrón.
(b) Una mutación que impida la unión de U1 al mRNA.
(c) Una mutación que elimine la secuencia señal N-terminal de una proteasa destinada a los lisosomas.

14. Aunque la hidrólisis proteica es un proceso termodinámicamente favorable, la hidrólisis selectiva de las proteínas marcadas con ubiquitina requiere ATP. Sugiera por qué debe ser ello necesario.

15. En la degradación de las proteínas por la ruta de la ubiquitina (Figura 28.42), tan sólo los pasos 1 y 4 dependen del ATP. ¿Por qué estos dos pasos y no otros?

HERRAMIENTAS DE LA BIOQUÍMICA 28A

Descubrimiento de factores de unión y secuencias de unión

En este capítulo y en los precedentes hemos visto que un gran número de secuencias de DNA unen proteínas específicas, y que estas interacciones son importantes. Frecuentemente nos encontramos con la siguiente pregunta: ¿se une una proteína concreta de manera específica a una secuencia concreta? Una pregunta más general es la siguiente: dada una determinada proteína, ¿a qué secuencia es más probable que se una? Algunas técnicas nuevas han permitido obtener respuestas rápidas a estas preguntas.

Retardo electroforético

El **retardo electroforético**, al que a veces se denomina **retardo en gel** o **desviación en gel**, es una técnica sencilla y rápida. Un fragmento clonado de DNA (preferiblemente corto, por ejemplo de 50 a 300 pb) se mezcla con la proteína (o mezclas de proteínas) a estudiar, y se somete a electroforesis en gel de acrilamida en condiciones no desnaturalizantes. El DNA suele estar marcado radiactivamente. El DNA desnudo se analiza en otra calle como control. Si se produce la unión de la proteína, se obtiene el tipo de resultado que se muestra en la Figura 28A.1. La unión produce una reducción de la movilidad electroforética, con la producción de una o varias bandas de migración lenta. En el ejemplo que se muestra, se obtienen pruebas de la existencia de dos lugares de unión en el fragmento de DNA en cuestión.

El estudio puede perfeccionarse de diversas formas. Así, por ejemplo, si se utiliza una mezcla de proteínas (un lisado celular, por ejemplo), puede determinarse la identidad de la proteína de unión realizando transferencias Western con los anticuerpos adecuados. Con cuidado pueden hacerse cálculos semicuantitativos de la fuerza de la unión midiendo la fracción de DNA en las distintas bandas.

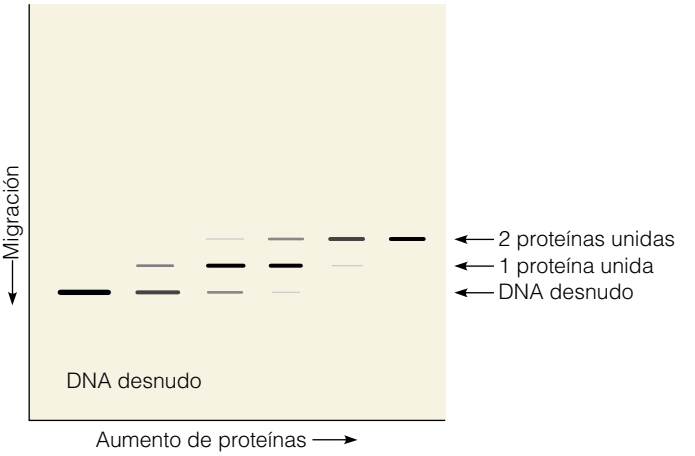


FIGURA **28A.1**

Retardo electroforético en un caso en el que dos moléculas proteicas están unidas a una secuencia de DNA.

Técnicas de selección para determinar secuencias de consenso

Supongamos que tenemos una proteína que se sospecha se une a una secuencia de DNA específica, o más exactamente, a una clase de secuencias semejantes. ¿Cómo puede determinarse de qué tipo de secuencia se trata? Recientemente se han puesto a punto diversos métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, véase Herramientas de la Bioquímica 24A). Un ejemplo es el siguiente. Supongamos que se deseara sintetizar un conjunto de secuencias como las que se muestran en la Figura 28A.2. Este conjunto contiene dos secuencias definidas en los extremos 5′ y 3′, que flan-

FIGURA **28A.2**

Tipo de secuencia que podría utilizarse para la selección de una secuencia de consenso mediante el empleo de la PCR. Se han subrayado los lugares de restricción.

Cebador A 5′
GAGCTGGATCCTACTCAGGTGA

GAGCTGGATCCTACTCAGGTGA—25 "N" bases—GTCTGGAATTCCAGGGCACTGC
Molde aleatorio

CAGACCTTAAGGTCCCGTGACG
Cebador B 3′

quean una secuencia *completamente aleatoria* de longitud definida. En otras palabras, el sintetizador comienza construyendo un oligonucleótido definido, añade nucleótidos aleatoriamente, y termina con la adición de otro nucleótido definido. Las secuencias "cebadoras" se sintetizan también de manera que se correspondan con estas regiones 5′ y 3′.

La colección de DNA oligoméricos se mezcla entonces con la proteína en cuestión, y las pocas secuencias que se unen bien se capturan mediante retardo electroforético o unión a un filtro y, de esta forma, separados del DNA no unido. Estas secuencias se amplifican posteriormente mediante PCR, utilizando los cebadores indicados, y se repite el ciclo varias veces. Véase la Figura 28A.3. Si la proteína se une a una secuencia de consenso, los productos finales obtenidos después de varios ciclos contendrán principalmente moléculas con secuencias muy similares a ésta.

En este punto, se rompe el DNA con una nucleasa de restricción, que corta en dos lugares de restricción incorporados en las regiones de flanqueo y se une a un plásmido en el que puede clonarse. La secuenciación de una serie de clones debe permitir establecer la naturaleza de la secuencia de consenso, que deberá ser representativa de la secuencia de DNA unida específicamente por esta proteína.

Bibliografía

Lane, D., P. Prentki y M. Chandler (1992) Use of gel retardation to analyze protein nucleic acid interactions. *Microbiol. Rev.* 56:509-528.

Wright, W. E., M. Binder y W. Funk (1991) Cyclic amplification and selection of targets (CASTing) for the myogenin consensus binding site. *Mol. Cell. Biol.* 11:4104-4110.

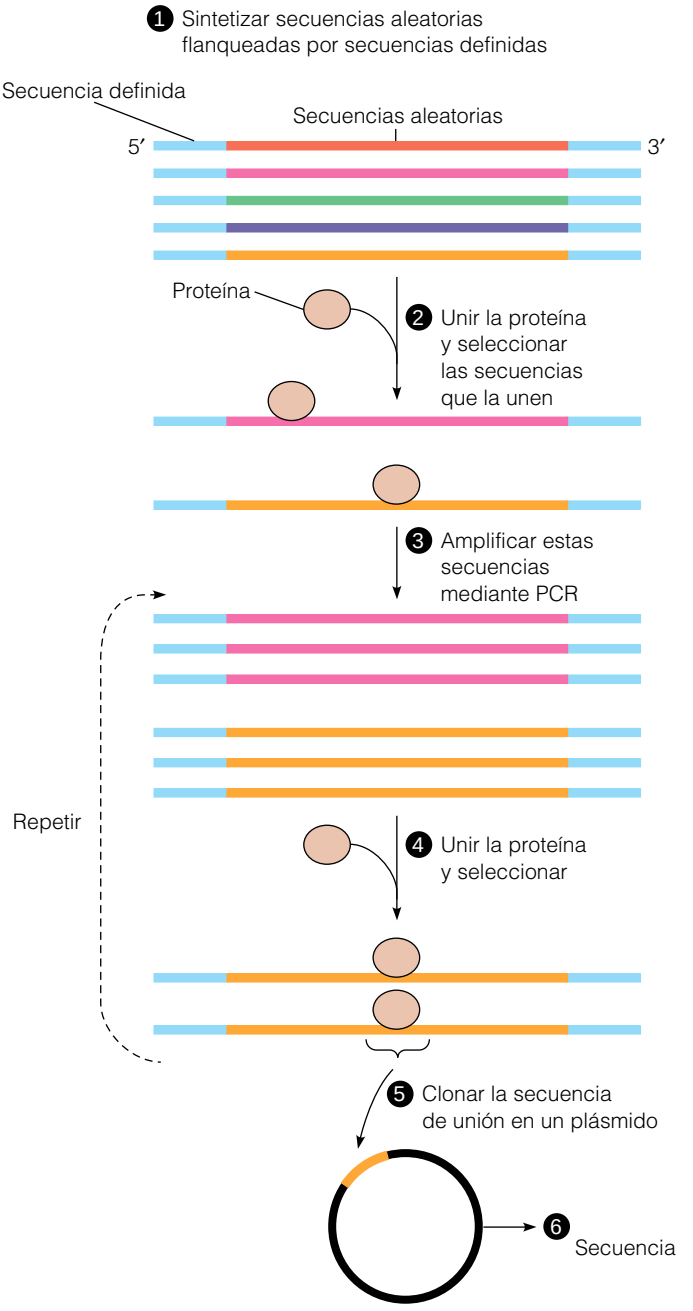


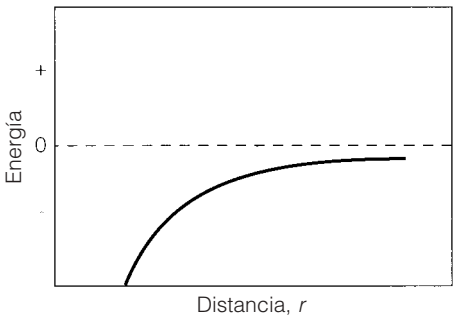
FIGURA **28A.3**

Esquema del uso de las secuencias como las de la Figura 28A.2 para identificar secuencias de consenso que se unen a una determinada proteína de unión al DNA.

Respuestas a los problemas

CAPÍTULO 2

1. (a) 3.54 kJ/mol.
   (b) 151 kJ/mol.
2. CCl_4, H_2S, $H_3\overset{+}{N}—CH_2—COO^-$, $H_3\overset{+}{N}—CH_2—CH_2—CH_2—COO^-$. CCl_4 es simétrico, $\mu = 0$; H_2S será comparable a H_2O; los dos últimos implican la separación de cargas completas, y en el último la separación es la mayor.
3. El gráfico será un reflejo del gráfico dado, a través de la línea $E = 0$.



4. (a) $K_a = \dfrac{[H^+][A^-]}{[HA]} = \dfrac{X^2}{A_0 - X}$

$$K_aA_0 - K_aX = X^2$$

o $X^2 + K_aX - K_aA_0 = 0$

$$X = \frac{-K_a \pm \sqrt{K_a^2 + 4K_aA_0}}{2}$$

(b) En primer lugar, suponer que $X << A_0$ y obtener

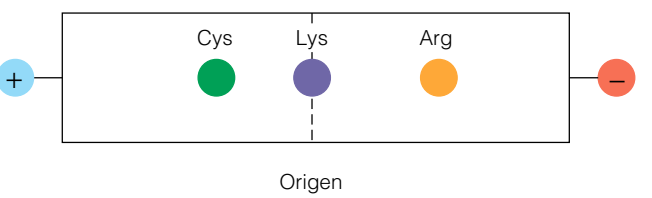
$$X^2 \cong K_aA_0, \qquad X \cong \sqrt{K_aA_0}$$

Utilizar esta X aproximada para obtener una aproximación mejor para el denominador $(A_0 - X)$. Repetir el cálculo hasta que el cambio en cada paso sea menor que la precisión requerida.

Si K_a es muy pequeña (ácido débil), bien lo anterior o la aproximación directa proporcionan

$$[H^+] \cong \sqrt{K_aA_0}$$

5. (a) pH = 0.456
   (b) pH = 2.608 mediante aproximación, 2.609 exactamente
   (c) pH = 3.108 mediante aproximación, 3.113 exactamente.
6. (a) $K_a = 8.16 \times 10^{-5}$.
   (b) pH = 2.39.
7. Elegir una serie de unos 10 puntos en los que se han añadido volúmenes de KOH para neutralizar las fracciones crecientes del ácido. Utilizar la ecuación de Henderson-Hasselbalch para calcular el pH en cada punto.
8. (a) pH = 4.46.
   (b) pH = 2.57.
9. (a) 0.138 M.
   (b) $[KH_2PO_4] = 0.126$ M; $[Na_2HPO_4] = 0.174$ M.
10. pH = 3.93.
11. La mejor opción sería una mezcla de $H_2PO_4^-$ y $H_2PO_4^{2-}$, que tiene un valor de $pK_a = 6.86$.
12. Se disolverán 2×7.507 g de glicina en los 2 L para obtener una disolución 0.1 M. Para obtener un pH de 9.0, la ecuación de Henderson-Hasselbalch indica que la proporción $Gly^-/Gly^{\pm}$ debe ser de 0.251. Esto puede alcanzarse mediante la adición de NaOH a una concentración de 0.02 M. Para 2 L, ello requeriría 0.04 moles, es decir 40 mL de NaOH 1 M.
13. 8.5% como H_2CO_3. Muy poco CO_3^{2-}.
14. (a) $B = (A_0/2.303)f(1 - f)$.
    (b) Cuando $f = 0.5$.
    (c) $A_0/9.2/2$.
    (d) Aumentando A_0 aumenta B.
15. pI = 11.1. La forma I solo estará presente en cantidades insignificantes por encima de pH 7.
16. Dada la potencia de atracción protónica del dianión producido cuando se han disociado dos de los protones del ácido cítrico, el tercero se mantiene con una fuerza anómala. De hecho, tiene un pK_a de 6.86.
17. La fuerza iónica de $(NH_4)_2SO_4$ 1 M es 3.0.
18. La lisina tiene un pI de aproximadamente 9.5. Así pues, no migraría a pH 9.5, mientras que la cisteína con una cadena lateral de pK_a 8.3 portaría una carga negativa parcial a este pH, y la arginina, con su cadena lateral con un pK_a muy alto (12.5) tendría una intensa carga positiva.



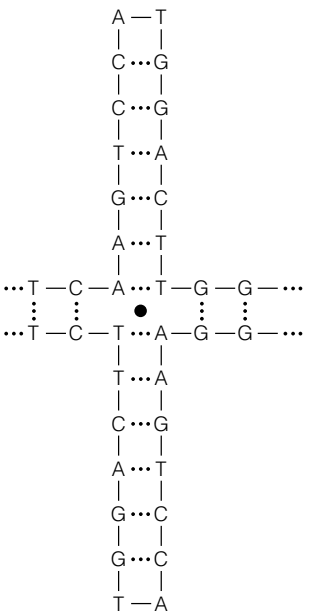
19. (a) Enfoque isoeléctrico. La diferencia de una carga produciría una diferencia pequeña de la movilidad, pero una diferencia de pI detectable.
    (b) Cerca del pI.

CAPÍTULO 3

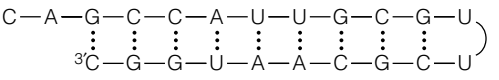
1. $\Delta H_f - \Delta E_f = -0.165$ J/mol, $\left(\dfrac{\Delta H_f - \Delta E_f}{\Delta E_f}\right) \times 100 = 0.003\%$
2. (a) +926 kJ/mol.
   (b) 463 kJ/mol.
3. (a) $\Delta S° = +470$ J/K·mol.
   (b) Un material sólido se está transformando completamente en gases. La mayor libertad de movimiento de las moleculas gaseosas produce un aumento de entropía.
   (c) $\Delta E° = 103.4$ kJ/mol.
   (d) Porque el sistema realiza trabajo sobre los alrededores al expandirse de un sólido a un gas.
4. (a) $\Delta G° = -2872$ kJ/mol.
   (b) $\Delta G° = -1694$ kJ/mol.
   (c) 41%.
5. (a) 1.1×10^4 mM.
   (b) $\Delta G°' = -17$ kJ/mol.
   (c) 11 M. No se alcanza nunca ya que la glucosa-6-fosfato se consume de manera continua en otras reacciones. El sistema nunca alcanza el equilibrio.
6. (a) $K = 5.44 \times 10^{-2}$; $(f_{G3P})_{eq} = 0.052$.
   (b) $\Delta G = -4.37$ kJ/mol.
7. (a) ΔS debe ser positivo, puesto que el aumento de los estados posibles corresponde a un aumento de la entropía.
   (b) Dado que $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, un valor de ΔS positivo contribuye negativamente al ΔG (T es siempre un número positivo). Así pues, para que las proteínas sean estables, lo cual requiere un ΔG para lo anterior que sea positivo, la desnaturalización debe comportar un gran ΔH positivo y/o una contribución negativa adicional a ΔS. Como veremos en el Capítulo 6, se producen ambas cosas.
8. Este proceso debe corresponder a una disminución de la entropía ($\Delta S < 0$), puesto que se establece orden en la estructura del H_2O.
9. (a) Es de prever que el valor de ΔS para la desnaturalización sea positivo, puesto que se pierde orden. Si ΔH es también positivo (se requiere energía para romper los enlaces internos), tenemos la situación +,+ de la Tabla 3.3.
   (b) Si hay muchos residuos hidrófobos en una proteína, el valor de ΔS podría ser negativo para el desplegamiento (véase el Problema 9). Si ΔH fuera también negativo, tendríamos la situación –,– de la Tabla 3.3.
10. Dado $\Delta G° = \Delta H° - T\Delta S°$ y $\Delta G° = -RT \ln K$, la combinación y el reordenamiento producen el resultado deseado, que se denomina ecuación de van't Hoff. Según la ecuación, si $\Delta H°$ y $\Delta S°$ son independientes de la temperatura, un gráfico de ln K frente a $1/T$ debe ser una línea recta con una pendiente $-\Delta H°/R$.
11. (a) $\Delta H° = +59.0$ kJ/mol.
    (b) $\Delta S° = -103$ J/K·mol. Para obtener el valor verdadero de K, con objeto de determinar $\Delta G°$, debe dividirse K_w por 55.5, que es la concentración molar del agua pura.
12. (a) $K = 16.8$.
    (b) Hacia la glucosa-1-fosfato.
13. No, puesto que la repulsión entre ADP^{2-} y P_i^{2-} es menor que la existente entre ADP^{3-} y ADP^{2-}, y la liberación de un H^+ modificará también el valor.
14. (a) 2.18×10^3 kJ.
    (b) 70 moles.
15. 217 g.
16. Para un mol de moléculas de proteína, $\Delta S \times R \ln W - R \ln 1$, donde W es el número de conformaciones disponibles para cada una y R es la constante de los gases, 8.314 J/K·mol. Como hay 99 enlaces entre 100 residuos, $W = 3^{99}$.
    (a) $\Delta S = 9.04 \times 10^2$ J/K·mol.
    (b) $\Delta H = 292$ kJ/mol.
    (c) Aumento, ya que ΔS y ΔH son ambos positivos.
17. (a) 5.93×10^{-6} kJ.
    (b) -5.93×10^{-6} kJ.
    (c) En (a) 1.91×10^{-7} moles de ATP, en (b) ninguno.

CAPÍTULO 4

1. (a) Debe ser un DNA de una sola cadena, puesto que no se cumplen las reglas de Chargaff.
   (b) Debe ser fundamentalmente un ovillo aleatorio, tal vez con algo de autoenlace en horquillas, etc.
2. (a) $^{3'}$TGGCATTCCGAAATC$^{5'}$.
   (b) $^{5'}$pApCpCpGpTpApApGpGpCpTpTpTpApGp$^{3'}$.
   (c) $^{3'}$UGGCAUUCCGAAAUC$^{5'}$.
3. El centro de simetría se indica en la figura de la derecha mediante un punto negro grande.



4. $W \cong -2.65 \times 10^4$.

5. 

6. Será la forma A, es decir 1313 nm.

7. (a) 200.
   (b) $\sigma = -0.06$.

8. 20 pares de bases corresponde a 2 vueltas del B-DNA con +1 giro/vuelta, y 1.7 vueltas de Z-DNA con –1 giro/vuelta. En consecuencia, (a) $\Delta T = -3.7$, (b) $\Delta L = 0$, (c) $\Delta W = +3.7$.

9. El virus de Epstein-Barr debe tener la máxima; el virus del mosaico de la coliflor o el cromosoma de la mosca de la fruta, la mínima.

10. (a) El DNA debe ser de una sola cadena.
    (b) Debe haber pequeñas regiones con apareamiento de bases autocomplementario.

11. Aproximadamente 60% GC.

12. (a) Debe requerir 3 vueltas en una repetición, para dar un número entero. El número = 28 pb/repetición.
    (b) Más estrechamente.
    (c) Desfavorece.

13. La distribución indica la presencia de moléculas superhelicoidales con $\Delta L = \pm 1, \pm 2, \pm 3$, etc. Éstas podrían formarse como consecuencia de fluctuaciones de la estructura en el momento en que se cierra el círculo. Proporciona una demostración directa de la distribución de Boltzman de las energías moleculares.

14. (a) Positiva ya que L es fija (=0) y ΔT se hace negativo por el etidio.
    (b) Ninguna.
    (c) El retorcimiento positivo producido por el etidio disminuye el retorcimiento negativo hasta que $W = 0$; esta estructura tendrá una movilidad mínima dado que está más extendida que la forma retorcida. Al añadir más etidio, el DNA se retuerce positivamente, aumentando de nuevo la movilidad.

CAPÍTULO 5

1. 109.5.

2. (a) SYSMEHFRWGKPV.
   (b) 1624. Esto no es exactamente correcto, ya que no tiene en cuenta la disociación de algunos protones.

3. (a) La curva presentará inflexiones correspondientes a dos grupos que se titulan cerca de 4 (carboxilo terminal y cadena lateral glutámica), un grupo cerca de 7 (histidina), dos cerca de 9 (N-terminal y lisina), uno cerca de 10 (tirosina) y uno cerca de 12 (arginina).
   (b) Aproximadamente –2, +2, +4.
   (c) pI ≅ 9.

4. (a) SYSMEHFR, WGKPV.
   (b) SYSM*, EHFRWGKPV; M* = homoserina lactona.
   (c) SYS, MEHFRWGKPV.

5. DSGPYKMEHFRWGSPPKD.

6. (a) –1 a pH 7; –4 a pH 12.
   (b) (1) 2; (2) ausencia de ruptura; (3) 3.
   (c) Electroforesis o cromatografía en una columna catiónica a pH 7.

7. Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-Met-Pro-Phe.

8. AC.

9. (a) 2.
   (b) Entre la primera y la segunda, y entre la tercera y la cuarta cisteínas.

10. (a) Una posibilidad, de entre muchas:

    ···UGUAAUUGUAAAGCGCCCGAGACCGCGCUUU
    GUGCUCGACGAUGUCAACAACAU···

    (b) Dado que no tiene una metionina N-terminal, al menos parte de la ruptura proteolítica debe intervenir en su síntesis.

11. Met-Phe-Pro-Ser-Tyr-Pro-Lys-Asp-Lys-Lys-Glu-

12. (a) Bien el N-terminal está bloqueado (como, por ejemplo, por acetilación) o el péptido es cíclico.
    (b) Si el péptido no es cíclico, habrá un C-terminal libre. En la mayoría de los casos (excepto si es Pro) puede ser atacado por la carboxipeptidasa A. Otra posibilidad, si el péptido es cíclico, es que puede encontrarse alguna proteasa que lo romperá sólo una vez, dando un N-terminal libre para permitir la secuenciación.

13. Dado que la cadena A no contiene residuos básicos y que la cadena B contiene varios, funcionarán bien el enfoque isoeléctrico, la electroforesis o la cromatografía de intercambio iónico. Obsérvese que la separación será mejor a alrededor de pH = 5, donde las histidinas de la cadena B están cargadas positivamente y los glutamatos de la cadena A son negativos.

14. El coeficiente de sedimentación no es directamente proporcional a la masa molecular y depende *tanto* de la masa como del tamaño y la forma de la molécula proteica. Por lo tanto, no existe razón por la que los coeficientes de sedimentación deban ser aditivos.

CAPÍTULO 6

1. (a) Hacia la izquierda.
   (b) 3.0.

2. Si la hélice se distorsionara para tener 3.5 residuos/vuelta, una leucina podría proyectarse en la misma cara cada 2 vueltas. Las leucinas de las dos cadenas proporcionarían las caras hidrófobas para la interacción. Esta estructura se denomina *cremallera de leucina.*

3. (a) Las cuatro hélices pueden disponerse de tal manera que las cadenas laterales hidrófobas apunten hacia el centro del haz

y queden juntas allí (véase el Problema 2). Esto proporcionaría un núcleo hidrófobo de estabilización.
(b) Una prolina en este punto rompería la hélice cerca de los lugares de unión de Fe_2. Ello haría probablemente que el Fe_2 no se uniera, y la proteína mutante no sería funcional.
(c) Un enrollamiento inicial de la cadena en cuatro regiones helicoidales consecutivas, seguida de un plegamiento de las mismas, facilitado tal vez por la unión de Fe_2.

4. Están espaciados por unos tres o cuatro residuos. En consecuencia, se encontrarán en el mismo lado de la hélice α. Esto sugiere que este lado de la hélice puede estar situado frente al interior de la proteína.

5. En la forma desplegada de la proteína, la mayor parte de sus donadores y aceptores de hidrógeno pueden establecer enlaces de H con el agua. En consecuencia, es tan sólo la *diferencia* de energía de unión del hidrógeno lo que contribuye a la estabilidad de la proteína.

6. (a) $3^{200} = 2.7 \times 10^{95}$.
(b) No todas estas conformaciones serán estéricamente posibles. Pero aunque sólo lo fuera un 0.1%, continúa habiendo 2.7×10^{92}, que es un número muy elevado.

7. (a) $\Delta S_{\text{plegamiento}} = S_{\text{plegado}} - S_{\text{desplegado}}$
$= R \ln W_{\text{plegado}} - R \ln W_{\text{desplegado}}$
$= 8.314 \text{ J/K·mol} \times [\ln 1 - \ln(2.7 \times 10^{92})]$
$= -1769 \text{ J/K·mol} = -1.77 \text{ kJ/K·mol}$
(b) $\Delta H_{\text{plegamiento}} = 96 \times (-5 \text{ kJ/mol}) = -480 \text{ kJ/mol}$
(c) $\Delta G_{\text{plegamiento}} = \Delta H_{\text{plegamiento}} - T\Delta S_{\text{plegamiento}}$
$= -480 \text{ kJ/mol} - 298 \text{ K}(-1.77 \text{ kJ/K·mol})$
$= +47 \text{ kJ/mol}$

Dado que $\Delta G_{\text{plegamiento}} > 0$ a 25°, la proteína no sería estable. Sería estable a 0°C. Ello resalta la importancia de las fuentes de estabilización distintas de los enlaces de H del armazón.

8. Una hélice α a partir de los residuos 4-11, una lámina β entre 14-19 y 24-30. Muy probablemente exista una vuelta β que afecta a los residuos 20-23.

9. (a) C_4, mantenido unido mediante una interacción heteróloga, o D_2, mantenido unido mediante una interacción isóloga.
(b) C_2, puesto que cada dímero $\alpha\beta$ forma una unidad asimétrica.

10. (a) C_8, D_4.
(b) D_4, puesto que comporta más interacciones subunidad-subunidad.
(c) Ambas. Debe haber interacciones heterólogas alrededor del eje cuádruple e interacciones isólogas alrededor de los ejes dobles.

11. La medición mediante dicroismo circular detectará tan sólo el desplegamiento de la estructura terciaria en las subunidades. La calorimetría captará también la energía requerida para la degradación de la estructura cuaternaria.

12. (a) Utilizando los datos de la Tabla 5.1, calculamos el peso molecular de 1072. Una solución de 1 mg/cm^3 será 9.33×10^{-4} M. En la Figura 5.6, se aprecia que el coeficiente de extinción molar de Tyr es ~1000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La Phe no contribuye de manera apreciable. En consecuencia, ε es 0.93 cm^2/mg.
(b) 2.8 mg/cm^3.
(c) 5%.

13. En ausencia de BME, se obtiene una sola banda de $M \cong 70\,000$. Esto sugiere, aunque no demuestra, que hay dos subunidades idénticas unidas de manera no covalente. Sin embargo, la adición de BME elimina esta banda y produce dos bandas de $M \cong 30\,000$ y $\cong 40\,000$, respectivamente. La suma de ambas es 70 000, lo que sugiere claramente que la molécula nativa contiene cuatro subunidades, dos de $M \cong 30\,000$ y dos de $M \cong 40\,000$. Las unidades de 30 000 y 40 000 están unidas mediante un enlace o enlaces disulfuro.

14. 154 000 g/mol.

15. El hecho de que la reacción con disulfuro tenga poco efecto significa que la proteína tiene una sola cadena. Debe tener una estructura extendida, que la ruptura en un residuo crítico de Arg puede relajar, dando una migración más rápida; los fragmentos se mantienen aún juntos por los enlaces disulfuro. Su rotura tras el tratamiento con trombina, proporciona dos fragmentos.

16. Suponiendo que no es práctica la difracción de rayos X, tenemos
(a) Análisis por DC o por RMN.
(b) Equilibrio de sedimentación.
(c) Puede observarse más de un plegado secundario/terciario para la misma secuencia. Por lo tanto, la secuencia sólo no puede dictar el plegado en todos los casos y las predicciones basadas en la secuencia pueden a veces fallar.

CAPÍTULO 7

1. (a) 2.6 mm.
(b) Alrededor del 94%.

2. (a) Disminución.
(b) Aumento.
(c) Disminución.

3. (a) (1) 98%; (2) 56%.
(b) Alrededor del 42%.
(c) Alrededor del 70%.

4. Los iones cloruro deben interaccionar con los grupos con carga positiva para estabilizar el estado desoxi. Por tanto, cuanto mayor sea la concentración de Cl^-, menor será la afinidad de la hemoglobina por el O_2.

5. (a) $P_{50} = 4.47$ mm. (Nota: Este valor muy bajo es consecuencia del desplegamiento, junto con el hecho de que la temperatura es inferior a la fisiológica (37°C).)
(b) $n_H \cong 3.5$.
(c) $P_{50T} = 28$ mm; $P_{50R} = 0.022$ mm. Estos valores se obtienen extrapolando las líneas limitantes tangenciales a los extremos de la representación de Hill.

6. La concentración de hemoglobina puede influir en la afinidad únicamente si se produce la disociación o la asociación de la proteína. La disociación más probable es a dímeros $\alpha\beta$, que habrán perdido parte de las interacciones que estabilizan el estado T. Así pues, la afinidad debe aumentar y el valor de P_{50} debe disminuir.

7. (a) $P_{50} = 125$ mm.
(b) $n_H = 3.1$.
(c) Dado que $n_H = 3.1$, debe haber al menos 4 lugares, puesto que $n_H \leq n$. (Realmente, es una molécula inmensa, con 24 lugares de unión.)

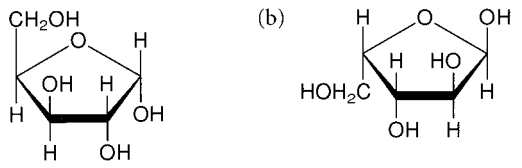
8. (a) Dado que la H146 se encuentra en la interfase α/β, la mutación deberá esperarse que interfiera con la transición T → R. El efecto es aumentar la afinidad. Esta mutación se conoce; es la *hemoglobina Hiroshima*.
   (b) Dado que F8 interviene en la unión del hemo, el hemo debe ser inestable. La leucina no se unirá al hierro del hemo.
   (c) La His de β2 interviene en la unión del DPG (véase la Figura 7.18). El cambio a Asp la debilitaría.
   En cada caso, podría bastar un solo cambio de base.
9. (a) Más rápido.
   (b) Probablemente igual.
   (c) Más rápido.
10. (a) Se iniciaría con una pendiente de aproximadamente 1 a valores bajos de log *P*, a continuación, presentaría una región con una pendiente inferior a 1, y se aproximaría a una línea con una pendiente de 1.
    (b) La teoría MWC se basa en un cambio del equilibrio de todos los lugares entre dos estados: débil y fuerte. En cambio, en la teoría KNF, un lugar puede modificar a otro lugar adyacente en ambos sentidos: hacia una unión más fuerte o más débil.
11. Una explicación posible: en la Hb nativa, la unión del oxígeno está realmente impedida por el hecho de que la tracción sobre la hélice F debe moverla contra impedimentos dentro de la molécula. En la sustitución de imidazol, no hay necesidad de realizar un mayor trabajo para mover la hélice F. Esta diferencia muestra una energía libre más favorable para la unión.
12. (a) Sí, ya que el ligamiento entre la subunidades es tal que la separación de un par de hélices favorece el movimiento de separación del otro par, facilitanto la unión del O_2 en el segundo par.
    (b) Probablemente también. La desprotonación de la His 13 destruye el puente salino, permitiendo una apertura más fácil del lugar de unión del O_2.
    (c) La molécula podría exhibir una mayor afinidad por el O_2 y probablemente menor cooperatividad, ya que los lugares del O_2 se abrirían posteriormente. Posiblemente, la estructura completa sería inestable.
13. (a) Si se multiplican ambos lados de la primera ecuación por 1 + *Kc*, se divide todo por *c* y se reagrupa, se obtiene la segunda ecuación.
    (b) De acuerdo con la segunda ecuación, la pendiente de un gráfico de *r*/*c* frente a *r* debería ser –*K*, y su intersección en *r*/*c* = 0 debería dar *n*. Utilizando los datos de esta forma, obtenemos $K = 2.2 \times 10^4\ \text{M}^{-1}$ y $n = 2.1$. Como el número verdadero de lugares debe ser entero, elegiríamos $n = 2$.
14. La integridad de los lugares de unión del anticuerpo debería estar comprometida por la estabilidad reducida de los pares cadena pesada-ligera de esta región.

CAPÍTULO 8

1. (a) En el estado relajado, hay un solapamiento de aproximadamente 0.6 μm en cada lado; en el estado contraído, es de alrededor de 0.75 μm.
   (b) Aproximadamente 20 pasos.
2. (a) 0.0033 min ≅ 0.2 s.
   (b) 0.021 min = 1.2 s.
   (c) Que la creatina fosfato debe producirse de manera continuada en el músculo activo.
3. Que el crecimiento de los filamentos de actina (que se produce en los extremos) es de algún modo esencial para la modificación de la forma celular por la actina no muscular.
4. Si la actividad GTPasa es lenta, los microtúbulos que tengan extremos de GTP podrán captar la GTP-tubulina y crecer durante un período de tiempo considerable, hasta que se hidrolice el GTP del extremo. Tenderán a reducirse mientras la liberación de GDP-tubulina continúe mostrando nuevos extremos de GDP. Así pues, segun el "estado final" (GTP o GDP), un determinado microtúbulo crecerá o se reducirá en competencia con sus vecinos.
5. Alrededor de 840 nm.
6. La observación sugeriría que pueden producirse sucesivamente varios golpes de fuerza. Sin embargo, pueden ser en distintas cabezas de miosina y el filamento de actina puede deslizarse una distancia considerable más allá de una única cabeza durante la porción del ciclo del ATP cuando está desenganchada.

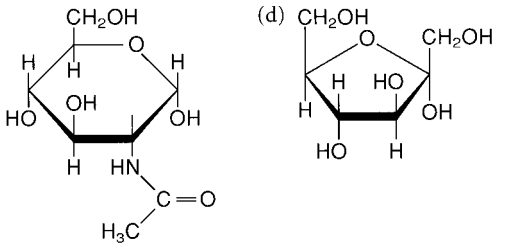
CAPÍTULO 9

1. (a) (b)

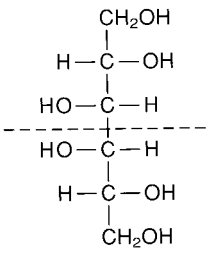


β-D-Xilofuranosa

(c) (d)



2. El galactitol tiene la estructura siguiente:



Dado que posee un plano de simetría entre C-3 y C-4, es ópticamente inactivo. Estos compuestos, que contienen carbonos asimétricos pero que carecen de una actividad óptica neta, se denominan formas *meso*.

3. En la forma de silla, hay un choque estérico mayor entre el 2-OH y el 1-OH en la forma α de la glucosa y en la forma β de la manosa. (Compárese la glucosa y la manosa con la representación de la glucosa de la Figura 9.13.) Además, las interacciones dipolo-dipolo serán más favorables en la β-D-glucosa y la α-D-manosa.

4. Para la reacción

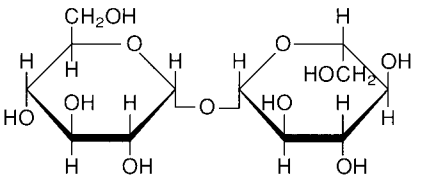
$$\alpha\text{-D-Glucopiranosa} \rightleftharpoons \beta\text{-D-glucopiranosa}$$

tenemos $K = 64/36 = 1.78$. En consecuencia

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K = -8.314 \text{ J/K·mol} \times 313 \text{ K} \times 0.577$$
$$= -1.50 \text{ kJ/mol}$$

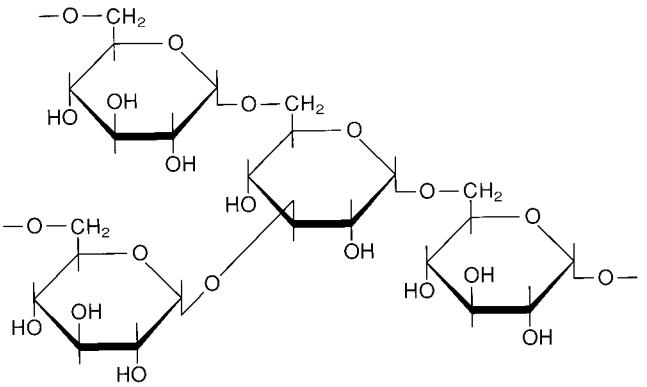
La explicación se basa en el Problema 3. Como indica la Figura 9.13, el 2-OH y el 1-OH están muy próximos en la α-D-glucosa. Además, los momentos dipolares de los dos grupos OH son más claramente paralelos en el anómero α, y antiparalelos en el anómero β. Todas estas son consideraciones fundamentalmente energéticas, por lo que ΔG deriva principalmente de una contribución de la entalpía.

5.



6. Reductor: maltosa, celobiosa, lactosa, gentiobiosa. No reductor: trehalosa, sacarosa.

7.



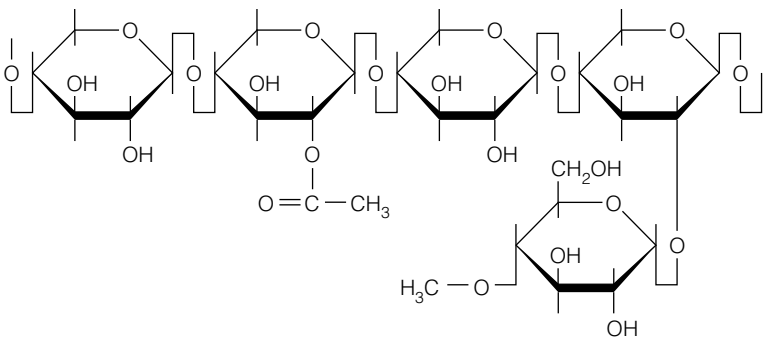
Nota: Para mayor simplicidad, los átomos de H se representan mediante barras verticales.

8. Ácido hialurónico.

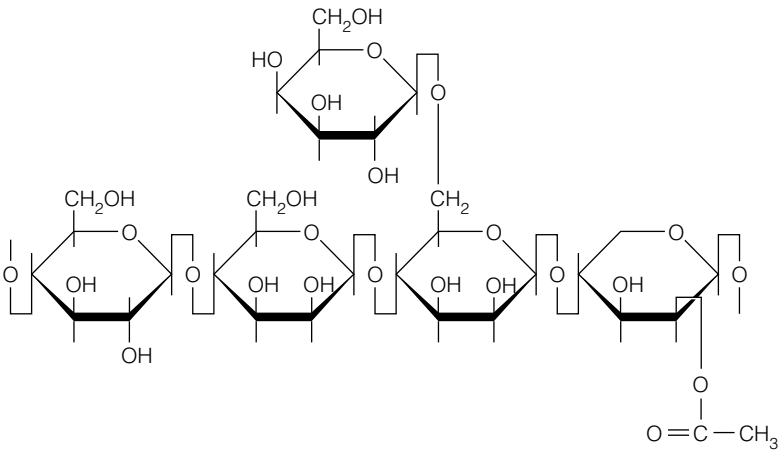
9. (a) *S*.
(b) *R*.

10. La fragmentación de la forma piranosa se producirá dos veces, dando ácido fórmico. La fragmentación de la forma furanosa también se producirá dos veces (entre C2 y C3 y entre C5 y C6) pero se producirá formaldehído de C6.

11.



Xilano



Glucomanano

12. Tal vez el enlace Gal-GlcNAC no sea β o no sea 1–4.

13. (a) a; (b) f; (c) a; (d) c; (e) d, f.

CAPÍTULO 10

1. (a) $CH_3CH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$.
   (b) $CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_9COOH$. (Éste se denomina ácido vaccénico.)
   (c) Según la Tabla 10.1, cualquiera con menos de 10 carbonos se fundirá por debajo de 30°C. Un ejemplo sería el $CH_3(CH_2)_6COOH$, ácido *n*-octanoico.
2. (a) Ácido graso, alcohol de cadena larga.
   (b) Glicerol, ácido graso.
   (c) Hidrato de carbono, alcohol de cadena larga.
3. A partir de los datos, 4.74×10^9 células tendrían una superficie total de 4.74×10^{11} $(\mu m)^2$, es decir, 0.474 m^2. La proporción del área de la monocapa respecto a la superficie celular es de 0.89 m^2/0.474 m^2, o 1.89, muy próximo a 2.00.
4. (a) 20.
   (b) La secuencia MVGALLLLVVALGIGILFM tiene 19 residuos, es muy hidrófoba y posee numerosos residuos formadores de hélice.
5. La relación de concentración es 10^5. En consecuencia
   (a) $\Delta G = 29.67$ kJ/mol.
   (b) $\Delta G = 36.4$ kJ/mol.
   En ambos casos, la hidrólisis de 1 mol de ATP (o la concentración celular) bastaría para transportar 1 mol de ion.
6. $J = -P(C_2 - C_1)$; de la Tabla 10.6, sabemos que $P = 2.4 \times 10^{-10}$ cm/s. Si expresamos $C_2 - C_1$ en mol/cm^3, J tendrá las dimensiones de mol/cm^2·s. El cálculo produce $J = 2.04 \times 10^{-14}$ mol/cm^2·s. En consecuencia, la cantidad transferida en 1 min a través de 100 $(\mu m)^2$ $(= 100 \times 10^{-8}$ $cm^2)$ será la siguiente:
$$M = -1.224 \times 10^{-18} \text{ mol}$$
7. La concentración inicial en el interior = 100 mM = 0.1×10^{-3} mol/cm^3. El volumen celular es 100 $(\mu m)^3$, es decir, 100×10^{-12} cm^3. La cantidad inicialmente presente es la siguiente:
$$M = 0.1 \times 10^{-3} \text{ mol/cm}^3 \times 1 \times 10^{-10} \text{ cm}^3 = 1 \times 10^{-14} \text{ mol}$$
   En consecuencia, el porcentaje que escapa en 1 minuto será:
$$\frac{1.224 \times 10^{-18} \text{ mol}}{1 \times 10^{-14} \text{ mol}} \times 100 = 1.224 \times 10^{-2} \%$$
   Así pues, salvo que exista un transporte facilitado, la "fuga" de K^+ de las células es muy lenta.
8. Considere el flujo de masa solamente en una dirección, con el ligando A a una concentración [A] por fuera de la membrana. Reacciona con el transportador X en la superficie de la membrana, para producir XA:
$$X + A \longrightarrow XA \qquad k = [XA]/([X][A])$$
   Si decimos que J es proporcional a la fracción de transportadores ocupados, entonces
$$J = K\frac{[XA]}{[X] + [XA]}$$
   y obtenemos
$$J = K\frac{k[A]}{1 + k[A]}$$
   Esto alcanza un valor limitante ($J = K$) a [A] elevada.
9. Si el ion calcio se mantiene a esta diferencia de concentración, debemos tener, según la ecuación (10.2), $V_{\text{dentro-fuera}} = -92$ mV. Dado que $V_{\text{dentro-fuera}}$ se define como el potencial de la parte interna menos el potencial de la parte externa, el interior del orgánulo es negativo respecto al exterior.
10. (a) –60 mV (derecha –).
    (b) +60 mV (derecha +).
    (c) 0.
11. No en (a) y (b). Sí en (c). Las concentraciones se igualarán.
12. (a) 0.28.
    (b) –72.9 mV.
13. Las subunidades que atraviesan la membrana normalmente necesitan presentar diferentes dominios a los dos lados. Así, no debería esperarse una simetría que implique ejes binarios paralelos a la superficie de la membrana (como D_n).
14. 2.65 kg de K^+, 2.35 kg de Na^+.

CAPÍTULO 11

1. Dado $\ln([A]/[A]_0) = -kt$. Cuando $t = t_{1/2}$, tenemos
$$\ln\left(\frac{1}{2}\right) = -0.693 = -kt_{1/2}$$
   En consecuencia, $t_{1/2} = 0.693/k$. La constante de proporcionalidad es 0.693.
2. La representación gráfica de $\ln([A]/[A]_0)$ frente a t da una línea curva. En consecuencia, la cinética no es de primer orden.
3. Alrededor de 1.1×10^{14}.
4. $k = 4 \times 10^9$ $(\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}$. Algunos valores de $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ se aproximan a este límite.
5. Si la proteína puede unirse a una localización aleatoria del DNA y deslizarse a lo largo del mismo hasta encontrar el lugar específico, una búsqueda unidimensional más eficiente sustituye a la búsqueda tridimensional más dificultosa.
6. Dado $d[A]/dt = -k_1[A] + k_{-1}[B]$. Teniendo en cuenta que $[B] = [A]_0 - [A]$, obtenemos
$$d[A]/dt = -(k_1 + k_{-1})[A] + k_{-1}[A]_0 \qquad (1)$$
   El segundo término de la derecha puede evaluarse a partir de la condición de equilibrio
$$-k_1[A]_e + k_{-1}[B]_e = 0 \qquad (2)$$

que, tras nuevas sustituciones, nos da

$$k_{-1}[A]_0 = (k_1 + k_{-1})[A]_e \qquad (3)$$

Introduciendo en (1), y teniendo en cuenta que $d[A]/dt = d([A] - [A]_e)/dt$, obtenemos

$$\frac{d([A] - [A]_e)}{([A] - [A]_e)} = -(k_1 + k_{-1})dt \qquad (4)$$

Tras la integración, esto da el siguiente resultado

$$[A] - [A]_e = ([A]_0 - [A]_e)e^{-(k_1 + k_{-1})t} \qquad \text{Q.E.D.} \qquad (5)$$

7. (a) A partir de la ecuación (11.7) podemos escribir

$$-d[A]/dt = 2k_2[A]^2$$

donde el factor 2 aparece porque se utilizan 2 moles de A por cada mol de B formado. Integrando, obtenemos

$$-1/[A] = -2k_2t + C$$

La constante C debe ser igual a $-1/[A]_0$, con lo que

$$1/[A] - 1/[A]_0 = 2k_2t$$

(b) Una forma de hacerlo es representar gráficamente $1/[A]$ frente a t.
(c) Los datos producen un gráfico lineal por lo que la reacción es de segundo orden.

8. (a) Resulta muy difícil estimar $V_{máx}$ a partir de estos datos. Puede hacerse una aproximación de 150 $(\mu mol/L)min^{-1}$. Entonces, tomando K_M como la concentración de sustrato a $V_{máx}/2$, calcularíamos $K_M = 20$ μmol/L.
(b) $V_{máx} = 162$ $(\mu mol/L)min^{-1}$; $K_M = 32$ μmol/L. Estos valores son considerablemente más fiables que los indicados en (a).
(c) El mejor ajuste nos da $V_{máx} = 158$ $(\mu mol/L)min^{-1}$; $K_M = 30$ μmol/L.

9. (a) Utilizando $V_{máx} = 160$ $(\mu mol/L)min^{-1}$, $k_{cat} = 1.60 \times 10^5$ $min^{-1} = 2667$ s^{-1}.
(b) Utilizando $K_M = 31$ μmol/L, $k_{cat}/K_M = 8.6 \times 10^7$ $(mol/L)^{-1}s^{-1}$. Esto puede compararse favorablemente con los valores máximos de k_{cat}/K_M.

10. (a) Sólo es necesario reordenar la ecuación para obtener

$$\left(\frac{K_M}{[S]} + 1\right)d[S] = -V_{max}dt$$

y a continuación integrar desde $t = 0$ ($[S] = [S]_0$) hasta un tiempo finito t. Obtenemos

$$[S]_0 - [S] - K_M \ln \frac{[S]}{[S]_0} = V_{max}t$$

(b) Cuando $[S]_0 >> K_M$, el primer término de la izquierda será muy superior al tercero, con lo que

$$[S_0] - [S] \cong V_{max}t$$

es decir

$$[S] = [S]_0 - V_{max}t$$

Esto corresponde a una situación en la que la enzima está saturada con el sustrato, por lo que las moléculas de sustrato se consumen a la máxima velocidad.

11. Una forma es reordenar la respuesta dada en 10(a) para obtener

$$\frac{1}{t}\ln\left(\frac{[S]}{[S]_0}\right) = \frac{1}{K_M}\left(\frac{[S]_0 - [S]}{t}\right) - \frac{V_{max}}{K_M}$$

y representar gráficamente el lado izquierdo en función de $([S_0] - [S])/t$. La pendiente nos dará K_M, y la intersección en $(1/t)\ln([S]/[S]_0) = 0$ nos dará $V_{máx}$.

12. El cambio de k_{cat} entre pH 6 y pH 7 debe comportar la pérdida de un protón en el lugar activo. El mejor candidato es His 57. El aumento de K_M a un pH más alto debe comportar un cambio del estado de unión. El grupo afectado es probablemente el N-terminal en Ile 16, creada por la ruptura que activa la quimotripsina.

13. (a) Si tomamos las proporciones k_{cat}/K_M, encontramos que PA-PAF sería digerido con mayor rapidez y PAPAG de manera más lenta.
(b) Parece favorecerse un residuo C-terminal hidrófobo en el enlace roto. La elastasa requiere siempre un residuo pequeño (como Ala) en el lado N-terminal.
(c) Serina e histidina.

14. (a) La enzima debe ser estable tanto en presencia de detergentes como a temperaturas moderadamente elevadas.
(b) Reemplazar la metionina, mediante mutagénesis de lugar dirigida, por otro residuo. Dado que la metionina es muy hidrófoba, parece apropiada una sustitución hidrófoba. Un solo cambio de base en el codón podría producir Phe, Leu, Ile o Val.

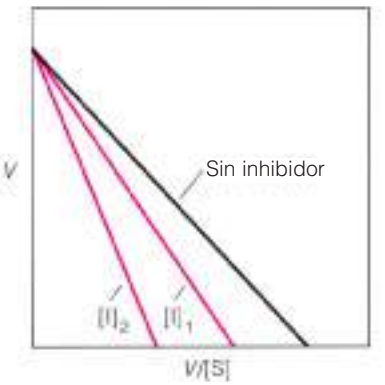
15. (a) No competitivo.
(b) Sin inhibidor: $K_M = 2.5$ mmol/L, $V_{máx} = 5.0$ $(mmol/L)min^{-1}$. Con inhibidor: $K_M = 2.5$ mmol/L, $V_{máx} = 3.0$ $(mmol/L)min^{-1}$.

16. (a) Competitivo.
(b) $V_{máx} = 5.0$ $(mmol/L)min^{-1}$ a todas las concentraciones del inhibidor

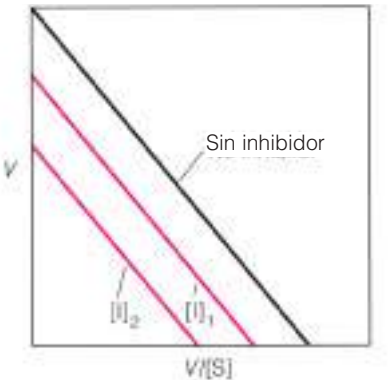
[I] (mmol/L)	K_M^{app} (mmol/L)
0	2.5
3	3.8
5	4.0

(c) $K_I = 4.3$ mmol/L.

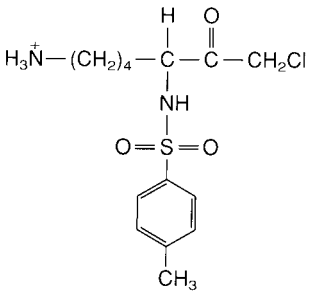
17. Según la ecuación (11.33), podemos escribir la ecuación de Michaelis-Menten de la siguiente forma: $V = V_{máx} - K_M V/[S]$, con lo que podremos representar gráficamente V frente a $V/[S]$. La intersección en $V/[S] = 0$ nos dará $V_{máx}$; la pendiente será K_M^{ap}. En consecuencia, los gráficos tendrán los siguientes esquemas:
(a) Inhibición competitiva $[I]_1 < [I]_2$



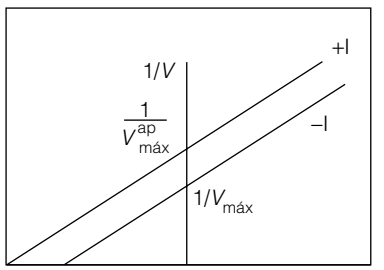
(b) Inhibición no competitiva $[I]_1 < [I]_2$



18. Debe sustituirse el grupo hidrófobo de TPCK por un grupo con carga positiva. Un buen candidato sería el siguiente:



19. $V = V_{máx}[S]/\{K_M + [S](1 + [I]/K_I)\} = \dfrac{V_{máx}[S]/(1 + [I]/K_I)}{[S] + K_M/(1 + [I]/K_I)}$



En donde, $K_M^{ap} = K_M/(1 + [I]/K_I)$, $V_{máx}^{ap} = V_{máx}/(1 + [I]/K_I)$.

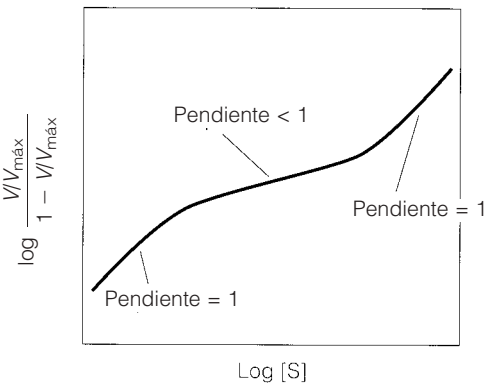
20. (a) Si construimos un gráfico de V frente a [S], los datos presentan una curva ligeramente sigmoidea. Una demostración más convincente es el empleo de una representación de Lineweaver-Burk o una representación de Eadie-Hofstee. Ninguna de ellas es lineal.
(b) A partir del gráfico de Lineweaver-Burk podemos estimar que $V_{máx}$ es de aproximadamente 5 (mmol/L)min^{-1}.

21. La ecuación es

$$\log\left(\frac{V/V_{máx}}{1 - V/V_{máx}}\right) = \log [S] - \log K_M$$

(a) La representación de Hill de $\log\left(\dfrac{V/V_{máx}}{1 - V/V_{máx}}\right)$ en función de log[S] se aproximará a líneas rectas con una pendiente = 1 a los valores bajos y altos de log[S]. Los primeros proporcionarán K_M^T, y los segundos K_M^R.
(b) La curva es claramente cooperativa. Los *cálculos* de K_M^T y K_M^R son de aproximadamente 4.0 mM/L y 0.25 mM/L, respectivamente.

22.



23. En la teoría MWC, la unión más favorable al estado R hace que el equilibrio se desplace a medida que aumenta [S]; el desplazamiento sólo puede ser hacia R. En la teoría KNF, la unión en un lugar puede tener *cualquier* clase de efecto sobre otro, incluyendo la inhibición.

24. (a) La clave para la deducción está en observar que

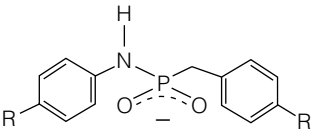
$$\theta = \frac{\text{número de lugares ocupados}}{\text{número total de lugares}} = \frac{[RS] + 2[RS_2]}{2([T] + [R] + [RS] + [RS_2])}$$

Se introducen las expresiones indicadas para [T], [RS] y [RS_2], y se simplifica la ecuación.
(b) Debe hacerse gráficamente. Un valor alto de L y bajo de K garantizan una curva sigmoidea.

25. (a) La activación de la molécula por la tripsina quedará bloqueada.
(b) Si se produce la activación, el péptido N-terminal dejará de estar limitado por un enlace —S—S— y puede liberarse.
(c) La automodificación de la π-quimotripsina para dar lugar a la α-quimotripsina quedaría bloqueada.

26. La técnica más sencilla consistiría en incubar la ribozima con un pentanucleótido marcado radiactivamente y obtener muestras a intervalos para la electroforesis. La autorradiografía mostraría inicialmente tan sólo el pentanucleótido, pero con el paso del tiempo aparecerían también en el gel oligómeros más largos y más cortos.

27.



CAPÍTULO 12

1.

Ecuación	RQ
(a) $C_2H_5OH + 3O_2 \rightarrow 2CO_2 + 3H_2O$	0.67*
(b) $CH_3COOH + 2O_2 \rightarrow 2CO_2 + 2H_2O$	1.0
(c) $CH_3(CH_2)_{16}COOH + 26O_2 \rightarrow 18CO_2 + 18H_2O$	0.69
(d) $CH_3(CH_2)_{14}(CH)_2COOH + 25_O_2 \rightarrow 18CO_2 + 17H_2O$	0.71
(e) $CH_3(CH_2)_{12}(CH)_4COOH + 25O_2 \rightarrow 18CO_2 + 16H_2O$	0.71

*Ejemplo: RQ = $2CO_2/3O_2$.

2. (a) > 1.
(b) < 1.
Dado que las enzimas dependientes de NAD^+ generalmente actúan deshidrogenando los sustratos, una proporción $[NAD^+]/[NADH]$ superior a la unidad tiende a impulsar las reacciones en esa dirección. De igual modo, las proporciones de $[NADP^+]/[NADPH]$ inferiores a la unidad proporcionan unas concentraciones que tienden a impulsar estas reacciones en la dirección de reducción del sustrato.

3. (a) 0.
(b) 1.
(c) 4.

4. Para la glucosa: 2815 kJ/mol, 469 kJ/átomo de C.
Para el ácido palmítico: 9958 kJ/mol, 622 kJ/átomo de C.

5. -45.2 kJ/mol.

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ\prime} + RT \ln([ADP][P_i]/[ATP])$$

6. (a) 20, en la dirección de B a C (es decir, 100 – 80).
(b) (1) El flujo hacia la derecha se reduce 2 veces. (2) El flujo hacia la derecha aumenta un 50%. (3) El flujo cambiaría hacia la izquierda, con un valor de 60.
(c) Los inhibidores específicos de la enzima X o Y resultarían útiles. Podría inhibirse parcialmente una de estas actividades y observarse el efecto sobre la tasa de flujo. Si un ciclo de sustrato está en funcionamiento, el cambio de la tasa de flujo deberá ser superior al cambio porcentual de actividad de cualquiera de las enzimas.

7. La forma más directa es purificar la enzima hasta la homogeneidad y determinar su peso molecular y el número de recambio. A continuación, a partir de la actividad observada en un extracto bruto, puede calcularse el número de moléculas de enzima activa que son necesarias para alcanzar esa actividad (suponiendo que el extracto no contiene inhibidores de la actividad). Otro enfoque sería tratar el extracto con un anticuerpo específico para la enzima de interés y cuantificar el inmunoprecipitado proteico. Todavía es necesario conocer el peso molecular para convertir esta cifra en el número de moléculas de la enzima.

8. (a) 20% (600 cpm/pmol ÷ 3000 cpm/pmol).
(b) 7500 cpm de dTTP incorporados por minuto por 10^6 células, que proporciona 2.5 pmol por célula por minuto por 10^6 células, es decir, 1.5×10^6 moléculas por célula por minuto.
(c) Preparar un extracto ácido de las células (por ejemplo, con ácido tricloroacético al 5%), separar los nucleótidos mediante HPLC de intercambio iónico y determinar en la fracción de dTTP su radiactividad y su masa, esta última a partir de la absorbancia UV.

9. (a) 9131.
(b) 2.6%.
Este problema se resuelve utilizando la forma diferencial de la ecuación de desintegración radiactiva, $dN/dt = \lambda N$, donde dN/dt es la velocidad de desintegración radiactiva en dps, λ es $0.693/t_{1/2}$ y N es el número de átomos radiactivos.

CAPÍTULO 13

1. Ninguno; el mismo.

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ\prime} + RT \ln([FBP][ADP]/[F6P][ATP])$$

2. El etanol generará NADH, a través de la acción de la alcohol deshidrogenasa, y ello reducirá el formaldehído para dar lugar de nuevo a metanol, también a través de la alcohol deshidrogenasa. El acetaldehído formado puede metabolizarse para producir acetato. Además, el etanol puede competir simplemente con el formaldehído por la unión a la alcohol deshidrogenasa.

3. Probablemente F1,6BP. Cuando la triosa fosfato empiece a acumularse, el equilibrio desfavorable de la reacción directa podría hacer que DHAP y G3P produjeran de nuevo F1,6BP. Naturalmente, se acumularía G3P en primer lugar, pero probablemente no en una concentración significativamente aumentada.

4. (a) 4 (2 de cada a partir de glucosa y fructosa).
(b) 5 (3 a partir de G6P + 2 a partir de fructosa).

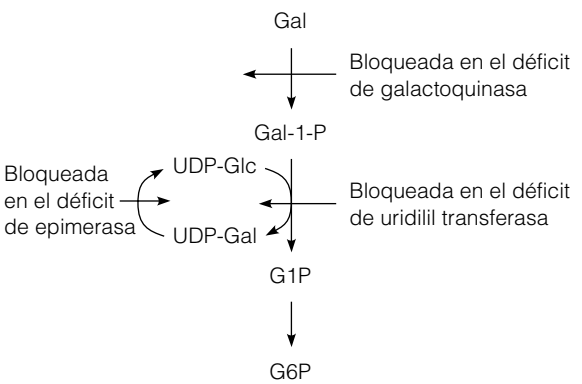
5. C-3 o C-4. Ambos pasan a ser C-1 del piruvato, que se pierde en forma de CO_2 en la reacción de la piruvato descarboxilasa.

6. (a) Sacarosa + $5P_i$ + 5ADP → 4 lactato + 5ATP + $4H_2O$ + $4H^+$
(b) Maltosa + $4P_i$ + 4ADP + $4NAD^+$ → 4 piruvato + 4ATP + $3H_2O$ + 4NADH + $4H^+$
(c) Residuo (de glucosa) + $2P_i$ + 2ATP (2 etanol + 2ATP + $2CO_2$ + H_2O + $2H^+$

7. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. El análogo acil arsenato del 1,3-bisfosfoglicerato se hidroliza espontáneamente.

8. 1.09 M (el EtOH al 10% es 2.18 M, y 1 mol de glucosa genera 2 moles de etanol). No, puesto que la glucosa no es un componente libre abundante de la mayor parte de fuentes vegetales fermentables. El almidón, la sacarosa, o algunos otros oligosacáridos o polisacáridos.

9.



10. Piruvato $\xrightarrow[\text{Coenzima A}]{}$ formato + acetil-CoA $\xrightarrow{P_i}$ acetil fosfato + CoA-SH

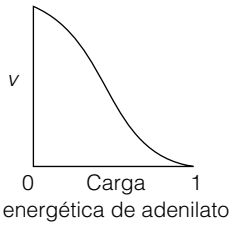
$\downarrow$ (P_i, ATP)

Acetato

11. Glc $\longrightarrow$ G6P $\longrightarrow$ G1P $\longrightarrow$ UDP-Glc $\longrightarrow$ UDP-Gal $\xrightarrow[\text{Glc}]{}$ lactosa

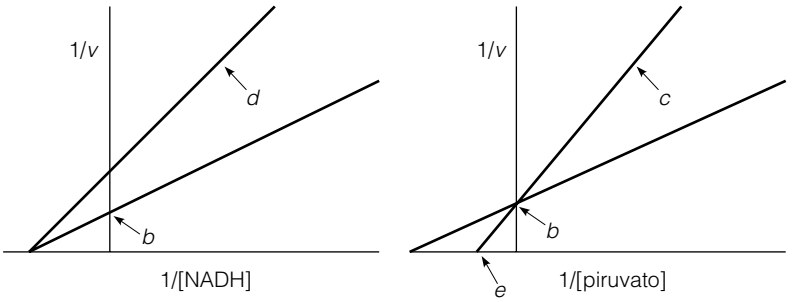
2 Glucosa + ATP + UTP $\longrightarrow$ lactosa + ADP + UDP + PP_i

12.



13. La UDP-glucosa se utiliza catalíticamente en el sentido de que por cada molécula de Gal-1-P convertida en G1P, una molécula de UDP-Glc se convierte en UDP-Gal, que inmediatamente se reconvierte en UDP-Glc, para reaccionar con otra molécula de Gal-1-P.

14.



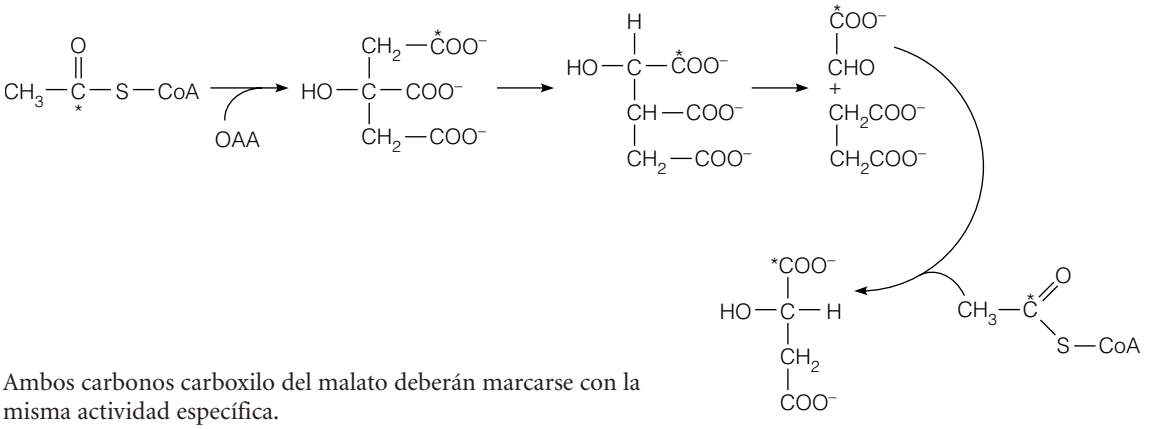
(f) 10^{-3} M.

CAPÍTULO 14

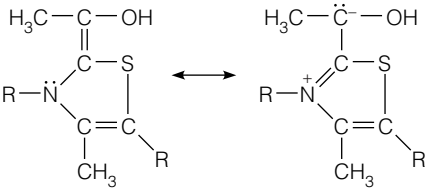
1. Administrar por separado 1-[^{14}C]glucosa y 6-[^{14}C]glucosa, y medir la velocidad inicial de formación de $^{14}CO_2$. La relación nos indica las velocidades de flujo relativas a través de las dos rutas. Así, por ejemplo, si las velocidades de flujo de ambas reacciones son iguales, la relación de glucosa marcada en C^1 con respecto a la glucosa marcada en C^6 es de 2:1.
3. (a) G6P + $2NADP^+$ + H_2O $\longrightarrow$ R5P + CO_2 + 2NADPH + $2H^+$
   (b) G6P + $12NADP^+$ + $7H_2O$ $\longrightarrow$ $6CO_2$ + 12NADPH + $12H^+$ + P_i
   (c) 3G6P + $6NADP^+$ + $25NAD^+$ + 5FAD + 13ADP + $10P_i$ + $5H_2O$ $\longrightarrow$ $18CO_2$ + 6NADPH + 25NADH + 13ATP + $5FADH_2$ + $12H^+$
3. C-1: liberado en su totalidad como CO_2. C-2 y C-3: retenidos en su totalidad en el oxalacetato.
4. Una vuelta: un cuarto. Dos vueltas: tres octavos.
5. La acción de la piruvato carboxilasa sobre el piruvato marcado produciría oxalacetato marcado, de manera que una vuelta del ciclo del ácido cítrico podría marcar el C-5 del isocitrato.
6. La adición a glioxisomas aislados de citrato, isocitrato, glioxilato, malato u oxalacetato estimularía la formación de succinato de manera desproporcionada con respecto a la cantidad añadida.
7. C-3 y C-4, puesto que adquieren el grupo carboxilo del piruvato, que se pierde en la reacción de la piruvato deshidrogenasa.
8. Se marcarían el C-1 y C-3 de la fructosa-6-fosfato. La eritrosa-4-fosfato no se marcaría.
9. Dado que NADH y acetil-CoA activan la enzima, tiene sentido, desde el punto de vista metabólico, prever que el NAD^+ y el CoA-SH serían inhibidores, y estas inhibiciones se han observado.
10. En primer lugar, la localización citosólica de gran parte de la enzima dependiente del $NADP^+$ levanta sospechas respecto a su función en el ciclo del ácido cítrico. Y, lo que es más importante, las células que tienen unas velocidades de flujo altas o bajas a través del ciclo presentan actividades altas o bajas, respectivamente, de la enzima dependiente de NAD^+. La actividad de la enzima dependiente de $NADP^+$ no varía en coordinación con las actividades de otras enzimas del ciclo.
11. E_1: Piruvato + TPP + H^+ $\longrightarrow$ hidroxietil-TPP + CO_2.
    E_2: Hidroxietil-TPP + lipoamida oxidada + CoA-SH $\longrightarrow$ TPP + lipoamida reducida + acetil-CoA.
    E_3: Lipoamida reducida + NAD^+ $\longrightarrow$ lipoamida oxidada + NADH + H^+.

12. (a) Es una señal de que las concentraciones de sustratos son adecuadas para la oxidación en el ciclo del ácido cítrico, por lo que el piruvato puede desviarse a la gluconeogénesis en vez de oxidarse.
    (b) Tiende a inactivar la piruvato deshidrogenasa cuando las concentraciones de los transportadores electrónicos reducidos son suficientes para la producción de ATP a través de la cadena respiratoria y, por tanto, para dejar piruvato disponible para otros fines.
    (c) Es una señal para reducir el flujo a través del ciclo del ácido cítrico cuando las concentraciones de transportadores electrónicos reducidos son adecuadas para la generación de energía.
    (d) Cuando la carga energética es baja, la acumulación de ADP proporciona una señal para activar el ciclo del ácido cítrico y aumentar, por tanto, la oxidación de los nutrientes para la producción de ATP.
    (e) Es equivalente a la inhibición por el producto, pero sirve también como indicador general de que cuando un sustrato de energía elevada (succinil-CoA) es abundante, puede reducirse el flujo a través del ciclo del ácido cítrico.
    (f) Es también una regulación de la carga energética, es decir, una señal de que es preciso aumentar la producción de ATP. Esto puede conseguirse aumentando la producción de acetil-CoA a partir de piruvato, para la oxidación en el ciclo del ácido cítrico.

13. Algunos mecanismos posibles: control a nivel de sustrato de la citrato sintasa, activación de la citrato liasa por la acetil-CoA o los ácidos grasos, inhibición de la isocitrato liasa por el succinato (para asegurar un flujo adecuado a través del ciclo del ácido cítrico).

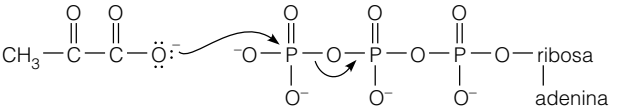
14. 

Ambos carbonos carboxilo del malato deberán marcarse con la misma actividad específica.

15. 

16. 2 Acetil-CoA + $2NAD^+$ + FAD + $3H_2O$ ⟶ oxalacetato + 2NADH + $FADH_2$ + 2CoA-SH + $4H^+$

17. $NAD^+ + FADH_2 \rightleftharpoons NADH + FAD + H^+$
El NAD^+ puede oxidar al $FADH_2$ si su concentración local es mucho mayor que la del $FADH_2$.

18. 

19. $[NAD^+]/[NADH]$ deberá ser elevada, de forma que pueda impulsar la oxidación de los sustratos, e.j. malato + $NAD^+ \rightleftharpoons$ oxalacetato + NADH + H^+. Por el contrario, como NADPH y $NADP^+$ normalmente impulsan la reducción de sustratos, esperamos que $[NADP^+]/[NADPH]$ sea baja.

CAPÍTULO 15

1. +28.95 kJ/mol: a partir de la ecuación $\Delta G^{\circ\prime} = -nF\,\Delta E'_0$. $E'_0 = -0.17 - (-0.32)$.

2. (a) cit *c* ⟶ cit *a* ⟶ cit a_3 ⟶ O_2
   (b) Para bloquear la oxidación de sustratos endógenos.
   (c) Un lugar se asocia con la citocromo oxidasa.
   (d) 2 cit *c*-Fe^{2+} + ½O_2 + $4H^+$ + ADP + P_i ⟶ 2 cit *c*-Fe^{3+} + ATP + $2H_2O$
   (e) –70 kJ/mol (calculado como en el Problema 1).

3. (a) *β*-Hidroxibutirato ⟶ NAD^+ ⟶ FMN ⟶ FeS ⟶ CoQ ⟶ cit *b* ⟶ FeS ⟶ cit c_1 ⟶ cit *c*
   (b) 2, ya que se evita la citocromo oxidasa.
   (c) Porque el NADH no puede entrar libremente en la mitocondria.
   (d) Para bloquear la citocromo oxidasa, con lo que los electrones salen de la cadena en el citocromo *c*.
   (e) *β*-Hidroxibutirato + 2 cyt *c*-Fe^{3+} + 2ADP + $2P_i$ + $4H^+$ ⟶ acetoacetato + 2 cyt *c*-Fe^{2+} + 2ATP + $2H_2O$
   (f) –35.8 kJ/mol (calculado como en el Problema 1).

4. Bloquear la succinato deshidrogenasa y medir la fosforilación debida únicamente a la reacción de la α-cetoglutarato deshidrogenasa. Relación P/O = 4 (3 procedentes del NADH y 1 de la reacción de la succinil-CoA sintetasa).

5. +67.6 kJ/mol (resuelto como en el Problema 1). Relación: 4.0×10^{10}, calculado a partir de la expresión

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ\prime} + 2.3RT \log\{([\text{fumarato}][\text{NADH}])/([\text{succinato}][\text{NAD}^+])\}$$

en donde $\Delta G' < 0$.

6. [ADP] = 1.44 mM y [AMP] = 0.29 mM, calculado a partir de dos ecuaciones simultáneas: la ecuación de definición de la carga energética y [ADP] = 5 × [AMP]. $\Delta G' = -41.2$ kJ/mol: a partir de $\Delta G' = \Delta G^{\circ\prime} + 2.3RT\log([\text{ADP}][P_i])/[\text{ATP}]$.

7. 1.8×10^{17}. Calcular $\Delta G^{\circ\prime}$ como en el Problema 1, y a continuación aplicar $\Delta G^{\circ\prime} = -2.3RT\log K_{eq}$. Utilizar $E'_0 = +0.30$ para el H_2O_2 (véase la Tabla 15.1).

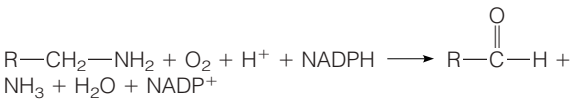
8. Añadir ADP en una cantidad limitante y medir la captación de O_2. La relación de los μmol de ADP consumidos respecto a los μátomos de oxígeno captados es idéntica a la relación P/O (véase la Figura 15.22).

9. Porque la energía no utilizada para el ATP se disipó en forma de calor, y los pacientes presentaron fiebre incontrolable.

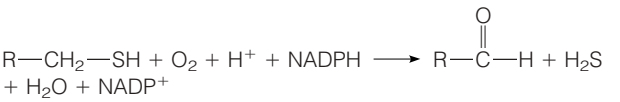
10. (a) A,4; B,2; C,1; D,3; E,5.
    (b) 3 dividido por 4 (relación de captaciones en presencia y en ausencia de ADP, con el sustrato presente para ambas determinaciones).
    (c) 5; sustratos agotados.
    (d) 4; concentración de ADP baja debido a que la concentración de ATP es elevada.
    (e) 3; la producción y el recambio rápido del ATP requieren una captación rápida y continua de O_2.

11. 1.

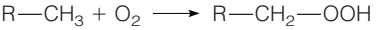
12. Desaminación:



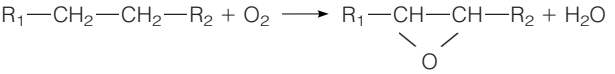
Desulfuración:



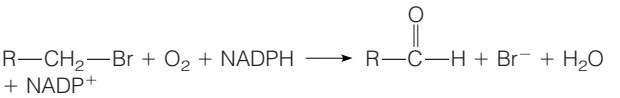
Peroxidación:



Epoxidación:



Deshalogenación:



13. Porque debe actuar en contra de un gradiente de concentración.

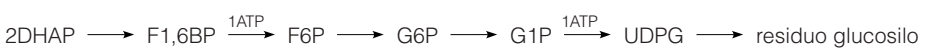
14. (a) El NADH se oxida por el FMN, no el FAD.
    (b) La flavina reducida ($FADH_2$ o $FMNH_2$) se oxida por la CoQ, no la $CoQH_2$.
    (c) El cit c_1 acepta e^- del cit *b* que se oxida luego por el cit *c*.
    (d) El O_2 se reduce a H_2O no a H_2O_2.

15. (a) $\Delta G^{\circ\prime} = -2 \times 96.5(-0.23 - (-0.32)) = -17.37$ kJ/mol
    (b) El mismo, ya que E'_0 para NAD^+/NADH es el mismo que para $NADP^+$/NADPH.
    (c) $\Delta G'$ probablemente será positivo in vivo para una enzima ligada al NADH, dado que una relación de concentraciones NAD^+/NADH elevada impulsaría la oxidación de GSH a GSSG.

16. (a) Succinato ⟶ FAD ⟶ CoQ ⟶ cit *b* ⟶ cit c_1 ⟶ cit *c*
    (b) Succinato + 2 cit *c*-Fe^{3+} + ADP + P_i ⟶ fumarato + 2 cit *c*-Fe^{2+} + ATP + H_2O
    (c) $\Delta G^{\circ\prime} = -nF(0.25 - 0.03) + 31 = -11.46$ kJ/mol
    (d) Para bloquear la citocromo oxidasa y forzar la salida de los electrones de la cadena respiratoria en el citocromo *c*.

CAPÍTULO 16

1. (a) 3:



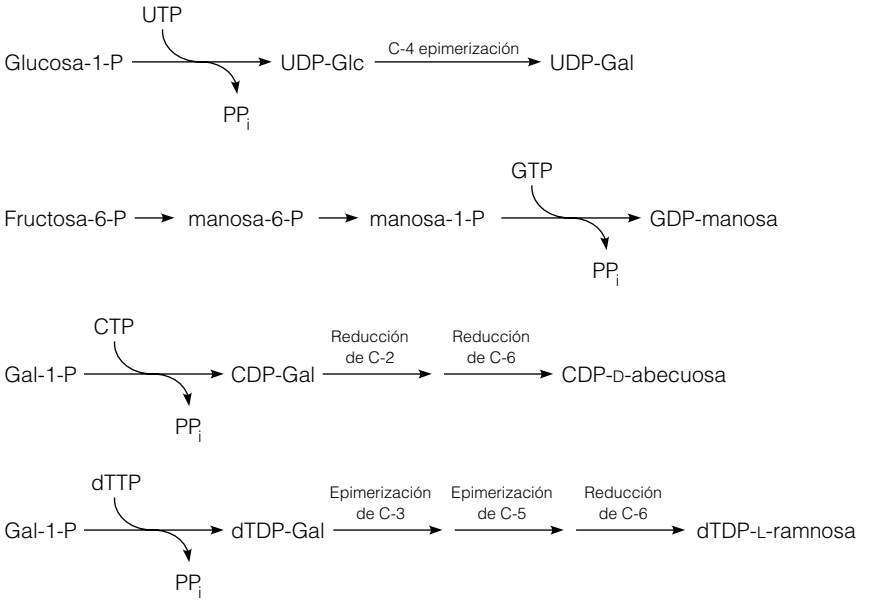
    (b) 2.
    (c) 12 (véase la Figura 16.3).
    (d) 1.

2. (a) 2 (glucólisis).
    (b) 6 (la gluconeogénesis requiere ATP).

3. (a), porque es el único sustrato que debe pasar por la reacción de la piruvato carboxilasa.

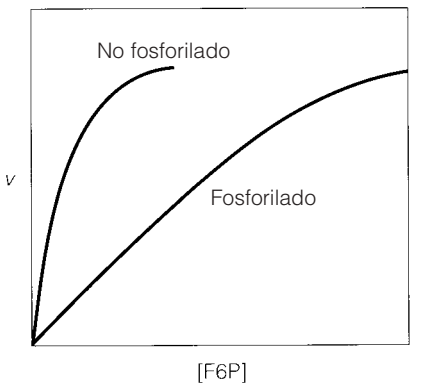
4. Ninguno. El CO_2 que se fija se libera en la reacción de la PEP carboxiquinasa.

5.

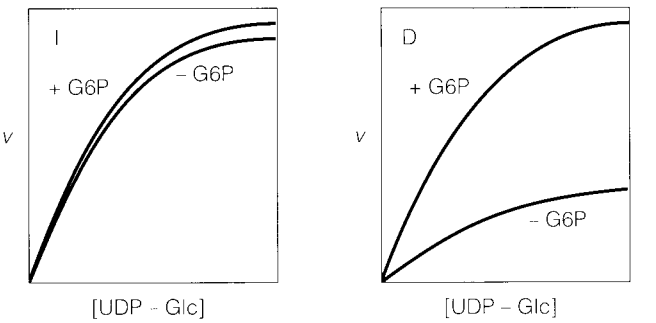


6. (a) Fructosa-6-fosfato + ATP ⟶ fructosa-2,6-bisfosfato + ADP
(b) 2 Oxalacetato + 2ATP + 2GTP + 2NADH + $2H^+$ + $4H_2O$ ⟶ glucosa + $2CO_2$ + $2NAD^+$ + 2ADP + 2GDP + $4P_i$
(c) Glucosa + ATP + UTP ⟶ UDP-Glc + PP_i + ADP
(d) 2 Glicerol + 2ATP + $2NAD^+$ + $2H_2O$ ⟶ glucosa + 2ADP + 2NADH + $2H^+$ + $2P_i$
(e) 2 Malato + 2ATP + 2GTP + $3H_2O$ ⟶ glucosa-6-fosfato + $2CO_2$ + 2ADP + 2GDP + $3P_i$

7.



8.



9. Activación por el AMP de la glucógeno fosforilasa *b*; activación por la glucosa-6-P de la glucógeno sintasa D.

10. 8 ATP y 4 acetil-CoA:

Acetyl-CoA ⟶ citrato ⟶ isocitrato ⟶ glioxilato ⟶ malato ⟶ oxalacetato $\xrightarrow{2ATP}$ PEP ⟶
2PG ⟶ 3PG $\xrightarrow{2ATP}$ 1,3BPG ⟶ G3P ⟶ F1,6BP $\xrightarrow{2ATP}$ F6P ⟶ G6P ⟶ glucosa

Serán necesarios dos o más ATP para reconvertir la glucosa en G6P, dando una inversión de 8 ATP por mol de glucosa.

11. Porque la piruvato carboxilasa tiene dos funciones metabólicas: reponer intermediarios del ciclo del ácido cítrico e iniciar la gluconeogénesis. La PEPCK cataliza la primera reacción dirigida de manera específica a la gluconeogénesis.

12. El principal factor es la localización intracelular del piruvato, ya que si se acumula en las mitocondrias, predomina la función anaplerótica, mientras que el piruvato en el citosol se utiliza fundamentalmente como precursor gluconeogénico. Las concentraciones de los demás intermediarios son también importantes. Así, por ejemplo, si las concentraciones intramitocondriales de oxalacetato son suficientes, el piruvato puede oxidarse por la piruvato deshidrogenasa o exportarse a la gluconeogénesis. Sin embargo, el oxalacetato en las mitocondrias puede también convertirse por transaminación en aspartato, que puede exportarse al citosol para la gluconeogénesis.

13. (1) El hígado es el tejido más activo en la gluconeogénesis. Dado que la alanina es un precursor gluconeogénico importante, su acumulación en el hígado es una señal de que debe activarse la gluconeogénesis, con inhibición simultánea de la glucólisis.
(2) La función de la glucosa-6-fosfato es la producción de glucosa, para la salida de ésta de la célula y el transporte a otros tejidos. En consecuencia, la enzima actúa tan sólo en los tejidos (principalmente el hígado) que elaboran glucosa para exportarla.

14. El PP-1 inactiva la SPK, catalizando su desfosforilación. Esto bloquea la conversión de la glucógeno fosforilasa *b* en *a*, con lo que se inhibe la glucogenólisis. El PI-1, al inhibir el PP-1, tiene el efecto contrario.
15. (a) La función del glucagón es aumentar la concentración sanguínea de glucosa. La estimulación de la rotura del glucógeno y la gluconeogénesis son consistentes ambas con esta función.
    (b) El déficit de glucosa-6-fosfatasa interferirá con la liberación de glucosa por el hígado para su exportación a otros tejidos.
    (c) La SPK convierte la fosforilasa *b* en *a*, la cual activa la ruptura de glucógeno, y esto convierte la glucógeno sintasa I en D, la forma menos activa de esta enzima.
    (d) La sangre de un donante AB contiene antígeno A, que es inmunógeno en las personas con grupo B o O, y la sustancia sanguínea del grupo B, que es inmunógena en las personas con grupo A o O.
    (e) Debe hidrolizarse la glucosa-6-fosfato para que salga la glucosa de la célula hepática y se exporte a otros tejidos.

CAPÍTULO 17

1. $\Delta G^\circ = 164$ kJ/mol. Un einstein de 700 nm de luz producirá 171 kJ.
2. 14.7%.
3. 1050 nm.
4. (a) Tras la unión al C-2 de la ribulosa-1,5-bisfosfato, el ^{14}C pasará a ser el carboxilato (C-1) de *una* de las dos moléculas de 3-fosfoglicerato. Luego pasa a ser el carbono carbonilo (C-1) de la G3P o el C-1 de la DHAP. Al condensarse para formar la fructosa-1,6-bisfosfato, el ^{14}C aparecerá en los carbonos 3 y/o 4.
   (b) No. Pueden contener 0, 1 ó 2 carbonos marcados, según la combinación de triosas marcadas y no marcadas que se haya utilizado en su formación.
5. Suponiendo 48 fotones por mol de hexosa, la hoja podría producir teóricamente 0.0263 moles, es decir, 4.73 g de hexosa en 1 hora. De hecho, producirá tan sólo una pequeña fracción de esta cantidad, ya que no todos los fotones se absorben, ni todos los fotones absorbidos sirven para hacer pasar electrones a través de la ruta fotosintética.
6. (a) No, ya que las plastoquinonas no están implicadas en este proceso.
   (b) La adición de ferricianuro como donador de electrones permite una reacción de Hill.
7. Con el empleo de iluminación a 700 y 680 nm, por separado o conjuntamente. Observar el estado de oxidación de las plastoquinonas y la plastocianina. Si sólo interviene el p700, estarán oxidadas. Si sólo interviene el p680, estarán reducidas. Si intervienen ambos, la iluminación simultánea a las dos longitudes de onda potenciará la oxidación del donador.
8. Carbono 3.
9. Competitiva.
10. Los datos sugieren la unión fuerte de un inhibidor. Aparentemente es termoestable, por lo que probablemente no es una proteína, pero se libera con la precipitación de sulfato amónico. Otros datos indican que el inhibidor es un compuesto fosforilado de bajo peso molecular.
11. (a) Disminución.
    (b) Aumento.
    (c) Aumento.
12. (a) Dado que tanto el O_2 como el CO_2 se consumen y producen por los procesos opuestos de la fotorrespiración y la fotosíntesis, se alcanzará un estado estacionario.
    (b) La afinidad relativa de la rubisco por el CO_2 y el O_2.
13. La mayoría del 3PG que se marca inicialmente se reutiliza al sustituir la RuBP, que luego vuelve a entrar en el ciclo.

CAPÍTULO 18

1. Ácido palmítico, 129 ATP; ácido linoleico, 142 ATP; ácido esteárico, 146 ATP; ácido oleico, 144 ATP.
2. 40.5% [(130 × 30.5/9788) × 100%].
3. 412 (130 de cada palmitato, 22 del glicerol). 412 ATP/51 carbonos = 8.1 ATP por átomo de carbono (6.3 por glucosa).
4. Ejemplo: ácido palmítico (c).

$$\text{CoA-SH} + \text{palmitato} + \text{ATP} \longrightarrow \text{palmitoil-CoA} + \text{AMP} + PP_i$$

$$PP_i + H_2O \longrightarrow 2P_i$$

$$\text{Palmitoil-CoA} + 7\text{CoA-SH} + 7\text{FAD} + 7NAD^+ + 7H_2O \longrightarrow 8\ \text{acetil-CoA} + 7FADH_2 + 7\text{NADH} + 7H^+$$

$$8\ \text{Acetil-CoA} + 16H_2O + 24NAD^+ + 8\text{FAD} + 8\text{ADP} + 8P_i \longrightarrow 16CO_2 + 24\text{NADH} + 24H^+ + 8\text{ATP} + 8FADH_2 + 8\text{CoA-SH}$$

$$\text{Suma: Palmitato} + 24H_2O + 15\text{FAD} + 31NAD^+ + 8\text{ADP} + 6P_i \longrightarrow 16CO_2 + \text{AMP} + 15FADH_2 + 31\text{NADH} + 31H^+ + 7\text{ATP}$$

A continuación, se suman las ecuaciones para la oxidación metabólica del NADH y el $FADH_2$.

$$31\text{NADH} + 31H^+ + 15\tfrac{1}{2}O_2 + 93\text{ADP} + 93P_i \longrightarrow 31NAD^+ + 93\text{ATP} + 124H_2O$$

$$15FADH_2 + 7\tfrac{1}{2}O_2 + 30\text{ADP} + 30P_i \longrightarrow 15\text{FAD} + 45H_2O + 30\text{ATP}$$

$$\text{Suma: Palmitato} + 23O_2 + 131\text{ADP} + 129P_i \longrightarrow 16CO_2 + \text{AMP} + 130\text{ATP} + 145H_2O$$

5.

Acetoacetil-CoA ⟶ 2 acetil-CoA	0 ATP
2 Acetil-CoA ⟶ $4CO_2$	24 ATP (dos vueltas del ciclo del ácido cítrico)
Suma:	24 ATP
Propionoacetil-CoA ⟶ propionil-CoA + acetil-CoA	5 ATP (un ciclo de β-oxidación)
Propionil-CoA ⟶ succinil-CoA	−1 ATP
Succinil-CoA ⟶ $4CO_2$	24 ATP (dos vueltas del ciclo del ácido cítrico)
Acetil-CoA ⟶ $2CO_2$	12 ATP (una vuelta del ciclo del ácido cítrico)
Suma:	40 ATP

6. Carnitina aciltransferasa I. Si la inhibición se produjera en un paso posterior, se inhibiría la oxidación de la palmitoilcarnitina, así como la de la palmitoil-CoA.
7. La acil-ACP producida por una subunidad pasa por el siguiente ciclo de adición reductora de dos carbonos en la otra subunidad.
8. Acetil-CoA $\xrightarrow{\text{Ciclo del ácido cítrico}}$ oxalacetato $\xrightarrow{\text{PEP carboxiquinasa}}$ PEP $\xrightarrow{\text{Gluconeogénesis}}$ glucosa

   El punto principal es que los carbonos que se pierden en una vuelta del ciclo del ácido cítrico no son los que han entrado en forma de acetil-CoA en ese ciclo.
9. Propionil-CoA ⟶ metilmalonil-CoA ⟶ succinil-CoA ⟶ oxalacetato ⟶ fosfoenolpiruvato ⟶ glucosa
10. 14 (2 de cada molécula de malonil-CoA marcada).
11. El aumento de las concentraciones de citrato incrementaría la generación de acetil-CoA en el citosol, estimulando, por tanto, la síntesis de ácidos grasos.
12. (1) El glucagón activa la fosforilación de la piruvato deshidrogenasa, que inhibe la formación de acetil-CoA, el sustrato de la enzima.
    (2) El glucagón promueve la degradación de triacilgliceroles, produciendo un aumento de las concentraciones de ácidos grasos que, en forma de acil-CoA, podrían impedir la polimerización y activación de la acetil-CoA carboxilasa.
13. El palmitato y el octanoato se activan por diferentes acil-CoA ligasas, de las que sólo una se inhibe por la malonil-CoA.
14. La malonil-CoA, un intermediario clave en la síntesis de ácidos grasos, inhibe la carnitina aciltransferasa I, bloqueando de esta forma la entrada de las unidades de acilo en la mitocondria para la oxidación. Las acil-CoA, los sustratos de la oxidación de los ácidos grasos, inhiben la síntesis de ácidos grasos interfiriendo con la polimerización de la acetil-CoA carboxilasa. Los efectos hormonales sobre los adipocitos son opuestos; la insulina promueve la síntesis de ácidos grasos mediante varios mecanismos, mientras que el glucagón promueve la degradación de las grasas y la oxidación de los ácidos grasos.
15. Ésta podría ser una forma para una célula de inhibir la síntesis de ácidos grasos en condiciones en las que se necesitan sustratos para la oxidación, para proporcionar ATP.
16. Las concentraciones de glucosa aumentadas en el citosol estimulan la glucólisis, la cual proporciona piruvato para la oxidación en la mitocondria. La acetil-CoA resultante puede volver al citosol (como citrato) y generar precursores para aumentar la síntesis de ácidos grasos. El aumento intracelular de glucosa estimula también la síntesis de glucógeno.

CAPÍTULO 19

1. Probablemente K_{eq} está próxima a la unidad, puesto que el enlace roto es idéntico al enlace creado.
2. Si se yuxtaponen la fosfatidilserina sintasa y la fosfatidilserina descarboxilasa (E_1 y E_2 de la Figura 19.4), la PS no podría acumularse nunca, ya que, una vez formada por la E_1, reaccionaría inmediatamente con la E_2. Si las dos enzimas están estrechamente acopladas en la membrana, la adición de PS marcada radiactivamente a un sistema enzimático no marcaría la PE, puesto que E_2 actuaría tan sólo sobre la PS generada por E_1.
3. Estimulando la liberación de ácido araquidónico a partir de fosfolípidos de membrana. Éstos se convertirían a su vez en prostaglandinas, que contribuyen a la inflamación.
4. La sustitución de las grasas animales por grasas vegetales podría reducir las concentraciones de colesterol. Ello reduciría en última instancia la inhibición de las concentraciones de HMG-CoA reductasa por el colesterol, lo que podría dar lugar a un aumento de las concentraciones de mevalonato.
5. Ácido esteárico + ácido oleico + 3ATP + CTP + serina ⟶ *sn*-1-estearoil-2-oleilglicerofosforilserina + 2AMP + $3PP_i$ + ADP + CMP
6. Ninguna.
7. Dado que es un análogo no hidrolizable del glicerol-3-fosfato, cabría prever que se acilara sin dificultad para dar el análogo fosfonato del diacilglicerol. Al actuar como análogo del diacilglicerol, podría inhibir de forma competitiva la síntesis de CDP-diacilglicerol a partir de ácido fosfatídico.
8. Un 25% de la ruta de utilización de la colina, un 75% de la ruta de la fosfatidilserina. Para determinar las tasas reales de síntesis intracelular, es preciso conocer también la radiactividad específica del intermediario final de cada ruta, si las reservas de productos intermediarios están compartimentadas y la velocidad de degradación del producto (véase Herramientas de la Bioquímica 12A).

9. Acetoacetato + succinil-CoA ⟶ acetoacetil-CoA + succinato
Acetoacetil-CoA + acetil-CoA ⟶ HMG-CoA + CoA-SH
HMG-CoA + 2NADPH + $2H^+$ ⟶ mevalonato + $2NADP^+$ + CoA-SH

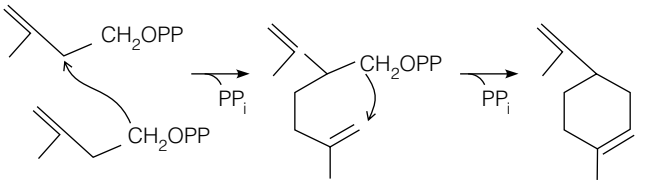
10. Al reducir la ruta que conduce a la aldosterona, este déficit da lugar a un aumento del aporte de progesterona disponible para la conversión en esteroides sexuales.

11. La ruta más sencilla es la desaturación de la palmitoil-CoA a palmitoleoil-CoA, seguida de una elongación de C_2 en el grupo carboxilo, como se describe en la página 737, para dar *cis*-vaccenil-CoA. Otra posibilidad es que la estearoil-CoA pudiera ser un intermediario unido a la enzima en un proceso iniciado con la elongación y seguido por la desaturación.

12. La forma más sencilla es purificar una de las enzimas, como la PE metilasa, hasta la homogeneidad y averiguar entonces si la enzima puede catalizar tres metilaciones para dar PC, o si puede actuar sobre los intermediarios monometilados y dimetilados. Otra posibilidad sería seguir las tres actividades mediante un procedimiento de fraccionamiento.

13. El AMP cíclico promueve la degradación de los triacilgliceroles, mediante la activación de la lipasa sensible a las hormonas. Esto aumenta probablemente las concentraciones intracelulares de diacilglicerol, que a su vez podrían incrementar el flujo a través de las últimas reacciones de las rutas de salvamento hacia PE y PC (véase la Figura 19.5).

14. Ejemplo: 2 isopentenil pirofosfato a limoneno:



15.

A	1	2	3	4	5	6
B	3	7	1	9	10	5
C	6	5	4	3	2	1

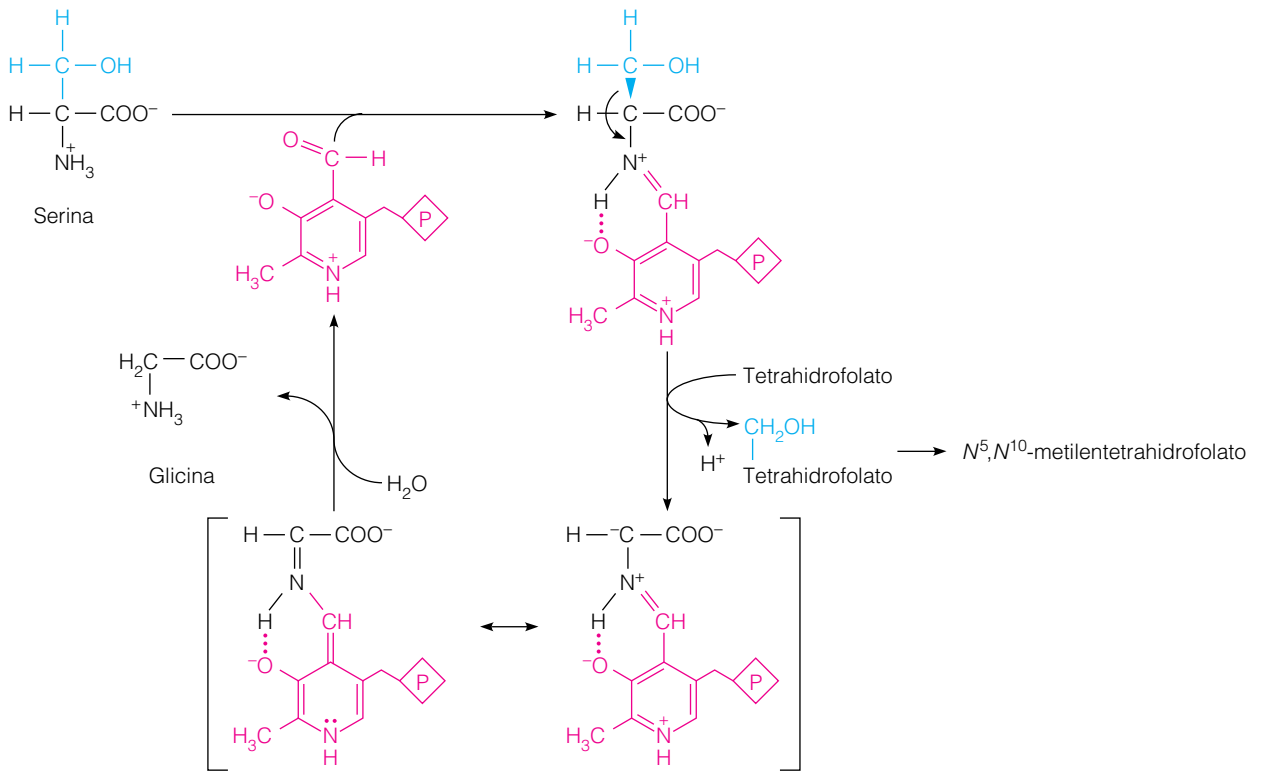
1. Glicerofosfolípido; cambiar a esfingolípido.
2. Quilomicrones; cambiar a intestino.
3. Producto de; cambiar a sustrato para.
4. Déficit en; cambiar a acumulación de.
5. Biosíntesis; cambiar a degradación.
6. Degradación; cambiar a síntesis.

CAPÍTULO 20

1. Adenosil-B_{12}; tetrahidrofolato; ATP + glutamina; α-cetoglutarato + piridoxal fosfato; *S*-adenosilmetionina.

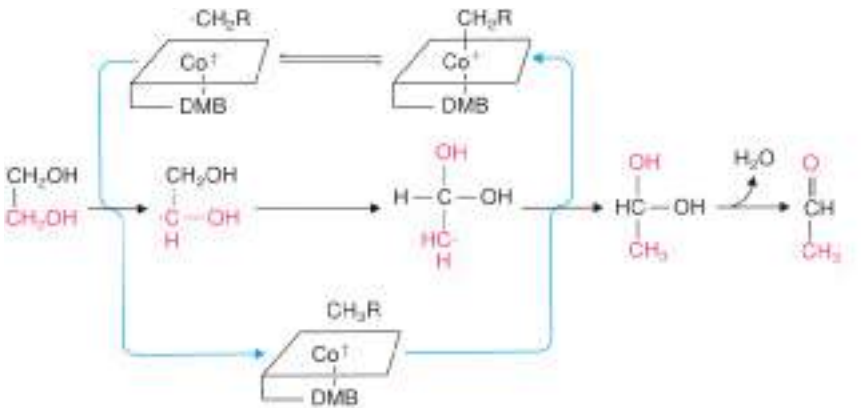
2. (a) 5-Metiltetrahidrofolato.
(b) Metilmalonato.
(c) Disminución de la afinidad de la enzima C por la coenzima B_{12}.
(d) Homocistina (véase el Capítulo 21).

3.

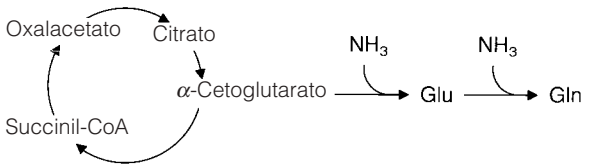


4. El consumo de folato con el alimento incrementará las reservas intracelulares de 5-metil-tetrahidrofolato. Ello hará aumentar la reacción de la metionina sintasa y, por tanto, derivará las reservas ya escasas de B_{12}, con lo que se reducirá su disponibilidad para otras funciones.

5. $^{-}OOC^{5}—C^{4}H(C^{3}H_3)—C^{2}H(N^{+}H_3)—C^{1}OO^{-}$

6. 

7. Una teoría plausible propone que el amoníaco agota las reservas de α-cetoglutarato a través de las reacciones de la glutamato deshidrogenasa y la glutamina sintetasa, que convierten el αCG en glutamato y glutamina, y que ello reduce la producción de ATP al reducir el flujo a través del ciclo del ácido cítrico.



8. La CPS I está en las mitocondrias y la CPS II, en el citosol. Al parecer, el carbamoil fosfato no puede atravesar la membrana mitocondrial, por lo que el que se forma en las mitocondrias sólo puede utilizarse para la síntesis de arginina y el que se forma en el citosol se emplea tan sólo para la síntesis de pirimidina.

9. La enzima inyectada debe convertir toda la asparagina circulante en aspartato. Las células normales captarían el aspartato y volverían a sintetizar asparagina. Sin embargo, las células leucémicas no serían capaces de sintetizar la asparagina y sucumbirían. En cambio, una enzima inyectada en el torrente sanguíneo tendría probablemente una semivida demasiado breve para resultar eficaz. Además, al ser una proteína extraña, podría causar una reacción inmunológica.

10. (a) Verdadero. El catabolismo completo de los aminoácidos produce CO_2, H_2O y amoníaco. Sin embargo, el amoníaco debe convertirse en urea para su destoxificación y excreción, y ello requiere ATP, lo que reduce la producción neta de ATP.
(b) Falso. El glutamato puede utilizarse para sintetizar aminoácidos esenciales tan sólo si se dispone de los esqueletos carbonados en forma de cetoácidos.
(c) Falso. La biosíntesis de arginina en el hígado forma parte del ciclo de la urea, y la mayor parte de la arginina que se forma se rompe dando urea y ornitina. Se deja poca arginina para satisfacer las necesidades de otros tejidos.
(d) Falso. Aunque está presente en todas las proteínas, la alanina puede sintetizarse por las células de los mamíferos y no es necesario que se encuentre en el alimento.

11. $\overset{+}{N}H_4$ (músculo) + α-cetoglutarato + NADH + H^+ $\longrightarrow$ glutamato + H_2O + NAD^+

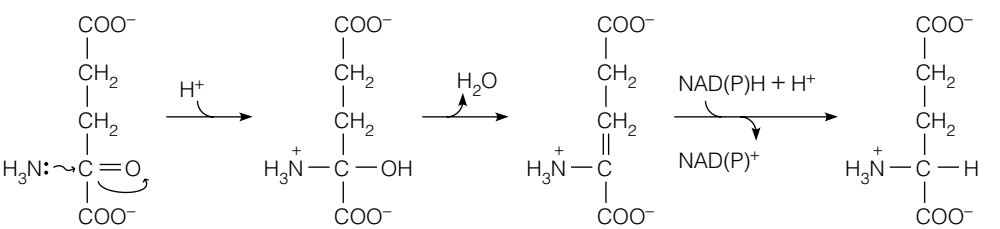
Glutamato + piruvato $\longrightarrow$ α-cetoglutarato + alanina

Alanina + α-cetoglutarato $\longrightarrow$ glutamato + piruvato

Glutamato + H_2O + NAD^+ $\longrightarrow$ $\overset{+}{N}H_4$ (hígado) + α-cetoglutarato + NADH + H^+

Suma: $\overset{+}{N}H_4$ (músculo) $\longrightarrow$ $\overset{+}{N}H_4$ (hígado)

12. (a) El NH_3 tiene un par de electrones no compartidos que pueden iniciar el ataque nucleófilo sobre el átomo de carbono carbonilo con pocos electrones.
(b) La dirección de una reacción depende de la constante de equilibrio y de las concentraciones de los reactivos y los productos. La relación $[NAD^+]/[NADH]$ intramitocondrial es elevada, y esto dirige la reacción hacia el α-cetoglutarato:
(c)



13. El PLP forma una base de Schiff covalente entre el carbono del aldehído de la coenzima y un grupo ε-amino de un residuo de lisina. Evidentemente, este enlace debe romperse para que la coenzima forme una base de Schiff con un aminoácido sustrato.

14. (a) Esto controlará la síntesis de carbamoil fosfato mediante la regulación de la síntesis de glutamina, que es el sustrato preferido para la carbamoil fosfato sintetasa.
    (b) Esto tendrá como efecto la activación de la desadenililación de la glutamina sintetasa, lo cual activa a su vez la glutamina sintetasa. Esto impulsará la utilización de α-cetoglutarato para la síntesis de glutamato y glutamina.
    (c) Esto tiene también el efecto de activar la glutamina sintetasa, en unas condiciones en las que es abundante el ATP necesario para la reacción.

15. En primer lugar, purificar la enzima a partir de células HeLa u otro tejido humano y preparar un antisuero contra la enzima. A continuación, marcar los cultivos de células HeLa mediante el cultivo de estas células en un medio con un aminoácido radiactivo. A intervalos establecidos tras la extracción del aminoácido marcado (experimento de pulso-caza), preparar un extracto proteico acelular, tratar una alícuota con antisuero y medir la radiactividad en el inmunoprecipitado.

16. Dihidrofolato: N-1, C-2, C-4, N-5, C-7, N-8, C-9. GTP: N-3, C-2, C-6, N-7, C-1′, N-9, C-2′, respectivamente.

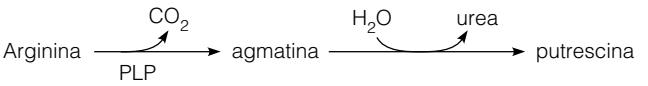
17. (a) B. (b) C. (c) D. (d) E, metionina.
    (e) A. (f) F. (g) C.

18. La adenililación tiende a inactivar a la glutamina sintetasa. Por tanto, el efecto de la glutamina es inhibir su propia síntesis cuando está presente en abundancia.

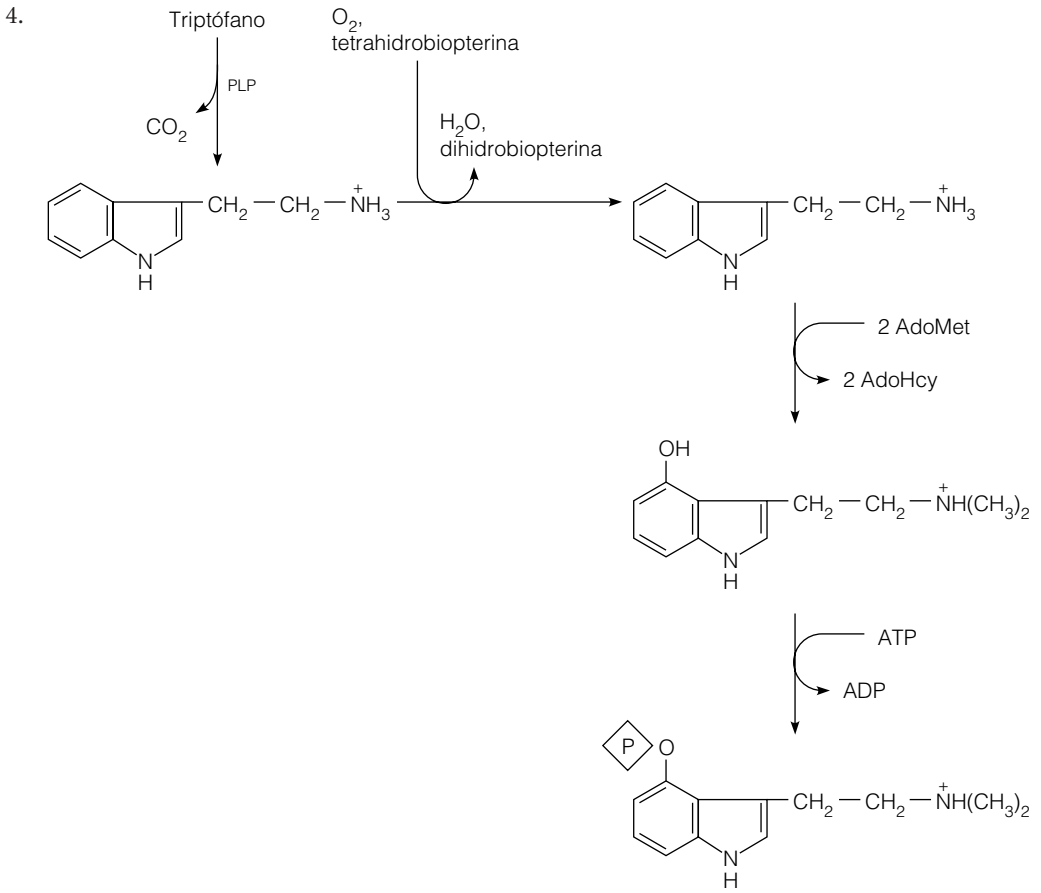
19. La respuesta más directa es colocar las dos enzimas en diferentes compartimientos celulares, la enzima catabólica en las mitocondrias y la enzima asimiladora en el citosol.

CAPÍTULO 21

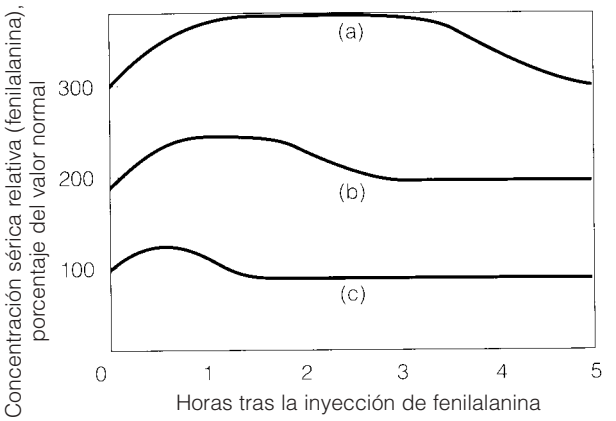
1. Formiminoglutamato, puesto que la siguiente reacción de su catabolismo requiere tetrahidrofolato.

2. 

3. El *N*-acetilglutamato es un intermediario de la biosíntesis de ornitina. La actividad del ciclo de la urea requiere la presencia de ornitina y de carbamoil fosfato. Si la cantidad de carbamoil fosfato disponible es insuficiente, se acumulará ornitina, y ello podría causar una acumulación del precursor de la misma, el *N*-acetilglutamato. Esta acumulación actúa como una señal para estimular la síntesis de carbamoil fosfato para aumentar el flujo por el ciclo de la urea.

4. 

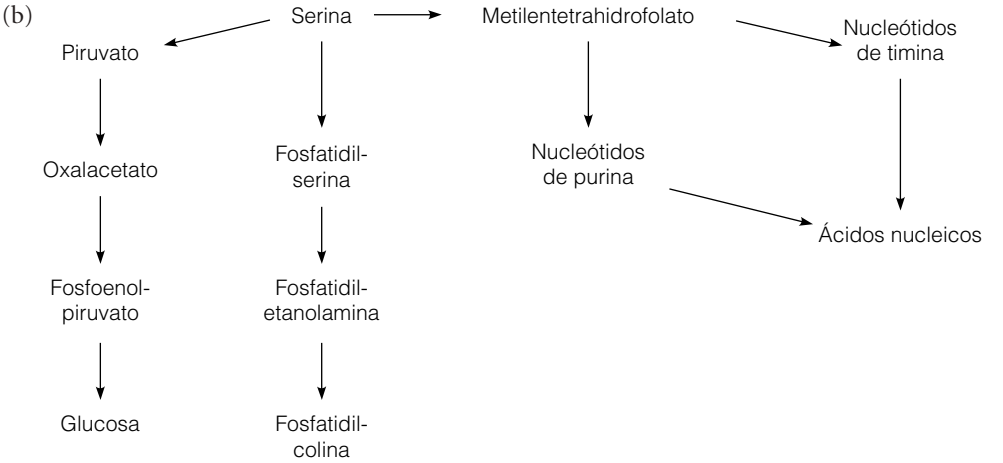
5.



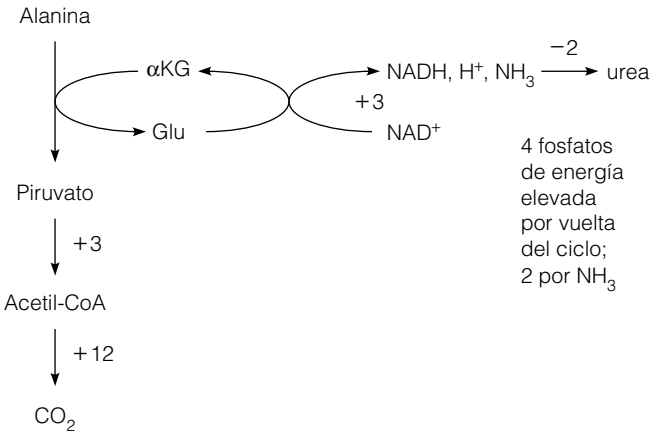
Una prueba de tolerancia al triptófano

6. (a) Tetrahidrofolato, glicina y serina transhidroximetilasa.

(b)

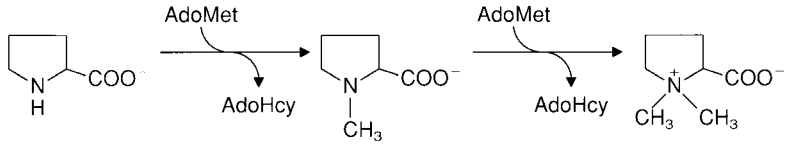


7. 16 ATP.



Leucina: 5 ATP netos, leucina ⟶ HMG-CoA.
Tirosina: 1 ATP neto, tirosina ⟶ fumarato + acetoacetato.
Cabría prever que todas estas rutas generaran algo más de energía en un pez, ya que en este caso no es necesario consumir ATP para convertir el amoníaco en urea para la excreción.

8. Una debería retroinhibirse o tener su síntesis reprimida por la treonina, una segunda por la metionina y una tercera por la lisina, ya que la reacción de la aspartoquinasa interviene en rutas biosintéticas diferentes que dan lugar a cada uno de estos tres aminoácidos.

9. 

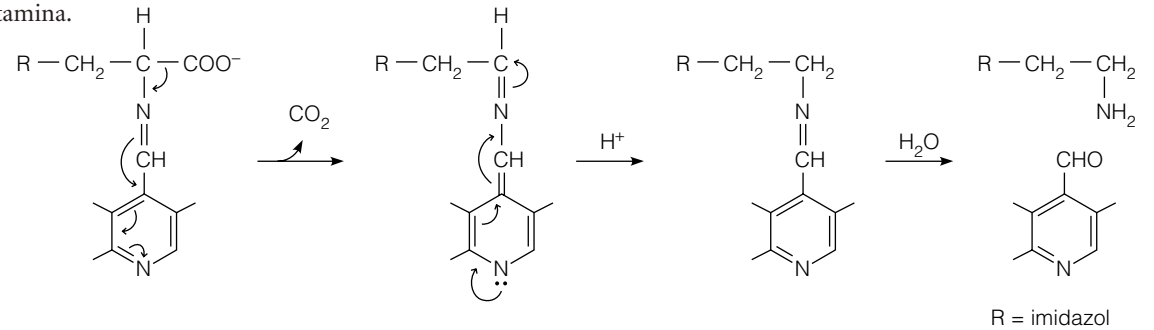
10. Porque las mismas enzimas intervienen en pasos comparables de la biosíntesis de la isoleucina y de la valina. Treonina deshidratasa.

11. Treonina ⟶ α-cetobutirato: inhibido por la isoleucina

α-Cetoisovalerato + acetil-CoA ⟶ β-isopropil malato: inhibido por la leucina

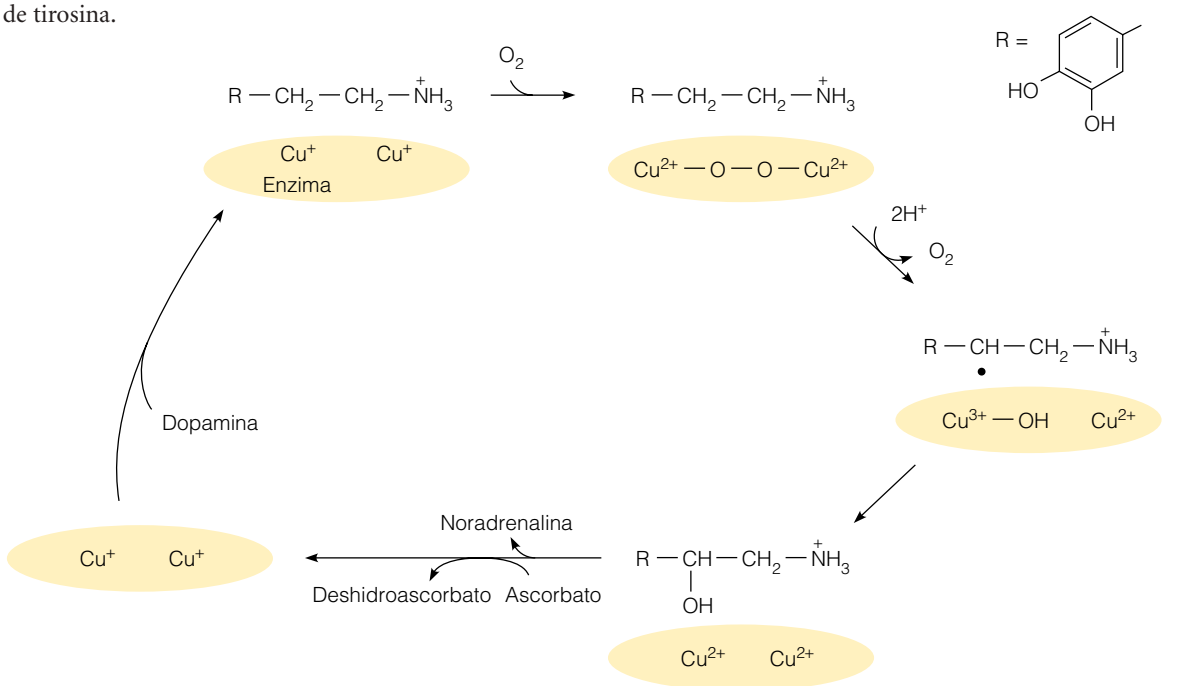
El control de la síntesis de valina es más complicado, ya que tres de las enzimas intervienen en la síntesis de los tres aminoácidos. Podría examinarse la retroinhibición acumulativa (producida por la valina, la isoleucina y la leucina) de la primera reacción dirigida:

Piruvato + hidroxietil-TPP ⟶ α-acetolactato

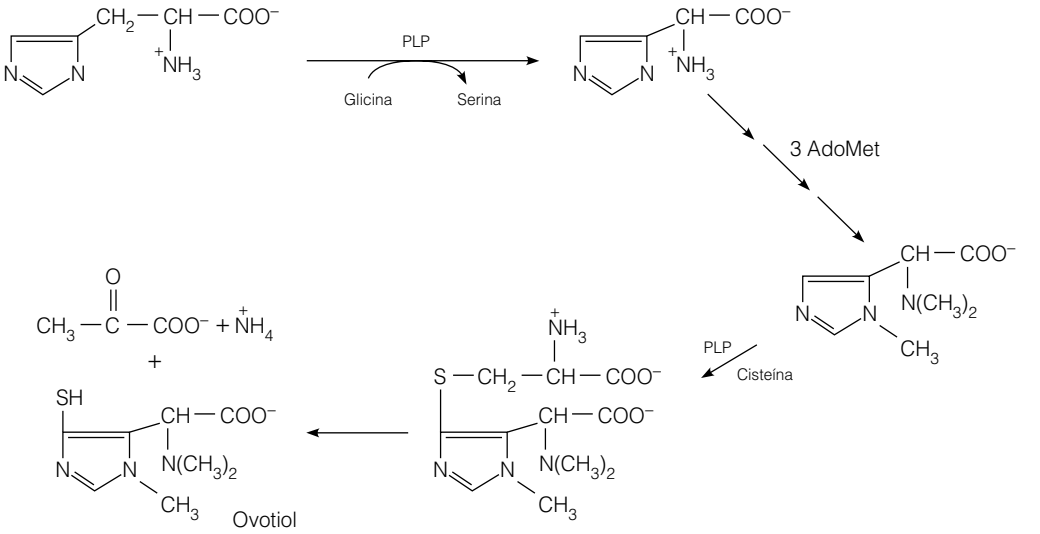
12. Histamina. 

13. (a) 5. (d) Ninguno.
(b) 2, 3, 4. (e) 5.
(c) 3,4. (f) 5.

14. Porque un déficit de pteridina reductasa deterioraría todas las reacciones dependientes de la tetrahidrobiopterina, que incluyen la síntesis de catecolaminas, serotonina y óxido nítrico, así como de tirosina.

15. 

16.



17. La estructura del glufosato es similar a la del fosfoenolpiruvato, lo que sugiere que actúa como inhibidor competitivo respecto al PEP y como inhibidor no competitivo respecto al ácido sikímico 3-fosfato.

18. Dado que la síntesis del diglucurónido de bilirrubina se produce en el hígado, una hepatopatía crónica impediría que se efectuara esta conversión, y se acumularía bilirrubina no conjugada. En el caso de una obstrucción de la vía biliar o de una elevada destrucción del hemo a causa de una hemólisis, inicialmente no habría un deterioro del sistema de conjugación, por lo que la mayor parte de la bilirrubina acumulada se encontraría en forma conjugada.

19. Reacción 1: piridoxal fosfato
Reacción 2 y reacción 3: O_2 y NADPH (u otro donante de dos electrones)

20. (a) La conjugación del glucuronato con la bilirrubina se lleva a cabo por una enzima hepática, y el daño hepático reduce la capacidad de esta reacción, la cual es esencial para la solubilización y excreción de la bilirrubina.
(b) Al desviar los intermediarios de la síntesis del hemo a las porifirinas de tipo I no utilizables, estas personas son incapaces de sintetizar hemo suficiente para la hemoglobina de los eritrocitos.
(c) El déficit de esta enzima reduce el flujo a través de la metionina sintasa, lo cual conduce a la acumulación de más homocisteína de la que puede metabolizarse a través de la cistationina.

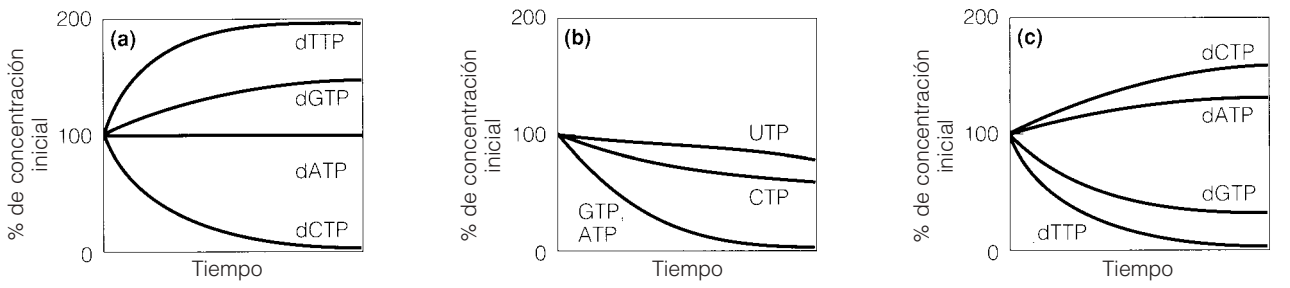
CAPÍTULO 22

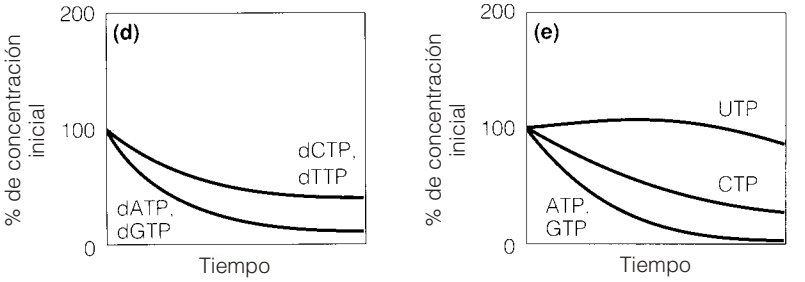
1. (a) C.
(b) E, F.
(c) A, B.

2. BrdUrd $\xrightarrow[\text{ATP}]{\text{TK}}$ Br-dUMP $\xrightarrow[\text{ATP}]{}$ Br-dUDP $\xrightarrow[\text{ATP}]{\text{Nucleósido difosfato quinasa}}$ Br-dUTP

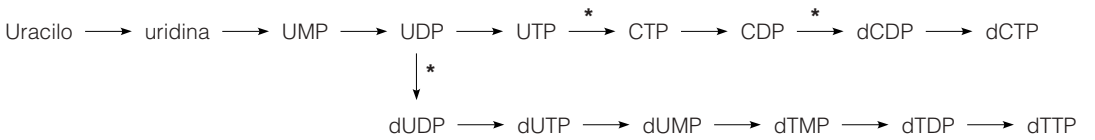
El Br-dUTP puede incorporarse al DNA en lugar del dTTP. Sin embargo, también podría inhibir la síntesis de DNA actuando como un falso retroinhibidor de la reducción del CDP. Dado que el dTTP es un inhibidor alostérico de la reducción del CDP por la ribonucleótido reductasa, el Br-dUTP podría tener un efecto similar. Ello podría inhibir la replicación del DNA al causar un déficit de dCTP.

3.





4. Esquema de la respuesta (* = lugares de regulación alostérica).



5. Esquema de la respuesta (* = lugares de regulación alostérica).



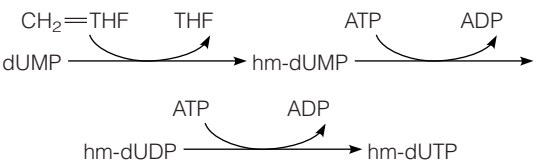
6. Podría dar lugar a la acumulación de adenosina y desoxiadenosina, como en el déficit de adenosina desaminasa. Ello haría que se acumulara dATP e inactivaría todas las actividades de la ribonucleósido difosfato reductasa.

7. La disminución del flujo a través de la HGPRT podría hacer que los sustratos se acumularan, incluyendo el PRPP. Esto podría incrementar la síntesis de pirimidina en la reacción de la orotato fosforribosiltransferasa, si las concentraciones de PRPP son normalmente inferiores a la saturación de esta enzima. La incorporación de orotato a las reservas de nucleótidos o de ácidos nucleicos produciría un cálculo razonable de la velocidad de síntesis de novo de los nucleótidos de pirimidina.

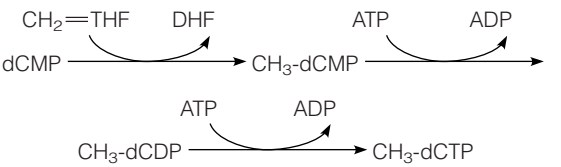
8. (a) Un déficit de la actividad timidilato sintasa, medido en un extracto acelular, o un requerimiento de timidina para el crecimiento de las células confirmarían que los mutantes presentan un déficit de esta enzima.
   (b) Dado que los mutantes presentan un flujo de reacción desdeñable a través de la reacción de la timidilato sintasa, no producen un agotamiento del tetrahidrofolato intracelular. La timidina satisface las necesidades existentes de síntesis de nucleótidos de timina.
   (c) El empleo de metotrexato en vez de trimetoprima, dado que la trimetoprima no es un inhibidor eficaz de la dihidrofolato reductasa de los mamíferos.

9. La mutación del gen DHFR que hace que la enzima sea resistente; la mutación en el mecanismo de control de la transcripción o la traducción que produce una sobreproducción de DHFR normal; el defecto del transporte que produce un fallo de la captación de metotrexato por parte de la célula.

10. (a) Inhibidores de la timidilato sintasa y de la dUTPasa especificados por el genoma vírico.
    (b) dUMP hidroximetilasa especificada por el virus y hm-dUMP quinasa:



   (c) dCMP metilasa especificada por el virus, por ejemplo,



11. (a) Mutantes con un defecto de la síntesis de DNA (falta de incorporación de timina al DNA).
    (b) Pueden seleccionarse mutantes con un déficit de timidina quinasa, timidilato sintasa, dihidrofolato reductasa o serina transhidroximetilasa por su resistencia a la desintegración de la [^{3}H]desoxiuridina incorporada.

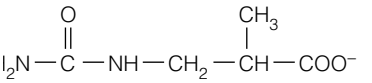
12. Si los intermediarios de una ruta se ven limitados en su capacidad de difusión para alejarse de las superficies enzimáticas, puede catalizarse de manera eficaz una ruta de múltiples pasos con unas concentraciones muy bajas de estado estacionario de los intermediarios. Así pues, podría establecerse un sistema de análisis para una secuencia de este tipo y podrían analizarse las concentraciones de intermediarios en diversos momentos. Otra prueba para la canalización sería la realización de una secuencia de múltiples pasos empezando con un sustrato marcado radiactivamente y determinando si la adición de un exceso claro de un intermediario sin marcar diluirá la radiactividad del producto. Una ruta canalizada por un complejo enzimático utiliza preferentemente intermediarios producidos por este complejo.

13. 4-carboxi-5-aminoimidazol ribonucleótido + aspartato + ATP $\longrightarrow$ *N*-succinilo-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido + ADP + P_i

    IMP + aspartato + GTP $\longrightarrow$ adenilosuccinato + GDP + P_i

    Citrulina + aspartato + ATP $\longrightarrow$ argininosuccinato + AMP + PP_i

14. La conversión descontrolada de UTP en CTP eleva las reservas de nucleótidos de citidina y desoxicitidina, al tiempo que se reducen las reservas de nucleótidos de uridina y timidina. El agotamiento del nucleótido de timidina endógeno explica la necesidad de timidina exógena para el crecimiento, y la alteración del equilibrio de la reserva de dNTP (la relación dCTP/dTTP está elevada) produce errores de replicación, principalmente la incorporación de C en vez de A, que conduce a mutaciones.

15. 

16. (a) La administración de timidina con el alimento estimula la síntesis a través de la ruta de salvamento y la acumulación de ATP, que inhibe la reducción de CDP por la ribonucleótido reductasa e inhibe la replicación del DNA mediante el agotamiento del dCTP de la célula.
    (b) El dATP se une a los lugares de actividad y de especificidad de la ribonucleótido reductasa, con una afinidad baja y alta, respectivamente. Cuando se une en el lugar de especificidad, el dATP activa la reducción del CDP y del UDP. A concentraciones superiores, el dATP se une a los lugares de actividad e inhibe las cuatro actividades de la ribonucleótido reductasa.

17. Succinil-CoA sintetasa.

CAPÍTULO 23

1. Se supone que el almidón aumenta las concentraciones sanguíneas de glucosa en menor medida de lo que lo hacen los azúcares simples. Así pues, hay una menor estimulación de la secreción de insulina. La insulina tendería a retardar la movilización energética a partir de las reservas intracelulares, algo que no es deseable durante un maratón.
2. Aproximadamente 2.5 horas.
3. Aproximadamente un 28% en reposo, alrededor de una décima parte del valor existente durante una carrera de maratón.
4. La proteólisis medida constituye la suma de las tasas de síntesis y degradación proteica. La tasa real de degradación proteica no aumenta, pero en la fase inicial de un ayuno, la utilización de aminoácidos en las rutas catabólicas reduce las concentraciones necesarias para respaldar la síntesis proteica a tasas que contrarresten la degradación. Posteriormente, cuando se utilizan en mayor medida los ácidos grasos y las cetonas para la producción de energía, se evita el consumo de aminoácidos para este fin, por lo que pueden emplearse con mayor facilidad para la síntesis de proteínas.
5. La hemoglobina glucosilada se acumula en la sangre de los diabéticos y puede medirse con facilidad. Dado que la reacción de glucosilación es covalente, la concentración de hemoglobina glucosilada refleja la concentración de glucosa en sangre a lo largo de un período de tiempo, mientras que una determinación simple de la glucosa refleja tan sólo el valor existente en el momento de la obtención de la muestra de sangre. Así pues, en un paciente diabético puede efectuarse una vigilancia con muchas menos extracciones de sangre y con una mayor exactitud con el empleo de las medidas de hemoglobina glucosilada.
6. El hígado contiene unas concentraciones bajas de la enzima que sintetiza la acetoacetil-CoA a partir del acetoacetato, ATP y CoA-SH. En consecuencia, cuando el hígado sintetiza cuerpos cetónicos, éstos no pueden activarse con facilidad para el catabolismo en el hepatocito. En vez de ello se liberan y finalmente se utilizan por otros tejidos.
7. Con el empleo de técnicas de DNA recombinante (véase el Capítulo 25), podrían prepararse secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen, o bien toda una subunidad α de una proteína G, o bien un dominio de unión de GTP, y se podría determinar si una "sonda" puede hibridar con el DNA procedente de la especie vegetal de interés. Otra posibilidad sería determinar si los anticuerpos contra las proteínas G de los mamíferos reaccionan de forma cruzada con alguna proteína de un extracto vegetal. De ser así, la proteína podría aislarse y podrían analizarse sus propiedades (incluyendo su capacidad de unión a nucleótidos de guanina). Otro enfoque sería buscar proteínas que puedan ser ADP-ribosiladas por la toxina del cólera o la toxina de la tos ferina.
8. Algunos factores posibles son los siguientes: almacenamiento, control de la actividad, plegado adecuado de la cadena polipeptídica, secuencias señal para la dirección a la parte adecuada de la célula.
9. Etileno. Probablemente sería difícil preparar un anticuerpo contra el mismo, puesto que es un gas.
10. Dado que los complejos hormona esteroidea-receptor activan la transcripción de genes específicos, cabría pensar que una hormona esteroidea pudiera activar la transcripción del gen de la adenilato ciclasa y, por tanto, aumentar la concentración de estado estacionario de esta enzima.
11. (a) 1, 4, 9, 14.
    (b) 5, 6, 8, 10, 16.
    (c) 1, 2, 7, 12, 16.
    (d) 1, 4, 15, 16.
12. Podría tratarse un complejo proteína G-GDP con γ-[^{32}P]ATP y determinar si se sintetiza GTP marcado radiactivamente. El hecho de que no se sintetice indica que la proteína G no puede fosforilar al GDP unido. También puede comprobarse que el GTP marcado radiactivamente puede desplazar al GDP no marcado unido en diversas condiciones. Puede mostrarse asimismo que la activación de la proteína G requiere la presencia de GTP. Por último, puede demostrarse que la subunidad α aislada tiene actividad GTPasa, al observar su capacidad de convertir el GTP en GDP en ausencia de este último.
13. El tejido adiposo carece de glicerol quinasa. La glucólisis genera dihidroxiacetona fosfato, que se reduce a glicerol-3-fosfato.

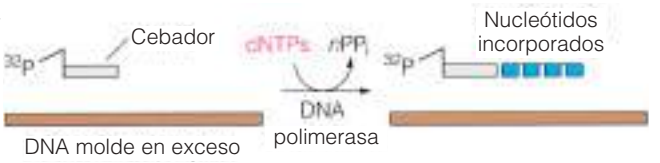
14. (a) La malonil-CoA a concentraciones elevadas inhibe la carnitina aciltransferasa I, y esto inhibe la cetogénesis al bloquear el transporte de los ácidos grasos al interior de las mitocondrias, tanto para la β-oxidación como para la cetogénesis.
    (b) La K_M elevada de la glucoquinasa, una enzima específica del hígado, permite a este órgano controlar la velocidad de fosforilación de la glucosa en una amplia gama de concentraciones de la misma. La acumulación de glucosa-6-fosfato activa la forma D de la glucógeno sintasa y fomenta el depósito de glucógeno. A través de varios mecanismos, el hígado percibe también cuándo las concentraciones sanguíneas de glucosa son bajas y en consecuencia moviliza sus reservas de glucógeno.

15. La fosforilación de la piruvato quinasa por la proteína quinasa dependiente del AMP cíclico. La forma fosforilada de la enzima es mucho menos activa que la forma desfosforilada.

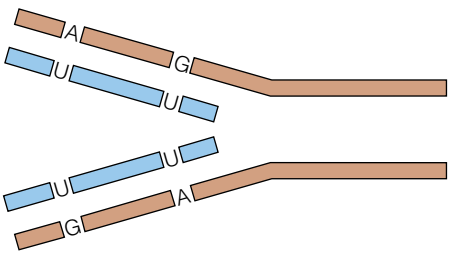
16. Dado que el inositol trisfosfato procede del fosfatidilinositol, que a su vez procede del diacilglicerol y del inositol, los inositol fosfatos deben desfosforilarse completamente para reincorporarse al fosfatidilinositol para otro proceso de síntesis.

17. (1) La mayor parte de las hormonas vegetales son compuestos terpenoides.
    (2) No hay péptidos ni hormonas esteroideas conocidas en las plantas superiores. Se han descrito, en las plantas, compuestos semejantes a los esteroides, pero no está claro que actúen como hormonas esteroideas.

CAPÍTULO 24

1. 

Utilizar un cebador marcado en el extremo 5′ y realizar una reacción de polimerasa en el DNA en exceso (de manera que cualquier polimerasa que se disocie se vuelva a unir a una nueva cadena). Detener las reacciones después de una breve incubación y determinar el peso molecular del material radiactivo mediante electroforesis en gel. El M_r nos indica cuántos nucleótidos se han incorporado por cadena, lo que proporciona la procesividad (número de nucleótidos incorporados por unidad de tiempo por cadena).

2. 

La incorporación de dUMP genera lugares para la ruptura de la cadena, cuando comienza el proceso de sustitución de uracilo. Si las rupturas de la cadena única no se hubieran reparado por completo al aislar el DNA, se observarán fragmentos cortos. Se identificarían menos si el experimento se realizara con un mutante con un déficit de la uracilo-DNA-*N*-glucosilasa, y más si el experimento se realizara con un mutante negativo para dUTPasa.

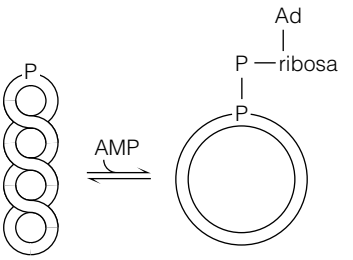
3. (a) 1.725 g/cm^3.
   (b) 1.772 g/cm^3.

4. (a) Eliminar prácticamente la ulterior incorporación de isótopo radiactivo.
   (b) Si se incorpora en forma de ribonucleótidos, el producto marcado será hidrolizado por álcali poco concentrado. Si se incorpora en forma de desoxirribonucleótidos, el producto será estable en álcali.
   (c) Los RNA cebadores son metabólicamente inestables. Se degradan rápidamente, al reemplazarse por los desoxirribonucleótidos en el DNA.

5. (a) Ácido desoxiinosínico (dIMP).
   (b) Conversión de un par de bases A-T en G-C.

6. (a) 0.016 mm.
   (b) 9.79×10^4 nucleótidos por horquilla por minuto.
   (c) 1250 orígenes (2500 horquillas de replicación).
   (d) 2937 kilopares de bases.

7. (a) Es el inverso de la reacción de la DNA ligasa. La interrupción de la cadena única relaja el DNA superenrollado.



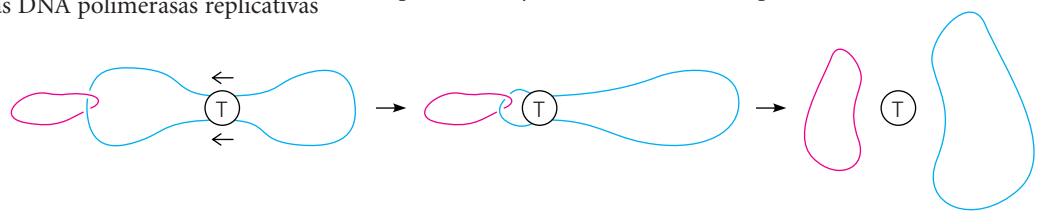
   (b) Analizar el DNA mediante electroforesis en gel.

8. Sincronizar las células y marcar con 5-bromodesoxiuridina de manera temprana o tardía en la fase S. Separar el DNA replicado mediante centrifugación de equilibrio en CsCl. Esto puede analizarse mediante hibridación en DNA clonados a partir de genes que se expresan o no se expresan en estas células.

9. 

Nota: La 3′ exonucleasa elimina las A y T mal apareadas antes de que se inicie la acción de la polimerasa.

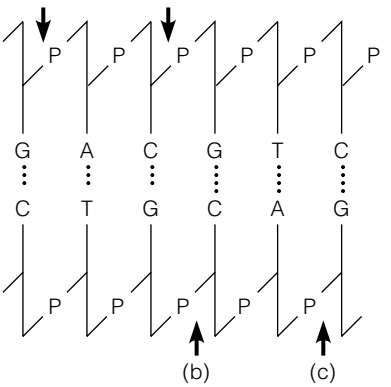
10. Se observó que la actividad de la polimerasa realiza una extensión más lenta a partir de una terminación con un apareamiento incorrecto. Así pues, una base mal apareada tiene un tiempo de residencia en la terminación 3′ superior al de una base apareada, lo que aumenta la probabilidad de ruptura por la actividad exonucleasa.
11. La didesoxiinosina se convierte en el correspondiente didesoxirribonucleósido trifosfato, ddITP. La incorporación de este nucleótido en lugar de dGTP bloquearía la ulterior elongación de la cadena, dada la ausencia de una terminación 3′-OH. Si la transcriptasa inversa del VIH incorpora ddITP con mayor facilidad que las DNA polimerasas celulares, la replicación del genoma del virus se inhibiría de manera selectiva.
12. Si la mutación afecta a uno de los lugares de control de retroacción de la ribonucleótido reductasa, la célula podría producir un exceso de dNTP hasta el punto de que podría superarse la inhibición competitiva in vivo de las DNA polimerasas replicativas por la afidicolina.
13. Inician ciclos de replicación a intervalos de menos de 40 minutos. En consecuencia, una célula puede tener dos cromosomas idénticos, ambos en el mismo estado de replicación.
14. Porque el bromuro de etidio en el gel relaja los superenrollamientos positivos, convirtiendo la doble cadena superenrollada en un círculo relajado, con la consiguiente pérdida de movilidad.
15. El modelo movimiento de gusano sugiere que cada subunidad de la helicasa está continuamente en contacto con sólo una cadena de DNA, mientras que en el modelo de mano sobre mano, se produce un intercambio continuo de cadena.
16. Un mecanismo tendría la enzima unida en dos lugares distantes sobre el DNA y luego se deslizaría a lo largo del DNA de forma que los dos puntos de contacto del DNA estarían cada vez más juntos. Si se encuentra algún tallo o enlace, puede eliminarse por el corte y nuevo sellado de la topoisomerasa.



17. Abundancia fraccional: 10^{-6}.
Abundancia tras 10 ciclos, 1.02×10^{-3}; 15 ciclos, 3.3×10^{-2}; 20 ciclos, 1.0 (esencialmente 100%).

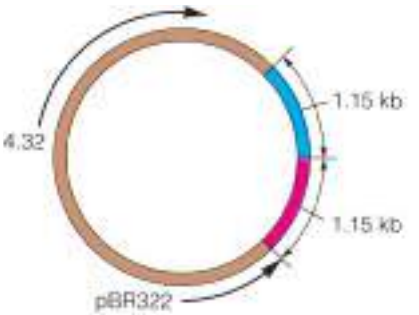
CAPÍTULO 25

1. Aumento, debido a que la reparación de mal apareamiento repararía el nucleótido mal apareado "correcto" la mitad de las veces.
2. (a) 2, 7, 9, 11.
(b) 3, 5, 6.
(c) 2, 11.
(d) 1, 11.
(e) 1, 8, 11.
(f) 4, 6.
(g) 10, 11.
3. Extremos igualados: *Eco*RII, *Hae*III, *Hin*dII, *Hpa*I, *Sma*I. No igualados por la acción de la DNA polimerasa (debido a que el extremo retraído carece de hidroxilo 3′): *Hga*I, *Hha*I, *Ple*I, *Pst*I.
4. (a)

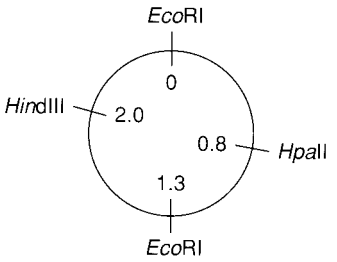


(d) A una distancia de hasta 1 kb de este lugar.
(e) 4.1 kpb.

5. (a) A.
(b) B.
(c) C.
(d) D.
(e) A, C.
(f) C.
6. Porque ambas cadenas están metiladas.
7. El déficit de dUTPasa aumenta la incorporación de dUMP al DNA y aumenta la posterior reparación por escisión. El déficit de ligasa aumenta la semivida de los fragmentos de Okazaki. Ambos trastornos aumentan el número de interrupciones de una sola cadena, que son las estructuras que inician la recombinación.
8. (a) Para linealizar el DNA circular, de manera que su movilidad electroforética pueda compararse con las de los demás fragmentos de DNA lineales.
(b) El DNA recombinante contiene dos insertos en tándem de 1.15 kb.
(c)

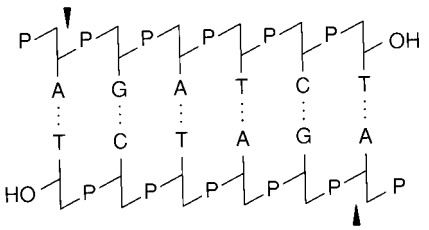


9. (a) Circular.
(b)



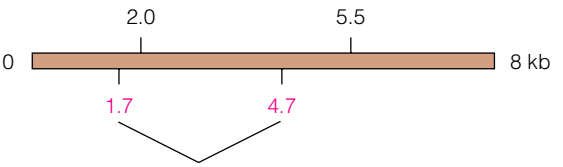
(c) 7.
(d) Ruptura con *Hpa*II y *Hin*dIII.

10. (a)



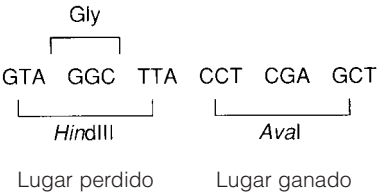
(b) A y B.
(c) E y F.
(d) F.

11. Lugares *Bgl*I



Sería laborioso, pero podrían separarse las cadenas de DNA y se podría determinar qué cadena hibrida con el RNA. Ello determinaría la orientación de la transcripción, puesto que conocemos los extremos 3′ y 5′ del DNA.

12. En primer lugar, clonar un gran número de fragmentos de DNA a partir de células que contengan el virus integrado. A continuación realizar hibridaciones de colonia con estos clones, utilizando DNA del virus marcado como sonda de hibridación. Mediante el análisis de transferencia Southern de los clones que contienen el DNA del virus, identificar fragmentos del DNA del virus que sean más grandes que los correspondientes fragmentos de DNA del virus de doble cadena no integrado. Estos corresponderán a secuencias del virus fusionadas con secuencias celulares adyacentes. A continuación, pueden subclonarse y secuenciarse.
13. Para identificar rápidamente los clones deseados.
14.



15. El sistema de reparación de mal apareamiento dirigido por el metilo corrige muchos de los mal apareamientos establecidos deliberadamente. También muchas de las reacciones de extensión de la cadena in vitro no se realizan por entero alrededor del molde circular, puesto que deben sufrir ligamientos.
16. Digerir muestras idénticas de DNA genómico con *Msp*I y *Hpa*II. Separar los fragmentos mediante electroforesis y tratar con una sonda de DNA recombinante marcada radiactivamente que contenga el gen que interesa. Cada lugar CpG que está metilado (dentro de la secuencia CCGG) mostrará ruptura por *Msp*I pero no por *Hpa*II, mientras que los lugares sin metilar serán reconocidos como lugares de ruptura por ambas enzimas.
17. La desaminación no enzimática de la citosina en un par de bases G·C da un par de bases G·U que se repara fácilmente por el sistema de reparación de escisión de base de la uracil-*N*-glucosilasa. Sin embargo, si la C en ese par de bases se ha metilado antes de la desaminación, entonces la desaminación de G·mC da un par de bases G·T, que no se corrige tan fácilmente. También es posible que la metilación de C en un par de bases G·C facilite su desaminación.
18. Es un resultado sorprendente, ya que la función de la proteína MutT se cree que es la hidrólisis del 8-oxo-dGTP, un producto de oxidación del dGTP. No está claro cómo puede producirse esta oxidación en ausencia de O_2. Quizás la MutT también actúa sobre otro nucleótido mutágeno aún sin identificar, que puede formarse durante el crecimiento anaerobio.

CAPÍTULO 26

1. Marcar las células con pulsos con un RNA precursor radiactivo, aislar el RNA e hidrolizarlo con bases débiles. Ello producirá un nucleósido por terminación 3′. El total de picomoles de nucleótido marcado en el hidrolizado dividido por el número de picomoles de nucleósidos da el número de nucleótidos incorporados por cadena en el intervalo de marcado.
2. En primer lugar, diseñar unas condiciones en las que tan sólo se sintetice el gen clonado. Podría iniciarse la transcripción mediante la adición de tres ribonucleótidos. En el momento cero, añadir el cuarto nucleótido y detener la incubación tras un período fijo. Utilizar una cantidad baja y medida del molde para que el número de genes que se transcriben sea aproximadamente igual al número de moléculas de molde. Determinar la longitud media de los transcritos sintetizados mediante electroforesis en gel.
3. Mediante electroforesis en gel de productos de RNA marcados radiactivamente. Cualquier especie con pausa se acumulará y podrá detectarse en forma de una banda más intensa de lo esperado en la autorradiografía del gel.
4. (a) $$\frac{(10 \text{ moléculas/célula})/6.02 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}}{0.3 \times 10^{-15} \text{ L/célula}}$$

$$= 5.5 \times 10^{-8} \text{ M}$$

(b) $$\frac{10 \text{ moléculas/célula}}{5.5 \times 10^{-8} \text{ M}} = \frac{2 \text{ moléculas/célula}}{1.1 \times 10^{-8} \text{ M}}$$

(c) Aproximadamente 2.5×10^{-14} M.
(d) Una célula en crecimiento rápido podría tener, como media, dos copias, debido a que cada cromosoma esté replicado parcialmente.

5. Es improbable, ya que en los eucariotas la transcripción se produce en el núcleo y la traducción en el citosol. Así pues, no se da el acoplamiento directo entre la transcripción y la traducción, que es esencial para la atenuación.
6. Puede ser una forma de control de la síntesis total de RNA cuando se agotan las reservas de ribonucleótidos, al controlar la iniciación y evitar la incorporación inútil de nucleótidos a moléculas de RNA que podrían no completarse.
7. Un dinucleótido, complementario de los dos primeros nucleótidos del molde, puede evitar el primer paso de incorporación del nucleótido y permitir una transcripción eficaz a concentraciones de nucleótidos bajas. A continuación pueden detenerse todos los procesos de transcripción en un nucleótido sabiendo la secuencia de nucleótidos del gen que se transcribe y añadiendo tan sólo dos o tres rNTP, en vez de los cuatro, de manera que el nucleótido que falte sea el que se hubiera introducido en el lugar en el que se desea detener la transcripción.
8. Con el empleo de la técnica de huellas dactilares, realizar experimentos de unión competitiva para determinar si un represor inhibe la unión de la RNA polimerasa y viceversa. Se examinará también la transcripción in vitro para determinar si la transcripción se extiende hasta el lugar de unión del represor.
9. Dado que utiliza la región –35 del *trp* y la región –10 del *lac*, el promotor *tac* híbrido se aproxima más estrechamente a las secuencias de consenso –35 y –10, en comparación con las regiones *lac* o *trp*.

	Número de identidades con la secuencia de consenso
lac	9/12
trp	8/12
tac	10/12

10. (a) El gen *i* del plásmido codifica un represor que no puede unirse al inductor.
    (b) El operador del plásmido no puede unirse al represor.
11. El Mu se inserta de forma aleatoria en el genoma (véase el Capítulo 25). Si se inserta más adelante de un promotor inducible por un daño, la irradiación UV de esa célula activará la síntesis de la β-galactosidasa a partir del genoma del fago integrado.
12. La actinomicina es un inhibidor no competitivo ya que se une al DNA, no a un lugar de unión del sustrato de la enzima. La cordicepina actúa como nucleótido, 3′-desoxiATP. Éste debe competir con el ATP por la utilización por la RNA polimerasa.
13. (a) RNA $^{3'}$ CUAGGAUUCAGUAAGG $^{5'}$

    DNA $^{5'}$ CTACCTAAGTCATTCCCATTACCAGTATAG $^{3'}$
    $^{3'}$ GATGGATTCAGTAAGGGTAATGGTCATATC $^{5'}$

    (b) La caja de Pribnow esta subrayada en (a).

    (c)
    ```
      ↓
    TAGCTA
    ATCGAT
      ↑
    ```

14.

	Antes	Después
(a)	−	++
(b)	−	++
(c)	−	+
(d)	−	−
(e)	−	−
(f)	++	++
(g)	−	+

15. Una mutación que elimina la unión al represor. Las subunidades del represor mutante podrían interactuar con las del represor de tipo normal sintetizado en la misma célula para formar tetrámeros mixtos con una afinidad reducida por el operador del DNA.
16. Una posibilidad es que la velocidad de adición de un ribonucleótido a un ribonucleótido 3′-terminal que esté mal apareado con su DNA molde pueda ser relativamente lenta, por ejemplo,

    $^{3'}$ ACTTCGATTTGGCCCAATGCTCA . . . DNA
    $^{5'}$ UGAAGCUAAG-OH + CTP ⟶

    Si hay un retraso significativo en la adición del nucleótido correcto (C) a una terminación 3′ mal apareada (G, mal apareada con T), entonces puesto que la reacción de polimerización es reversible, puede aumentar la probabilidad de que el nucleótido mal apareado reaccione con el pirofosfato y se escinde en forma de GTP.
17. Si dos genes de un plásmido están orientados en la misma dirección y ambos están siendo transcritos, el superenrollamiento creado por delante del gen 1 puede compensarse por el infraenrollamiento creado por detrás del gen 2 y viceversa.

CAPÍTULO 27

1. ···Ile-Tyr-Ile-Tyr-Ile-Tyr-···. Bien AUA codifica Ile y UAU Tyr o viceversa.
2. El código mitocondrial utiliza AUA para codificar *Met* y no *Ile*. El experimento también nos dice que UAU es un codón de Tyr.
3. (a) En primer lugar, los codones como UUU o AAA pueden dar sólo un polipéptido. En segundo lugar, algunos marcos de lectura en algunos polinucleótidos se leerán como repeticiones de codones de parada.
   (b) $(GUA)_n$ Val_n o Ser_n (el tercer marco de lectura es UAG = detención).
   $(UUA)_n$ Leu_n o Tyr_n o Ile_n.
4. Cualquier polinucleótido construido a partir de un tetranucleótido repetido, salvo que intervenga un codón de parada.
5. La secuencia Shine-Dalgarno, como la AUG que se lee únicamente como fMet, se encuentra cerca del extremo 5′ del mensaje. Ello implica que, en la formación del complejo de iniciación, tan sólo puede unirse una región próxima al extremo 5′ del mRNA. Es decir, una secuencia Shine-Dalgarno que se encuentra por azar dentro de un mensaje no podría fijarse en este lugar para formar un complejo de iniciación. Puede haber otras explicaciones posibles.

6. (a) $^{5'}$GGU$^{3'}$, $^{5'}$GGC$^{3'}$ o $^{5'}$GGA$^{3'}$. Todos ellos son codones de Gly.
   (b) $^{5'}$AGU$^{3'}$ o $^{5'}$AGC$^{3'}$. Ambos son codones de Ser.
7. (a) La explicación más sencilla para las partículas 100S y 130S es que representan algún tipo de dímeros y trímeros de partículas 70S (obsérvese la falta de linealidad de S con la masa). Por lo que ahora sabemos, representan pequeños oligorribosomas en el mRNA. La investigación no pudo descubrir el mecanismo básico de la síntesis de proteínas.
   (b) La disociación habría producido subunidades ribosómicas y RNA libre. Dado que eran tan sólo fragmentos de polirribosomas, la probabilidad de que se reasociaran en el RNA es pequeña. Además, el mRNA es extremadamente inestable, salvo que se tomen precauciones para eliminar los restos de ribonucleasas (un hecho que este investigador no apreció en ese momento). En consecuencia, probablemente el mRNA se degradó con rapidez.
8. Dado que el tRNA va a liberarse del lugar E, el reconocimiento del codón y el apareamiento con el anticodón son, sin lugar a duda, ventajosos y pueden, en realidad, ser perjudiciales para una liberación suave.
9. Con la infección por MS2 de las bacterias naturales, la liberación del ribosoma se produce con bastante frecuencia en la terminación de la secuencia de la proteína de cubierta, produciendo el exceso necesario de proteína de la cubierta. En el mutante, esperaríamos que se formara mucha más replicasa, lo cual conduciría a una sobreproducción ineficaz de replicasa y a un desequilibrio de la relación RNA/proteína.
10. Si δ es la probabilidad de que se cometa un error en cada paso, $1 - \delta$ es la probabilidad de que no se haya producido un error en un determinado paso. La probabilidad de que no haya habido ningún error en *ninguno* de los n pasos es, pues, $(1 - \delta)^n$. Ésta es la probabilidad de que la proteína esté completamente sin errores.
11. (a) 0.990.
    (b) 0.904. En este caso, cerca del 10% de las proteínas contendrían uno o varios errores.
12. Las bacterias reciben un pulso de aminoácidos radiactivos (por ejemplo, [^{14}C]leucina) para marcar las nuevas cadenas polipeptídicas. Las células se rompen; se eliminan mediante centrifugación los nucleoides, las paredes celulares y las membranas, y el lisado se coloca sobre un gradiente de sacarosa. La aparición de ^{14}C en las fracciones que sedimentan con una rapidez superior a 70S indican que la proteína recién sintetizada se asocia a estas estructuras. Las muestras obtenidas un cierto tiempo *después* del pulso tendrán poco marcaje en estas fracciones, lo que indica que era la proteína del proceso de transducción la que se asociaba a la fracción polisómica. La digestión con ribonucleasa desplazará el marcaje radiactivo a 70S o inferior.
13. 36 (ATP/glucosa)/4 (ATP/residuo añadido) = 9 residuos añadidos/glucosa

    Esto corresponde a un máximo, puesto que cualquier ineficacia en la producción de ATP o el empleo de ATP adicional en la lectura de pruebas y otros procesos reducirá la eficacia.
14. Cada molécula de puromicina se une a la cadena polipeptídica que ha abortado y se emplea, por tanto, una sola vez. Una molécula de eritromicina puede bloquear todo un polirribosoma y puede utilizarse repetidas veces.
15. Rompiendo un enlace fosfodiéster cerca del extremo 3′ del RNA 16S podría eliminarse (y de hecho se elimina) la secuencia que une la secuencia Shine-Dalgarno del RNA mensajero.
16. Cualquier cosa que reemplace los grupos fosfato cargados con grupos sin carga ayudaría siempre que las estructuras permanezcan suficientemente como RNA para permitir la hibridación con el DNA.

CAPÍTULO 28

1. (a) 3.3×10^{-13} g = 0.33 picogramos.
   (b) 3.4 cm.
   (c) 7×10^3.
   (d) 1.5×10^9 km, es decir, 10 veces la distancia al sol.
2. Un posible método es el siguiente. Pueden sincronizarse células (por ejemplo, mediante el bloqueo con timidina; véase el Capítulo 22), permitiendo que una mayor fracción se encuentre en la fase S al mismo tiempo. La administración de 5-bromodesoxiuridina marcará el DNA recién sintetizado y hará que sea más denso que el DNA global. La fragmentación con una nucleasa de restricción producirá fragmentos, circundantes a los orígenes de la replicación, que podrán separarse mediante centrifugación en gradiente de densidad. Si el análisis se realiza en un período inicial de la fase S, los orígenes representarán una fracción significativa del DNA denso.
3. Si tomamos el nucleosoma medio (incluyendo el ligador) que contenga unos 200 pb, obtenemos una relación de compactación de 40 para la fibra de cromatina de 30 nm. Evidentemente, esta fibra debe plegarse en gran medida sobre sí misma para producir la relación general de más de 7000 que se observa en el cromosoma en metafase.
4. (a) Si el nucleosoma estuviera posicionado exactamente (ocupando el mismo lugar en el fragmento de 208 pb), sólo se hubiera obtenido un único par de bandas (que sumarían 146 pb). El hecho de que se observaran dos pares de este tipo (29 + 117,39 + 107) indica que había dos localizaciones alternativas, con una separación de 10 pb.
5. Utilizando un gráfico de log (pb) frente a d para los marcadores, pueden interpolarse los fragmentos de cromatina para obtener los tamaños de 185, 380, 578 y 772 pb. Se indica una repetición de aproximadamente 195 pb, con el monosoma ligeramente degradado.
6. La explicación más sencilla se basa en la hipótesis de que el DNA se encuentra en la superficie de la partícula. En consecuencia, cada cadena presenta una exposición máxima aproximadamente cada 10 residuos y es muy vulnerable a la formación de mellas en estos puntos con una separación periódica.
7. El DNA realiza 1.75 vueltas de superhélice hacia la izquierda en cada nucleosoma. Estas vueltas están "limitadas" y no pueden eliminarse mientras están presentes las histonas. Sin embargo, si se eliminan primero las histonas, el DNA así producido tendrá su-

perenrollamientos no limitados que pueden relajarse por la topoisomerasa.

8. (a) Si el origen está en el centro, observamos que cada horquilla de la burbuja de crecimiento sólo tiene que replicar la mitad del DNA, por lo que serían necesarios 5.79 días. Cualquier otra posición del origen aumentaría el tiempo.
   (b) Aproximadamente 8.3 minutos. Sin embargo, esto supone que todas las regiones de replicación lo hacen simultáneamente. Se sabe que algunas regiones se replican antes que otras, lo cual aumentará el tiempo total necesario para la fase S.
9. Las histonas son necesarias en cantidades muy elevadas durante tan sólo un período de tiempo breve (el inicio de la fase S) del ciclo celular. Además, siempre son necesarias en cantidades equivalentes para formar los nucleosomas. La presencia de múltiples copias facilita una transcripción rápida, y un número igual de cada dominio deberá facilitar el mantenimiento del equilibrio de la producción. La ausencia de intrones y de colas de poli(A) implica que dos de los pasos principales que intervienen en el procesamiento de la mayor parte de los genes eucariotas se evitan, con lo que los mRNA de las histonas pueden pasar rápidamente al citoplasma.
10. Una forma sería medir la distribución de las longitudes de cola de poli(A) en el mRNA total. Si se observara una distribución que se separara a un valor mínimo concreto, la hipótesis se vería respaldada.
11. Existen muchas maneras posibles. Una sería simplemente realizar enlaces cruzados del DNA con las histonas en un sistema de transcripción in vitro. Si esto bloquea la transcripción, que se produce en presencia de nucleosomas no entrecruzados, será una prueba de la necesidad de la eliminación o, al menos, el desplazamiento. Una prueba más crítica sería llevar a cabo la transcripción in vitro en presencia de un exceso del DNA no genómico marcado radiactivamente. Si se encuentran nucleosomas tras la transcripción, está indicada la eliminación del DNA genómico.
12. (a) 7 exones, 6 intrones.
    (b) Estas dos estructuras serán los extremos opuestos del RNA (cadena más corta). Sin embargo, no es posible identificar de manera inequívoca los extremos 5′ y 3′ a partir de ello a no ser que se conozca algo de su secuencia.
13. (a) Fallo para eliminar el intrón concreto.
    (b) Fallo general del corte y empalme (probablemente letal).
    (c) La proteasa podría liberarse al citoplasma y tener un efecto muy nocivo.
14. Es necesaria una identificación muy específica y tal vez también un paso de corrección de pruebas. Como en cualquier proceso bioquímico en el que las tasas de error deben ser muy bajas, puede adquirirse exactitud a costa del empleo de energía libre (compárese con la traducción).
15. El paso 2 forma un enlace tioéster de energía elevada. El paso 5 es una reacción que requiere el reconocimiento específico y tal vez un paso de corrección de pruebas.

Glosario

absorbancia (A_λ) Cifra sin dimensiones que indica hasta qué punto absorbe una disolución de una sustancia la luz de una determinada longitud de onda. Se define como el logaritmo negativo de la fracción de luz de longitud de onda λ que pasa a través de una muestra de la disolución. Su valor depende de la longitud del paso de la luz, la concentración de la disolución, y el coeficiente de extinción de la sustancia a esa longitud de onda.

acetilcolinesterasa Enzima que se encuentra en las sinapsis colinérgicas y que degrada la acetilcolina, con lo que interrumpe la acción de ésta sobre la célula postsináptica.

ácido graso Ácido carboxílico con una cadena hidrocarbonada larga.

ácidos biliares Una familia de derivados anfipáticos del colesterol que se producen en el hígado y se excretan por la bilis; las sales de los ácidos biliares emulsionan la grasa en el intestino.

ácidos grasos esenciales Ácidos grasos que deben obtenerse de la alimentación, puesto que no pueden sintetizarse en el organismo en cantidades adecuadas. Como ejemplos cabe citar el ácido linoleico y el ácido β-linolénico.

acoplamiento quimiosmótico Acoplamiento de una reacción química catalizada por una enzima con el transporte de una sustancia a través de una membrana, a favor o en contra de su gradiente de concentración. El ejemplo más destacado es el acoplamiento de la síntesis de ATP con el movimiento de protones a través de una membrana en respuesta a un gradiente protónico.

activación por catabolitos En las bacterias, un sistema de control de la transcripción que induce la síntesis de enzimas para el catabolismo de los sustratos energéticos distintos de la glucosa cuando las concentraciones de glucosa son bajas. Interviene en ello una proteína activadora, la CRP, que une AMP cíclico cuando la glucosa es baja; este complejo se une entonces a lugares del DNA y promueve la transcripción de los genes adecuados.

adenililación En las células, la transferencia de un grupo adenililo desde el ATP a otra molécula. Algunas enzimas se regulan mediante una adenililación reversible.

adipocitos Células grasas; células que están especializadas en el almacenamiento de triacilgliceroles y, cuando es necesario, en la liberación de éstos a la sangre en forma de ácidos grasos y glicerol.

agonista En biología molecular, una sustancia que mimetiza los efectos celulares de un compuesto natural (como una hormona o un neurotransmisor) al unirse al mismo receptor celular y activarlo. Compárese con *antagonista.*

alcaloides Grupo amplio de sustancias básicas nitrogenadas, que se encuentran en las plantas. La mayor parte de ellas tienen un sabor amargo, y muchas son farmacológicamente activas. El término puede utilizarse también para los compuestos sintéticos del mismo tipo. La morfina, la cafeína y la nicotina son alcaloides conocidos.

alditoles Compuestos que se producen mediante la reducción del grupo carbonilo de un monosacárido (es decir, reduciendo el R—CH═O a R—CH_2—OH).

aldosa Monosacárido en el que el grupo carbonilo se encuentra al final de la cadena y constituye, por tanto, un grupo aldehído. Compárese con *cetosa.*

alelo Una versión específica de un gen que ocupa un lugar determinado en el genoma. Se diferencia de los demás alelos del mismo gen por diferencias de la secuencia de nucleótidos.

alostérico En lo relativo a las enzimas, un efecto que se produce sobre la actividad de una parte de una enzima (como un lugar activo) por la unión de un efector a una parte diferente de la enzima.

aminas biógenas Una serie de derivados de aminoácidos de bajo peso molecular que contienen un grupo amino básico y actúan en el organismo como mediadores intercelulares. Son ejemplos de aminas biógenas la serotonina, la histamina y la adrenalina.

amino terminal Véase *N-terminal.*

aminoácidos esenciales Aminoácidos que deben obtenerse de la alimentación, ya que no pueden sintetizarse en el organismo (al menos en cantidades suficientes).

amortiguación Capacidad de una mezcla de un ácido y su base conjugada a un pH cercano a su pK_a para reducir al mínimo los cambios de pH producidos por la entrada de ácido o de base.

anabolismo La suma de todos los procesos metabólicos mediante los cuales se forman las biomoléculas complejas a partir de moléculas más sencillas. En general, estos procesos consumen energía celular en lugar de producirla. Compárese con *catabolismo.*

anaerobio Indica la ausencia de oxígeno o la ausencia de una necesidad de éste; los procesos que han de producirse o que pueden tener lugar sin oxígeno se denominan procesos anaerobios.

andrógenos Hormonas sexuales masculinas; concretamente, las hormonas esteroideas testosterona, dihidrotestosterona y androstenediona, que actúan fundamentalmente impulsando el desarrollo sexual masculino y manteniendo las características sexuales masculinas.

anfipático Respecto a una molécula la propiedad de tener partes hidrófobas y partes hidrófilas. Generalmente un extremo o un lado de la molécula es hidrófilo y el otro extremo o lado es hidrófobo.

anfólito Una sustancia cuyas moléculas tienen grupos ácidos y grupos básicos.

anómeros Estereoisómeros de moléculas de monosacáridos cicladas, que difieren tan sólo en la configuración de los sustituyentes del carbono carbonilo. (Este carbono es un centro quiral de la forma ciclada pero no de la forma de cadena abierta de la molécula.)

antagonista En bioquímica, una sustancia que contrarresta los efectos celulares de un compuesto natural (como una hormona o un neurotransmisor) al unirse al receptor celular del compuesto y bloquear su acción. Compárese con *agonista.*

anticodón Triplete de nucleótidos de un tRNA que se une a un codón complementario del mRNA durante la síntesis de proteínas, y de este modo interviene en la traducción del codón en un aminoácido específico.

anticuerpos (también denominados inmunoglobulinas) Conjunto de proteínas relacionadas producidas por los linfocitos B que pueden unirse de manera específica con los antígenos. Algunos tipos se liberan a los líquidos corporales y se encargan de la inmunidad humoral; otros tipos se mantienen en la superficie de la célula B, o son captados y presentados por otros tipos celulares.

antígeno Sustancia que puede desencadenar una respuesta inmunitaria específica.

antígenos de los grupos sanguíneos Grupo de oligosacáridos que se transportan en forma de glucoproteínas y glucolípidos en la superficie de las células, incluidas las células sanguíneas. Están codificados por un gran número de *loci* génicos polimorfos y pueden provocar una respuesta inmunitaria en una persona con antígenos de grupos sanguíneos diferentes.

antimetabolito Una sustancia que es un análogo estructural de un metabolito normal o que se parece al mismo, y que interfiere en la utilización del metabolito por la célula.

antioxidante Compuesto fuertemente reductor, como el ácido ascórbico, que contrarresta la tendencia de un metabolito a oxidarse a una especie potencialmente tóxica o perjudicial.

antiporte Proceso de transporte de membrana que acopla el transporte de una sustancia en una dirección a través de una membrana con el transporte de una sustancia distinta en la otra dirección. Compárese con *simporte.*

antisuero Suero que contiene una concentración elevada de anticuerpos contra un determinado antígeno.

apolipoproteínas Proteínas específicas que forman la fracción proteica de las lipoproteínas; intervienen en las interacciones de las lipoproteínas con los tejidos.

apoptosis Muerte celular programada (para diferenciarla de la necrosis; véase *autólisis*).

arqueobacterias Grupo de procariotas que se diferencian desde el punto de vista bioquímico de las bacterias verdaderas (Eubacterias), y que se separaron de ellas en una fase temprana de la historia de la vida. Las arqueobacterias modernas viven en su mayor parte en medios con unas condiciones extremas, como los manantiales ácidos de agua caliente.

atenuación Mecanismo para regular la expresión de los genes procariotas, en el que la síntesis de un transcrito de RNA de nueva formación se termina antes de que la RNA polimerasa haya alcanzado los genes estructurales.

atmósfera contraiónica Una nube de pequeños iones con carga contraria (*contraiones*) que se reúnen alrededor de un macroión disuelto en una solución salina. Las atmósferas contraiónicas protegen en parte a los macroiones frente a las cargas de los otros e influyen, por tanto, en sus interacciones.

autocatalítica Hace referencia a la reacción que cataliza una enzima sobre parte de su propia estructura, como una ruptura que realiza una proteasa sobre su propio precursor polipeptídico.

autoinmunidad Situación en la que el organismo pone en marcha una respuesta inmunitaria contra uno de sus propios componentes normales.

autólisis Muerte celular programada; la autodestrucción ordenada de una célula en un organismo multicelular. Es el proceso mediante el cual se eliminan del cuerpo las células no deseadas. También se denomina apoptosis (véase).

autorradiografía Técnica en la que un material que contiene elementos marcados radiactivamente (por ejemplo, un corte de tejido o un gel de cromatografía) se pone en contacto con una película fotográfica; la radiactividad produce el velado de la película que forma una imagen de los elementos marcados.

autótrofos Organismos que son capaces de sintetizar sus compuestos orgánicos enteramente a partir de precursores inorgánicos, y que necesitan tan sólo CO_2 como fuente de carbono. Compárese con *heterótrofos.*

auxótrofos Cepas de microorganismos que requieren como nutriente una determinada sustancia que no necesita la cepa prototipo. Generalmente, esta necesidad se debe a una mutación que inactiva una enzima necesaria para la síntesis endógena de la sustancia.

axón Prolongación en forma de hebra que se extiende a partir de una célula nerviosa por la que se transmiten los impulsos a otras células nerviosas o a células efectoras, como las musculares o las glandulares. La mayor parte de las células nerviosas tienen un solo axón; hay otras extensiones más cortas que reciben los impulsos de otras neuronas y a las que se denomina dendritas.

B-DNA Un DNA dúplex con una estructura específica de hélice a derechas. Es la forma habitual de las dobles cadenas de DNA in vivo.

barrera hematoencefálica Barrera de permeabilidad selectiva que se encuentra en las paredes de los vasos sanguíneos del

cerebro y que impide que la mayor parte de las moléculas grandes o polares entren con facilidad en el tejido cerebral. Físicamente, la barrera está formada por uniones estrechas entre las células endoteliales; estas células tienen transportadores para sustancias polares, como la glucosa, que tienen que llegar al cerebro.

biblioteca En genética molecular, una colección amplia de fragmentos de DNA aleatorios clonados procedentes de un determinado organismo, que corresponden a veces a la totalidad de su genoma nuclear.

bicapa lipídica Estructura de membrana que puede formarse mediante moléculas anfipáticas en un medio acuoso. Consiste en dos capas de moléculas distribuidas de tal manera que los grupos de cabeza polares se colocan hacia el agua y las colas no polares hacia el centro de la membrana. La estructura de las membranas celulares es una bicapa lipídica.

bombeo de protones Bombeo activo de protones a través de una membrana celular para formar un gradiente protónico. Así, por ejemplo, las cadenas de transporte electrónico de las membranas mitocondrial interna y tilacoide incorporan bombas de protones, que crean un gradiente protónico que activa las ATP sintasas de estas membranas.

cadena con sentido Para un gen, la cadena de DNA que es homóloga a un transcrito de RNA del gen, es decir, que lleva la misma secuencia que el transcrito, excepto porque contiene T en vez de U. Es, pues, complementaria a la cadena que ha servido de molde para el RNA.

cadena conductora Durante la replicación del DNA, la cadena que se sintetiza en la misma dirección que la dirección del movimiento de la horquilla de replicación. Se sintetiza de una forma continua y no en fragmentos. Compárese con *cadena retardada.*

cadena de transporte electrónico Secuencia de transportadores electrónicos en una célula con un potencial de reducción progresivamente mayor que están ligados, con lo que los electrones pueden pasar de un transportador al siguiente. La cadena captura parte de la energía liberada por el flujo de los electrones y lo utiliza para impulsar la síntesis de ATP.

cadena más En los genomas víricos, una cadena de ácido nucleico que puede actuar como mRNA o (para una cadena de DNA) que es homóloga a una cadena que puede hacerlo; a diferencia de la cadena complementaria (menos). La mayor parte de los virus con genomas de una sola cadena empaquetan únicamente la cadena más o la cadena menos en los viriones; la otra cadena se forma de manera transitoria durante la replicación. Compárese con *cadena menos.*

cadena menos En los genomas víricos, una cadena de ácido nucleico que es complementaria de la cadena de RNA que actúa como mRNA. Compárese con *cadena más.*

cadena molde Una cadena de DNA o RNA que dirige la síntesis de una cadena de ácido nucleico complementaria.

cadena respiratoria Cadena de transporte electrónico que se utiliza durante la respiración celular y que tiene al O_2 como aceptor electrónico final.

cadena retardada Durante la replicación del DNA, la cadena que se sintetiza en dirección contraria a la dirección del movimiento de la horquilla de replicación. Se sintetiza mediante una serie de fragmentos, que se unen posteriormente. Compárese con *cadena conductora.*

caja homeo Elemento de secuencia común de aproximadamente 180 pares de bases que se encuentra en los genes homeóticos. Codifica un elemento de unión al DNA con especificidad de secuencia de la clase hélice-bucle-hélice. Véase también *genes homeóticos.*

caloría Unidad de energía definida como la cantidad de energía calorífica que aumentará la temperatura de 1 gramo de agua 1°C. 1 caloría = 4.182 julios (véase).

canal con puerta Un canal iónico de membrana que puede abrirse o cerrarse en respuesta a las señales procedentes del exterior o el interior de la célula.

caotrópico Propiedad de ser capaz de romper la estructura de enlace de hidrógeno del agua. Las sustancias que se unen muy bien al hidrógeno, como la urea o el clorhidrato de guanidina, son caotrópicas. Las disoluciones concentradas de estas sustancias tienden a desnaturalizar las proteínas ya que reducen el efecto hidrófobo.

carbono asimétrico Átomo de carbono que lleva cuatro sustituyentes diferentes y que actúa, por tanto, como centro de quiralidad, lo que significa que la sustancia puede presentarse en dos enantiómeros (estereoisómeros que no son imágenes especulares superponibles uno de otro) diferentes.

carboxilo terminal Véase *C-terminal.*

carga energética Magnitud que indica el estado de las reservas energéticas de una célula. Es igual a las reservas de la célula de las fuentes de energía libre ATP y ADP (teniendo en cuenta que el ADP almacena menos energía libre que el ATP) dividido por el aporte total de ATP y sus productos de degradación ADP y AMP: ([ATP] + 1/2[ADP])/([ATP] + [ADP] + [AMP]).

carnitina Derivado de bajo peso molecular de la lisina que lleva los ácidos grasos a través de la membrana mitocondrial interna hasta la matriz. La porción ácido graso se transfiere desde la CoA a la carnitina para el paso a través de la membrana y luego se transfiere de nuevo al CoA. La carnitina liberada en el lado de la membrana en contacto con la matriz es devuelta para que vuelva a utilizarse de nuevo.

caspasas Familia de proteasas que intervienen en la apoptosis (véase).

catabolismo Suma de todos los procesos metabólicos mediante los cuales las moléculas complejas se degradan a otras más sencillas, y que incluye los procesos mediante los cuales las moléculas se degradan para proporcionar energía celular. Compárese con *anabolismo.*

catepsinas Proteasas lisosómicas que actúan degradando proteínas en los lisosomas y que se liberan también en la célula extensamente durante la autólisis celular (muerte celular programada).

cebador Fragmento corto de DNA o RNA que forma pares de bases con una cadena molde de DNA y proporciona un extremo —OH 3′ libre, a partir del cual la DNA polimerasa puede extender la cadena de DNA. También indica los oligómeros de DNA que se utilizan en la reacción en cadena de la polimerasa.

célula exocrina Célula que segrega una sustancia que se excreta a través de un conducto hacia el tubo digestivo o hacia el exterior del organismo. Las células exocrinas se agrupan en las glándulas exocrinas.

células T colaboradoras Linfocitos T cuya función consiste en reconocer a los antígenos y ayudar a otras células de defensa a poner en marcha una respuesta inmunitaria. Ayudan a activar a las células B estimuladas por el antígeno (dando lugar a la producción de anticuerpos específicos) y/o a las células T citotóxicas estimuladas por el antígeno (produciendo un ataque sobre las células antigénicas) y dan lugar también a mediadores inmunitarios que estimulan las respuestas de defensa inespecíficas.

centro de quiralidad En relación con los compuestos orgánicos, un átomo de carbono que tiene cuatro sustituyentes diferentes unidos a él. Un grupo así no puede superponerse a su propia imagen especular y puede existir, por tanto, en dos enantiómeros.

centro de reacción En la fotosíntesis, una pareja específica de moléculas de clorofila de un fotosistema que captan la energía luminosa absorbida por otras moléculas de clorofila y la pasan a un aceptor electrónico, que normalmente es el primer compuesto de una cadena de transporte electrónico.

centrómero Región de un cromosoma en la que las dos cromátidas hermanas se unen juntas. También es el lugar de fijación de las fibras del huso durante la mitosis y la meiosis.

cetosa Monosacárido en el que el grupo carbonilo se encuentra dentro de la cadena y constituye, por tanto, un grupo cetona. Compárese con *aldosa.*

chaperoninas Proteínas que intervienen en la regulación del plegado de otras proteínas. Algunas de ellas hacen que las proteínas se plieguen correctamente; otras impiden el plegado prematuro, y otras impiden que los polipéptidos se asocien con otros polipéptidos hasta que se hayan plegado adecuadamente.

ciclinas Proteínas que regulan el ciclo celular mediante la unión a proteína quinasas nucleares específicas y su activación. Las activaciones de las quinasas dependientes de las ciclinas se producen en tres puntos durante el ciclo celular, lo que proporciona tres puntos de decisión respecto a si el ciclo continuará.

ciclo C_4 Un ciclo de algunas plantas que reduce al mínimo los efectos de pérdida que se dan con la fotorrespiración, al utilizar una enzima distinta de la rubisco para realizar la fijación inicial del CO_2. Esta enzima se encuentra en las células mesófilas, en las que fija el CO_2 en un compuesto de cuatro carbonos (de ahí la denominación de C_4). Este carbono fijado se traslada a unas células con fundas protegidas, en donde se libera en forma de CO_2 y entra en el ciclo de Calvin.

ciclo de Calvin Ciclo de reacciones oscuras de la fotosíntesis mediante el cual se fija el CO_2, se reduce y se convierte en gliceraldehído-3-fosfato (el precursor de las hexosas monofosfato).

ciclo de Cori Ciclo metabólico mediante el cual el lactato producido por los tejidos que realizan la glucólisis anaerobia, como el músculo en ejercicio, se regenera a glucosa en el hígado y vuelve a los tejidos a través del torrente sanguíneo.

ciclo de Krebs Véase *ciclo del ácido cítrico.*

ciclo del ácido cítrico (también llamado ciclo del ácido tricarboxílico y ciclo de Krebs). Ciclo de reacciones que tiene lugar en la matriz mitocondrial y que conlleva la oxidación de unidades acetilo a CO_2 con la producción de equivalentes reductores y ATP. Es una ruta central de la respiración oxidativa. Otros sustratos además de la acetil-CoA pueden incorporarse al ciclo en puntos intermedios.

ciclo del ácido tricarboxílico Véase *ciclo del ácido cítrico.*

***cis*-dominante** Se refiere a una mutación de un elemento regulador genético que afecta a la expresión de los genes adecuados *únicamente* en el mismo cromosoma, pero no en otro cromosoma homólogo presente en la misma célula. La dominancia *cis* indica que un elemento regulador no codifica un factor difusible.

cistrón La unidad más pequeña de DNA que debe estar intacta para codificar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Corresponde, pues, a la parte de codificación de un gen, menos las secuencias 5′ y 3′ no traducidas, y los elementos reguladores.

citocinesis División de la célula eucariota para formar dos células. Generalmente, acompaña a la división nuclear, aunque también puede producirse la división nuclear sin citocinesis.

citosol Medio líquido que está situado en el interior de una célula pero fuera del núcleo y los orgánulos (en los eucariotas) o del nucleoide (en los procariotas). Es una solución o suspensión semilíquida concentrada.

citoesqueleto Red organizada de proteínas en forma de cilindros y de fibras que ocupa toda la célula, y ayuda a darle su forma y motilidad. El citoesqueleto incluye filamentos de actina, microtúbulos y un grupo diverso de proteínas filamentosas a las que se denomina colectivamente filamentos intermedios.

clon Grupo de células, organismos o secuencias de DNA que son genéticamente idénticos, puesto que proceden todos de un único antecesor común.

cloroplastos Orgánulos de las células vegetales y las algas que realizan fotosíntesis.

código genético Código mediante el cual una secuencia de nucleótidos de una molécula de DNA o RNA especifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Está formado por codones de tres nucleótidos que especifican un determinado aminoácido o indican al ribosoma que detenga la traducción y libere el polipéptido. Con unas pocas excepciones, de importancia menor, todos los seres vivos utilizan el mismo código.

codones de parada Codones del RNA que señalan a un ribosoma que detenga la traducción de un mRNA y libere el polipéptido. En el código genético normal, estos codones son UAG, UGA y UAA.

coeficiente de difusión (*D*) Coeficiente que indica la rapidez con la que una determinada sustancia difunde en un medio concreto bajo la influencia de un determinado gradiente de concentración.

coeficiente de extinción (ε_λ) Coeficiente que indica la capacidad de una determinada sustancia en disolución para absorber la luz de una longitud de onda λ. El coeficiente de extinción molar, ε_M, es la absorbancia que presentaría una solución 1 M en un trayecto de luz de 1 cm.

coeficiente de fricción Coeficiente que determina la fuerza de fricción sobre una determinada partícula (como una molécula) en un medio concreto y a una velocidad dada. En el contexto de la electroforesis o la centrifugación, determina la rapidez con la que una molécula se desplazará en un medio concreto en respuesta a un campo eléctrico o una fuerza centrífuga determinada.

coeficiente de Hill (n_H) Coeficiente que indica el grado de cooperatividad de una transición cooperativa. Es la pendiente máxima de una representación de Hill de la transición.

coeficiente de reparto (*K*) Coeficiente que indica la forma en que se distribuirá una determinada sustancia entre dos medios si se permite que difunda hasta el equilibrio entre ellos; es igual a la relación de las solubilidades de la sustancia en los dos medios.

coeficiente de sedimentación (*S*) Coeficiente que determina la velocidad a la que sedimentará una partícula concreta durante la centrifugación; depende de la densidad del medio, la densidad específica de la partícula y el tamaño, forma y masa de la misma.

coenzima Una molécula orgánica pequeña que se une a una enzima y que es esencial para su actividad, pero que no sufre una alteración permanente en la reacción. La mayor parte de las coenzimas derivan metabólicamente de las vitaminas.

complejo de Golgi Apilamiento de vesículas membranosas planas que se encuentra en el citoplasma. Actúa como centro de direccionamiento de las proteínas destinadas a la secreción a los lisosomas o a la membrana celular; realiza unas funciones similares para los lípidos de la membrana y modifica y termina las porciones de oligosacáridos de las glucoproteínas.

complejo F_0F_1 (también denominado ATP sintasa F_0F_1) Complejo enzimático de la membrana mitocondrial interna que utiliza la energía del gradiente protónico transmembrana para catalizar la síntesis de ATP. La porción F_0 del complejo se extiende de un lado a otro de la membrana y la porción F_1, que realiza la actividad ATP sintasa, se proyecta hacia el interior de la matriz mitocondrial.

complejo promotor abierto Un complejo entre la holoenzima RNA polimerasa y un promotor que ha sufrido un desenrollamiento inicial (se ha "abierto") preparatorio para la iniciación de la transcripción. Va precedido de un *complejo promotor cerrado*, mucho menos estable, en el que el promotor no está desenrollado, y que puede separarse o evolucionar hacia un complejo promotor abierto.

complejo proteinasa multicatalítico (**MPC**) Complejo voluminoso de enzimas proteolíticas que se encuentra en el citosol de muchas células eucariotas y parece actuar en la destrucción programada de las proteínas celulares.

concatémero Molécula de DNA formada por una serie de genomas completos en tandem. Algunos genomas de fagos forman concatémeros durante la replicación, como parte de una estrategia para la replicación de toda la longitud de una doble cadena de DNA lineal.

conjugación En lo que se refiere a las bacterias, un proceso en el que dos células bacterianas se aparean y una de ellas pasa una copia (generalmente parcial) de su cromosoma a la otra. También se denomina apareamiento bacteriano.

constante de afinidad Véase *constante de asociación.*

constante de asociación (*K*) (también llamada constante de afinidad) Constante de equilibro que indica la tendencia de dos especies químicas a asociarse entre sí; es igual a la concentración de la forma asociada dividida por el producto de las concentraciones de las especies libres en el equilibrio.

constante de disociación Para un ácido, la constante de equilibrio K_a de la disociación del ácido en su base conjugada y un protón. Para un complejo de dos biomoléculas, la constante de equilibrio K_d de la disociación en las moléculas componentes.

constante de velocidad En relación con las reacciones químicas, una constante que relaciona la velocidad de una reacción concreta con las concentraciones de los sustratos.

constante dieléctrica Constante sin dimensiones que expresa el efecto de apantallamiento de un medio interpuesto sobre la interacción de dos partículas cargadas. Cada medio (como una solución acuosa o una parte interpuesta de una molécula orgánica) tiene una constante dieléctrica característica.

constitutivo Con respecto a la expresión génica, hace referencia a las proteínas que se sintetizan a una velocidad bastante estable en todo momento, en vez de ser inducidas y reprimidas en respuesta a los cambios de las condiciones existentes.

corte y empalme alternativo Corte y empalme de un RNA transcrito eucariota de diferentes formas, para incluir o excluir a determinados exones del mRNA final.

crestas Pliegues de la membrana mitocondrial interna que se proyectan dentro de la matriz mitocondrial. Las enzimas de la cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa están situadas principalmente en las crestas.

cromatina Material filamentoso de los cromosomas eucariotas, formado por DNA con las histonas y las otras proteínas asociadas. Durante la interfase, se dispersa y ocupa la mayor parte del núcleo; durante la división nuclear se condensa para formar los cromosomas compactos.

cromóforo Grupo químico que absorbe luz a longitudes de onda características.

cromosoma politénico Cromosoma extra-grueso que incluye muchas copias paralelas de la molécula de DNA original; se produce mediante ciclos repetidos de replicación del DNA sin separación de las copias resultantes. Los cromosomas politénicos se encuentran en varios tipos de células, en especial en las células de las glándulas salivales de *Drosophila*; son útiles para el establecimiento de los mapas cromosómicos, puesto que son grandes y los genes de las hebras están dispuestos en un orden estricto.

cromosomas artificiales de levaduras (YAC) Cromosomas artificiales utilizados para la clonación y el mantenimiento de fragmentos grandes de DNA genómico con fines de investigación. Un YAC se construye mediante técnicas de DNA recombinante a partir de un centrómero de levadura, dos telómeros (extremos del cromosoma), marcadores seleccionables y DNA clonado del orden de megabases.

cruciforme En una doble cadena de DNA, una estructura que puede adoptar una secuencia palindrómica, en la que cada cadena aparea las bases consigo misma para formar un brazo que se proyecta desde la doble cadena principal y termina en un bucle en horquilla. Los dos brazos forman una "cruz" con la doble cadena principal.

C-terminal (también llamado carboxilo terminal) El extremo de una cadena polipeptídica que contiene un grupo carboxilo sin reaccionar. Véase también *N-terminal.*

cuerpos cetónicos Las sustancias acetoacetato, β-hidroxibutirato y acetona, que se producen a partir del exceso de acetil-CoA en el hígado, cuando la velocidad de β-oxidación de los ácidos grasos en las mitocondrias del hígado supera a la velocidad a la que se utiliza la acetil-CoA en la generación de energía o la síntesis de ácidos grasos.

curio Unidad básica de la desintegración radiactiva. Cantidad de radiactividad equivalente a la producida por 1 g de radio, es decir, 2.22×10^{12} desintegraciones por minuto.

densidad de superhélice (σ) Una medida de la superhelicidad de una molécula de DNA. Es igual al cambio del número de ligazón causado por la introducción del superenrollamiento dividido por el número de ligazón que tendría la molécula de DNA en su estado relajado.

desnaturalización Para un ácido nucleico o una proteína, la pérdida de la estructura terciaria y secundaria, de manera que el polímero se convierte en un ovillo aleatorio. En el caso del DNA, este cambio comporta la separación de las dos cadenas. La desnaturalización puede inducirse por calentamiento y por determinados cambios del entorno químico.

despurinación Ruptura del enlace glucosídico entre el C-1′ de la desoxirribosa y una base púrica del DNA. Se utiliza en el análisis de secuencia de Maxam-Gilbert.

determinante antigénico Véase *epítopo.*

diabetes mellitus Enfermedad producida por una deficiencia de la acción de la insulina en el cuerpo, que se debe a unas concentraciones bajas de insulina o a unas concentraciones insuficientes combinadas con una falta de respuesta de las células diana a la insulina. La enfermedad se manifiesta fundamentalmente por alteraciones de la homeostasis de los combustibles, con hiperglucemia (concentraciones anormalmente elevadas de glucosa en sangre).

diálisis Proceso mediante el cual se añaden o se eliminan solutos de bajo peso molecular de una disolución mediante la difusión a través de una membrana semipermeable.

diastereómeros Moléculas que son estereoisómeros pero no enantiómeros entre sí. Isómeros que difieren en la configuración alrededor de dos o más átomos de carbono asimétricos y no son imágenes especulares completas.

dicroísmo circular Propiedad de absorber la luz polarizada circularmente hacia la derecha y la luz polarizada circularmente hacia la izquierda en una cantidad diferente. Los estereoisómeros presentan dicroísmo circular. También algunos tipos de estructura secundaria, como las hélices α y las láminas β de las proteínas presentan un dicroísmo circular predecible a longitudes de onda específicas.

difracción de rayos X Técnica que se utiliza para determinar la estructura tridimensional de las moléculas, incluyendo las macromoléculas. Un cristal o una fibra de la sustancia se ilumina con un haz de rayos X y los elementos de repetición de la estructura dispersan los rayos X formando un patrón de difracción que aporta información sobre la estructura de la molécula. Véase también *patrón de difracción.*

dinucleótido de flavina y adenina (FAD), mononucleótido de flavina (FMN) Coenzimas que derivan de la vitamina B_2 (riboflavina) que actúan como aceptores electrónicos en las enzimas que catalizan las reacciones de transferencia de electrones.

diploide Respecto a una célula u organismo, la posesión de dos conjuntos homólogos de cromosomas por núcleo (con la posible excepción de los cromosomas sexuales, que pueden estar presentes en una sola copia). Compárese con *haploide.*

dipolo inducido Una molécula tiene un dipolo inducido si un campo eléctrico externo induce una distribución asimétrica de la carga existente en ella.

dipolo permanente En química, una molécula que tiene una distribución asimétrica permanente de la carga, de manera que un extremo es negativo y el otro es positivo. La molécula de agua es un ejemplo de ello: el extremo de oxígeno tiene una carga negativa parcial, y el extremo de hidrógeno tiene una carga positiva parcial.

dismutación Una reacción en la que dos moléculas de sustrato idénticas tienen destinos diferentes. Particularmente, una reacción en la que una de las moléculas de sustrato se oxida y la otra se reduce.

dispersión de neutrones de ángulo bajo Conjunto de técnicas que pueden utilizarse para determinar el tamaño de una partícula en disolución o para establecer el tamaño o el espaciamiento de regiones internas que pueden diferenciarse por su distinta capacidad de dispersar los neutrones, como los componentes proteínas y ácidos nucleicos de una partícula nucleoproteica o las proteínas marcadas de un complejo de múltiples subunidades.

DNA girasa Enzima capaz de introducir giros superhelicoidales negativos en una hélice de DNA circular.

DNA satélite DNA formado por múltiples repeticiones en tandem de secuencias nucleotídicas sencillas muy cortas. Es habitual que constituya entre un 10 y un 20% del genoma de los eucariotas superiores; al menos parte del mismo puede desempeñar un papel en la estructura cromosómica.

dominio Una parte de una cadena polipeptídica que se pliega sobre sí misma para formar una unidad compacta que continúa siendo reconocible dentro de la estructura terciaria de toda la proteína. Las proteínas globulares grandes están formadas a menudo por varios dominios, que están conectados entre sí por otros fragmentos de polipéptido relativamente alargados.

drepanocitosis Enfermedad genética que se produce por una mutación de la hemoglobina. Produce eritrocitos frágiles, lo que conduce a la anemia.

ecuación de Michaelis-Menten Ecuación que proporciona la velocidad de una reacción catalizada por una enzima en función de las concentraciones de sustrato y enzima, así como de dos constantes que son específicas para una determinada combinación de enzima y sustrato: una constante de velocidad, k_{cat}, para la producción catalítica del producto cuando la enzima está saturada, y la constante de Michaelis, K_M.

ecuación de Nernst Ecuación que relaciona el potencial eléctrico que existe a través de una membrana con las concentraciones de iones presentes a ambos lados de la misma.

ecuación de velocidad Ecuación, como la ecuación de Michaelis-Menten (véase), que relaciona la velocidad de una reacción catalizada por una enzima con parámetros medibles.

edición del RNA Tipo de procesamiento del RNA que se ha observado en los mRNA mitocondriales de determinados eucariotas, en el que la secuencia de RNA se altera mediante la inserción de residuos de uridina en lugares específicos.

efecto Bohr Efecto del pH sobre la curva de unión del oxígeno a la hemoglobina, por el cual una disminución del pH produce un descenso de la afinidad por el oxígeno. El efecto impulsa tanto la liberación de oxígeno de la hemoglobina en los tejidos, como la liberación del CO_2 al aire en los pulmones.

efecto hidrófobo En lo relativo a las proteínas globulares, la estabilización de la estructura terciaria que se produce como consecuencia del empaquetamiento de las cadenas laterales hidrófobas en el interior de la proteína.

efecto Pasteur Inhibición de la glucólisis por el oxígeno. Fue descubierto por Pasteur cuando observó que los cultivos aerobios de levaduras metabolizaban la glucosa de manera relativamente lenta.

eficacia cuántica (Q) En relación con la fotosíntesis, la relación de moléculas de oxígeno liberadas respecto a los fotones absorbidos.

einstein Un mol de fotones.

eje de simetría Eje imaginario a través de una estructura, de forma que la rotación de la estructura alrededor del eje con un ángulo adecuado mantiene inalterado el aspecto de la estructura.

eje diádico Eje de simetría doble.

electroforesis Método para separar sustancias con carga eléctrica que se encuentran en una mezcla. Se coloca una muestra de la mezcla sobre un medio de soporte (un trozo de papel de filtro o un gel), al que se aplica un campo eléctrico. Cada sustancia cargada migra hacia el cátodo o hacia el ánodo a una velocidad que depende de su carga neta y de su interacción de fricción con el medio. Véase también *electroforesis en gel.*

electroforesis en gel Tipo de electroforesis en el que el medio de soporte es una fina capa de gel colocada entre placas de vidrio. La técnica se utiliza habitualmente para separar proteínas y ácidos nucleicos. Véase también *electroforesis, enfoque isoeléctrico.*

electroforesis en gel de campo pulsátil Un tipo de electroforesis en gel en el que la orientación del campo eléctrico se cambia periódicamente. Esta técnica permite separar moléculas de DNA muy grandes, de un tamaño que llega a ser el de cromosomas enteros.

elemento sensible a las hormonas Lugar del DNA que une un complejo hormona-receptor. La unión del complejo a un elemento sensible a las hormonas afecta a la transcripción de genes específicos.

elementos *Alu* Secuencias de DNA de unos 300 pares de bases que se encuentran en múltiples copias diseminadas por todo el genoma de los mamíferos; el genoma humano tiene centenares de miles de ellas. Es posible que tengan una función todavía desconocida o que sean simplemente "parásitos", que se diseminan como elementos móviles por el genoma.

elementos genéticos transponibles Elementos genéticos que pueden moverse de un lugar a otro del genoma. Un transposón es un tipo de elemento transponible.

enantiómeros (también denominados isómeros ópticos) Estereoisómeros que no son imágenes especulares superponibles entre sí. La denominación de *isómeros ópticos* procede del hecho de que los enantiómeros de un compuesto desvían la luz polarizada en direcciones contrarias.

endergónico En un sistema no aislado, un proceso que se acompaña de un cambio positivo de la energía libre (ΔG positivo) y que, por tanto, no está favorecido termodinámicamente. Compárese con *exergónico.*

endonucleasa Enzima que rompe una cadena de ácido nucleico en un enlace fosfodiéster interno.

endonucleasas de restricción Enzimas que catalizan la ruptura de la doble cadena de DNA en secuencias de bases específicas. En las bacterias se han encontrado muchas endonucleasas de restricción con distintas especificidades de secuencia. Estas endonucleasas se utilizan mucho en genética molecular.

endorfinas Clase de péptidos cerebrales endógenos que ejercen efectos analgésicos en el sistema nervioso central al unirse a los receptores de opiáceos. Se producen por la ruptura del polipéptido de gran tamaño pro-opiomelanocortina.

energía interna (*E*) Energía contenida en un sistema. Para los fines de la bioquímica, este término engloba todos los tipos de energía que pueden intercambiarse mediante procesos químicos o físicos no nucleares, incluyendo la energía cinética del movimiento y la vibración de los átomos y moléculas, así como la energía almacenada en los enlaces y las interacciones no covalentes.

energía libre (*G*) (también denominada energía libre de Gibbs) Magnitud termodinámica (función de estado) que incluye la entalpía y la entropía: $G = H - TS$, donde H es la entalpía, S es la entropía y T es la temperatura absoluta. El *cambio de energía libre* (ΔG) de un proceso, como una reacción química, tiene en cuenta los cambios de entalpía y de entropía, e indica si el proceso estará termodinámicamente favorecido a una temperatura dada.

energía libre de Gibbs Véase *energía libre.*

energía libre molar parcial Véase *potencial químico.*

enfermedad de Tay-Sachs Enfermedad genética producida por un déficit de la enzima lisosómica *N*-acetilhexosaminidasa A, que interviene en la degradación de los esfingolípidos. El déficit da lugar a la acumulación del esfingolípido gangliósido GM_2, en especial en el cerebro.

enfoque isoeléctrico Una versión de la electroforesis en gel que permite separar los anfólitos de una forma casi pura en función de sus puntos isoeléctricos. Se añaden los anfólitos a un gel que contiene un gradiente de pH y se aplica un campo eléctrico. Cada anfólito migra hasta llegar al pH que corresponde a su punto isoeléctrico, y en este punto deja de tener una carga eléctrica neta, por lo que se detiene y se acumula. Véase también *electroforesis en gel, punto isoeléctrico.*

enlace de hidrógeno Interacción de atracción entre el átomo de hidrógeno de un grupo donador, como —OH o ═NH, y un par de electrones no enlazantes de un grupo aceptor, como O═C. El átomo del grupo donador, que incluye el hidrógeno, debe ser claramente electronegativo para que la atracción sea importante.

enlace fosfodiéster Enlace que conecta los monómeros nucleótidos de un ácido nucleico. Consiste en un residuo de fosfato que liga los grupos azúcar de los sucesivos monómeros formando un enlace éster con el carbono 5′ de un azúcar y el carbono 3′ del siguiente.

enlace peptídico Enlace que liga sucesivos aminoácidos para formar un péptido. Consiste en un enlace amida entre el grupo α-carboxilo de un aminoácido y el grupo α-amino del siguiente.

entalpía (*H*) Magnitud termodinámica (función de estado) que es igual a la energía interna de un sistema más el producto de la presión por el volumen: $H = E + PV$. Es igual al cambio de calor en las reacciones a presión constante, como son la mayor parte de las reacciones en los sistemas biológicos.

entrecruzamiento químico Técnica para investigar las disposiciones mutuas de los componentes de un complejo. Se expone el complejo a un reactivo que puede formar entrecruzamientos químicos entre componentes adyacentes y a continuación se desagrega y se analiza. Puede deducirse que los componentes que se unen están próximos en el complejo.

entropía (*S*) Magnitud termodinámica (función de estado) que expresa el grado de desorden o aleatoriedad de un sistema. Según la segunda ley de la termodinámica, la entropía de un sistema abierto tiende a aumentar a no ser que se gaste energía en mantener el sistema ordenado.

envoltura nuclear Doble membrana que engloba el núcleo. Está perforada por poros nucleares que permiten incluso el paso de moléculas bastante grandes, como los mRNA y las proteínas nucleares, para que entren o salgan del núcleo.

episomas Plásmidos que pueden integrarse en el cromosoma bacteriano.

epítopo (también denominado determinante antigénico) La parte específica de una partícula antigénica que reconoce un determinado anticuerpo o un receptor de célula T.

equilibrio de sedimentación Técnica que utiliza la centrifugación para medir la masa de una molécula grande como una proteína. Se centrifuga una solución de la sustancia a una velocidad baja hasta que la tendencia de la sustancia a sedimentar se compensa con su tendencia a la difusión hacia una concentración uniforme; el gradiente de concentración resultante se utiliza para medir la masa molecular.

equivalente reductor Una cantidad de un compuesto reductor que done el equivalente a 1 mol de electrones en una reacción de oxidación-reducción. Los electrones pueden expresarse en forma de átomos de hidrógeno.

errores congénitos del metabolismo Mutaciones humanas que dan lugar a alteraciones específicas del metabolismo intermediario. Generalmente, el problema radica en una enzima que es inactiva, hiperactiva, demasiado escasa o demasiado abundante. Los síntomas pueden deberse a una producción insuficiente de un metabolito necesario y/o a la acumulación de otro metabolito hasta alcanzar concentraciones tóxicas.

especies reactivas de oxígeno (ROS) Especies del oxígeno intermedias de los niveles de oxidación entre O_2 y H_2O, que son más reactivas que el O_2; entre las ROS se encuentran superóxido, peróxido, peroxinitrito y radical hidroxilo.

espectro de dicroísmo circular (espectro CD) Espectro de absorción obtenido mediante el empleo de luz polarizada circularmente. Proporciona el dicroísmo circular de la sustancia en una amplia gama de longitudes de onda.

espectro de diferencia En relación con los espectros de absorción, un espectro obtenido mediante la carga de la cubeta de muestra con las sustancias en estudio y una cubeta de referencia con una muestra equimolar de las mismas sustancias en un estado conocido (por ejemplo, totalmente oxidadas) y el registro de la diferencia entre los dos espectros.

espectrofotómetro Instrumento que expone una muestra a una luz de longitudes de onda definidas y mide la absorbancia. Distintos tipos de espectrofotómetros actúan en distintos márgenes de longitud de onda, como el ultravioleta, el visible y el infrarrojo.

espectrometría de masas Método para determinar la masa molecular a partir de la velocidad de movimiento de los iones en el vacío.

espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) Un tipo de espectroscopia que se basa en el hecho de que los núcleos de los isótopos que tienen la propiedad de "espín" resonarán con frecuencias específicas de radiación de microondas cuando se les coloca en un campo magnético de una determinada fuerza. La energía de resonancia es sensible al entorno molecular local, por lo que la espectroscopia de RMN puede utilizarse para explorar la estructura molecular. Además, diferentes tejidos vivos tienen unos espectros globales de RMN característicos, que son sensibles a los cambios del entorno tisular. La RMN puede utilizarse, pues, en el estudio del metabolismo de los tejidos y en el diagnóstico de las enfermedades.

espliceosoma Complejo de proteína-RNA que se encuentra en el núcleo y que es el responsable de la eliminación de los intrones de los transcritos de RNA.

estado activado En relación con una reacción química, un estado de energía elevada transitorio de una molécula de reactivo (como una configuración electrónica desfavorable o una conformación tensionada) que permite a la molécula experimentar la reacción.

estado de transición En cualquier reacción química, el estado de energía elevada, o improbable, que deben alcanzar la molécula o moléculas que reaccionan para que se produzca la reacción.

estado estándar Estado de referencia, con respecto al cual se definen las magnitudes termodinámicas (como los potenciales químicos). Para las sustancias en disolución, el estado estándar indica una concentración de 1 M a una presión de 1 atm y a una temperatura de 25°C.

ésteres de forbol Grupo de sustancias naturales que se parecen al *sn*-1,2-diacilglicerol (DAG) en parte de su estructura, y que pueden actuar como promotores de tumores. Este efecto sugiere que el sistema de segundo mensajero del DAG puede intervenir en la acción de los factores de proliferación.

estructura cuaternaria Para una proteína, el nivel de estructura que se obtiene cuando varias cadenas polipeptídicas plegadas distintas (subunidades) se asocian de una forma específica para producir una proteína completa. Compárese con *estructura primaria, estructura secundaria, estructura terciaria.*

estructura de clatrato Estructura en forma de jaula de moléculas de agua organizadas que se forma alrededor de una molécula hidrófoba en disolución. La estructura tiene una entropía menor que la del agua líquida, lo que ayuda a explicar por qué las sustancias hidrófobas se disuelven mal en el agua.

estructura primaria Para un ácido nucleico o una proteína, la secuencia de bases o de aminoácidos del polinucleótido o del polipéptido. Compárese con *estructura secundaria, estructura terciaria, estructura cuaternaria.*

estructura secundaria Plegado local del armazón de un polímero lineal para formar una estructura de repetición regular. Las formas B y Z de la hélice de DNA y las estructuras de hélice α y lámina β de los polipéptidos son ejemplos de ello. Compárese con *estructura primaria, estructura terciaria, estructura cuaternaria.*

estructura terciaria Estructura de plegado a gran escala en un polímero lineal que es de un orden superior al de la estructura secundaria. Para las moléculas de proteína y RNA, la estructura terciaria es la forma tridimensional específica en la que se pliega toda la cadena. Compárese con *estructura primaria, estructura secundaria, estructura cuaternaria.*

eucariotas Organismos cuyas células están compartimentalizadas mediante membranas celulares internas que producen un núcleo y orgánulos. Compárese con *procariotas.*

exergónico En un sistema no aislado, un proceso que se acompaña de un cambio negativo de energía libre (ΔG negativo) y que, por tanto, está favorecido termodinámicamente. Compárese con *endergónico.*

exón Región de la secuencia codificante de un gen que se traduce a una proteína (a diferencia de los intrones, que no se traducen). La denominación procede del hecho de que los exones son las únicas partes de un transcrito de RNA que se observan fuera del núcleo. Compárese con *intrón.*

exportinas Clase de proteínas que participan en el transporte de sustancias fuera del núcleo. Véase *importinas.*

factores de elongación Factores proteicos no ribosómicos que son participantes necesarios en el ciclo de elongación de la cadena en la síntesis de polipéptidos; interactúan con el complejo ribosoma-mRNA o con otros componentes importantes del ciclo.

factores de liberación Factores proteicos independientes que son participantes necesarios para la liberación del ribosoma de una cadena polipeptídica terminada.

factores de proliferación Péptidos mediadores que influyen en la proliferación y/o la diferenciación de las células; se diferencian de las hormonas de crecimiento en que las producen muchos tejidos y tienen una acción local.

factores de resistencia a fármacos Plásmidos bacterianos que llevan genes que codifican la resistencia a los antibióticos.

factores de transcripción Proteínas que influyen en la transcripción de determinados genes, generalmente mediante la unión en lugares promotores específicos.

factores sexuales Plásmidos que especifican productos génicos que permiten a las bacterias realizar la conjugación (apareamiento bacteriano).

fagos temperados Fagos bacterianos que pueden establecer un estado de lisogenia. Véase también *lisogenia.*

fenotipo Aspecto externo y otras características medibles de un organismo. Es consecuencia de la interacción de la composición genética del organismo con el entorno. Compárese con *genotipo.*

fermentaciones Procesos en los que la energía celular se genera a partir de la degradación de moléculas de nutrientes sin que haya un cambio neto del estado de oxidación de los produc-

tos, en comparación con el de los reactivos; la fermentación puede producirse en ausencia de oxígeno.

feromonas Compuestos mediadores intercelulares que se liberan por un organismo e influyen en el metabolismo o el comportamiento de otro organismo, generalmente de la misma especie. Los atrayentes sexuales que desencadenan una conducta reproductora en los receptores adecuados, son un ejemplo de ello.

flujo En relación con una ruta química, la velocidad (en moles por unidad de tiempo) con la que el reactivo "fluye a través" de la ruta para salir como producto. El término puede utilizarse para la velocidad con la que las partículas experimentan cualquier proceso en el que fluyan o pueda considerarse metafóricamente que hay un flujo.

fluorescencia Fenómeno por el cual una sustancia que absorbe luz de una determinada longitud de onda vuelve a irradiar una parte de la energía en forma de luz de una longitud de onda más larga.

fosforilación a nivel de sustrato Síntesis de un nucleósido trifosfato (normalmente ATP) impulsada por la degradación de un compuesto de mayor potencial de transferencia de fosfato.

fosforilación oxidativa Fosforilación del ADP a ATP que tiene lugar en conjunción con el tránsito de electrones por la cadena de transporte electrónico en la membrana mitocondrial interna.

fotofosforilación Fosforilación del ADP para producir ATP que depende directamente de la energía de la luz solar. La energía de la luz es capturada por un pigmento como la clorofila y se transmite en forma de electrones excitados a una cadena de transporte electrónico. La cadena de transporte electrónico utiliza la energía de los electrones para crear un gradiente protónico a través de una membrana, lo cual impulsa la síntesis del ATP.

fotofosforilación cíclica En la fotosíntesis, la fotofosforilación (síntesis de ATP dependiente de la luz) ligada al flujo cíclico de electrones desde el fotosistema II a una cadena de transporte electrónico y vuelta al fotosistema II. No está acoplada con la oxidación del H_2O o la reducción del $NADP^+$. Compárese con *la fotofosforilación no cíclica.*

fotofosforilación no cíclica En la fotosíntesis, la fotofosforilación (síntesis de ATP dependiente de la luz) que está ligada a un flujo unidireccional de electrones del agua a través de los fotosistemas II y I, y finalmente al NADPH. Está así acoplado a la oxidación del H_2O y a la reducción del $NADP^+$. Compárese *con fotofosforilación cíclica.*

fotoproducto 6-4 Un tipo de daño del DNA causado por la radiación UV en el que se forma un enlace entre el carbono 6 de una base pirimidínica y el carbono 4 de otra base pirimidínica adyacente. Este tipo de fotoproducto parece ser la causa principal de las mutaciones inducidas por la luz UV.

fotoproductos Productos que se forman cuando la energía luminosa produce una reacción química en una sustancia. Por lo que respecta al DNA, el término indica los tipos de DNA dañados que pueden aparecer por la acción de la radiación UV.

fotorreactivación Proceso de reparación del DNA en el que una enzima utiliza la energía luminosa para romper los dímeros de ciclobutano pirimidina creados por la radiación UV y para restablecer los enlaces correctos.

fotorrespiración Ciclo de reacciones que se producen en lugar del ciclo de Calvin cuando la enzima fotosintética rubisco añade O_2 en vez de CO_2 a la ribulosa bisfosfato carboxilasa. Se produce en parte en los cloroplastos, en parte en los peroxisomas y en parte en las mitocondrias; comporta un gasto de energía de ATP y una pérdida de una molécula de CO_2 previamente fijada en el proceso de regeneración del intermediario del ciclo de Calvin 3-fosfoglicerato.

fotosíntesis Proceso mediante el cual se captura la energía de la luz y se utiliza para impulsar la síntesis de hidratos de carbono a partir de CO_2 y H_2O.

fotosistema Unidad estructural de una membrana celular que captura la energía luminosa y convierte una parte de la misma en energía química. La fotosíntesis que realizan las plantas, las algas y las cianobacterias utilizan dos tipos de fotosistemas. Ambos capturan la energía en forma de electrones de energía elevada y la transducen a través de una cadena de transporte electrónico.

fragmentos de Okazaki Fragmentos discontinuos en los que se sintetiza inicialmente la cadena retardada durante la replicación del DNA. Estos fragmentos se unen posteriormente para formar una cadena continua.

fuerza iónica (*I*) Magnitud que refleja la concentración total de iones de una solución y la carga estequiométrica (carga por átomo o molécula) de cada ion. Se define como $I = \frac{1}{2} \sum_i m_i Z_i^2$, en donde M_i y Z_i son la molaridad y la carga estequiométrica, respectivamente, del ion *i*. Se utiliza, por ejemplo, para el cálculo del radio efectivo de una atmósfera contraiónica.

fuerza protón motriz (**fpm**) Gradiente electroquímico de H^+ que se establece a través de la membrana celular mediante bombas protónicas unidas a la membrana, como las de la membrana mitocondrial interna o la membrana tilacoide. Al caer el flujo de protones por su gradiente a través de la membrana pueden impulsar procesos como la síntesis de ATP.

fuerzas de dispersión Fuerzas de atracción intermolecular débiles que surgen entre las moléculas que están muy próximas, como consecuencia de que las fluctuaciones de las distribuciones electrónicas de las moléculas se sincronizan y producen una ligera atracción electrostática. Estas fuerzas intervienen en el empaquetado interno de muchas biomoléculas.

genes homeóticos Genes que contienen elementos de caja homeo que intervienen de forma característica en el control del patrón de desarrollo del organismo. Las mutaciones homeóticas, que dispersan partes de este patrón, afectan a los genes homeóticos. Las proteínas nucleares de unión al DNA codificadas por estos genes actúan presumiblemente como reguladores de la transcripción para la expresión coordinada de grupos de genes. Véase también *caja homeo.*

genoma Conjunto de toda la información genética contenida en una célula, un organismo, o un virus.

genotipo Constitución genética de un organismo concreto. Compárese con fenotipo.

giberelinas Familia de hormonas de crecimiento de las plantas de tipo diterpeno.

giro (*T*) En relación con una doble hélice de DNA, el número total de veces que las dos cadenas de la hélice se cruzan, excluyendo el retorcimiento. Es una medida de lo fuertemente enrollada que está la hélice. Véase también *número de ligazón, retorcimiento.*

glándulas endocrinas Glándulas que sintetizan hormonas y las liberan a la circulación. Las células glandulares productoras de hormonas se denominan células endocrinas.

glioxisoma Un tipo de peroxisoma especializado que se encuentra en las células vegetales. Realiza algunas de las reacciones de la fotorrespiración, y también degrada los ácidos grasos a acetil-CoA mediante la β-oxidación y convierte la acetil-CoA en succinato a través del ciclo del glioxilato, lo que permite a las plantas convertir los ácidos grasos en hidratos de carbono.

glóbulo fundido Un estado intermedio hipotético en el plegado de una proteína globular, en el que la estructura terciaria global se ha establecido pero las cadenas laterales internas (especialmente las hidrófobas) tienen todavía libertad de movimiento.

glucano Otro nombre de polisacárido.

glucocáliz Cubierta de polisacárido que se encuentra en muchas células eucariotas.

glucolípidos Lípidos que tienen sacáridos unidos a sus grupos de cabeza.

glucocorticoides Las hormonas esteroideas cortisol y corticosterona, segregadas por la corteza suprarrenal. Además de otras funciones, fomentan la gluconeogénesis en respuesta a unas concentraciones bajas de azúcar en sangre.

glucogénico En el metabolismo energético, se refiere a las sustancias (como algunos aminoácidos) que pueden utilizarse como sustratos para la síntesis de glucosa.

glucólisis Ruta inicial del catabolismo de los hidratos de carbono, en la que una molécula de glucosa se degrada a dos moléculas de piruvato, con la producción neta de moléculas de ATP y la reducción de dos moléculas de NAD^+ a NADH. En condiciones aerobias, estas moléculas de NADH se reoxidan por la cadena de transporte electrónico; en condiciones anaerobias, se utiliza un aceptor de electrones diferente.

gluconeogénesis Procesos mediante los cuales se sintetiza glucosa a partir de precursores que no son hidratos de carbono, como el glicerol, el lactato, algunos aminoácidos y (en las plantas) la acetil-CoA.

glucosaminoglucanos (también denominados mucopolisacáridos) Polisacáridos formados por unidades repetidas de disacáridos en los que un azúcar es la *N*-acetilgalactosamina o la *N*-acetilglucosamina. Habitualmente la unidad de disacárido contiene un grupo carboxilo, y a menudo uno o varios sulfatos, por lo que la mayor parte de los glucosaminoglucanos tienen una densidad elevada de cargas negativas. Los glucosaminoglucanos frecuentemente se combinan con una proteína para formar proteoglucanos y son un componente importante de la matriz extracelular de los vertebrados.

grupo prostético Un ion metálico o una molécula pequeña (distinta de un aminoácido) que forma parte de una proteína en el estado nativo de la misma y que es esencial para el funcionamiento proteico; su unión a la proteína puede ser covalente o no covalente.

haploide Respecto a una célula u organismo, la posesión de una sola copia de cada cromosoma por núcleo. Compárese con *diploide.*

hapteno Molécula que es demasiado pequeña para estimular una respuesta inmunitaria por sí misma, pero que puede hacerlo cuando se acopla con una molécula transportadora inmunógena más grande (generalmente una proteína).

helicasas Enzimas que catalizan el desenrollamiento de los ácidos nucleicos de doble cadena.

hélice A Hélice de estructura a derechas de dobles cadenas de ácido nucleico que tiene un paso más pequeño y un diámetro mayor que la hélice B-DNA. Es la estructura adoptada por las dobles cadenas de RNA y por las moléculas híbridas RNA-DNA.

hélice de reconocimiento En un motivo de unión al DNA hélice-vuelta-hélice, la hélice α-3, que se adapta a la profundidad del surco principal y es la responsable de la especificidad de secuencia de la unión.

hemo Molécula formada por un anillo de porfirina (protoporfirina IX o un derivado de la misma) con un hierro central formando complejo. Actúa como grupo prostético en proteínas como la mioglobina, la hemoglobina y los citocromos.

heterocigoto En un organismo diploide, la posesión de dos alelos diferentes para un determinado gen (en vez de dos copias del mismo alelo). Compárese con *homocigoto.*

heterótrofos Organismos que no pueden sintetizar sus compuestos orgánicos enteramente a partir de precursores inorgánicos, sino que deben consumir al menos algunos compuestos orgánicos elaborados por otros organismos. En concreto, estos organismos no pueden utilizar CO_2 como fuente de carbono. Compárese con *autótrofos.*

hibridación de colonias Técnica que se utiliza para el estudio de bacterias con objeto de determinar la presencia en ellas de una secuencia específica de DNA recombinante. Se transfieren las colonias de las bacterias a un filtro, se las trata para lisar las células y desnaturalizar el DNA, y a continuación se las expone a una sonda de DNA marcado que es complementaria de parte de la secuencia en cuestión. Las colonias que unen la sonda poseen la secuencia.

hibridación in situ Técnica para identificar la localización cromosómica de una determinada secuencia de DNA mediante el estudio de los cromosomas con una secuencia sonda marcada radiactivamente que hibridará con la secuencia en cues-

tión. La localización de la sonda se visualiza luego mediante autorradiografía.

hibridomas Líneas celulares en cultivo que se obtienen mediante la fusión de linfocitos B productores de anticuerpos con células procedentes de un mieloma (un tipo de cáncer) de ratón. Igual que las células B, producen anticuerpos específicos, y a la vez, igual que las células de mieloma, pueden proliferar de manera indefinida en cultivo.

hidratos de carbono En general, sustancias que tienen la fórmula estequiométrica $(CH_2O)_n$ donde $n \geq 3$, o que proceden de una sustancia de este tipo mediante la adición de grupos funcionales.

hidrófilo Hace referencia a la capacidad de un átomo o una molécula de presentar interacciones de atracción con las moléculas de agua. Las sustancias que son iónicas o pueden participar en enlaces de hidrógeno son hidrófilas. Las sustancias hidrófilas son solubles en el agua o, como mínimo, humedecibles. Compárese con *hidrófobo.*

hidrófobo La propiedad molecular de no presentar interacciones de atracción con moléculas de agua. Las sustancias hidrófobas son no iónicas y no polares; no son humedecibles y no se disuelven con facilidad en el agua. Compárese con *hidrófilo.*

hipocromía En lo relativo al DNA, una reducción de la absorbancia de la luz ultravioleta de una longitud de onda de alrededor de 260 nm que acompaña a la transición de las cadenas desnaturalizadas con un ovillo aleatorio a la hélice de doble cadena. Puede usarse para seguir el proceso de desnaturalización o renaturalización.

histonas Proteínas que participan en la formación de la estructura nucleosómica de la cromatina. Cuatro de los cinco tipos de histonas forman la partícula central del nucleosoma. La quinta se asocia al DNA de unión entre los nucleosomas. Todas las histonas son proteínas pequeñas muy básicas.

homocigoto En un organismo diploide, la posesión de dos alelos idénticos para un determinado gen. Compárese con *heterocigoto.*

homopolímero Polímero que está formado en su totalidad por un único tipo de monómero. El almidón, formado tan sólo por unidades glucosilo, es un ejemplo de ello. Los polímeros que incluyen más de un tipo de monómero, como los polipéptidos y los ácidos nucleicos, se denominan heteropolímeros.

hormona Sustancia que se sintetiza y segrega por células especializadas, y se transporta por la circulación a las células diana, en las que provoca modificaciones específicas de la conducta metabólica de la célula al interactuar con un receptor específico para la hormona.

hoyo recubierto Hoyo de la membrana celular que está recubierto en su lado citosólico por una red de la proteína clatrina. Los hoyos recubiertos participan en el mecanismo de la endocitosis mediada por receptores, en la que los receptores de superficie que tienen sustancias extracelulares específicas unidas se reúnen en hoyos recubiertos que finalmente se separan para dar lugar a vesículas citoplasmáticas.

huellas dactilares En genética molecular, una técnica que se utiliza para identificar el segmento de DNA que está en contacto con una determinada proteína de unión al DNA. El complejo DNA-proteína se somete a una digestión con una nucleasa inespecífica, que lo rompe en los residuos que no están protegidos por la proteína.

importinas Clase de proteínas que participan en la importación de moléculas al núcleo. Veáse *exportinas.*

inducción En el metabolismo celular, la síntesis de una determinada proteína en respuesta a una señal; así, por ejemplo, la síntesis de una enzima en respuesta a la aparición de su sustrato.

inhibidor basado en el mecanismo Inhibidor enzimático cuya acción depende del mecanismo catalítico de la enzima. Habitualmente es un análogo del sustrato que modifica de manera irreversible la enzima en un paso concreto del ciclo catalítico.

inhibidor competitivo Sustancia que inhibe una reacción catalizada por una enzima compitiendo con el sustrato por el lugar activo. El inhibidor puede ocupar reversiblemente el lugar activo pero no sufre la reacción.

inhibidor no competitivo Inhibidor de una reacción catalizada enzimáticamente, que actúa uniéndose a un lugar de la enzima distinto del lugar activo y reduciendo la eficacia catalítica de la enzima.

inhibidor suicida Inhibidor enzimático sobre el que la enzima puede actuar catalíticamente, pero que altera de manera irreversible el lugar activo de la enzima en el proceso. (Se denomina inhibidor suicida porque la enzima "se suicida" al actuar sobre él.)

inmunoglobulinas Véase *anticuerpos.*

interacciones no covalentes Todos los tipos de interacciones entre los átomos y las moléculas que no implican compartir realmente electrones en un enlace covalente. Incluyen las interacciones electrostáticas, las interacciones de dipolo permanente e inducido y los enlaces de hidrógeno.

intercalado En lo relativo al DNA, hace referencia al ajuste (intercalado) de una pequeña molécula entre bases adyacentes de una hélice de DNA.

interferón Glucoproteína antivírica producida en respuesta a la infección vírica.

intrón Región de la secuencia codificante de un gen que no se traduce en proteína. Los intrones son frecuentes en los genes eucariotas, pero son en cambio raros en los procariotas. Se eliminan del transcrito de RNA antes de la traducción. Compárese con *exón.*

isoenzimas (también denominadas isozimas) Formas diferentes, pero relacionadas, de una enzima que catalizan la misma reacción. A menudo difieren tan sólo en unas pocas sustituciones de aminoácidos.

isómeros ópticos Véase *enantiómeros.*

isozimas Véase *isoenzimas.*

Julio (J) Una unidad de energía o de trabajo, definida como el trabajo realizado por una fuerza de 1 newton cuando su punto de aplicación se desplaza 1 metro en la dirección de la fuerza. Es la unidad de energía utilizada en el Sistema Internacional (SI).

leucotrienos Familia de moléculas que se sintetizan a partir del ácido araquidónico por la ruta de la lipooxigenasa y que actúan como hormonas locales, principalmente impulsando las reacciones inflamatorias y alérgicas (como la constricción bronquial del asma).

ley de Beer Ecuación que relaciona la absorbancia de la disolución de una muestra a una determinada longitud de onda, con la longitud del paso de la luz, la concentración de la sustancia disuelta y el coeficiente de extinción de la sustancia a esa longitud de onda. Véase *coeficiente de extinción.*

ligando En general, una molécula pequeña que se une de manera específica a otra más grande; por ejemplo, una hormona que se une a un receptor. El término puede utilizarse también para hacer referencia a una especie química que forma un complejo de coordinación con un átomo central que suele ser un átomo metálico.

lípidos Grupo de compuestos biológicos, químicamente diversos, que se clasifican conjuntamente por su estructura, generalmente apolar, que hace que sean poco solubles en agua.

lipoproteínas Cualquier conjugado lípido-proteína. Se refiere específicamente a las asociaciones lípido-proteína que transportan lípidos en la circulación. Cada lipoproteína tiene un núcleo de lípidos hidrófobo, rodeado por una envoltura de lípidos anfipáticos con apolipoproteínas incluidas en ellos. Distintos tipos de lipoproteínas desempeñan funciones diferentes en el transporte de lípidos.

lipoproteínas de densidad baja (LDL) Un tipo de partícula lipoproteica que actúa principalmente distribuyendo el colesterol desde el hígado a otros tejidos. Su componente proteico es una única molécula de apoproteína B-100.

lipoproteínas de densidad elevada (HDL) Un tipo de partícula lipoproteica que actúa principalmente eliminando el exceso de colesterol de las células de los tejidos y transportándolo al hígado, donde puede excretarse en forma de ácidos biliares.

lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL) Un tipo de partícula lipoproteica que se forma en el hígado y actúa principalmente transportando triacilgliceroles desde el hígado al tejido adiposo y otros tejidos.

lisogenia Estado latente que pueden alcanzar determinados bacteriófagos, en el que el genoma del fago está integrado en el cromosoma del hospedador bacteriano y se expresan pocos o ningún gen del virus.

lugar activo Lugar de una molécula enzimática al que se une el sustrato y donde se facilita la reacción. A menudo es una hendidura o bolsillo situado en la superficie de la enzima.

mapa de ligamiento Mapa en el que se muestra la disposición de los genes en un cromosoma. Se construye midiendo la frecuencia de recombinación entre pares de genes.

marcaje de espín Una sustancia que tiene un electrón no apareado detectable mediante resonancia de espín electrónico y que se utiliza como un marcador químico.

marco de lectura abierto Secuencia del RNA mensajero que está limitada por codones de comienzo y de parada, y que puede traducirse de manera continua. Corresponde a la secuencia codificadora de un polipéptido.

matriz nuclear (también denominada andamiaje nuclear) Una red proteica que queda en el núcleo cuando se extraen las histonas y otras proteínas con enlaces débiles y se digiere la mayor parte del DNA. Se supone que actúa como andamiaje de organización de la cromatina.

membrana plasmática Bicapa lipídica que encierra el citoplasma. Está rodeada por la pared celular, si la hay.

metabolismo intermediario Todas las reacciones de un organismo que tienen relación con el almacenamiento y la generación de energía metabólica, y con la biosíntesis de compuestos de peso molecular bajo y compuestos de almacenamiento de energía. No incluye la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas.

metabolismo La totalidad de las reacciones químicas que se producen en un organismo. Compárese con *anabolismo, catabolismo, metabolismo intermediario.*

metaestabilidad Para un sistema, el hecho de estar en un estado que no constituye un equilibrio termodinámico, pero es casi estable en la escala temporal de interés, ya que el avance hacia el equilibrio es lento.

micelas Pequeñas gotas que se forman cuando una sustancia anfipática que tiene un grupo de cabeza polar y un grupo de cola no polar (como un ácido graso) se añade a un medio acuoso y se agita. Cada gota está formada por una acumulación esférica de moléculas anfipáticas dispuestas con los grupos de cabeza polares hacia fuera, en dirección al agua, y sus colas no polares enfrentadas hacia el centro.

microscopia confocal Técnica de microscopia lumínica que permite una resolución elevada en muestras gruesas.

microscopia crioelectrónica Variación de la microscopia electrónica (véase) en la que las muestras se congelan en una matriz de hielo cristalino.

microscopia electrónica Forma de microscopia en la que los electrones se utilizan como radiación. Capaz de una resolución muy elevada.

microscopia electrónica de barrido Un tipo de microscopia electrónica en la que se hace pasar un haz de electrones por un objeto, y se analiza el patrón de electrones reflejados para crear una imagen de la superficie del objeto. Compárese con *microscopia electrónica de transmisión.*

microscopia electrónica de transmisión (MET) Un tipo de microscopia electrónica en la que el haz de electrones atraviesa el objeto a examinar y crea una imagen en una placa fotográfica o en una pantalla. Compárese con *microscopia electrónica de barrido.*

microtúbulos Estructuras citoplasmáticas en forma de fibras que están formadas por unidades de la proteína tubulina, dis-

puestas de manera helicoidal formando un tubo hueco. Intervienen en diversos tipos de motilidad celular, como el bateo de los cilios y los flagelos, y el movimiento de los orgánulos de una parte a otra de la célula.

migración de rama Durante la recombinación, la migración de un punto de entrecruzamiento (unión de Holliday) mediante el desenrollamiento y nuevo enrollamiento de las dos dobles cadenas.

mitocondrias Orgánulos cuya principal tarea consiste en aportar a la célula ATP a través de la fosforilación oxidativa. Contienen las enzimas para la oxidación del piruvato, el ciclo del ácido cítrico, la β-oxidación de los ácidos grasos y la fosforilación oxidativa, así como la cadena de transporte electrónico.

modelo de ajuste inducido Modelo para explicar de qué forma interactúan las enzimas con los sustratos para realizar la catálisis. Según este modelo, el lugar activo vacío de la enzima sólo se ajusta aproximadamente al sustrato o sustratos y la entrada del sustrato hace que la enzima modifique su forma para adaptarse exactamente y hacer que el sustrato adopte un estado intermediario que se parece al estado de transición de la reacción sin catalizar. Éste es el modelo más aceptado en la actualidad para la catálisis enzimática.

modelo del mosaico fluido Modelo que describe la estructura de la membrana celular, según el cual las proteínas están incluidas en una bicapa fosfolipídica y tienen libertad de movimiento en el plano de la membrana. Este modelo es básicamente correcto.

molécula de DNA recombinante Molécula de DNA que incluye segmentos procedentes de dos o más moléculas de DNA precursoras.

motivo hélice-bucle-hélice Motivo de unión que se observa en la calmodulina y en algunas otras proteínas que unen calcio, así como en algunas proteínas que se unen al DNA. Está formado por dos segmentos de hélice conectados por un bucle.

motivo hélice-vuelta-hélice Motivo de unión al DNA que es responsable de la unión al DNA en una secuencia específica en muchos factores de transcripción. Está formado por dos segmentos de hélice α conectados por una vuelta β; una de las hélices ocupa el surco principal del DNA y establece contactos con bases específicas.

mucopolisacáridos Véase *glucosaminoglucanos.*

mutación de desplazamiento de marco Mutación que modifica el marco de lectura de un gen mediante la adición o la pérdida de uno o dos nucleótidos, con lo que hace que el resto del mensaje en el lado 3′ respecto a la mutación carezca de sentido.

mutación de sentido equivocado Mutación que altera el codón de DNA de manera que hace que un aminoácido de una proteína sea sustituido por otro distinto.

mutación sin sentido Una mutación que crea un codón de detención anormal y causa, por tanto, una interrupción prematura de la traducción. La proteína truncada resultante no suele ser funcional.

mutación somática Mutación que se produce en una célula de un organismo que no es una célula germinal. Puede afectar al organismo en el que se produce, pero no se transmite a sus descendientes.

mutación Cualquier cambio heredable de la secuencia de nucleótidos del DNA genómico (o del RNA genómico en el caso de un virus RNA)

mutagénesis de lugar dirigida Técnica mediante la cual se introduce una mutación específica en un lugar determinado de un gen clonado. A continuación el gen puede introducirse en un organismo y expresarse.

mutágeno Sustancia que es capaz de producir mutaciones.

neurohormonas Sustancias que se liberan por las neuronas y modulan el comportamiento de las células diana, que a menudo son otras neuronas. A diferencia de los neurotransmisores, no actúan estrictamente a través de una sinapsis. La mayor parte de las neurohormonas son péptidos.

neurotoxina Toxina que actúa alterando la función de la célula nerviosa. Las neurotoxinas de acción rápida actúan a menudo bloqueando la acción de una puerta iónica necesaria para la formación de un potencial de acción.

neurotransmisor Sustancia de peso molecular bajo que se libera en una terminación axónica en respuesta a la llegada de un potencial de acción y que difunde luego a través de la sinapsis para influir en la célula postsináptica, que puede ser otra neurona o bien una célula muscular o glandular.

N-terminal (también denominado amino terminal) El extremo de una cadena polipeptídica que contiene un grupo amino sin reaccionar. Un ribosoma sintetiza un polipeptico en la dirección que va del N-terminal al C-terminal. Véase también *C-terminal.*

nucleasa Enzima que rompe los ácidos nucleicos.

núcleo Estructura rodeada por una membrana en la célula eucariota, que contiene el material genético cromosómico y los componentes asociados. También es el lugar en el que se procesan las moléculas de RNA y se ensamblan los ribosomas.

nucleoide La molécula de DNA circular grande de una célula procariota, junto con sus proteínas asociadas; también se le llama a veces cromosoma bacteriano. Está superenrollado y forma una masa densa en el interior de la célula, y el término *nucleoide* se utiliza a veces para designar la región de la célula ocupada por esta masa.

nucléolo Región del núcleo de la célula en la que se transcriben y se procesan los RNA ribosómicos y se ensamblan los ribosomas.

nucleosoma Unidad estructural de primer orden para el empaquetamiento del DNA en la cromatina, que está formada por 146 pb de DNA que envuelven 1.75 veces un núcleo octamérico de proteínas histonas. Los sucesivos nucleosomas están conectados por fragmentos de DNA "conector".

nucleótido Una molécula que, tras su hidrólisis completa, da al menos 1 mol por mol de una base púrica o pirimidínica, un azúcar y fosfato inorgánico.

número de copia Número de copias de un gen concreto o de una secuencia de DNA que hay por célula.

número de ligazón (*L*) Número total de veces que las dos cadenas de una hélice circular cerrada de DNA se cruzan mediante giros o retorcimientos. Es igual al número de veces que están entrelazadas las dos cadenas. Refleja tanto el enrollamiento de la hélice de DNA nativo como la presencia de cualquier superenrollamiento. Véase también *giro, retorcimiento.*

número de recambio En relación con una reacción catalizada por una enzima, el número de moléculas de sustrato que una molécula de enzima puede procesar (recambiar) por segundo, cuando está saturada con el sustrato. Es equivalente a la constante de velocidad catalítica, k_{cat}.

oncogén Un gen que, en una versión mutada, puede facilitar la transformación de una célula normal en cancerosa. Muchos oncogenes codifican proteínas que intervienen en la recepción y transducción de las señales de factores de proliferación.

oncoproteína El producto proteico de un oncogén.

operador Lugar del DNA al que se une una proteína represora para bloquear la iniciación de la transcripción a partir de un promotor adyacente.

operón Un conjunto de genes estructurales procariotas contiguos que se transcriben como una unidad, junto con los elementos reguladores adyacentes que controlan su expresión.

orgánulos Compartimientos del citoplasma de las células eucariotas limitados por membranas. Cada tipo de orgánulo realiza un conjunto específico de funciones. Son ejemplos de orgánulos las mitocondrias, los cloroplastos y los núcleos.

ovillo aleatorio Se refiere a un polímero lineal que carece de estructura secundaria o terciaria, y en vez de ello es completamente flexible, con una geometría que varía de manera aleatoria. Es el estado de una proteína o de un ácido nucleico desnaturalizados.

oxidasa Enzima que cataliza la oxidación de un sustrato con el oxígeno como aceptor electrónico.

oxidasa de función mixta Una enzima oxigenasa que cataliza una reacción en la que se oxidan dos sustratos diferentes, uno mediante la adición de un átomo de oxígeno procedente del O_2 y el otro mediante el aporte de dos átomos de hidrógeno para reducir el átomo de oxígeno que queda a H_2O.

oxigenasa Una enzima que cataliza la incorporación de oxígeno a un sustrato.

palíndromo Con respecto al DNA, un segmento en el que la secuencia es la misma en una cadena leída de derecha a izquierda y en la otra leída de izquierda a derecha. Así pues, se trata de una serie de repeticiones invertidas.

pared celular Una pared protectora rígida que se encuentra alrededor de una célula vegetal, bacteriana o fúngica, que se secreta por la célula y se sitúa por fuera de la membrana plasmática.

partículas de reconocimiento de señal (SRP) Partículas citoplasmáticas que fijan los ribosomas en la superficie del retículo endoplásmico (RE) si el polipéptido en formación está destinado a ser procesado por el RE. Las SRP reconocen y se unen a una secuencia señal N-terminal específica en el polipéptido en formación.

patrón de difracción Patrón que se produce cuando una radiación electromagnética pasa a través de una estructura con una repetición regular. Se produce porque las ondas dispersadas por la estructura interactúan de manera destructiva en la mayoría de las direcciones (creando zonas oscuras), mientras que lo hacen de manera constructiva en unas pocas direcciones (creando puntos brillantes). Para que el patrón sea bien definido, la longitud de onda de la radiación debe ser algo más corta que la distancia repetida en la estructura. Véase también *difracción de rayos X.*

peptidiltransferasa Durante la síntesis de los polipéptidos en los ribosomas, el complejo enzimático que transfiere la cadena polipeptídica del tRNA del lugar P al aminoácido transportado por el tRNA en el lugar A, con lo que añade un nuevo aminoácido a la cadena. El complejo es parte integral de la subunidad ribosómica grande.

peroxisoma Orgánulo vesicular pequeño que se especializa en la realización de reacciones celulares que comportan la transferencia de hidrógeno de un sustrato al O_2. Estas reacciones producen como intermediario H_2O_2, que se rompe para dar H_2O y O_2 por la enzima peroxisómica catalasa.

placa Una zona clara que se forma por la infección local por un fago en un cultivo de bacterias en una placa de Petri. Con fines de experimentación, es el equivalente a las colonias bacterianas en el caso de los fagos.

placas ateroscleróticas Masas salientes que se forman en las paredes internas de las arterias en la enfermedad aterosclerótica. Una placa madura está formada en parte por lípidos, principalmente ésteres de colesterol, que pueden estar libres o contenidos en macrófagos llenos de lípidos, a los que se denomina células espumosas, y en parte por una proliferación anómala de células de músculo liso y de tejido conjuntivo

plásmidos Moléculas de DNA circulares pequeñas extracromosómicas que se encuentran en muchas bacterias. Se replican independientemente del cromosoma principal y puede haber múltiples copias de los mismos en una misma célula.

polímero Molécula grande que se forma mediante la unión de unidades moleculares prefabricadas (monómeros) que son semejantes o idénticas entre sí. El número de monómeros de un polímero puede ascender a varios millones.

polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (PLFR) Tipo de polimorfismo genético que se detecta con facilidad mediante *transferencia Southern* y que puede utilizarse para la detección sistemática de enfermedades genéticas. Se basa en el hecho de que los alelos presentan a menudo lugares de ruptura diferentes por las endonucleasas de restricción, y producen, por tanto, conjuntos diferentes de fragmentos al ser tratados con las endonucleasas adecuadas.

poro iónico Poro de la membrana celular a través del cual pueden difundir los iones. Está formado por una proteína trans-

membrana, y puede diferenciar hasta cierto punto los diversos iones en función del tamaño y de la carga. Muchos poros iónicos disponen de puertas que pueden abrirse y cerrarse en respuesta a las señales.

potencial de acción Onda de despolarización transitoria que se desplaza a lo largo de la membrana de una célula nerviosa (o cualquier otro tipo de célula excitable, como una célula muscular), como resultado de los flujos de iones a través de la membrana. Un impulso nervioso.

potencial de reducción estándar (E_0) Para un determinado par formado por un donador electrónico y su aceptor conjugado, el potencial de reducción en condiciones estándar (25°C; donador y aceptor a concentración de 1 M, ambos).

potencial de reposo Diferencia de voltaje que existe a través de la membrana de una célula excitable, como una célula nerviosa, excepto en los lugares en que está en curso un potencial de acción. Es una consecuencia de los gradientes iónicos que se mantienen a través de la membrana.

potencial eléctrico de membrana Respecto a las membranas biológicas, una diferencia de voltaje que existe a través de una membrana a causa de las diferencias de las concentraciones de iones a ambos lados de la membrana.

potencial químico ($\overline{G}$) (también llamado energía libre molar parcial) En un sistema, la energía libre que se encuentra en un componente químico por mol del componente presente. Así, por ejemplo, en un sistema que contenga a moles del componente A, y b moles del componente B, la energía libre total G sería la suma de la energía libre de los dos componentes, es decir $G = a\overline{G}_A + b\overline{G}_B$.

primera ley de la termodinámica Ley que establece que la energía no puede crearse ni destruirse y que, por tanto, es posible explicar cualquier cambio de la energía interna de un sistema ΔE por un intercambio de calor (q) y/o de trabajo (w) con el entorno. $\Delta E = q - w$.

primosoma Complejo enzimático que se encuentra en la horquilla de replicación durante la replicación del DNA; sintetiza los RNA cebadores en la cadena retardada e interviene también en el desenrollamiento de la hélice del DNA original.

procariotas Organismos unicelulares primitivos que no están compartimentalizados por membranas celulares internas; las eubacterias y las arqueobacterias. Compárese con *eucariotas.*

procesividad Para una DNA o una RNA polimerasa, el número medio de nucleótidos que se incorporan por cada proceso de unión entre la polimerasa y un extremo 3′ cebador. Describe la tendencia de una polimerasa a mantenerse unida a un molde.

profago Un genoma de fago inactivo que se encuentra en una célula bacteriana y en sus descendientes. Está integrado en el cromosoma del hospedador.

promotor Secuencia de DNA que puede unirse a la RNA polimerasa, dando lugar a la iniciación de la transcripción.

prostaglandinas Familia de compuestos que proceden de determinados ácidos grasos insaturados de cadena larga (especialmente el ácido araquidónico) a través de una ruta de ciclooxigenasa, y que actúan como hormonas locales.

proteasas Enzimas que rompen los enlaces peptídicos de un polipéptido. Muchas presentan especificidad para una determinada secuencia de aminoácidos.

proteasoma Complejo grande de proteasa dependiente de ATP que se encuentra en el citosol de las células y participa en la degradación selectiva de las proteínas citoplasmáticas de vida corta.

proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP) Clase de proteínas asociadas con los microtúbulos que ayudan en los procesos dinámicos.

proteínas de fusión Proteínas obtenidas a través de ingeniería genética que se crean mediante el corte y empalme de secuencias codificadoras procedentes de dos o más genes. La proteína resultante combina porciones de dos proteínas diferentes.

proteínas del choque térmico Grupo de chaperoninas que se acumulan en una célula cuando ésta se ha sometido a un cambio brusco de temperatura o a otra agresión. Se cree que ayudan a resolver la acumulación de proteínas con un pliegue o ensamblaje inadecuado en las células agredidas.

proteínas fibrosas Proteínas de forma alargada, que se utilizan a menudo como materiales estructurales de las células y los tejidos. Compárese con *proteínas globulares.*

proteínas G Familia de proteínas asociadas a la membrana que transducen las señales recibidas por diversos receptores de la superficie celular. Se les llama proteínas G porque para su acción es esencial la unión de GTP y GDP.

proteínas globulares Proteínas cuya forma tridimensional plegada es relativamente compacta. Compárese con *proteínas fibrosas.*

proteoglucanos Glucoproteínas en las que el elemento dominante es el hidrato de carbono. Éste se encuentra en forma de polisacáridos glucosaminoglucanos, que están unidos al núcleo amplio de polipéptidos, formando moléculas enormes y ligeras. Los proteoglucanos son componentes importantes de la matriz intercelular.

protofilamentos Las 13 columnas lineales de unidades de tubulina que pueden verse en la estructura de un microtúbulo; se producen porque cada vuelta de la hélice de microtúbulos contiene exactamente 13 unidades de tubulina. Cada protofilamento está formado por subunidades de tubulina α y β alternadas.

provirus Genoma de un virus animal que está integrado en un cromosoma del hospedador.

proyección de Fischer Convenio para representar los estereoisómeros en un plano. Un tetraedro de enlaces de un carbono se representa como un corte plano, de manera que los enlaces situados a la derecha y a la izquierda se considera que van hacia el observador, y los enlaces de la parte superior e inferior se considera que se alejan del observador. Las proyecciones de Fischer de los monosacáridos están orientadas con el grupo

carbonilo en la parte superior; el carbono quiral más alejado del grupo carbonilo (que es el que determina si el azúcar es de la forma D o L), se representa con su hidroxilo hacia la derecha para la forma D y hacia la izquierda para la forma L.

proyección de Haworth Una representación convencional en el plano de una molécula de monosacárido ciclada. Los hidroxilos que se representan a la derecha de la cadena en una proyección de Fischer se muestran por debajo del plano en una proyección de Haworth.

prueba de Ames Prueba para determinar la mutagenicidad de una sustancia. Una cepa de la bacteria *Salmonella typhimurium* que tiene una mutación que inactiva una enzima necesaria para la utilización de la histidina se expone a la sustancia en cuestión y se siembra en un medio que carece de histidina. Una mutación de reversión que activa la enzima mutante hace que las células crezcan en este medio.

pseudogenes Fragmentos de DNA no transcritos que presentan una semejanza de secuencia considerable con genes funcionantes y que evidentemente proceden de ellos a lo largo de la evolución. Muchas familias génicas contienen pseudogenes.

punto isoeléctrico (pI) pH al que la carga neta de un anfólito es, en promedio, cero.

α-queratinas Clase de queratinas que son las proteínas principales del pelo. Están formadas por largos polipéptidos con hélice α, que se entrelazan entre sí para formar hélices triples.

quilomicrón Tipo de lipoproteína que se produce en las vellosidades intestinales y se utiliza para transportar los lípidos del alimento en la circulación.

quimiotaxia Proceso mediante el cual las bacterias perciben un gradiente de concentración de una determinada sustancia en el medio y se desplazan a favor o en contra de ese gradiente.

quiral Respecto a una molécula u otro objeto, la propiedad de no ser superponible a su imagen especular. Un átomo que hace a una molécula quiral, como un carbono con cuatro sustituyentes diferentes, se denomina átomo quiral o centro de quiralidad.

radio de van der Waals (*r*) Radio efectivo de un átomo o una molécula que define la proximidad a la que pueden llegar otros átomos o moléculas; se trata pues del radio efectivo para el maximo empaquetamiento molecular.

reacción de primer orden Reacción cuya velocidad depende de la primera potencia de la concentración del reactivo. Compárese con *reacción de segundo orden.*

reacción de segundo orden Una reacción en la que deben unirse dos moléculas de reactivo para que se produzca la reacción. Se denomina de segundo orden porque la velocidad de la reacción depende del cuadrado de la concentración del reactivo (para dos moléculas del mismo reactivo) o del producto de las concentraciones de dos reactivos (cuando los dos reactivos son diferentes). Compárese con *reacción de primer orden.*

reacción en cadena de la polimerasa (RCP) Técnica que se utiliza para amplificar el número de copias de una secuencia de DNA específica mediante ciclos repetidos de desnaturalización y replicación.

reacciones luminosas Subprocesos de la fotosíntesis que dependen *directamente* de la energía de la luz, concretamente la síntesis de ATP mediante la fotofosforilación y la reducción del $NADP^+$ a NADPH a través de la oxidación del agua. Compárese con *reacciones oscuras.*

reacciones oscuras Subprocesos fotosintéticos que no dependen *directamente* de la energía luminosa. Específicamente, la síntesis de hidratos de carbono a partir de CO_2 y H_2O. Compárese con las *reacciones luminosas.*

receptor Una proteína que se une de manera selectiva a una molécula específica (como un mediador intercelular o un antígeno) e inicia una respuesta biológica.

receptores adrenérgicos Receptores de la superficie celular a los que se unen la adrenalina y la noradrenalina. Los hay de varios tipos, con especificidades de ligando y efectos algo diferentes.

receptores de acetilcolina muscarínicos Una clase de receptores para el neurotransmisor acetilcolina que se caracterizan por la capacidad de unir la toxina fúngica muscarina. Las sinapsis que tienen estos receptores pueden ser excitadoras o inhibidoras. Compárese con *receptores de acetilcolina nicotínicos.*

receptores de acetilcolina nicotínicos Una clase de receptores para el neurotransmisor acetilcolina que se caracteriza por su capacidad de unir la nicotina. Las sinapsis que tienen este tipo de receptor son excitadoras. Compárese con *receptores de acetilcolina muscarínicos.*

recombinación Proceso que se produce en un organismo, por el cual dos moléculas de DNA de origen dan lugar a una molécula de DNA hija que combina segmentos procedentes de las dos moléculas originales. Puede comportar la integración de una molécula de DNA en la otra, la sustitución de un segmento de DNA por un segmento homólogo en otra molécula de DNA, o el intercambio de segmentos homólogos entre las dos moléculas de DNA.

recombinación genética Cualquier proceso que da lugar a la transferencia de material genético desde una molécula de DNA a otra. En los eucariotas puede referirse específicamente al intercambio de segmentos correspondientes entre cromosomas homólogos mediante el proceso de entrecruzamiento.

recombinación homóloga Recombinación genética que requiere una homología de secuencia amplia entre las moléculas de DNA recombinantes. La recombinación meiótica mediante entrecruzamiento en los eucariotas es un ejemplo de ello.

regulón Grupo de genes no ligados (no adyacentes) que se regulan todos por un mecanismo común.

reparación de mal apareamiento Sistema para la corrección de nucleótidos mal apareados o de inserciones o pérdidas de una sola base producidas durante la replicación del DNA. Rastrea el DNA recién replicado y cuando encuentra un error, lo elimina, y sustituye un fragmento de la cadena que contiene el error.

repeticiones terminales largas (LTR) Un par de repeticiones directas de varios centenares de pares de bases de longitud que

se encuentran en ambos extremos del genoma del retrovirus. Intervienen en la integración en el genoma del hospedador y en la expresión génica del virus.

replicación semiconservativa Modo de replicación del DNA en el que cada doble cadena hija contiene una cadena de la doble cadena original y una cadena de nueva síntesis. Es la forma en que se produce de hecho la replicación del DNA.

replicón Unidad del genoma formada por un origen de replicación y todo el DNA que se replica a partir de ese origen.

representación de Lineweaver-Burk Representación que permite calcular la constante de velocidad k_{cat} y la constante de Michaelis K_M para una reacción catalizada por una enzima. Se construye midiendo la velocidad de reacción inicial V a diversas concentraciones de sustrato [S], y representando gráficamente los valores en un gráfico de $1/V$ frente a $1/[S]$.

representación de Ramachandran Representación que constituye un mapa de todas las configuraciones posibles del armazón para un aminoácido en un polipéptido. Los ejes de la representación son los ángulos de rotación de los dos enlaces del armazón que tienen libertad de giro (ϕ y ψ, respectivamente); cada punto ϕ, ψ en la representación refiere, pues, una configuración concebible del armazón del aminoácido.

represor En genética molecular, una proteína que inhibe la transcripción de un gen mediante la unión a un operador.

resinas de intercambio iónico Polímeros policatiónicos o polianiónicos que se utilizan en la cromatografía de intercambio iónico en columna para separar las sustancias en función de la carga eléctrica.

resonancia de espín electrónico (también denominada resonancia paramagnética electrónica, o ERP) Una forma de espectroscopia que es sensible al entorno de electrones desapareados en una muestra.

respiración En relación con el metabolismo energético, el proceso por el cual se genera energía celular a través de la oxidación de moléculas de nutrientes con el O_2 como aceptor electrónico final. Este tipo de respiración se denomina también *respiración celular* para diferenciarla de la respiración en el sentido de inspiración y espiración de aire.

respuesta de restricción Mecanismo que inhibe la expresión de todos los genes estructurales en las bacterias en condiciones de carencia de aminoácidos. Comporta una inhibición de la síntesis de los RNA ribosómicos y de transferencia.

respuesta SOS Respuesta bacteriana frente a diversos tipos de tensión que pueden ser letales, como la irradiación UV intensa. Comporta una expresión coordinada de un conjunto de proteínas que realizan maniobras de supervivencia, como el tipo de reparación propensa a error para los dímeros de timina del DNA.

restricción y modificación inducidas por el hospedador Sistema genético que se encuentra en las bacterias, mediante el cual un elemento genético (a menudo un plásmido) codifica una enzima para la metilación del DNA en una secuencia de bases específica y una endonucleasa que rompe el DNA no metilado en esa secuencia. Por lo tanto, el sistema *restringe* el DNA que puede persistir en la célula al DNA que está *modificado* por la metilación de las secuencias correctas.

retículo endoplásmico (RE) Compartimiento membranoso muy plegado dentro del citoplasma que se encarga de una gran variedad de funciones celulares, como la glucosilación y el tráfico de proteínas destinadas a la secreción o a la membrana celular, o a algunos orgánulos. También interviene en la síntesis de lípidos, y se encuentran en su superficie las enzimas de muchas rutas del metabolismo intermediario.

retículo sarcoplásmico Red de túbulos membranosos que rodea a cada miofibrilla en una célula de músculo esquelético. Es una zona especializada del retículo endoplásmico; su principal función consiste en el secuestro y posterior liberación del Ca^{2+} que desencadena la contracción de las miofibrillas.

retinoides Sustancias que proceden del ácido retinoico (una forma de vitamina A) y que actúan como mediadores intercelulares; son especialmente importantes para regular el desarrollo.

retorcimiento (*W*) En relación con la hélice de DNA superenrollada, el número de veces que el conjunto de la hélice se cruza sobre sí misma, es decir, el número de vueltas de superhélice presentes. Véase también *número de ligazón, giro.*

retrovirus Familia de virus de RNA que poseen transcriptasa inversa. Cuando un virus ha infectado a una célula, esta enzima transcribe el genoma de RNA en una versión de DNA de doble cadena, que se integra en el cromosoma del hospedador. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un retrovirus.

ribosomas Complejos grandes de proteína y RNA que se encargan de la síntesis de polipéptidos bajo la dirección de los mRNA moldes.

RNA antisentido Molécula de RNA que es complementaria de un mRNA; puede bloquear la traducción del mRNA mediante la formación de una doble cadena con él. La expresión génica puede regularse por la producción de RNA antisentido.

RNA cebador Durante la replicación del DNA, el fragmento corto de nucleótidos de RNA que se coloca al inicio de cada fragmento de Okazaki; proporciona un extremo —OH 3′ a partir del cual la DNA polimerasa puede alargar el fragmento. Posteriormente es sustituido por DNA.

RNA de transferencia (tRNA) Clase de moléculas pequeñas de RNA que transfieren los aminoácidos a los ribosomas para incorporarlos a las proteínas.

RNA mensajero (mRNA) Moléculas de RNA que actúan como moldes para la síntesis de los polipéptidos en los ribosomas.

rubisco (ribulosa bisfosfato carboxilasa-oxigenasa) Enzima que realiza la fijación del carbono en la fotosíntesis, mediante la adición de CO_2 a la ribulosa-1,5-bisfosfato. También puede añadir O_2 en lugar de CO_2, iniciando con ello la fotorrespiración.

secuencia de consenso Para un grupo de secuencias de nucleótidos o aminoácidos que presentan semejanza pero que no

son idénticas (por ejemplo, las secuencias de una familia de secuencias genéticas reguladoras relacionadas), una secuencia artificial construida eligiendo para cada posición el residuo que se encuentra aquí con más frecuencia en las secuencias estudiadas.

secuencia líder (también denominada secuencia señal) Para un mRNA, la secuencia no traducida del extremo 5′ de la molécula que precede al codón de iniciación. Para una proteína, una secuencia hidrófoba corta N-terminal que provoca una translocación de la proteína en una membrana celular o a través de ella.

secuencia potenciadora Secuencia de DNA que está situada a distancia de un gen pero a la que puede unirse un factor proteico que afecta a la transcripción del gen para ejercer su acción. Es posible que la formación de bucles en el DNA lleve a las proteínas unidas al potenciador a un lugar próximo al promotor del gen.

secuencia señal Véase *secuencia líder.*

secuencias de replicación autónoma (ARS) Secuencias de los cromosomas de la levadura que, cuando se incorporan a un plásmido artificial, permiten a éste replicarse de manera eficaz en las células de la levadura.

secuencias PEST Familia de secuencias de aminoácidos que se ha observado en las proteínas celulares que sufren un recambio metabólico rápido; puede marcar a las proteínas para una proteólisis rápida de las mismas. Consisten en una región de unos 12 a 60 residuos de longitud, con abundante prolina, glutamato, serina y treonina (P, E, S y T, según el sistema de abreviaturas de una sola letra).

segunda ley de la termodinámica Ley que afirma que la entropía de un sistema cerrado nunca disminuye. Una enunciación alternativa es la de que los procesos que están favorecidos termodinámicamente a temperatura y presión constantes comportan una disminución de la energía libre.

segundo mensajero Sustancia intracelular que transmite una señal extracelular (como una señal hormonal) desde la membrana celular a las proteínas intracelulares efectoras.

semimetilado En cuanto al DNA, hace referencia al estado en el que una cadena de la doble cadena está metilada y la otra no. El DNA recién replicado está semimetilado; normalmente, una enzima metilasa metila luego las bases adecuadas en la nueva cadena.

semivida (también llamada tiempo medio) Para una reacción química, el tiempo necesario para que se haya consumido y transformado en producto la mitad de sustrato. El término puede referirse también al tiempo análogo en otros procesos, como la desintegración radiactiva de un isótopo (período de semidesintegración).

SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) Enfermedad causada por la infección prolongada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que se caracteriza por una incapacitación del sistema inmunitario. Las víctimas de la enfermedad fallecen por infecciones o cánceres que su sistema inmunitario no es capaz de controlar.

simporte Proceso de transporte de membrana que acopla el transporte de un sustrato en una dirección a través de una membrana, con el transporte de un sustrato diferente en la misma dirección. Compárese con *antiporte.*

superenrollamiento Para una doble hélice de DNA, vueltas de las dos cadenas, una alrededor de la otra, cuyo número supera o es inferior al número de vueltas existente en la conformación helicoidal más estable. Tan sólo una hélice que es circular o está fijada de algún otro modo en ambos extremos puede mantener el superenrollamiento. Véase *giro, retorcimiento.*

supresión En relación con las mutaciones, una mutación que se produce en un lugar diferente del de una mutación existente en un gen pero que restablece el fenotipo natural.

supresor de desplazamiento de marco tRNA mutante que contiene dos o cuatro bases en el bucle del anticodón y puede suprimir los efectos de una determinada mutación de desplazamiento de marco de un gen.

sustitución isomorfa La sustitución de un átomo de una macromolécula por un átomo de metal pesado, de manera que la estructura de la macromolécula no se modifique. Se emplea en la determinación de la estructura molecular mediante la difracción de cristales con rayos X.

sustrato Un reactivo en una reacción catalizada por una enzima.

tautómeros Isómeros estructurales que difieren en la localización de sus hidrógenos y dobles enlaces.

telomerasa Una DNA polimerasa que añade una secuencia de repetición corta a la cadena 3′ en cualquiera de los extremos de la molécula de DNA cromosómico, creando así un saliente de una sola cadena. Este saliente deja espacio para el cebado del origen de un fragmento de Okazaki final durante la replicación del DNA, con lo que puede copiarse toda la longitud del cromosoma.

telómeros Secuencias especiales de DNA en los extremos de los cromosomas eucariotas.

teoría de la selección clonal Modelo (que ha resultado correcto) que describe cómo puede producir el organismo respuestas inmunitarias específicas contra una amplia gama de antígenos. Las células B y T producidas por el organismo tienen especificidades antigénicas generadas de manera aleatoria. Cuando un determinado antígeno entra en el cuerpo, induce la proliferación tan sólo de las células B y T que resultan ser específicas para el mismo. Así pues, el antígeno selecciona las células que pondrán en marcha una respuesta inmunitaria contra él y las estimula a experimentar una proliferación clonal.

tilacoides Sacos unidos a la membrana dentro de un cloroplasto (véase) que contienen los fotosistemas (véase).

tipo natural Indica el genotipo normal que se encuentra en los elementos naturales de vida libre de un grupo de organismos.

topoisomerasas Enzimas que modifican el superenrollamiento de las hélices de DNA al permitir la relajación de la torsión

superhelicoidal (con lo que se reduce el superenrollamiento) o añadir giros adicionales (con lo que aumenta el superenrollamiento).

topoisómeros En relación con el DNA, moléculas de DNA circulares cerradas que son idénticas excepto en su sentido o grado de superenrollamiento. Los topoisómeros de DNA pueden intercambiarse únicamente mediante el corte de una o las dos cadenas utilizando topoisomerasas.

traducción Síntesis de un polipéptido dirigida por un mRNA, de manera que la secuencia de nucleótidos del mRNA se "traduce" en una secuencia de aminoácidos de la proteína. Compárese con *transcripción.*

transaminación En la célula, la transferencia enzimática de un grupo amino de un aminoácido a un cetoácido. El cetoácido se transforma en aminoácido y viceversa.

transcripción Síntesis de una molécula de RNA complementaria de una cadena de DNA; la información codificada en la secuencia de bases del DNA se "transcribe" pues a la versión de RNA del mismo código. Compárese con *traducción.*

transcriptasa inversa Enzima que se encuentra en los retrovirus y que sintetiza una molécula de DNA de doble cadena a partir de un RNA molde de una sola cadena. Es una herramienta importante en genética molecular.

transferencia northern Técnica para detectar la presencia de una secuencia de RNA específica en una célula y determinar su tamaño. Se extrae el RNA total de la célula, se separa mediante electroforesis en gel y se transfiere a un filtro. Se incuba en él en condiciones de alineamiento con una sonda marcada radiactivamente para la secuencia en cuestión, y se detectan las dobles cadenas heterogéneas de la sonda con el RNA mediante autorradiografía.

transferencia southern Técnica para detectar la presencia de una secuencia de DNA específica en un genoma. Se extrae el DNA, se fragmenta, se separan los fragmentos mediante electroforesis en gel, se desnaturaliza y se aplica a un filtro de nitrocelulosa. A continuación, se incuba en condiciones de alineamiento con una sonda marcada radiactivamente para la secuencia en cuestión, y se detectan las dobles cadenas heterogéneas de la sonda con el DNA genómico mediante autorradiografía.

transferencia western Técnica para identificar proteínas o fragmentos de proteínas de una mezcla que reaccionan con un determinado anticuerpo. La mezcla se separa primero en bandas mediante electroforesis en gel desnaturalizante unidimensional. A continuación, se transfieren las bandas proteicas a una lámina de nitrocelulosa que se trata con el anticuerpo, y se identifican las bandas que unen el anticuerpo. Se llama con más exactitud inmunotransferencia.

transgénico Hace referencia a un organismo cuyo genoma contiene una o varias secuencias de DNA procedentes de una especie distinta (transgenes). La ingeniería genética puede usarse para crear animales transgénicos.

transición cooperativa Una transición en una estructura de múltiples partes que hace que la aparición de la transición en una parte de la estructura haga que sea más probable que se produzca la transición en las otras partes.

transportador de glucosa Proteína de membrana que se encarga del transporte de glucosa a través de la membrana celular. Los diferentes tejidos pueden tener transportadores de glucosa con propiedades distintas.

transporte activo Transporte de una sustancia a través de una membrana biológica mediante un mecanismo que puede funcionar en contra de un gradiente de concentración (o electroquímico). Requiere siempre el gasto de energía celular. Compárese con *transporte facilitado, transporte pasivo.*

transporte facilitado (también denominado difusión facilitada) Movimiento de una sustancia a través de una membrana biológica en respuesta a una concentración o gradiente electroquímico en que el movimiento está facilitado por poros de la membrana o por proteínas de transporte específicas. Compárese con *transporte activo, transporte pasivo.*

transporte pasivo (también denominado difusión pasiva) En relación con el transporte a través de membranas, el movimiento de una sustancia a través de una membrana biológica mediante difusión molecular a través de la bicapa lipídica. Compárese con *transporte activo, transporte facilitado.*

transposasa Enzima que participa en la inserción de un transposón bacteriano en un lugar diana.

traslación de mella Proceso en el que los nucleótidos de una cadena de la doble cadena de un ácido nucleico son sustituidos uno a uno por nucleótidos complementarios de la otra cadena. El proceso comienza con una mella en la cadena y hace que se vaya desplazando la localización de la misma (de aquí el origen del término).

ultrafiltración Técnica de filtrado de una solución bajo presión a través de una membrana semipermeable, que permite el paso de agua y pequeños solutos a través de la misma, pero retiene las macromoléculas.

unidad Svedberg (S) En la ultracentrifugación, una unidad utilizada para el coeficiente de sedimentación; es igual a 10^{-13} segundos.

unión de Holliday Intermediario que se forma durante la recombinación homóloga. Una estructura de cuatro brazos en donde cada una de las dobles cadenas de DNA participantes ha intercambiado una cadena con la otra doble cadena.

vector En ingeniería genética, una molécula de DNA que puede usarse para introducir una secuencia de DNA en una célula, en la que se replicará y mantendrá. Generalmente se trata de un plásmido o un genoma vírico.

virión Una partícula vírica única.

virus Entidades infecciosas que contienen el ácido nucleico para codificar su propia estructura pero que carecen de la maquinaria enzimática de una célula; se replican invadiendo una célula y utilizando su maquinaria para expresar el genoma del virus. La mayor parte de los virus contiene poco más que el ácido nucleico encerrado en una cubierta proteica; algunos

virus tienen también una envoltura externa de doble capa lipídica.

xenobiótico Un compuesto orgánico que no lo produce el organismo en el que se encuentra.

Z-DNA Una doble cadena de DNA con una estructura helicoidal, a izquierdas, específica. In vitro, tiende a ser la forma más estable de dobles cadenas de DNA que tienen purinas y pirimidinas alternadas, especialmente en condiciones de metilación de la citosina o superenrollamiento negativo.

Índice

NOTA: Los números de página que se indican en negrita hacen referencia a una definición o a un comentario detallado de la entrada. Una *f* después de un número de página indica una figura y una *t* indica una tabla.

D-abecuosa, 660-61
Absorbancia, **227**
Absorción de luz, 670-75*f*
Abzimas, **441**
Aceptor electrónico terminal, **472**
Aceptores electrónicos, **503,** 585-87
  artificiales, 596-97, 597*f*
Acetaldehído, 436, 769-70
Acetaldehído activo, **549**
Acetato, 472-73, 769-70
Acetato tioquinasa, **569**
Acetil-ACP, 733*f*
N-Acetil-β-D-glucosamina, 337-38
N-Acetil-β-D-lactosamina, **650**
Acetil-CoA, **467, 543**, 630, 638-39, 877
  biosíntesis de ácido palmítico a partir de, 728-38
  biosíntesis de ácidos grasos y, 727-28, 728*f*
  conversión del piruvato en, 546-47, 553-55
  en el ciclo del ácido cítrico, 545*f*, 555-56
  en el ciclo del glioxilato, 568-69, 569-70
  oxidación de ácidos grasos y, 469-70, 634-35, 718-21, 723*f*, 723-24, 726*f*
Acetil-CoA-ACP transacilasa, **731**, 731-32
Acetil-CoA carboxilasa, 730-31, 731-32, 738-40
Acetil-coenzima A, **467, 543**, *Véase también* Acetil-CoA
Acetilcolina, **876,** 878
Acetilcolinesterasa, 434, **877**
N-Acetilgalactosamina, 343-44, 344*f*, 650-52
N-Acetilglucosamina (NAG), 326, 338-40, 343-44, 344*f*, 650-52, 656-58
N-Acetilglutamato, **838**
N-Acetilhexosaminidasa A, **766**
N-Acetilmanosamina-6-fosfato, **650**
N-Acetilmuramilpéptido, 656-58
Acetoacetato, **727**, 727-28, 863, 862*f*
Acetoacetil-CoA, 724, 727-28, 770
Acetona, 727-28, 943
Aciclovir, **921,** 921-22
Acidemia metilmalónica, **724**
Ácido 3-indolacético, **858,** 975-77
Ácido abscísico (ABA), **975**
Ácido acetilsalicílico, 784-85
Ácido alantoico, **899,** 899-901
Ácido *p*-aminobenzoico (PABA), **820**
Ácido γ-aminobutírico (GABA), 840-41, 873-75, 881-82
Ácido 1-Aminociclopropano carboxílico, 847-48
Ácido 6-aminolevulínico (ALA), 868-69, 870*f*
Ácido δ-aminolevulínico sintetasa, 869-70
Ácido antranílico, 852, 854-55
Ácido araquidónico, 713-14, **738**
  conversión del ácido linoleico en, 738*f*
  ciclooxigenación de, 785*f*
Ácido ascórbico (vitamina C), 194-95, 619-20, 840-41
Ácido aspártico, 144*f*, **149**
Ácido γ-Carboxiglutámico, 150
Ácido CMP-acetilneuramínico (CMP-Sia), 765-66
Ácido cólico, 705*f*-**775**
Ácido corísmico, **851**
Ácido deshidroascórbico, 619-20
Ácido 3-Desoxi-D-arabino-heptulosónico 7-fosfato, 853*f*
Ácido desoxirribonucleico (DNA), 7, 13*f*, **96.** *Véase también* biosíntesis y metabolismo de desoxirribonucleótidos; Ácidos nucleicos
  circular, 113-15, 114*f*, 1006-07
  como molde, 1106-10
  como sustrato, 1043-44
  composición de bases de, 106-07, 106*f*, 108*t*
  de cadena única, 116, 116*f*, 987-89, 989-91, 1012-15
  desnaturalización de, 128-29, 129*f*, 130-31
  elementos *Alu*, 1208-10
  en los cromosomas, 9f (*véase también* Cromosomas)
  espectro de absorción en el ultravioleta cercano de, 227*f*
  estructura de doble hélice de, 105-08*f*
  estructura química de, 95-98
  estructuras de horquilla y cruciformes, 126
  estructuras secundarias no habituales de, 124-28*f*
  eucariota, 1211-18
  eucariota, y desarrollo científico, 1251-54
  exones de (*véase* Exon(es))
  forma H de, 126-28*f*
  forma Z de, 125-26
  formas A y B de, 109-13
  formas de, in vivo, 112-17*f*
  fotoproductos, 1053-57
  genomas y, 118
  intrones de, 1208-10 (*véase también* Intrones)
  ligador, 1215-16*f*
  manipulación de, 121-22 (*véase también* DNA recombinante)
  metilación de, 1044-47
  mitocondrial, 1024-27
  moléculas, 12*f*
  propiedades de las moléculas naturales de, 113*t*
  prueba de, como sustancia genética, 105, 104*f*
  relación de, con el mRNA y las cadenas polipeptídicas, 160*f*
  reparación de, 1019-21, 1051-64
  replicación de (*véase* Replicación)
  satélite, 1207-08
  secuencias repetitivas de, 1206-10
  superenrrollado, 113-15, 115*f*, 122-25
  sustituciones de bases en, como mutación, 257-60
  técnicas de secuenciación de, 118, 1157-58
  tipos y consecuencias del daño del, 1051-54
  transcripción de, a RNA, 119-20 (*véase también* Transcripción)
Ácido Δl-Pirrolin carboxílico, **840**
Ácido 5-Enoilpyruvilsikímico-3-fosfato, 853*f*
Ácido esteárico, 705-06
Ácido fenilacético, 716
Ácido fitánico, **725,** 726*f*
Ácido fólico, 817-18, 818-22, 829-31
Ácido formimino glutámico, 864-65
Ácido fosfatídico, **359, 741,** 749-53
Ácido fuerte, **45**
Ácido giberélico, 975-77
Ácido D-Glucónico, 325
Ácido β-D-glucurónico, 325
Ácido glucurónico, **325, 873**
Ácido glutámicod, 144*f*, **149**
Ácido graso insaturado, **354,** 721-22
Ácido graso sintasa, **732**
Ácido guanidinoacético, **838**
Ácido hialurónico, 337-38, 339*f*
Ácido homogentísico dioxigenasa, **863**
Ácido homogentísico, **863**
Ácido inosínico, **894**
  síntesis de ATP y GTP a partir de, 896-98
  síntesis de purinas de PRPP a, 893-97
Ácido lactobacílico, 847-48
Ácido linoleico, 705-06, 738*f*
Ácido linolénico, 711-13, 713-14
Ácido lipoico (lipoamida), 547*f*, 547-48, **549**
Ácido lipoteicoicos, 342*f*
Ácido lisofosfatídico, **757**
Ácido mercaptúrico, 85
Ácido mevalónico, **770**
Ácido murámico, 326
Ácido N-acetilmurámico (NAM), 326, 338-40, 656-58
Ácido N-acetilneuramínico 9-fosfato, **650**
Ácido N-acetilneuramínico, 326, **650**
Ácido nalidíxico, **1019**
Ácido nitroso, 258*t*
Ácido oleico, 354-55, 705-06, 737-38
Ácido orótico, **902**
Ácido palmítico, 472-73, 705-06
Ácido palmitoleico, 737-38
Ácido pantoténico, **552**
Ácido *p*-Hidroxibenzoico, 851-52
Ácido pirúvico, 818-20
Ácido polipróticos, 48
Ácido prefénico, **852**
Ácido pristánico, **725,** 726*f*
Ácido pteróico, **821**
Ácido pteroilglutámico (ácido fólico), 817-18, 818-22, 829-31
Ácido quenodesoxicólico, **773**
Ácido ribonucleico (RNA), **14, 96**. *Véase también* Ácidos nucleicos
  antisentido (*véase* RNA antisentido)
  cadena única, 116, 117*f*
  como enzima, 441-44
  control de la iniciación de la replicación por, 1024-26
  de transferencia (*véase* RNA de transferencia (tRNA))
  DNA como molde para la síntesis de, 1106-10
  enzimología de la síntesis de, 1109-14
  estructura química de, 96-98
  formas de, in vivo, 112-17*f*
  genomas y, 118, 119*f*
  guía, 1240-41
  mensajero (*véase* RNA mensajero (mRNA))
  nuclear pequeño, 1236-37
  propiedades de algunos naturales, 119*t*
  ribosómico (*véase* RNA ribosómico (rRNA))
  síntesis de las secuencias líder de, 1011-12
  traducción de, a proteína, 120-22, 160-61, 162*f* (*véase también* Traducción)
  transcripción del DNA a, 1203 (*véase* Transcripción)
  vírico, 1031-34
Ácido salicílico, 784-85
Ácido siálico, 326, 350-51, **650,** 650-52
Ácido sikímico, **851,** 853*f*
Ácido UDP-*N*-acetilmurámico, 656-58
Ácido β-Ureidopropiónico, 904-05
Ácido úrico, **619, 813,** 891-92, 892-93
  acumulación excesiva de, en la gota, 620-21, 898-902
  catabolismo de, a amoniaco y dióxido de carbono, 900*f*
  formación de, 898-99, 900*f*
Ácido urocánico, 864-65
Ácidos, 587-88

biliares, 771-73
como derivados de monosacáridos, 325
débiles, y bases conjugadas, 46*t*
disociación de, 48-9
equilibrio de una base débil y un ácido débil, 47-49
equilibrios iónicos y, 45-6
fuerza de, 55-57
polipróticos, 48-9
titulación de ácidos débiles, 48-51
Ácidos aldónicos, **325**
Ácidos biliares, 629, 691-92, 693*f*
Ácidos débiles, **45,** 47-49, 48-51
Ácidos grasos esenciales, **738**
Ácidos grasos saturados, **354**
Ácidos grasos *ω*–3, **713**
Ácidos grasos, **354**-57
biosíntesis (véase biosíntesis de acidos grasos)
de importancia biológica, 355*t*
desaturación de, 738*f*
estructuras de las formas ionizadas de, 354*f*
oxidación (véase Oxidación de ácidos grasos)
Ácidos nucleicos, 95-134. *Véase también* Ácido desoxirribonucleico (DNA); Ácido ribonucleico (RNA)
degradación de, 890-92
desnaturalización de, 128-31
determinación de las secuencias de, 118,1157-58
enlaces fosfodiester, 99-103
estabilidad de las estructuras secundaria y terciaria de, 128-32
estructura primaria de, 103-05
estructura secundaria y terciaria de, 105-117*f*
funciones biológicas de, 117-22
genomas y, 118
manipulación del DNA, 121-22
naturaleza de, 95-103
plasticidad de las estructuras secundaria y terciaria, 121-28*f*
prpiedades de, 98-99
replicación, 105 (*véase también* Replicación)
tipos de, 95-98
traducción del RNA a proteinas, 120-22
transcripción del DNA a RNA, 119-20
Ácidos urónicos, **325**
Acilación, 758-59
Acil-carnitina, **718**
Acil-CoA desaturasa, **737**
Acil-CoA deshidrogenasa, **719**
Acil-CoA deshidrogenasa, 725-26
Acil-CoA ligasas, **718,** 718*f*
Acil-CoA, 718-19, 740-41
Acil-CoA, 719-20, 720-21, 737-38
Acil-CoA:colesterol aciltransferasa (ACAT), **711**
1-Acil-DHAP, 752-53
l-Acildihidroxiacetona fosfato, 761*f*
1-Acilglicerol-3-fosfato, 750*f*, 752-53
N-Acilhomoserina lactona, 837-38
Aconitasa, **556**-57, 592-93
cis-Aconitato, 545-46
Acoplamiento químico, **604**
Acoplamiento quimiosmótico, 603-08
definición, **604**
Actina, **287**-90
cabezas de la miosina sobre los filamentos de, 290*f*
F-actina, 288*f*, 295*f*
G-actina, 288*f*
movimiento/fuerza generada por la interacción de la miosina y, 294*f*
no muscular, 297-99
Actinomicina D, **1111**
Activación autocatalítica, 450-52
Activación hacia adelante, **522**
Activación por catabolito, **1131**
Activación, **447**
Activador del plasminógeno (t-PA), **454**
Actividad (a), **77**
Actividad específica, **497**
Activo redox, **907**
Acuocobalamina, **825**
Adenilato ciclasa, **484,** 937-40, 952-55, 954*f*
Adenilato de ácido graso, **718**
Adenilato quinasa, 476-77, 897-98
Adenilil transferasa, **803**
Adenililación, **479,** 801-03
control de la actividad enzimática por, 480*f*
Adenilosuccinato, 897*f*
Adenina nucleotido translocasa, **613,** 613*f*
Adenina, **97,** 1058-59
estructura de, 97*f*
Adenosilcobalamina, **724,** 826-29, 828*f*, 906
5′-Adenosilcobalamina, **825**
S-Adenosilhomocisteína (AdoHcy), **755,** 755-56
S-Adenosilmetionina (AdoMet), **755,** 755-56, 907
Adenosina, 85*f*, 98*f*, 474-75, 476-77
Adenosina 3′ fosfato 5′-difosfato, 553
Adenosina 3′,5′-monofosfato, **484**
Hidrólisis de, 85*f*
Adenosina desaminasa (ADA), **899,** 901-02, 910-11, 1095-96
Adenosina difosfato (ADP), 85*f*, 474-75, 610-11, 911-12
Adenosina difosfato glucosa, 647-48
Adenosina monofosfato (AMP), 85*f*, 98*f*, 897*f*. *Véase también* AMP cíclico (cAMP); Adenosina-3′-5′-monofosfato
Adenosina trifosfato (ATP), **84**
acoplamiento quimiosmótico y, 603-08
bombas iónicas y, 380-85
carga energética de adenilato y, 476-79
ciclo del ácido cítrico y generación de, 559-60
como inhibidor de la fosfofructoquinasa, 520-22
como moneda de intercambio energético, 473-79
contracción muscular y, 293, 294*f*
en el metabolismo de los glicerofosfolípidos, 755-56
fotosistema y generación de, 674-76, 680-84
generación de, a partir de ácido inosínico, 896-98
glucólisis e inversión de, 505-09
glucólisis y generación de, 509-16
hidrólisis de (*véase* hidrólisis de ATP)
otros nucleótidos de energía elevada y, 476-77
polimerización de amilosa y papel de, 690
propiedades termodinámicas de, 474-76
regulación de la ATCasa por, 448, 449*f*
síntesis de compuestos energéticos de energía superior y, 475-77
síntesis de, 511, 583-84, 584-85, 601-14, 682*f*
síntesis de, a partir de ácido inosínico, 896-98
síntesis de, lugares de acoplamiento para, 601-02, 602*f*
síntesis de, rendimientos energéticos, 613-15
Adipocitos, **357,** 358*f*, 701-03, 715*f*, 934-35
AdoHcy. *Véase* S-Adenosilhomocisteina (AdoHcy)
AdoMet descarboxilasa, **849**
AdoMet. *Véase* S-Adenosilmetionina (AdoMet)
ADP cíclico ribosa, 978
ADP-ribosilación, **479,** 480*f*
Adrenalina, **3, 483, 952**
Adrenalina, 3, 4*f*, **483,** 876*f*, 952-53
acciones de, en el metabolismo de los combustibles, 937*t*, 937-40
metabolismo del glucógeno y acciones de, 531-33, 532*f*, 642-44
Afidicolina, **1008**
Aflatoxina, 258*t*, 616-17
Agentes caotrópicos ("formadores de caos"), **233**
Agonistas, **880,** 951-53
Agresión metabólica, 939-45
ciclos de alimentación normales y, 939-41
diabetes, 941-45
inanición, 940-43
Agresión oxidativa, **619**-20, 620-21
Agua, 33-39
como disolvente, 40-46
como red molecular, 40*f*
como reductor en la fotosíntesis, 666-68
enlaces de hidrógeno en, 39f, 42*f*
estructura y propiedades de, 38-40*f*
hidratación de los iones en una disolución de, 42*f*
interacciones de moléculas anfipáticas con, 44*f*
interrelación entalpía-entropía en la transición hielo-agua, 73-74
microscopía crioelectrónica y, 1201-02
propiedades de otros compuestos comparados con, 39*t*
propiedades del n-pentano comparado con, 41*t*
ruptura de, en el fotosistema II, 676-81
ALA deshidratasa, 869-70
ALA sintasa, 871-73
Alanina, 144*f*, 147, 151*f*, 904-05, 934-35
como sustrato en la gluconeogénesis, 629-30
estereoisómeros de, 145*f*
síntesis y catabolismo de, 835-38
transporte de amoniaco, 816-17
Alantoína, **899,** 899-901
Albinismo, **861**
Albúmina, **715**
Alcano, 147-48
Alcaptonuria, 863
Alcohol coniferilo, 856-58, 858-59
Alcohol deshidrogenasa, **504,** 634-35
Alditoles, **326**
Aldohexosas, 318*f*
Aldolasa B, **526**
Aldolasa, **509**-10
Aldopentosas, **316,** 318*f*
Aldosa(s), 313
relaciones estereoquímicas de las D-cetosas y las D-, 96*f*
Aldosterona, 776*f*, 775-77
Aldotetrosas, 315-16, 316*f*, 318*f*
Aldotriosa, 318*f*
Alelo, **993**
Alelos marcadores, **993,** 996*f*
Algas, fotoquímica en. *Véase* Fotosistema(s)
Alimentación
ácidos grasos en, 711-14
alimentos con abundante purinas y gota, 899-901
proteínas en, 803-04, 804-05
regulación de la gluconeogénesis a través de, 636-37
Almidón, 11-14
almacenamiento de, 332-33, 334*f*, 335-36
digestión de, 528-30
Alolactosa, **1125**
Alopurinol, **901**
Alquil éter fosfolípidos, 759-60, 761*f*
1-alquil-2-acetilglicerofosfocolina, **762**
l-alquil-2-acilglicerofosfoetanolamina, 761*f*
1-alquil-2-acilglicerol-3-fosfato, 761*f*
l-Alquildilhidroxiacetona fosfato, 760-61
1-Alquilglicerofosfocolina, 760-62
l-Alquilglicerol-3-fosfato, 760-61
O^6-alquilguanina alquiltransferasa, **1056**-57
O^6-alquilguanina, **1056**
α-Amanitina, **1110**
Ambientes anaerobios, 465-472
Ametopterina, **821**
Amidotransferasas, **837,** 896-97
Amigdalina, 327-28
α-Amilasa, **528,** 529*f*
Amilo-(1,4→1,6)-transglucosilasa, 641-43
Amilopectina, **333**
digestión secuencial de, 529*f*
estructura de, 334*f*
Amilosa, 311, 312*f*, **333,** 690
estructura secundaria de, 335*f*
Aminácidos cetogénicos, **813**
Aminas biógenas, **859**
Amino terminal, **151**
D-Aminoácido oxidasa, **812**
L-Aminoácido oxidasa, **812**
Aminoácido(s), **14,** 141-50, 790
α-, **141,** 143*f*, 144-48
acoplamiento de los tRNA a, 1168-72
activación de, 161*f*
como neurotransmisores, 873-84
como sustrato en la gluconeogénesis, 629-30, 633-35
como sustratos en la gluconeogénesis, 633-35
composición de, en las proteínas, 171-72
de importancia biológica, que no se encuentran en las proteínas, 146*t*
degradación de (véase degradación de los Aminoácidos)
destinos de los esqueletos carbonados de, 813*f*
en las proteínas fibrosas, 191*t*
en las proteínas, 144*f*
estructura secundaria de las proteínas y residuos de, 216*t*
inanición, 1146-50
metabolismo de, a partir de los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, 812-13, 835-42
metabolismo de, visión general de, 468f (véase también metabolismo del nitrógeno)
modificados, 150
oxidación de los residuos de, 811
propiedades de las cadenas laterales, 147-150*f*
propiedades de, en las proteínas, 143*t*
que contienen azufre, 147-50, 841-51
receptor adrenérgico, 954*f*
requerimientos de los mamíferos de, 805*t*

secuencia de, en el ser humano, 59-60
secuencias de, en la mioglobina del ser humano y de la ballena, 156-57, 157*f*
síntesis de, 803-08
transaminación de, 804-08
transaminación de, en el ciclo del ácido cítrico, 566-69
Aminoácidos ácidos, 148-50, 149*f*
Aminoácidos alifáticos, 147-48
Aminoácidos aromáticos, 850-65
biosíntesis de histidina, 854-58, 857*f*
biosíntesis de los anillos aromáticos, 850-56, 855*f*, 856*f*
espectro de absorción de, 148*f*
metabolismo animal de, 858-65
utilización de las plantas de, 856-59
Aminoácidos básicos, 148-50, 149*f*
Aminoácidos esenciales, **805**
Aminoácidos glucogénicos, 634-35, 812-13
Aminoácidos modificados, 150
Aminoácidos no esenciales, **805**
Aminoácidos que contienen azufre, 147-50, 841-51
Aminoácidos que contienen hidroxilos, 147-50
α-Aminoácidos, 141, 143*f*, 144-48. *Véase también* Aminoácido(s)
estructura de, 184*f*
hélice α, 183-87
modelo de relleno espacial de, 187*f*
Aminoacil adenilato, 1170
Aminoacilación, 1168-72
Aminoacil-tRNA sintetasas, **161,** 1159-60, **1169**
Aminoacil-tRNA, **161**
Aminoazúcares
biosíntesis de, 648-50
como derivados de monosacáridos, 326-28
1-Aminociclopropano carboxilato, 847-48
Aminopterina, **821**
2-Aminopurina (2AP), **924**
Aminotransferasas, 806-07
Amital, **597**
Amoniaco, 636-37
Catabolismo del ácido úrico a, 900*f*
destoxificación y excreción de, 813-14
reducción de nitrato a, 797-99
transporte de, al hígado, 816-17
utilización de, y biogénesis del nitrógeno orgánico, 798-804
AMP cíclico (cAMP), **484,** 639-40
acciones hormonales sobre, 952-55
cascada reguladora y control de la actividad de la triacilglicerol lipasa en las células adiposas, 715*f*
como segundo mensajero, 945-46, 958-60
degradación del glucógeno y, 531-33, 532*f*
en la regulación de la transcripción, 1129-33
regulación de la glucógeno sintasa y, 645-46
AMP, *Véase* Monofosfato de adenosina (AMP)
Amplificación (DNA), 1037-40
Amplificación (génica), 904-05, 1085-87
Anabolismo, **463**. *Véase también* Biosíntesis
ciclo del glioxilato, 568-71
glucólisis y, 521-22, 523*f*
Anaerobios, **501**
Análisis cinético, 538-39, 1029*f*, 1030-31
Análisis con biosensores, 538-39
Análisis de flujo detenido de las reacciones catalizadas por enzimas, 458-60
Análisis de salto de temperatura de las reacciones catalizadas por enzimas, 460-61
Análisis del control metabólico, **486,** 485-86
Análisis forense, 1038-39, 1100-01
Análisis inmunosorbente con la enzima marcada (ELISA), **283**
Análisis radiactivos de las reacciones catalizadas por enzimas, 458-59
Análogos de nucleótidos, 921-22
como agentes quimioterápicos, 921-25
mutagénesis y, 923-25
Análogos del estado de transción, **434**
Análogos metabólicos, 3, 4*f*
Andamiaje nuclear, 1216-**17**
Andamiaje, 1216-18
Andrógenos, 775, 776*f*, 775-77
Androstenediona, 776*f*, 775-77
Anemia, 576-78, 827-31
Anemia drepanocítica, 266-69
Anemia megaloblástica, **820**
Anemia perniciosa, 827-29
Anfetamina, 880-81
Anfolitos, 51-53
Anillo de corrina, **775**
Anillo de isoaloxazina, **551**
Anillo de piridina, 817-20
Anillo de pirimidina, 902-04, 903*f*
Anillo de pteridina, 797-98, 818-20, 921-22
Anillo lactámico, **658**
Animales
célula característica de, 20*f*
como heterótrofos, 464-65
degradación del hemo en, 871-75
hibernantes, 741-42
ingeniería genética de, 1095-96
metabolismo de los aminoácidos aromáticos en, 858-65
necesidad fisiológica de síntesis de glucosa en, 627-30
quitina en, 337-38
requerimientos de aminoácidos por los mamíferos, 805*t*
transgénicos, 883-84, 1095-96
transporte y utilización del colesterol en, 707-714
Animales invertebrados, quitina en, 337-38
Animales transgénicos, 883-84, **1096**
Anómeros, 319, 323*f*
Anquirina, 370-72
Antagonistas, 880, 951-53
Antibióticos. 1186-87. Véanse *también* los nombres de los fármacos individuales
como inhibidores enzimáticos reversibles, 433-34
como inhibidores respiratorios, 596-97
como poro iónico, 378-79, 379*f*
inhibición de glucoproteínas ligadas por N por, 653-54
inhibición de la fosforilación oxidativa por, 606-07, 612
inhibición de la síntesis de peptidoglucanos por, 657-58, 658-59
inhibición de la traducción por, 1186-88*f*
resistencia a, 997-98, 1077-79, 1094-96, 1187-89
rifampicina, 1109-13
rutas diferentes de la síntesis de los ácidos grasos, 740-41
transporte facilitado por transportador, 379-80
Anticodón, **161, 1159**
Anticuerpos catalíticos, 441-42
Anticuerpos monoclonales, **285,** 286*f*
Anticuerpos, **14,** 168-69, **270,** 271-72
catalíticos, 441-42
detección de las cadenas polipeptídicas ribosómicas utilizando, 1199-201*f*
diversidad en, 275-78
estructura de, 273-76
grupos sanguíneos y, 345-46, 650-52
métodos inmunológicos para su preparación, 282-86
modelo esquemático de, 274*f*
monoclonales, 285-86, 286*f*
reagrupamientos génicos y generación de diversidad en, 1074-79
Antígeno nuclear de proliferación nuclear (PCNA), **1008**
Antígeno O, 659-63
Antígeno, **270**
auto, 272-75
biosíntesis del O, 659-63
grupos sanguíneos, 344-46, 650-52
oligosacáridos como, 346-47
unión del, por el fragmento Fab, 275*f*
Antígenos de los grupos sanguíneos, **345**-46, 650-52
Antihistaminas, 864-65
Antimetabolitos, **821,** 922-23
Antimicina A, **597,** 601-02
Antimutantes, **1028**
Antioncogenes, **971**-73
Antioxidantes, **619**
Antiporte, **385, 607,** 612-14
Antirrepresor, **1136**
Antisuero, 282-83
Antiterminación, **1123**
Antocianinas, 858
Antranilato, 855*f*
Antropología molecular, 1038-39
Apareamiento de bases de tipo Hoogsteen, 126, 127*f*
Apareamiento de cadena, **1060**
Apareamiento de Watson-Crick (DNA), 994-95
Apertura angular apertura (microscopio lumínico), 24
Aplicaciones médicas de la bioquímica, 4*f*, 22-23
Apolipoproteinas, **707**
Apoproteinas, **707**
en las lipoproteínas del plasma humano, 707*f*
Apoptosis, **767, 1251**
Aporepresores, 1142-43
Arabinosiladenina, (araA), **922**
Arabinosilcitosina (araC), **922**
Araquidonato, 784-85
Arginasa, **814**
Arginina fosfato, **476**
Arginina, 144*f*, 148-50, 815*f*, 835
biosíntesis de, 803-04, 837-40
como precursor de óxido nítrico, 838-40, 839*f*
Argininosuccinasa, **814**
Argininosuccinato sintetasa, **814**
Argininosuccinato, **814,** 815*f*
Aromatasa, **777**
Arqueobacterias, **17**
Arqueología molecular, 1038-39
Ascorbato, 602-03
Asimetría de las membranas, 368-80
Asimilación de cadena, **1060**
Asma, 785-86
Asparagina sintetasa, **803**-04, 836-37
Asparagina, 144*f*, **150,** 836-37
oligosacáridos ligados a, 652-56
síntesis y catabolismo de, 803-04, 835-38
Asparaginasa, **836**
Aspartasa, **836**
Aspartato carbamoiltransferasa (ATCasa), **448**-51*f*
estructura cuaternaria de, 450*f*
inhibición de, 902-04
regulación de, por ATP y CTP, 449*f*, 902-04
Aspartato, **149,** 566-68, 803-04, 815*f*, 835-38, 903*f*
Aspártico-β-semialdehído, 837-38
β-aspartil fosfato, 837-38
Aspartoquinasa, 837-38
Aspirina, 784-85
Atenuación, **1124**
Aterogénesis, **708**
Aterosclerosis, 711-14
Atmósfera contraiónica, **55,** 56*f*
Átomo quiral, **145,** 313
Átomos
difracción de, 135*f*
radio de van der Waals de algunos, 37*t*
ATP sintasa, 610*f*, 610*f*, 682-83
ATPasa vacuolar, **879**
ATPasa, actividad de, en el complejo F_0F_1, 603-04
ATR. *Véase* Adenosina trifosfato (ATP)
Autoexcisión, 442-43, 444*f*
Autoimunidad, 272, **273**
Autólisis, **810**
Autorradiografía, **498,** 1091-96
Autorreplicación, 14-15, **107**
de ribozima, 442-44, 445*f*
Autótrofos, **464**
Auxina, **859, 975**
Auxotrofos, **854**
Axón gigante del calamar, estudios de, 387-88, 388*f*
Axón presináptico, **877**
Axon(es), 302-04, 386-87, 387*f*
mielinización de, 392*f*, 765-66, 767*f*
potenciales de reposo y de acción de, 386-92
Axonema, **301**
corte transversal de, 302*f*
estructura 9+2, 301*f*, 302-08
Azacitidina, **1046**
Azaserina, **893**
3′-Azido-2′,3′-didesoxitimidina (azidotimidina, AZT), 3, 4*f*, **915,** 921-22, 1032-33
Azúcares, amino. *Véase* Aminoazúcares
Azúcares. *Véase* Hidratos de carbono
Azúfre, reducción de inorgánico, 841-42

Bacitracina, 657-58
Bacterias desnitrificantes, **793**
Bacterias Gram negativas, 338-40, 341*f*, 659-60
Bacterias Gram positivas, 338-40, 341*f*, 342*f*
Bacterias *Rhizobium*, fijación del nitrógeno por, 793, 794*f*
Bacterias, **17**. *Véase* Procariotas
biosíntesis de aminoácidos que contienen azufre en, 841-44
biosíntesis de glicerofosfolípidos en, 748-53
biosíntesis de pirimidinas en, 902-04, 903*f*
conjugación en, 993*f*, 1064-65
control de la biosíntesis de pirimidinas en, 902-04, 903*f*

enfermedad (*Véase* enfermedades y trastornos humanos)
fijación del nitrógeno por, 793-97
fotosintéticas, 683-85*f*, 686*f*
Gram positivas, y Gram negativas, 338-40, 341*f*, 342*f*
motilidad en, 305-09
polisacáridos de las paredes bacterianas de, 338-44, 656-63
replicación, 999-1000
RNA en, 1108-10
Bacteriocinas, **998**
Bacterioclorofila, 683-86
Bacteriófago λ,1132-38
cartografiado del genoma, 1092*f*
genes tempranos en, 1135-36
genes y mutaciones en el sistema λ, 1133-35
interacciones entre represores, 1135-38
modificaciones de nucleótidos en E. coli infectada profagos T pares, 920*f*
placas de, 1047-48
recombinación específica de lugar en, 1066*f*
recombinación integradora en, 1074*f*
replicación bidireccional de, 997*f*
represor cI y operadores de, 1134-36
Bacteriófago M 13, 13-8, 1097-99
Bacteriófago MS2, RNA de, 1193*f*
Bacteriófago RB69, DNA polimerasa de, 1005*f*
Bacteriófago T2, 1107-09
Bacteriófago T4
electroforesis de, en *E.coli*, 498*f*
mapa parcial del genoma de, 1009f-11
mRNA en, 1107-09
proteínas de la replicación en, 1021*t*
sistema de reparación por excisión, 1057-59
Bacteriófago T7
DNA polimerasa en, 1004-06*f*
promotores en, 1122*f*
RNA polimerasa en, 1113-14
Bacteriorrodopsina, 369*f*, 369*f*, 607-08
Bacteroide, 794-96
Balance del nitrógeno normal, 804-05
Ballenas, secuencias de aminoácidos de la mioglobina del ser humano y, 156-57, 157*f*
Bandas A, 591-92
Bandas I, **291,** 291-93, 292*f*
Barrera de energía libre, **408**
disminución de, por catalizadores, 409-10, 411*f*
en la reacción de G3P a DHAP, 416*f*
Barrera hematoencefálica, **880**
Base de Schiff, **509,** 510*f*, 575*f*, 806-07, 817-18, 819
Base fuerte, **45**
Bases conjugadas, 45-46, 46*t*, 148-50
Bases débiles, **45,** 47-49
Bases, 587-88
conjugadas, 45-6, 46*t*, 148-50
débiles y fuertes, 45-6
equilibrios de ácidos débiles y bases débiles, 47-9
Bases, DNA y RNA, 97*f*
apareamiento de, 106-07, 107*f*, 126, 127*f*
Composición de, de organismos seleccionados, 108*t*
Creación de bases modificadas, 1151-52
daño de, 618-19, 1053-54
desnaturalización del DNA y composición de, 131*f*
reparación directa de, 1055-57
reparación por excisión de, 1057-59, 1061*f*
Secuencias bases de los codones, 120
sustitución de, como mutación, 257-60
sustituciones en, 920-21
tautomerización de, 99*f*
Bastones, 778*f*
Batorrodopsina, 779*f*
Benceno, 35*f*
Benzo[a]pireno, 258*t*
Benzoilo, 140
Beriberi, 547-49
Biblioteca, fragmentos de DNA, **1100**
Bilirrubina, **23, 873,** 874*f*
Biliverdina, **873,** 874*f*
Biocatalizadores. *Véase* Enzima(s)
Bioquímica, 3-24
como ciencia biológica, 8-15
como ciencia química, 14-23
como disciplina, 8-9
DNA eucariota y desarrollo en, 1251-54
entrelazado de la biología celular, la genética y, 6*f*
herramientas de, 22-3, 23*f* (*véase también* Herramientas de la Bioquímica)
isótopos y radioisótopos en, 495*t*
objetivos de, 5-7
raíces de, 5-9
usos de, 3-7, 22-4
Bioenergética, 65-92, 407-13
de la contracción muscular, 296-97
de la gluconeogénesis, 631-32, 632*t*
de la traducción, 1188-91
del ciclo del ácido cítrico, 560-63
del metabolismo (*véase* Energía metabólica)
del metabolismo de los combustibles 932-34, 933*f*, 933*t*
DNA polimerasas frente a RNA polimerasas, 1110-11
Energía almacenada en el DNA superenrollado, 130-32
energía libre y concentración, 76-79
energía libre y reacciones químicas, 79-83
energía libre, 72-77
entropía y segunda ley de la termodinámica, 69-72
fuentes de energía libre en los sistemas biológicos, 83-90
potencial de transferencia de fosfato y ATP como moneda de intercambio energético, 473-79
principios de la energía, el calor y el trabajo, 65-70
Biología, 14-23
características de la materia viva, 14-18
interconexiones de la genética, la bioquímica y, 6*f*
la célula como unidad básica, 15-21
virus, 19-23
Biología celular, 5*f*, **7**
Biología molecular, 6*f*, **7,** 117-22. *Véase también* Replicación; Transcripción; Traducción
Biosíntesis, 469*f*, 627-64
ácidos biliares, 771-75
capacidades de los organismos para la biosíntesis de los aminoácidos, 804-05
ciclo del ácido cítrico y, 563-65, 565*f*, 566-69
de ácido grasos (*véase* Biosíntesis de ácidos grasos)
de colesterol, 769-73
de eicosanoides, 783-86
de glicerofosfolípidos, 748-53
de hidratos de carbono (*véase* biosíntesis de los Hidratos de Carbono)
de hormonas esteroideas, 773-78
de hormonas, 949-50
de inmunoglobulinas, 1074-79
de RNA, 1106-10
de rRNA y tRNA, 1148-52
fotosíntesis (*véase* Fotosíntesis)
nitrógeno orgánico, 798-804
operones, 1141-45
rutas centrales diferentes para la, 469-72
Biosíntesis de ácidos grasos, 616-17, 634-35, 727-41, 934-35
biosíntesis de palmitato a partir de acetil-CoA y, 728-38
control de, 738-41
desaturación, 737-39
elongación de cadena, 737-38
metabolismo de los hidratos de carbono relacionado con, 727-28
primeros estudios de, 727-30
reacciones en cada ciclo de adición de, 730*f*
relación de, con la oxidación de los ácidos grasos, 729*f*
Biosíntesis de glucoconjugados, **627,** 648-49, 649-63
antígenos O, 659-63
oligosacáridos ligados por N, 652-56
oligosacáridos ligados por O, 650-52
peptidoglucano, 656-60*f*
Biosíntesis de glucógeno, 485-86, 640-48
de la UDP-glucosa, 640-43
defectos congénnitos de, en los seres humanos, 646-48
funciones de los almacenes de glucógeno en el músculo y el hígado, 646-47
Glucogenina, 641-43
proceso de ramificación en, 641-43, 642*f*
reacciones de la glucógeno sintasa, 641-43, 642*f*
relación inversa entre la movilización de glucógeno y la, 642-46*f*
Biosíntesis de hidratos de carbono, 627-64
de aminoazúcares, 648-50
de glucoconjugados, 649-63
de glucógeno, 640-48
de polisacáridos. 647-49
fotosíntesis (*véase* Fotosíntesis)
gluconeogénesis (síntesis de glucosa), 627-37
gluconeogénesis, regulación de, 636-41
oxidación de la glucosa (ruta de las pentosas fosfato), 570-79
relación de la biosíntesis de ácidos grasos con, 727-28, 728*f*
Biosíntesis y metabolismo de desoxirribonucleótidos, 904-15
biosíntesis de desoxiribonucleótidos de timina, 911-13, 914*f*
metabolismo de nucleótidos de desoxiuridina, 912-15, 914*f*
reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos, 904-12
rutas de salvamento, 913-15
Biotina, 435*t*, 567*f*, 566-68
Biotina carboxilasa, **730**
2,3-Bisfosfoglicerato (BPG), **255**-56, 257*f*, 513-14
Bisfosfoglicerato, 85*f*, 372, **505,** 511, 512, 688-89
Bloque timidina, **911**
Bocio, **861**
Bomba de sodio-potasio, **381,** 381*f*, 382-85, 383*f*
Bombas iónicas, 380-85, 387-88
Bombeo de protones, **604,** 609*f*
β-oxidación, **468**
de ácidos grasos, 718-21, 725-26
Bradiquinina, **784**
Brasinolida, 978
5-Bromodesoxiuridina (BrdUrd), **924,** 924*f*, 995-96
Bromuro de etidio, **1040**
Bucle del anticodón, **161**
Bucle variable, 1166-67
Bucles de desplazamiento (D), 1024-26, 1166-67
Bucles R, **1210**
Bulbo terminal, **877**
Burbuja
de replicación, 1221-23
de transcripción, 1116-17
Butiril-ACP, 733*f*

Cabeceros, miosina, 288-90, 290*f*
CAD (enzima), **904**
Cadaverina, 847-48
Cadena cebadora, **989**
Cadena con sentido, **1120**
Cadena conductora, **988**
Cadena de transporte electrónico, **471,** 583-84, 591-600
determinación de la secuencia de transportadores electrónicos, 593-99
en la fotosíntesis, 673-74
gradientes de protones y síntesis de ATP en, 606-08
proteinas de, en la membrana interna, 605-07
transferencia de transportadores electrónicos al interior de las mitocondrias, 598-600
transportadores electrónicos en, 591-95
Cadena hija, 986-87, 1221-23
Cadena menos, **1022**
Cadena molde, **988**
Cadena positiva, **1022**
Cadena respiratoria, **471,** 583-84. *Véase también* Cadena de transporte electrónico
Transportadores electrónicos en, 591-95
Cadena retrógrada, **989**
Cadenas antiparalelas, 987-89
Cadenas laterales, aminoacidos, 141, 147-49*f*
ácidas, 148, 149*f*
alifáticas, 147
aromáticas, 148
básicas, 148, 149*f*
que contienen hidroxilo o azúfre, 147-50
Cadenas retardadas, **989,** 988-89, 990*f*, 1026-29, 1030*f*
Caja de Pribnow, 1119-20
Caja TATA, 1228-33
Calcio
como regulador del metabolismo del glucógeno, 533-34, 534*f*
como segundo mensajero, 958-60
en la contracción muscular, 293-94, 295-96, 296*f*
reconstitución de la bomba de Ca^{2+}, 398*f*
sistema de transporte para, 612-14, 613*f*
Calicreína, 453
Calmodulina, **534,** 534*f*
Calor, **66**
cambios en (entalpía), 68-70
intercambio de trabajo y, 68*f*

Calorimetría de barrido, 397
Calpainas, **809**
Cambio de energía libre, 72, 73, 75-77, 373-74
  como función de la composición de la mezcla de reacción, 83*f*
  constante de equilibrio y, 79-81
  de las reacciones de oxidación-reduction, 588-92
Cambio de energía libre de estado estándar, **80,** 88
Cambios conservadores, **158**
Cambios no conservadores, **158**
cAMP *Véase* AMP cíclico (cAMP); Adenosina 3′,5′-monofosfato
Camptotecina, **1018**
Canales con puertas, **389**
Canales de recuento, **496**
Canales iónicos, 378-79
Cáncer
  acumulación de mutaciones como causa de, 620-21, 1031-32, 1053-54
  de colon, 971-73, 1062-64
  de piel, 1057-58
  predisposición al de mama, 1220-21
  reparación por excisión y, 1057-58
  transducción de señal, oncogenes, y, 966-75
  tratamiento de, 915 (*véase también* Quimioterapia)
Cáncer colorreactal no poliposo hereditario (HNPCC), 971-73, 1062-64
Cáncer de colon, 1062-64
Cáncer de mama, 1220-21
Cancerígenos, 616-17
Carbamatos, **255**
Carbamoil aspartato, 903*f*
N-Carbamoil-L-aspartato (CAA), **448**
Carbamoil fosfato sintetasa II, **450**
Carbamoil fosfato sintetasa, **803**
Carbamoil fosfato, 798-99, 799*f,* 815*f,* 902-04, 903*f*
Carbanión, como especie reactiva, 819*f*
Carbono asimétrico, **145**
Carbono
  átomo anomérico, 317-19
  en el ciclo del ácido cítrico, 544-46, 545*f,* 546-49, 555-58
  en los ácidos grasos, 723-24
  en los aminoácidos, 141, 143*f,* 144-48
  en los monosacáridos, 322-23
  reducción del, fotosíntesis y, 666-68
  tetrahidrofolato y metabolismo de un carbono, 822-25
4-Carboxi-5-aminoimidazol ribonucleótido, 895*f*
1-(*o*-Carboxifenilamino)-1-deoxirribulosa-5-fosfato, 855*f*
γ-Carboxiglutamato, **780**
Carboxilo terminal, **151**
Carboxipeptidasa A, 437-38, 438*f*
Cardiolipina, 748-49, **750,** 751*f*
Carga energética de adenilato, 476-79
Cargadores de pinzas, **991,** 1006-08, 1012-13
Carnitina, **718**
Carnitina aciltransferasa I and II, **718**
β-Caroteno, 619-20, 672*f,* **778**
Carotenoide, 685-86
Cartílago, estructura del proteoglucano en, 337-38, 339*f*
Cartografiado de estructuras macromoleculares complejas, 1198-1203
  genoma, 1091-93
  puntos de iniciación de la transcripción, 1157-58
  S_1 nucleasa, 1157-58
Cartografiado de nucleasa S_1, **1157**
Cascadas reguladoras
  en la coagulación de la sangre, 454*f,* 479-81
  en la degradación del glucógeno, 479-81, 532*f,* 533-35
  en la síntesis y movilización del glucógeno, 644*f*
  liberación de la energía almacenada en las grasas, 715*f*
  modificación covalente y, 479-81
  regulación de la glutamina sintetasa por, 800-03
Caspasas, **1251**
Catabolismo, **463**
  aminoácidos, 803-08, 812-17
  apoptosis, 1251-52
  de ácidos nucleicos, 890-92
  de cisteína y metionina, 849-51
  de eicosanoides, 783-86
  de monosacáridos y disacáridos, 524-28
  de pirimidinas, 904-05
  de polisacáridos, 527-36
  de proteínas eucariotas, 1248-52
  de purinas, 898-904
  del mRNA, 1148-50
  glucólisis como, 521-22, 523*f*
  nucleótidos de nicotinamida en, 474*f*
  rutas diferentes para anabolismo y, 469-72
Catabolismo de polysacáridos, 527-36
  digestión del almidón y el glucógeno, 528-30, 529*f*
  movilización de glucógeno, 528-31
  regulación de la degradación del glucógeno, 531-36
  rupturas hidrolíticas y fosforolíticas, 527-30
Catalasa, 404-05, 437-38, 619-20
Catálisis enzimática, 412-29
  análisis de, 425-27
  cinética de Michaelis-Menten, 419-22
  cinética de, 419-29
  expresión de las velocidades de reacción para las reacciones con varios pasos, 421-24
  medida de las velocidades de, 458-61
  modelo de ajuste inducido de, 412-14
  parámetros significativos de, 423-26
  reacciones complejas, 427-29
  reacciones con varios sustratos, 426-28
  serina proteasas, 416-20
  triosa fosfato isomerasa, 415-16*f*
Catálisis, enzimática. *Véase* Catálisis enzimática
Catalizador(es), **403**
  enzimas (véase Catálisis enzimática; Enzima(s))
  factores entrópicos y entálpicos en, 412*f*
  función de, 409-13
  no proteicos (ribozimas), 441-45*f*
  RNA como, 985-86
Catecolamina(s), 860-61, **875**
  biosíntesis de, 873-76
  como receptores de transducción de señal, 952-53
  neuronas adrenérgicas y, 880-82
Catecolamine *O*-metiltransferasa (COMT), **882**
Catenación, **1019**
Catepsinas, **810**
CCA nucleotidiltransferasa, 1150-51
CDP-colina, **754**
CDP-colina:1,2-diaciglicerol colina fosfotransferasa, **754**
CDP-diacilglicerol, **749,** 750*f,* 751*f,* 758*f*
Cebadores de RNA, **989,** 1011-12
Cefalosporinas, 657-58
Celobiosa, 328-29
Célula unitaria, **136**
Célula(s), **16**-21
  células T y respuesta inmunitaria, 276-79
  compartimentación en, 479-83
  compartimentalización en, 18-19
  dinámica del RNA en no infectadas, 1108-10
  distribución de biomoléculas en, 19-21
  eritropoyéticas, 1211, 1244*f*
  estudio del metabolismp a nivel global, 488-90
  eucariotas, 19*t,* 20*f* (*véase también* Eucariotas; células eucariotas)
  flujo de información genética en, 121*f*
  núcleo de (*véase* Núcleo (célula))
  procariota, 16-18, 19*t* (*véase también* Procariotas; células procariotas)
  relaciones superficie/volúme en, 15*f*
  transporte intracelular
Células aerobias, 583-84
Células anaerobias, 583-84
Células B efectoras, **271,** 272*f*
Células de haces, 695-97
Células de memoria, **272**
Células de Schwann, 391-92
Células diana, **944**
Células diploides, **264, 993,** 1211-12
Células endocrinas, **937**
Células eritropoyéticas, 1211, 1244*f*
Células espumosas, **714**
Células eucariotas, 20*f*
  células procariotas frente a, 19*t*
  principales rutas metabólicas en, 482*f*
Células exocrinas, **937**
Células haploides, **993,** 1211-12
Células madre B, **271,** 272*f*
Células plasmáticas, 271-72
Células poliploides, 1211-12
Células procariotas, 16-18*f*
  células eucariotas frente a, 19*t*
  transporte electrónico y fosforilación oxidativa en, 584-87
Células T citolíticas, **276,** 277*f*
Células T citotóxicas, **276**
Células T colaboradoras, **271,** 272*f*
Células T, 271-72
Células transformadas, **967**
Celulasas, **336**
Celulosa, **10,** 13*f,* **332,** 335-36
  estructura de, 336*f*
  síntesis de, 647-48
Centrifugación diferencial, **490**
Centrifugación, 167-68, 1108-10
Centro de hierro dinuclear, **907**
Centro de quiralidad, **145**
Centro de reacción, **673,** 683-85*f,* 686*f*
  en las bacterias, 683-86, 686*f*
  P680 y P700, 674-76, 677*f,* 683*f,* 683-86
Centrómeros, **1208**
Centros de manganeso en el fotosistema II, 676-78, 679*f*
Centros hierro-azufre, 555-56, 591-92*f*
Ceramidas, **361,** 361-63, 762-63, 764*f*
Ceras, **358**-59
Cerebro
  barrera hematoencefálica, 880-81
  metabolismo de los combustibles por el, 932-34
Cerebrósidos, **362,** 762-63, 764*f*
Cetoácido, 566-68, 806-07
β-Cetoacil-ACP, 655*f*
3-Cetoacil-CoA, 719-20, 720-21
β-Cetoacil-CoA, 737-38
Cetoesfinganina, 764
Cetogénesis, **726**-28
α-Cetoglutarato, 546-47, 556-57, 558, 565-66, 566-68, 636-37, 798-800, 806-07, 835, 840-41
  descarboxilación de, 558, 559*f*
Cetohexosas, 317*f*
Cetopentosas, **316,** 319*f*
Cetosas, **313,** 314*f,* 317
Cetotetrosa, 319*f*
β-Cetotiolasa, **720**
Cetotriosa, 319*f*
Cianato amónico, 5-7
Cianocobalamina, **825**
Cianuro, 327-28, 433*t*
Ciclinas, **1220**-21
Ciclo C4, **695,** 637*f,* 696-98
Ciclo celular, 1217-21
Ciclo de Calvin, **687**-91
  estequiometría de, 689*f*
  fase de regeneración de, 690-691*f*
  fijación del dióxido de carbono y producción de azúcar en, 686-90
Ciclo de Cori, **633**
Ciclo de Krebs, 488. *Véase también* ciclo del ácido cítrico, 546-47
Ciclo de la urea de Krebs-Henseleit, 813-17
Ciclo de la urea, 813-14
Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), 546-47. *Véase también* Ciclo del ácido cítrico
Ciclo de sustrato, **470,** 629-30
Ciclo de transferencia electrónica, 795*f*
Ciclo del ácido cítrico, **467,** 541-71
  acetil CoA en, 555-56
  ciclo del glioxilato como variante anabólica de, 568-71
  coenzimas implicadas en, 547-55
  complejo piruvato deshidrogenasa y, 553-55
  descubrimiento de, 544-47
  entrada del carbono en, 544-46, 545*f,* 546-49
  estequiometría y energética de, 560-63
  estrategia de, 544-46
  etapas de la respiración, 541-46
  introducción y pérdida de átomos de carbono en, 555-58
  metabolismo de los aminoácidos a partir de intermediarios de, 816-13, 835-42
  oxidación del piruvato y, 541-47
  reacciones de, 562*t*
  regeneración del oxalacetato en, 558-61
  regulación de, 562-65
  rendimientos energéticos de, 614-15
  ruta de la pentosa fosfato como alternativa a, 570-71 (*véase* ruta de las pentosas fosfato)
  secuencias anapleróticas, 563-69
Ciclo del carbono, 666*f*
Ciclo del glioxilato, **568**-71
  reacciones de, 569*f*
  relaciones intracelulares que implican, 570*f*

Ciclo del nitrógeno, 790-99
  fijación biológica del nitrógeno, 793-97
  utilización del nitrato, 797-99
Ciclo energético de la biosfera, 311, 312*f*
Ciclo glucosa-alanina, **634,** 817, 837-38
Ciclo Q, **599**
Ciclobutano, **1054**
Cicloheximida, 1242-44
Ciclooxigenasa, **784**
Ciclopentanoperhidrofenantreno, **768**
Ciclos inútiles, **470**
Cilios
  modelo del doblado de, 303*f*
  movimiento de, 300-04
  ultraestructura de, 301*f*
Cinesina, **304**
  estructura dimérica de, 304*f*
  movimiento de, en los microtúbulos, 302-04, 305*f*
Cinética
  de la catálisis enzimática (*véase* cinética de Michaelis-Menten)
  de la formación de enlaces disulfuro, 211-13
  de la reasociación del, 1206-08
  del plegado proteico, 209-11
Cinética de Michaelis-Menten, 419-29
  análisis de los datos, 425-27
  estado estacionario en, 421*f*
  expresión de las velocidades de reacción para las reacciones de múltiples pasos, 421-24
  inhibición competitiva y, 430*f*
  inhibición no competitiva y, 432*f*
  parámetros significativos de, 423-26
  reacciones complejas, 427-29
  reacciones con múltiples sustratos, 426-28
  reacciones simples, 419-22
  unión cooperativa del sustrato y, 447*f*
Cininógeno, 435
Circulación enterohepática, **773**
Círculos de DNA superenrollados, **115**-16, 122-25
  demostración por electroforesis en gel de, 124*f*
  energía almacenada en, 130-32
  formación de, 123*f*
Cistationina, **844,** 845*f*
Cistationina sintasa, **844**
Cisteína, 143*f*, 147-48, 174*f*, 840-41
  biosíntesis de, 841-42, 843*f*, 845*f*
  catabolismo de, 849-51
  metionina como fuente de azufre de cisteína, 843-44, 845*f*
Cisteína tiolato, 616-17
Cistina, 147-48, **148**
Cistrón, **1126**
Citidina difosfato glucosa, 647-48
Citidina 5′-monofosfato (CMP), 98*f*
Citidina trifosfato (CTP), 448, 449*f*, 902-04
Citidina, 98*f*, 904-05
Citidine monofosfato-ácido siálico, **650**
Citocromo b_5 reductasa, **738**
Citocromo oxidasa de corazón de buey, 608*f*
Citocromo oxidasa, **595,** 595, 607-08, 609*f*
Citocromo P, 616-17, 617*f*
Citocromo(s)
  citocromo a, 593-95, 594*f*
  citocromo b, 593-95, 594*f*
  citocromo c, 584-85, 593-95, 595*f*, 602-03, 608-09
  citocromo P, 505-07, 616-17, 617-18
  citocromo, 622-23, 797-98
  como transportadores de electrones, 584-85, 592-93, 593-95
  espectro de absorción de, 594*f*
  hemos en, 594*f*
  P450, 616-18
Citoesqueleto, **298**
  actina y miosina en (*véase* Actina; Miosina)
Citomatriz, **482**
Citoplasma, **18**
  síntesis de proteínas en, 1244-45, 1246*f*
  transporte dentro del, 305
Citoquinas, **966**
Citoquinesis, **298,** 299*f*, 1218-20
Citoquininas, **975**
Citosina, **98**
  estructura de, 97*f*
Citosol, **18**
  citomatriz dentro del, 482-83
  degradación proteica en, 1250-53
  gluconeogénesis en, 629-30
  transferencia de transportadores de electrones a las mitocondrias desde, 598-600
  transporte de acetil-CoA al, 734-38
Citrato, 545-46, 555-57
  en el ciclo del ácido cítrico, 555-56
  en la biosíntesis de los ácidos grasos, 734-36, 736
  unión de, a la aconitasa, 558, 559*f*
Citrato liasa, **736**
Citrato sintasa, 555-56, 569-70, 570-71
  estructura de, 557*f*
  reacción de, 556*f*
Citroil-CoA, **556**
Citrulina, 813-14, 814-16, 815*f*
Clase IgG de las inmunoglobulinas, 274*t*, 275*f*, 282-83, 343*t*, 344-45, **1075**
Clasificador de células activadas por fluorescencia, **489**
Clatrina, **711**
Clon, 121-22, **271,** 1091-93
Cloranfenicol, 1188*f*
Clorofilas, 671-73, 673*f*, 868-69
Cloroplastos, 7, **19, 669**-71
  acoplamiento quimiosmótico y síntesis de ATP en, 606-08
  estructura de, 669*f*
  estructuras de captación de luz en, 671-74
  fotoquímica en, 675-83
Clorpromazina, **880**
Cloruro de guanidina, 233-34
Coagulación de la sangre, 338-40, 452-55
Coagulación, sangre, 338-40, 452-55
Cobalaminas, 817-18, **825,** 868-69
Cobamidas, **825**
Cociente [NAD^+]/[NADH], 562-63, 563-65, 636-37
Cociente P/O, 599-602
Cociente respiratorio (RQ), **472**-73
Código genético pñuntuado, **1160**
Código genético, **120,** 1160-65
  características de, 1162-65
  descifrado de, 1160-62
  diagrama de, 160*t*
  hipótesis del bamboleo de bases en, 145-46
  síntesis de proteínas y, 159-61
Código solapante, 1160-61
Codones de comienzo, 1163-65
Codones de parada, 161-62, 1163-64, 1184*f*
Codones tripletes, 1160-62
Codones, **120, 159**
  de parada, 161-62
  mutaciones génicas que implican, 266-67
  traducción y, 1159-60
Coeficiente de control de flujo, **486**
Coeficiente de difusión (D), **233, 376**
Coeficiente de extinción, **227**
Coeficiente de fricción, **59, 167**
Coeficiente de Hill, **247**
Coeficiente de permeabilidad, **376**
Coeficiente de reparto, **376**
Coeficiente de sedimentación, **167,** 233-34, 234*f*
Coenzima A, 547-48, 553-55
  oxidación de los ácidos grasos activada por, 730-31
Coencima Q_{10} reducida, 593-95
Coenzima Q_{10} oxidada (CoQ), 593-95
Coenzima(s), **435**-38
  biosíntesis de, utilizando nucleótidos de adenina, 897-98
  de flavina, 549-53
  en el ciclo del ácido cítrico y la oxidación del piruvato, 547-55
  en el metabolismo del nitrógeno, 817-31
  importantes, y vitaminas relacionadas, 389*t*
  piridoxal fosfato, 817-20, 819*f*
  tetrahidrofolato, 818-25
  vitamina B_{12}, 825-31
Coenzimas de flavina, **551**-53, 559-61
Coenzimas de tetrahidrofolato, 818-25, 914*f*
Coenzyme Q (CoQ), 584-85, 592-95
Cofactor hierro-molibdeno (FeMoco), **796**
Colágeno, **194**-77
  biosíntesis de, 196, 196-98, 838-41
  estructura de, 194-95
Colato, 774*f*
Colecalciferol, **779**-81
Cólera, 955-56
Colestanol, **769**
Colesterol, 361-64, 766-69. *Véase también* Grasas
  aterosclerosis, LDL, y 711-14
  biosíntesis de, 769-73
  como fuente de hormonas esteroideas, 773-75
  conversión de escualeno en, 773*f*
  efecto de, sobre la fluidez de la membrana, 365-66, 366*f*
  estructura de, 362*f*, 708-10, 768-69
  homeostasia de, 710-13
  síntesis de ácidos biliares a partir de, 771-75, 774*f*
  transporte y utilización en los animales, 707-14
Colesterol desmolasa, **775**
Colina, 753*f*, 847-48, 877-79
Colina quinasa, **754**
Colina-acetiltransferasa, 877
Compactación, 1212-13, 1216
Compartimentación, 478-79, 479-83
Compartimentalización en las células, 18-19
Compensación entropía-entalpía, **208**
Complajo ácido graso sintasa, 734*f*, 735*f*
Complejo α-cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, **868**
Complejo cAMP-CRP, 1132-33
Complejo α-Cetoglutarato deshidrogenasa, **558,** 559*f*
Complejo citocromo b_5, 676-78, 682-83, 683-86
Complejo CRP-cAMP-DNA, 1132-33
Complejo de Golgi, **18**
  en el direccionamiento proteico eucariota, 1247-48*f*, 1249*f*
  procesamiento de los oligosacáridos en, 653-56, 655*f*
Complejo de iniciación 70S, 1177-78
Complejo de iniciación, 338-40, 1178-80
Complejo enzima-sustrato, **415**
Complejo F_0 F_1, **603,** 604*f*
Complejo III, componentes redox, 608*f*
Complejo IV, 608-09
Complejo Nitrogenasa, **795,** 795*f*, 797*f*
Complejo Piruvato deshidrogenasa, 547-49
  estructura de, 548*f*
  mecanismos de, 554-55
  rendimientos energéticos, 614-15
  visión general de, 547*f*
Complejo promotor abierto, **1116**
Complejo promotor cerrado, 1116
Complejo proteico GDP-proteína Ras, 970*f*
Complejo proteoglucano, **338**-40
Complejo V, 609-10
  en el ensamblaje respiratorio, 598*f*
  transporte vectorial de proteínas por, 604*f*
Complejos que recogen luz, 671-**673,** 675*f*
Complejos respiratorios. *Véase* Complejos, multiproteicos
Complejos, multiproteicos, 584-85, 586*f*, 593-95, 596-99, 602-05
Component II, **796**
Componente I, **795**
Compuestos de energía elevada, 475-77, 512-14. *Véase también* Adenosina trifosfato (ATP)
Compuestos fosfato, 83-90
  de energía elevada, como lanzaderas de energía, 83-88
  potenciales de transferencia de, 88-90
Concatémero, **1026**
Concentraciones sanguíneas de glucosa
  agresión metabólica y, 939-45
  amortiguación y, 821-22
  ciclos de alimentación normales y, 935-37, 939-40, 941*f*
  consumo de etanol y reducción de, 634-37
  elevadas, bajas e inanición, 941*t*
  glucógeno como fuente de, 646-47
  hormonas y, 937-40, 939*f*
  regulación de, 636-37, 937-40
Concentrationes, energía libre y, 76-79
Condroitín sulfatos, 337-38
Conducción a saltos, 391-92
Conjugación, **993**
Constante de afinidad, **242**
Constante de asociación, **242**
Constante de Boltzmann, 72
Constante de disociación, **48,** 1128-29
Constante de equilibrio, 79-81
Constante de Michaelis, **422**
Constante de Planck, 670-71
Constante de velocidad de segundo orden, **407**
Constante de velocidad, 404-05
  definición, **405**
Constante dieléctrica, **32**

Contador de centelleo líquido, **496**-97
Contenido calórico, **472**
Contracción, muscular, 291-96
Control a nivel de sustrato, **445**
Control distributivo del metabolsimo, 485-**86**
Control negativo de la transcripción, 1125-26
Control por retroacción negativo, **446**
Control por retroacción
  de las enzimas, **446**-47
  de las hormonas, 833-34, 950*f*
Control respiratorio, **611**-14
Controles, metabólicos, 478-87. *Véase también* Regulación
  compartimentación, 479-83
  de la actividad enzimática, 479-81, 480*f*
  de las concentraciones enzimáticas, 478-79
  distributivos, 485-87
  regulación hormonal, 482-86
Convenio *R-S* para los enantiómeros, 314-15
Coordenada de reacción, **408**
Copiado de la información. *Véase* Replicación
Coproporfirinógeno, 125, 872*f*
Corazón
  ácido fólico, vitamin B_{12}, y, 829-31
  colesterol y placa aterosclerótica en las arterias de, 711-14
  metabolismo de los combustibles por, 934-35
Cordicepina, **1111**
Corismato, 853*f*, 855*f*
Correpresor, **1142**
Corte y empalme (mRNA), 1236-41
Corte y empalme alternativo, **1240**-41
Corticotropina, **775,** 949-50
β-corticotropina, **948**
Cortisol, 776*f*, 775-77
Creatina, 85*f*, 297, 475-76
Creatina fosfato (CP), **84,** 297, 475-76
  actividad muscular y agotamiento de, 297, 934-35
  biosíntesis de, 837-40, 939*f*
  hIdrólisis de, 85*f*
CreatinA quinasa, 297, **476**
Cremallera de leucina, 1139, 1228-31
Crestas, **544,** 584, 586*f*, 602-03
Criomicroscopía electrónica, 1201-02
Cromatina, 53-54, 1212, 1213*f*
  elementos de la estructura de, 1216*f*
  estructura de fibra asentada de, 1215*f*
  estructura de orden superior de, en el núcleo, 1216-18
  estructura de, y transcripción, 1232-36
  niveles de la estructura de, 1217*f*
  proteínas de unión al DNA en, 1212-15
  replicación de, 1220-24*f*
Cromatografía de afinidad, 168-69, 538-39, 951-52, 1012-13
Cromatografía de filtración en geles, 168-70
Cromatografía de inmunoafinidad, **284**
Cromatografía de intercambio iónico, **169**
Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), 168-69
Cromatografía, 167-70, 538-39, 1012-13
Cromóforos, **671,** 673*f*, 1055-57
Cromosomas artificiales de levaduras (YACs), **1092**
Cromosomas dobles diminutos, **1086**
Cromosomas politénicos, 1211-12
Cromosomas, 19
  descubrimiento de, 7
  DNA en, 9f (*véase también* Ácido desoxirribonucleico (DNA))
  doble diminuto, 1085
  eucariota, 1211-13
  ruptura y unión de, 1066-68
C-terminal (polipéptido), **151**
CTP (citidina trifosfato), 448, 449*f*, 902-04
CTP sintetasa, **905**
CTP: fosfocolina citidiltransferasa, **754**
Cuanto, **670**
Cuanto de radiación, **226**
Cubiertas de hidratación, **42**
Cuerpo humano
  composición de, 10*f*
  concentraciones sanguíneas de glucosa (véase Concentraciones sanguíneas de glucosa)
  digestión de las grasas, absorción, almacenamiento, y movilización en, 704*f*
  factores de iniciación de la transcrición, 1231*t*
  genoma, 1091-93
  grupos sanguíneos, 346*t*
  lipoproteínas plasmáticas en sangre, 706*f*, 707*f*
  órganos del metabolismo de los combustibles en, 931-37
  órganos endocrinos de, 944-45, 945*f*
  proteínas de la replicación de, 1021*t*
  secuencias de aminoácidos en la mioglobina de ballenas y, 156-57, 157*f*
  síntesis y utilización de glucosa en, 629*f*
Cuerpos basales, **19, 302**
Cuerpos cetónicos, 703-04, **726,** 728*f*, 935-37
Cultivo tisular, **489**
Curio (Ci), **495**
Curva de unión hiperbólica, 243-44
Curva de unión sigmoidea, 245*f*, 244-46
Curva de unión, oxígeno, 242*f*, 243-44, 245*f*, 244-46
Curvas de unión del oxígeno, 242*f*, 243-44, 244*f*, 244-46
Chaperonas moleculares, 212-13, 213*f*
Chaperonina GroEL-GroES, 213*f*
Chaperoninas (chaperones moleculares), 212-13, 213*f*, 1244-45, 1246*f*

dADP, 814
Daño oxidativo del DNA, 1053-54, 1058-59
Daño por alquilación del DNA, 1053-54
dATP, 910-11
dCDP, 911-12, 913*f*
dCMP desaminasa, **912**
dCMP hidroximetilasa, **920**
dCMP, 913*f*, 913-15
dCTP desaminasa, **912**
dCTP, 910-11
dCTPasa, **920**
ΔE, **66,** 68
Dedos de zinc, 864-66, **1140,** 1227-31
definición, **869**
Degradación de Edman, **159,** 172, 173*f*
Degradación de los aminoácidos, 812-17
  ciclo del la urea de Krebs-Henseleit, 813-17
  destoxificación y eliminación del amoniaco, 813-14
  economía del nitrógeno y aspectos de, 803-08
  rutas, 812-13, 813*f*
  transporte del amoniaco al hígado, 816-17
Degradación, metabólica. *Véase* Catabolismo
Dendrita postsináptica, **877**
Dendritas, 386-87, 387*f*
Densidad de grano, **996**
Densidad electrónica, **137**
Densidad superhelicoidal (DNA), **124**
Derivado de aminoácido de isoindol, 172
Derivados de los aminoácidos, como hormonas, 946-47
Dermatan sulfatos, 337-38
Desacopladores, **606**
Desamido-NAD^+, 863,64
Desarrollo (científico), DNA eucariota y, 1251-54
Descatenación, **1019**
Descodificación de la información. *Véase* Traducción
Desformilasa, 1191-93
7-deshidrocolesterol, 779-81
Deshidrogenasas, **544,** 556-58, 559-61
3-Deshidroquinato, 853*f*
3-Deshidrosiquimato, 853*f*
Desintegración radiactiva, 494-96
Desmosina, **197**
Desnaturalización, **128**
  de ácidos nucleicos, 128-31
  DNA, 128-29, 130-31
  proteica, **202,** 203*f*, 208*f*
Desnitrificación, **793**
Desoxiadenosina monofosfato (dAMP), I 1*f*, 13*f*, 1097-99
Desoxiadenosina, 125, 1110-11
Desoxicitidina quinasa, 913-15
Desoxicitidina, 125, 913*f*, 913-15
Desoxicolato, **774**
Desoxiguanosina quinasa, 913-15
Desoxihemoglobina, 250*f*, 252*f*
  drepanocitosis de, 265-69
  unión del 2,3-bisfosfoglicerato a, 256*f*
Desoximioglobina, 240-41
Desoxinudeotidiltransferasa terminal, **1093**
Desoxipirimidina quinasa, **921**
Desoxirribofosfodiesterasa, **1058**
Desoxirribonucleasa pancreática (DNase), 1154-56
Desoxirribonucleósido monofosfato quinasa, 920-21
Desoxirribonucleósido quinasas, 913-15, 915
Desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP), 904-05
  biosíntesis de, 906*f*
  como sustrato de la replicación, 987-98, 988*f*, 1000
Desoxirribonucleótido(s), 889, 904-12
2′-Desoxirribosa, **96**
Desoxitimidina, 911-12, 913*f*
Desoxiuridina monofosfato (dUMP), 911-12, 913*f*, 914*f*
Desplazamiento NIH, **861**
Desviación en gel, **1257**
Detergentes, 357-58
Determinante antigénico, **270,** 270*f*, 282-83. *Véase* epítopo
Deuterio, **495**
Dextrano, **648**
Dextrina límite, **529**
ΔG. *Véase* cambio de energía libre
dGDP, 911-12
dGTP, 910-11
ΔH, 69-70. *Véase* entalpía
Diabetes dependiente de insulina, **942**
Diabetes mellitus, 634-35, **940, 942**-45
Diabetes resistente a la insulina, **943**
sn-Diacilglicerol (DAG), **960,** 961-62
1,2-Diacilglicerol, 741-42
Diacilglicerol-3-fosfato, **741, 749**
Diálisis, **170**
Diaminopimelato, 868-69
Diastereómeros de tetrosa, 315-16
Diastereómeros, 314-16, 318*f*
  configuracional, 323*f*
  definidos, 315-19
6-Diazo-5-oxonorleucina (DON), **893**
2,6-Diclorofenol-indofenol (DCIP), 596-97
Dicroismo circular, 227-30
  definición, **229**
2′,3′-Dideshidro-3′-desoxitimidina (d4T), **922,** 922-23
2′,3′-Didesoxicitidina (ddC), **922,** 922-23
2′,3′-Didesoxiinosina (ddI), **922,** 922-23
2′,3′-Didesoxirribonucleósido trifosfatos, **1099**
2,4-Dienoil-CoA reductasa, **722**
Dietilamida del ácido lisérgico (LSD), 880-81, **881**
Dietilestilbestrol, **777, 951**
Difluorometilornitina, **849**
Difosfatidilglicerol, **750**
Difosfoglicerato (DPG), 254-55
Difracción de rayos X de cristales, 135-36
Difracción de rayos X de fibras,134-36
Difracción de rayos X, **7,** 22-23, **105,** 134-38
  difracción en cristales, 135-38
  difracción en fibras, 134-36
Difracción, 134-35
Difusión
  como proceso impulsado por la entropía, 71*f*
  transporte a través de membranas y, 77-79
Difusión molecular, **376**
Digitonina, 596-97
Digitoxina, **381**
Diglucurónido de bilirrubina, **873,** 874*f*
Dihidrofolato reductasa (DHFR), 821-22, 822*f*
  cambios estructurales cromosómicos que acompañan a la amplificación génica en, 1086*f*
  inhibición de, 922-25
7,8-Dihidrofolato, **821,** 913-15
Dihidrolipoamida deshidrogenasa, **547**
Dihidrolipoamida transacetilasa, **547**
Dihidropteridina reductasa, **859**
Dihidrotestosterona, 776*f*
Dihidrouracilo, 904-05
Dihidroxiacetona fosfato (DHAP), 415-16*f*, 505-07, 508-09, 509-10, 598-99, 600*f*, 690, 752-53, 934-35
Dihidroxiacetona, 313, 527-28, 574-75
3,4-Dihidroxifenilalanina, 861
Dihydroorotato, 903*f*
Diisopropil fluorofosfato (DFP), 431-33, 432*f*, 433*t*, 879-80
Dímeros de timina, **1054**
Dimetil nitrosamina, 258*t*
Dimetil suberimidato, 537-39
Dimetil sulfoniopropionato (DMSP), 797-98
Dimetil sulfuro (DMSO), **797**
Dimetilalil pirofosfato, **771,** 772*f*, 781-82
5,6-Dimetilbenzimidazol (DMB), 825-26
Dimetilsulfoxido reductasa, **797**
Dimetoxitritilo (DMTr), 140
Dineína citoplásmica, **304**
Dineína, **302**-04
2,4-Dinitrofenol (DNP), **606**

Dinucleótido de flavina y adenina (FAD), 547*f*, 547-48, 549-52, 551*f*
Dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD^+), **435,** 436, 437-38, 547-48, 556-58, 571-72, 863-64
Dióxido de carbono
  catabolismo del ácido úrico a amoniaco y, 900*f*
  efectos del, sobre la unión del oxígeno por la hemoglobina, 257*f*
  en el ciclo del ácido cítrico, 556-58, 560-61
  fijación del, en las reacciones oscuras de la fotosíntesis, 686-90
  fotosíntesis y reducción del, 666-68
  transporte, 254-55
Dioxigenasas, **615**
Dipalmitoilfosfatidilcolina, **755**
Dipéptido, **151**
Dipiridamol, **923**
Dipolo inducido por la carga, 33*f*
Dirección de los procesos, 69-71
  de la replicación, 995-98, 1024-27
  de la síntesis de polipéptidos, 1159-61
Direccionalidad de la estructura de los polinucleótidos, 103
Direccionamiento proteico en los eucariotas, 1244-49*f*
  papel del comlejo de Golgi, 1247-48*f*, 1249*f*
  síntesis proteica en el citoplasma, 1244-45, 1246*f*
  síntesis proteica en el retículo endoplásmico, 1244-48
Disacáridos, **311**
  estructuras de algunos importantes, 328-29*f*, 330-31
  metabolismo de, 526-28
  presencia y papeles biológicos de, 331*t*
Discos imaginarios, **1152**
Discos Z, **291,** 291-93, 292*f*
Dismutación, 619-20
Disociación, ácida, 48-49
Disolvente, el agua como, 40-46
  molécula anfipáticas y, 43-46
  molécula hidrófobas y, 43
  moléculas hidrófilas y, 40-43
Dispersión de neutrones de ángulo bajo, **1202**
Dispersión de rayos X y de neutrones de ángulo bajo, 1201-03*f*
Dispositivos de péptidos, 177-79
Dispositivos peptídicos combinatorios organizados espacialmente dirigidos por la luz, 177-79
Diterpenos, **781**
Diversidad genética, recombinación como fuente de, 276-78
Diyodosalicilato de lítio, 1217-18
DNA a izquierdas (Z-DNA), 125-26
DNA de cadena sencilla
  proteínas de unión (SSB), 987-89, **991,** 1012-15. *Véase también* Proteínas de unión al DNA
DNA fotoliasa, 1055-57
DNA girasa, **1116,** 491-92, **1016,** 1018-19
DNA heterodúplex, **1067**
Dna ligador, 1216*f*
DNA ligasa, 987-89, 988-89, **990,** 1009-11
DNA polimerasa I, **989,** 1001-03
DNA polimerasa II y III, 1002-04
DNA polimerasa(s), 118, **988,** 988*f*, 1000-09
  descubrimiento de, 1000-02
  DNA polimerasa I, 1001-03
  DNA polimerasas II y III, 1002-04
  estructura y mecanismo de, 1003-06
  eucariotas, 1007-09, 1221
  holoenzima DNA polymerase III, 1006-08
  RNA polimerasas frente a, 1110-13
DNA recombinante, 121-22, 1091-96
DNA satélites, **1207**
DNA semimetilado, **1050**
DNA-*N*-glucosilasas, 1057-59, 1060*f*
DNasa (desoxirribonucleasa pancreática), 1154-56
dNTP, 911-12
Doble hélice (DNA), 105-08*f*, 128-31
Dodecil sulfato sódico (SDS), 233-34, 357-58
Dolicol fosfato, **653**
Dominante *cis*, **1127**
Dominante *trans*, **1127**
Dominio variable, **275**
Dominio, **200**
Dominios constantes, **275**
Dominios SH2, **973**
Dopa, **861,** 876*f*
Dopamina, 875, 876*f*, 880-81, 883-84
Dopamina-β-hidroxilasa, **876**
Dopaquinona, **861**
Drosophila, 1251-54
ΔS, 74. *Véase* entropía
dTTP, 910-11, 911-12, 1030*f*, 1030-31
dUDP, 911-12, 913*f*
dUMP (desoxiuridina monofosfato), 911-12, 913*f*, 914*f*
dUTP, 911-12, 913*f*
dUTPasa, **912,** 912-13, 913-15, 914*f*

E (Energía interna), 65
E. coli. *Véase Escherichia coli* (*E. coli*)
*Eco*K, **1049**
Economía del nitrógeno, **793,** 803-08
  ausencia de compuestos nitrogenados y, 803-05
  capacidades biosintéticas y, 804-05
  transaminación y, 804-08
*Eco*RI, **1049,** 1051*f*, 1092*f*
Ecuación de Arrhenius, 409-10
Ecuación de Goldman, **388,** 388-89
Ecuación de Henderson-Hasselbalch, 48-51
Ecuación de Michaelis-Menten, **422**
Ecuación de Nernst, **387,** 589-92
Ecuación de Svedberg, 235
Edición del RNA, 1240-41
Edición, RNA, 1240-41
Efecto alostérico, **247**
  cambios de la hemoglobina relacionados con, 249-54
  efectos de otros ligandos sobre, en la hemoglobina, 249-59
  en el transporte de oxígeno, 243-47
  modelos ara, en la hemoglobina, 247-51
  regulación de la actividad enzimática, 444, 449*f*
Efecto Bohr, **254,** 254*f*
Efecto hidrófobo, 206-08
  definición, **207**
Efecto Pasteur, **520**
Efector (transducción de señal), **484**
Efectores alostéricos, 253-54
Efectores heteroalostéricos, **448**
Eficacia cuántica, 674-76
Eficacia de los procesos, **76**
  de la fosforilación oxidativa, 599-602
  de la fotosíntesis, 690-92
Eicosanoides, 738-39, 747, **781**-86, 944-45
Einstein (mol de protones), **671**
Eje diádico, **218**
Ejes de simetría, **218**
Elastina, **196**
Electrofoiresis en gel, 22-23, 60-63, 113-15
  análisis de las proteínas de la membrana de los eritrocitos por, 307*f*
  análisis de tppoisómeros de DNA mediante bidimensional, 1039-41
  en SDS, 61-62, 235
  enfoque isoeléctrico y, 61-62
  movilidad de las partículas en, 62*f*
  principios de la separación en, 61-62, 63*f*
  superenrollamiento del DNA demostrado por, 124*f*
Electroforesis en gel bidimensional, **498,** 1039-41
Electroforesis en gel de campo pulsatil, 1091-93
Electroforesis en gel de SDS, 235
Electroforesis en papel, 60
Electroforesis, 53, 59-63
  en gel (*véase* electroforesis en gel)
  en papel, 60-62
  enfoque isoeléctrico, 61-62, 63*f*
  principios generales, 59-60
Electroplacas, **880**
Elementos alu, **1208**
Elementos de control, 1230-32, 1232*t*
Elementos de identidad en el tRNA, 1170
Elementos de la materia viva, 8-12
Elementos de respuesta a las hormonas (HREs), 963-66
Elementos genéticos extracromosómicos, **998**
Elementos genéticos transponibles, **1078**-84
  estructuras de clase I, II, y II, 1080*f*
  generación de repeticiones directas, 1081*f*
  retrovirus y, 1085*f*
Elongación. *Véase* Elongación de cadena
Elongación de cadena, 986-87
  en la biosíntesis de los ácidos grasos, 737-38
  en la traducción, 1178-86, 1242-44
  en la transcripción, 1115-20, 1234-36
  enzimas que catalizan la de los polinucleótidos, 1000-09

Enantimerós L, 145-46, 314-15
Enantiómeros D, 145-46, 314-15
Enantiómeros R, 314-15
Enantiómeros S, 314-15
Enantiómeros, **145, 313**-15
  de configuración, 323*f*
  de gliceraldehído, 313*f*
  designaciones alternativas para, 314-15
  monosacáridos, en la naturaleza, 314-15
Encefalinas, **883,** 883-84, 949-50
Encefalopatía espongiforme bovina, 214
Endocitosis, **651, 711**
Endocitosis mediada por el receptor, **711,** 711-13
Endoglucosidasas, 350-51
Endonucleasas, **891**
Endonucleasa apirimidínica, **1020**
Endonucleasas de restricción, **1047**
Endonudeasa AP, **1058**
Endorfinas, **884,** 949-50
Endosoma, **711**
cis-Enediol, 415
Energía, 32-33, 65-70. *Véase también* Bioenergética
  de la luz, 670-73
  entalpía y, 68-70
  grasa como reserva de, 703-04
  interna, y estado del sistema, 65-67
  leyes de la termodinámica y, 66-68
  libre (*véase* Energía libre)
  metabólica (*véase* Energía metabólica; Metabolismo)
  rendimientos de, en el metabolismo oxidativo, 613-15
  superenrollamiento del DNA y, 130-32
Energía acoplada, 583-84
Energía de activación, efecto de los catalizadores sobre, 411*f*
Energía de interacción, **34**
Energía interna, **66**-67
Energía libre, 72-90
  ATP como moneda de intercambio de, 473-79
  barrera (*véase* barrera de energía libre)
  cálculo, 80-83
  cambios de (*véase* cambio de energía lbre)
  compuestos fosfato de energía elevada como fuentes de, 83-90
  concentración de los componentes de una mezcla y, 76-79
  de la hidrólisis de tioéster y éster, 553*f*
  del plegado proteico, 207*f*
  diagramas de, para las reacciones más simples, 409*f*
  interrelación entalpía-entropía y, 73-76
  reacciones químicas y, 79-83
  reglas de, 72-73
  trabajo útil y, 75-77
Energía libre de activación estándar, **408**
Energía libre de Gibbs, **72**
Energía metabólica, 491-27. *Véase también* Metabolismo
  ATP como moneda de intercambio energético, 473-79
  cálculo de los rendimientos de, 472-73
  generación de ATP y GTP a partir de ácido inosínico, 896-98
  oxidación como fuente, 470-73
Energías libres molares parciales, 76-77
Enfermedad de Alzheimer, 300-01, 620-21, 707
Enfermedad de células I, **656**
Enfermedad de la orina de jarabe de arce, **868**
Enfermedad de las vacas locas, 214-17
Enfermedad de Refsum, **725,** 726*f*
Enfermedad de Tay-Sachs, **766**
Enfermedad de von Gierke, 646-47
Enfermedad. *Véase* Enfermedades y trastornos humanos
Enfermedades de almacenamiento de lípidos, **765**
Enfermedades genéticas. *Véase también* Enfermedades humanas y trastornos
  hemoglobinopatías, 265-71
Enfermedades víricas, tratamiento de, 915, 919-20
Enfermedades y trastornos humanos
  ácido úrico excesivo (gota), 898-902
  Alzheimer, 300-01, 620-21, 706-07
  anemia drepanocítica, 265-69
  anemia, 576-78, 827-31
  aterosclerosis, 711-14
  cáncer (vease Cáncer)
  coegulación de la sangre (hemofilia), 454-55
  cólera, 955-56
  concentraciones de glucosa en sangre, 634-37, 647-48, 939-40, 941-45

corazón y arterias, 707-10, 710, 711-14, 829-31
de la uroporfirinógeno I sintasa, 871-73
de la uroporfirinógeno III cosintasa, 871-72
déficit de ácido homogentísico dioxigenasa, 861-63
déficit de cistationina sintase, 843-44
déficit de fenilalanina hidroxilasa, 859-61
déficit de iodo, 860-61
déficit de tirosinasa (albinismo), 861-63
déficit enzimático, 576-78, 578-79
del metabolismo de purinas, 898-904
diabetes, 634-35, 941-45
enfermedad de la célula I, 655-56
enfermedad de Refsum, 725-27
esclerosis múltiple, 391-92
fecetos de la helicasa, 1015-16
herpes, 920-21
hipoglucemia, 634-37
ictericia, 871-75
inanición, 940-43
intolerancia a la lactosa, 526-28
leucotrienos y asma, 785-86
metabolismo de la galactosa, 526
metabolismo defectuoso del glucógeno, 646-47, 647*t*
metabolismo del oxígeno y, 620-21
neurológicas, 880-81
nutricionales (vitaminas), 194-95, 547-49, 840-41, 863-64
obesidad, 741-43
oxidación defectuosa de ácidos grasos, 725-26, 726*f*
prione y, 214-17
pulmonares, 755-57
quimioterapia (*véase* Quimioterapia)
relacionadas con el colesterol, 707-10, 710, 711-14
relacionadas con los esfingolípidos, 765-66, 766*t*
reparación por excisión y, 1057-58
repuesta inmunitaria, 273-75
rotura de ganglиósido y, 362*f*
SIDA, 278-79, 915
síndrome de Lesch-Nyhan, 901-02
síndrome de Zellweger, 759-60
tiroideas, 860-61
toxinas y (*véase* Toxinas)
transferencia Southern y, 1100-01
variantes de la hemoglobina y, 265-71
víricas, 920-21 (véanse también los viris específicos)
whooping cough, 955-56
Enfermeddaes de almacenamiento de glucógeno, 646-47, 647*t*
Enfoque isoeléctrico, **53,** 61-62, 63*f*
Enlace amida, **151**
Enlace fosfodiester, 96*f,* **97,** 99-103
Enlace glucosídico, **98, 327,** 331-33, 528*f*
Enlace peptídico, **14, 151,** 154-57
estabilidad y formación de, 155-57
estructura de, 154-56
formas *trans* y *cis* de, 154, 155-56
hidrólisis de, 155-56, 417-19, 418*f*
requerimientos energéticos para, 1190-91
Enlaces covalentes, 31, 32*f*
Enlaces de hidrógeno, 33*f,* **37**-40
en el agua, 41*f,* 42*f*
en el plegado proteico, 204-06, 205*f*
en las estructuras biológicas, 38*f*
en las hélices, 187*f*
principales de importancia biológica, 38*t*
Enlaces disulfuro, **148**
en el plegado de las proteínas, 207-09, 211-13
en la insulina, 175-77
Enlaces exoglucosídicos, 530-31
Enlaces hidrófobos, 206
Enlaces no covalentes, 31, 32*f*
trans-δ2-Enoil-ACP, 733*f*
Enoil-CoA hidratasa, **720**
Enoil-CoA isomerasa, **722**
Enoil-CoA, 719-20, 737-38
5-Enoilpyruvilsikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa, **852**
Enolasa, **513**
Entalpía, 68-**69**
factores de, en la catálisis, 412*f*
interrelación de la entropía y la, 73-76
Enteropeptidasa, 450-52
Entrecruzamiento químico, 1198-200
Entrecruzamiento, químico, **1199**-200
Entropía conformaciónal del plegado, **204**
Entropía, 43, 69-**72**
conformacional, del plegado proteico, 204-06
difusión como impulsada por, 71*f*
dirección de los procesos y, 69-71
ejemplos de baja y elevada, 72*t*
factores de, en la catálisis, 411, 412*f*
interelación de la entalpía y, 73-76
segunda ley de la termodinámica y, 72
Envoltura nuclear, **19,** 1211-12
Enzima desubiquitinizante, 1251
Enzima fotorreactivante, 1055-57
Enzima málica, **566,** 736
Enzima ramificante, **643**-44
Enzima RecBCD, 1069, 1071-72
Enzimas alostéricas, 444, 450*f*
aspartato carbamoiltransferasa, 448-51*f*
control a nivel de sustrato, 445-46
control por retroacción, 445-47
heteroalosterismo, 448
homoalosterismo, 447-48
Enzimas híbridas, 439-42
Enzimas proteolíticas, **155**. *Véase también* Proteasas
Especificidades de secuencia de algunas, 155*t*
Enzyma(s), 6-7, **141, 403,** 458-59
alostéricas, **445**-51*f*
cinética de la catálisis enzimática, 419-29
cinética, pre-estado estacionario, 460-63
clasificación de proteínas, 438-40
coenzimas, vitaminas e iones metálicos en, 433-39
cofactores, metales y oligoelementos como, 437*t*
como catalizadores, 412-20
de la replicación (véase DNA polimerasa(s))
de la síntesis de RNA, 1109-14
en la síntesis de ATP, 602-04
estereoespecificide conferida por, 436*f*
funciones diversas de, 438-42
inducción, 1106-07
ingeniería molecular de nuevas y modificadas, 439-42
inhibición de, 428-34
medidas de las velocidades de las reacciones catalizadas por, 458-61
metabolizantes de nucleótidos, como marcadores genéticos seleccionables, 925-27
modificaciones covalentes y regulación de, 450-55
multifuncionales, en la síntesis de pirimidinas eucariotas, 902-05
papel de, 403-05
principales clases de, ejemplos, 438-39, 440*t*
proteolíticas, 155-57
relaciones gluconeogénesis-glucólisis y, 629-32
restricción y modificación, 1048-52
ribozimas, 441-45*f*
ruta de las pentosas fosfato, y trastornos genéticos humanos, 576-79
velocidades de reacción químicas y efectos de, 404-13
Episomas, 998-1000
Epítopo, **270,** 282-83
Equilibrio de sedimentación, **233**
Equilibrio del nitrógeno, **804**
Equilibrio químico, 79-83
Equilibrios iónicos, 45-54
ácidos y bases débiles, 47-49
ácidos y bases, 45-46
anfolitos, polianfolitos, y polielectrolitos, 51-54
escala de pH y margen fisiológico, 47-48
ionización del agua y producto iónico, 45-48
soluciones amortiguadoras, 50-53
titulación de un ácido débil, 48-51
valores de pKa y disociación ácida, 48-49
Equivalentes reductores, **473**
Eritritol, 326
Eritrocitos, 238*f*
antígenos de los grupos sanguíneos, 344-46, 650-52
déficit de las enzimas de la ruta de las pentosas fosfato, 576-79, 619-20
déficit de piruvato quinasa en, 513-16
en la anemia drepanocítica, 266-67, 267*f*
fantasmas de membrana de, 368-70, 399*f*
membranas de, 368-74
proteinas de la membrana de los eritrocitos humanos, 371*t*
tranporte de oxígeno en, 243-61
Eritromicina, 741*f,* 1187-89, 1188*f*
Eritrosa, 315-16
Eritrosa-4-fosfato, 574-75, 575-76, 853*f*
Eritrulosa, 315-16, 316*f*
Escalas de hidrofobicidad, 207*t*
Esclerosis lateral amiotrófca (Enfermedad de Lou Gehrig, 620-21
Esclerosis múltiple, 391, 620-21
Escorbuto, **195,** 547-49, 840-41
Escualeno, **770**
ciclación de, a lanosterol y colesterol, 771-73
conversión de, en colesterol, 773*f*
conversión del farnesil pirofosfato en, 670-71, 772*f*
síntesis de, a partir de mevalonate, 670-73
Escualeno 2,3-epóxido, 771-73
Escherichia coli (*E. coli*), 11-12
bacteriófagos de, 987-89, 1020-22*f*
DNA polimerasas en, 1000-02, 1003*t,* 1005*f*
DNA, replicación de, 995-96, 997*f,* 1023-26
elementos transponibles en, 1081-84
estructura de la dUTPase en, 914*f*
estructure of la rNDP reductasa en, 907*f*
fragmento Klenow, 1011*f,* 1027-29
genoma, 113*t,* 118, 1091-93
glutamina sintetasa en, 801*f,* 802*f*
helicasas, 1015*f*
holoenzima DNA polymerase III, estructura de subunidades de, 1006*f,* 1007*f*
mapa genético, 993-94, 994*f*
operón arabinosa en, 1145-48
pared celular de, 341*f*
pre tRNA y tRNA en, 1150-52
proteínas de la replicación de, 1021*t*
proteínas de unión al DNA, 1013-15
quimiotaxia en, 307-08, 308*f*
reparación de mal apareamiento, 1062-64
reparación por excisión en, 1056-58
replicación bidireccional en, 996-98
replicación del genoma lineal, 1027-30, 1030*f*
ribosomas de, 1170-78
RNA polimerasa en, 1112*t*
sistema de restricción, 1048-49, 1050*t*
topoisomerasas de, 1018-20
tRNA en, 1171*f*
Esferas F_1, **603,** 603*f*
D-4-esfinganina, 361
Esfinganina, **763,** 764*f*
Esfingolípidos, **361,** 747
enfermedades del catabolismo de, 766*f*
metabolismo de, 762-68
rutas lisosomales para la degradación de, 767*f*
Esfingolipidosis, **765**
Esfingomielina, 361-63, 762-63
Esfingosina, **361,** 361, 762-63
Especies reactivas de oxígeno, 617-**618**
Espectrinas, **371**
Espectro de acción, **1054**
Espectro de CD (dicroismo circular), 228-29
Espectro de dicroismo circular (CD), **229**
Espectro de emisión de fluorescencia, **228**
Espectro diferencial 595-97
Espectro energético, **496**
Espectro, diferencial, 595-97
Espectrofotómetro, **227**
análisis de reacciones catalizadas por enzimas utilizando, 458-59
Espectrometría de masas, 235
Espectroscopia de absorción, 225-28
Espectroscopia de correlación (COSY), 230-31
Espectroscopía de efecto Overhauser nuclear (NOESY), 230-31, 232*f*
Espectroscopía infrarroja, **226**
Espectroscopía ultravioleta, 226-28
Espermidina, **848,** 848*f*
Espermina, **848,** 848*f*
Espliceosoma, 1236-40
Esporulación, **809, 1114**
Esqueleto (proteína), **370**
Esqueleto proteico, 370-72
Estabilidad
DNA y metabólica, 1053-54
enlace peptídico, 155-57
enlaces fosfodiester, 99-103
Estabilización por resonancia de los productos fosfato, 86
Estado activado, **408**
Estado basal, 225-26
Estado cristalino líquido, 364-66
Estado de transición, **408**-10
Estado estacionario, **421,** 458-59, 501-04

Estado estándar, **78**
Estado intermedio, **411**
Estado, **66**
  Ejemplos de baja entropía y elevada entropía, 72*t*
  estándar, 77, 79-80, 89-90
Estados del plegado proteico fuera de ruta, 210-11
Estados electrónicos excitados, 225-26
Estados respiratorios, 610-14
Estados vibracionales, **226**
Estearoil-CoA, 737-38
Estereocentro, **145**
Estereoisómeros, **145**
  de los α-aminoácidos, 145*f*
  del gliceraldehído, 313*f*
  diastereómeros como, 314-16
  enantiómeros, 313-15
Estereoquímica de los α-aminoácidos, 144-48
Estereospecificidad, 436*f*
Ésteres de forbol, **961**
Ésteres fosfato, 324-25
  importantes bioquímicamente, 324*t*
Ésteres metilo de N-acetilaminoácidos, 424*t*, 428*t*
Esteroide(s), **363,** 363-64, 747, **768**
  ácidos biliares y, 771-75
  biosíntesis de colesterol, 769-73 (*véase también* Colesterol)
  estructura de, 768-70
  metabolismo, 766-78
Esteroides cardiotónicos, **381**
Esterol, **768**
Estradiol, 776*f*
17-β-Estradiol, 951-52
Estreptolidigina, **1113,** 1186-87
Estreptomicina, 1188*f*
Estrés. *Véase* Estrés metabólico; Estrés torsional
Estrés torsional, 991-93, 1016-20
Estrógenos, 773-75, 776*f*, 864-66, 966*f*
Estroma, **670**-71, 682-83, 684*f*
Estrona, 776*f*
Estructura cointegrada, **1083**
Estructura cruciforme (DNA), **126,** 131-32
Estructura cuaternaria de proteínas, **182, 217**-22
  interacciones heterotípicas proteína-proteína, 221
  interacciones homotípicas proteína-proteína, 217-189
  simetrías de, 219*f*
Estructura de bucle raiz, DNA, **1001**
Estructura de clatrato, **43**
Estructura de complejos, oligosacáridos, **654**
Estructura de horquilla (DNA), 126, **1001**
Estructura de manosa elevada, oligosacáridos, **653**
Estructura de ovillo aleatório
  DNA y RNA, 128-29
  proteína, 202-04, 204*f*
Estructura de ovillo enrollado, **192**
Estructura híbrida, oligosacáridos, **653**
Estructura nativa de las proteínas, 202-04
Estructura palindrómica (DNA), 126, 127*f*
Estructura primaria, **103**
  de ácidos nucleicos, 103-05
  de proteínas (secuenciación), 172-77
  de proteínas (*véase* Estructura proteica, nivel primario)
Estructura proteica, nivel primario, 141-66
  aminoácidos, 141-50
  código genético y traducción del mRNA a las proteínas, 159-63
  como polipéptidos de secuencia definida, 156-59
  péptidos y enlace peptídico, 151-57
Estructura proteica, tri-dimensional, 181-226
  cuatro niveles de, 217*f*
  enlaces disulfuro y plegado, 207-09
  estructura cuaternaria, 217-22
  estructura secundaria, 181-90
  factores que la determinan, 202-09
  información para el plegado, 202-06
  predicción de, 214-18
  proteína fibrosas, 190-98
  proteínas globulares (*véase* Proteínas globulares)
  termodinámica del plegado, 204-08
Estructura secundaria de las proteínas, **182**-90
  descripción de hélices polipeptídicas y hojas plegadas, 183-87
  descubrimiento de estrudturas polipeptídicas, 181-83
  factores que la determinan, 202-09
  predicción de, 214-17, 216*f*
  representaciones de Ramachandran, 187-90
Estructura secundaria de los ácidos nucleicos
  doble hélice, 105-108*f*
  estabilidad de, 128-32
  formas A and B, 112-13
  in vivo, 112-17*f*
  naturaleza semiconservativa de la replicación y, 107-10, 110*f*
  raras, 124-28*f*
Estructura terciaria de las proteínas, **182,** 196-204. *Véase también* Plegado proteico
  factores que la determinan, 202-09
  patrones de plegado, 199-204
  plegados ligados a la función, 196-200
  simulación por ordenador del plegado, 214-18
Estructura terciaria de los ácidos nucleicos, **115**
  de los tRNA, 116-117*f*
  estabilidad de, 128-31
  superenrollamiento y, 113-15*f*
Estructuras de anillo
  aromáticas, 850-56
  corrina, 825-26
  esteroides, 769*f*
  monosacáridos, 316-23
  piridine, 817-20
  pirimidina, 902-05
  pteridina, 797-98, 818-20
  purina, 893*f*, 894-96
Estructuras Theta, **997**
Estudios en órganos aislados, 488-90
Etanol, 436
  combustión de, 75*f*
  gluconeogénesis y consumo de, 634-37
  metabolismo de, 75*f*, 517-18, 518-19
Etanolamina, 754-55
Etching de congelación, 25-27, **396**
Éteres de vinilo, **760**
Éteres glicerilo, **760,** 761*f*
Etileno, 847-48, **975**
Etilmetanosulfonato (FMS), 1055-57
Eucariotas, **18,** 1205-58
  compartimentalización en, 18-19, 478-79, 479-83
  destrucción programada de las proteínas en, 1248-52
  direccionamiento proteico en, 1244-48*f*, 1249*f*
  DNA de, y desarrollo científico, 1251-54
  DNA polimerasas de, 1007-09
  exones e introns del DNA en, 1208-10
  genomas en, 1205-12
  metabolismo de los glicerofosfolípidos en, 752-63
  metilación del DNA en, 1045-47
  organización del DNA en, 1211-18
  procesamiento del mRNA en, 1235-41
  replicación y ciclo celular en, 1217-24*f*
  síntesis de pirimidinas en, 902-05
  traducción en, 1241-45
  transcripción en, 1224-36
Eucromatina, **1218**
Euglena, 4*f*
Evolución de las proteínas.
Evolución proteica, 257-71
  de la familia mioglobina-hemoglobina, 261-64
  estructura del gen eucariota, 257-59
  mecanismos de mutación, 257-61
  variantes de hemoglobina y, 264-71
Exactitud, replicación, 987-89, 1027-32
Excinucleasas, 1056-**57**
Exocitosis, **763**
Exoglucosidasas, 350-51
Exón(es), **257**
  defectuosos, 1240-41
  en el gen de la hemoglobina, 257-59, 258*f*, 259-61
  eucariotas, 1208-10
  recombinación de, como fuente de la diversidad de anticuerpos, 276-78
3′ Exonucleasa, **1001**
5′ Exonucleasa, **1001,** 1157-58
Expansión clonal, **1075**
Experimento de la replicación de Meselson-Stahl, 986-87, 994-96
Experimento de mercaje de densidad, 986-87, 1108-09
Experimento de Meselson-Weigle, 1067*f*
Experimento de pulso-caza, 497-98, 1107-08, 1108*f*
Explosión respiratoria, **620**
Exportinas, **1212**
Expresión de la información genética, **119**. *Véase también* Transcripción; Traducción
Extensión del cebador, **1158**
Extremo menos, filamento de F-actina, 288
Extremo positivo, filamento de F-actina, 288
Extremos cohesivos, **996**

Factor antihemofílico, (factor VIII), 454-55
Factor Christmas (factor IX), 454-55
Factor de activación de plaquetas, **760**
Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), **963**
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), **962, 963,** 975*f*
Factor de crecimiento epidérmico (EGF), **963**
Factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-I), **963**
Factor de flotación, **167**
Factor de necrosis tumoral, **966,** 1253
Factor de reciclado de ribosomas, 1184-87
Factor de terminación, **1123**
Factor de unión al origen, 1223-25
Factor estimulador de colonias 1 (CSF-1), **963**
Factor Hageman (factor XII), 453
Factor intrínseco, **829**
factor liberador de corticotropina (CRF), **775,** 948
Factor natriurético auricular, 963-64
Factor tisular, 453
Factores acoplantes, **603**
Factores asociados de unión a TATA (TAFs), 1230-31
Factores bacteriocinógenos, **998**
Factores de activación, 1230-31
Factores de actuación en *trans*, 1231-32
Factores de crecimiento, **946,** 961-62
Factores de elongación, 1177-78, **1182,** 1234-36
Factores de iniciación, 1177-78, **1178,** 1231*t*
Factores de la estructura, **137**
Factores de liberación, **947**
Factores de reconocimiento de superficie celular, 31*1f*
Factores de remodelado de la cromatina, **1234**
Factores de replicación, 1013-15, 1221
Factores de resistencia a los fármacos, **998**
Factores de transcripción, 1225
Factores para liberar, 1177-78, **1184**
Factores sexuales, 998
Factores, proteasa, 453, 454*f*
Fagocitosis, 28*f*, 619-20
Fagos temperados, **1066**
Fagos virulentos, **1066**
Fantasmas (membrana), 368-70
  preparación de, 397
Fármaco(s)
  acción del citocromo P450 sobre seleccionados, 616-17
  análogos de nucleótidos como, 921-25
  anemia hemolítica producida por, 576-78
  antibiótico (*véase* Antibióticos)
  antidepresivos, 881-82
  antihistamina, 864-65
  antiinflamatorios, 967*f*
  antiobesidad, 742-43
  antivíricos, 921-23
  barbitúricos, 596-97
  de diseño, 3, 23-24
  fenciclidina (PCP), 883-84
  litio como, 961-62
  opiáceos, 883-84
  psicotrópicos, 880-82
  quimioterápicos, 916-25, 966-67
  sulfa, 822-23
  Viagra, 838-40
Fármacos de diseño, 3, 23-24
Farnesil pirofosfato, **760,** 761*f*, **771,** 772*f*
Farnesil transferasa, **760, 771**
Fase de generación de energía (glucólisis), **503,** 509-16
Fase de inversión de energía (glucólisis), **503,** 505-10
Fe_2S_2, **592**
Fe_4S_4, **592**
Fenciclidina (PCP), 883-84
Fenfluramina, **742**
Fenilacetato, 859*f*
Fenilalanina, 144*f*, 148-50, 850-51, 855*f*, 856-58, 858-59, 859-60
Fenilalanina hidroxilasa, 858-59, 859*f*
Fenilcetonuria (PKU), 859-61, 993-94
Fenilpiruvato, 859*f*
Fenillactato, 859*f*
Fenotipo, **992**
  mutador, 798-99
Fenotipo constitutivo, **1126**

Fenotipo hipermutable, 1020
Fenotipo no inducible, **1126**
Fenotipo silvestre, **993**
Fenotipos mutadores, **911, 1027,** 1062-64
Feofitina, 683-86
Feofitina a (Ph), 676-78
Fermentación, 465-69, **472**
  ácido láctica, 504-05, 514-16
  alcohólica, 517-18
Fermentación a ácido láctico, 504-05, **516**
Fermentación alcohólica, **517**
Feromonas, **946**
Ferredoxina soluble, 680-81
Ferredoxina, 680-81
Ferredoxina-tiorredoxina reductasa, 692
Ferricianuro, 601-02
Ferroprotoporfirina, 215*f*. *Véase también* Hemo
Ferroquelatasa, **871**
FeS, **592**
Fibra A, **302**
Fibra B, **302**
Fibrina, coagulación de la sangre y, 452-54, 453*f*, 454*f*
Fibrinógeno, 452-54
Fibrinopéptidos, 452-54
Fibroína de la seda, 192-95
Fibroína, 192-95
Ficobilinas, 868-69
Ficocianina, 673*f*
Fidelidad, replicación, 987-89, 1027-32
Fijación biológica del nitrógeno, **793**-97
Fijación del nitrógeno, **799**-97
Filamentos finos, actina, **291,** 291-93, 292*f*
Filamentos gruesos, miosina, **291,** 291-93, 293*f*
Filoquinona, 680-81, **780**
Fitanato, 726*f*
Fitoesfingosina, **763**
Fitol, **725,** 726*f*
Flagelina, **306**
Flagelos, **18,** 301*f*
  modelo para el doblado de, 303*f*
  motilidad bacteriana y, 305-06, 306*f*, 308*f*
  sistema de microtúbulos para la motilidad de, 300-04
Flavodoxina, 796-97
Flavonoides, **857**-58
Flavoproteína de transferencia de electrones (ETFP), **720**
Flavoproteinas, **551**
Flujo, **463**
Flujo electrónico cíclico, **683**-86
Flujo electrónico no cíclico, **683**
Fluores, **496**
Fluorescencia, **228**
  análisis de las reacciones catalizadas por enzimas utilizando, 458-59
  principio de la, 228*f*
Fluoroacetato, **556,** 556-57
Fluoroacetil-CoA, 556-57
Fluorocitrato, **556**
5-Fluorodesoxiuridina (FdUrd), **916**
5-Fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), **916,** 917-19
5-Fluorouracilo (FUra), **916,** 922-23
Fluoxetina, **881**
Folato, 821-23, 922-25
Forma A (DNA), **110**-13
Forma B (DNA), 109-13
Forma semiquinona de la coenzima Q, 593-95, 598-99
Formación de hemiacetal, 316
Formación de la caperuza (mRNA), 1235-37
Formación de un aducto, inhibición irreversible por, 431-33, 434*f*
Formaldehído, 312-13
Formas replicativas (RF), **1022**
  RFI, **1022**
  RFII, **1022**
Formas tautómeras, **99,** 317*t*
Formicina B, **923**
N-Formilaminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (FAICAR), 895*f*
Formilglicinamida ribonucleótido (FGAR), 895*f*
Formilglicinamidina ribonucleótido (FGAM), 895*f*
Formilmetenilmetilen-tetrahidrofolato sintetasa, 894-96
N-Formilmetionil-tRNA, 824-25
N-Formilmetionina, 160*f*, 1163-64, 1178-80
N-Formilquinurenina, 616-17
N-Formiltetrahidrofolato, 1178-80
10-Formil-THF, 896*f*
Formimino, **823**
Fosa recubierta, **711,** 712*f*
Fosfatasa, 527-28
Fosfatidilcolina, 359-61, 752-56
Fosfatidiletanolamina, 359-61, 748-49, 751*f*, 752-56
Fosfatidiletanolamina serinatransferasa, **754**
Fosfatidilglicerol, 748-49, 751*f*
Fosfatidilglicerol-3-fosfato, 751*f*
Fosfatidilinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2), 485-86, 958-60, 960*f*, 961-62
Fosfatidilinositol sintasa, **757**
Fosfatidilinositol, 757-59, 758*f*, 759*f*
Fosfatidilserina descarboxilasa, **754**
Fosfatidilserina, **750,** 751*f*
Fosfato translocasa, **613,** 613*f*
3-Fosfo-5-pirofosfomevalonato, 670-71
3′-Fosfoadenosine-5′-fosfosulfato (PAPS), 841-42
5-Fosfo-α-D-ribosil-1-pirofosfato. *Véase* PRPP (5-fosfo-α-D-ribosil-1-pirofosfato)
Fosfocolina, 361-63, 753-54
Fosfodiesterasas, **891, 956**
Fosfoenolpiruvato (PEP), 84, 88, **505,** 512-14, 566-68, 853*f*, 937-40
  conversión del piruvato en, 630-31
  reacción de hidrólisis del, 85*f*
Fosfoenolpiruvato carboxilasa, 566-67
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), 630-31, 636-37, 637-39, 640-41
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa extrahepática, 636-37
Fosfofructoquinasa (PFK), **508,** 508-09, 519-20, 520-22, 563-65, 629-30, 637-39
3-Fosfoglicerato (3PG), 85*f*, 512, 687-88
Fosfoglicerato mutasa, **512**
Fosfoglicerato quinasa, **512,** 687-88
2-Fosfoglicerato, 512, 513-14
Fosfoglicerato, 693, 866-67
Fosfoglicéridos, 358-59. *Véase también* Glicerofosfolípido(s)
Fosfoglicolato, 693, 694*f*
Fosfoglucoisomerasa, **507**
Fosfoglucomutasa, **526**
6-Fosfogluconato, **573**
6-Fosfogluconolactona, 572-73
N-Fosfohistidina, 512
O-Fosfohomoserina, 866-67
Fosfoinosítidos, **758**
Fosfolipasa A, **756,** 757*f*, 961-62, 962-63
Fosfolipasa C, **960**
Fosfolipasa D, 962-63
Fosfolípido(s), **359**. *Véase también* Glicerofosfolípido(s)
  estructura de la membrana y, 359*f*, 368*f*
  síntesis intracelular y transporte de membrana, 748*f*
Fosfolípidos éteres, 759-62
  rutas biosintéticas a, 761*f*
5-Fosfomevalonato, 670-71
Fosfonato, 851-52
N-Fosfonoacetil-L-aspartato (PALA), **904,** 903-04, 904-05
Fosfopanteteína, 730-31
Fosfopentosa epimerasa, **573**
Fosfopentosa isomerasa, **573**
3-Fosfopiruvato, 866-67
Fosfoproteína fosfatasa-1 (PP-1), **646**
Fosforilación, **479,** 512-16, 559-60. *Véase también* Fosforilación oxidativa
  cíclica, 683-86
  de la glucógeno sintasa, 642-46
  inhibición de, 606-07, 612, 613*f*
  modificación covalente por, 450, 480*f*
Fosforilación a nivel de sustrato, **475, 505**
Fosforilación oxidativa, **468,** 599-614
  acoplamiento quimiosmótico como mecanismo de acoplamiento de, 603-08
  cociente P/O y eficacia de, 599-602
  estados respiratorios y control respiratorio en, 610-14
  estructuras de, 604-611
  inhibición de, 606-07, 612
  reacciones de, impulsoras de la síntesis de ATP, 601-03
  sistema de transporte mitocondrial, 612-14
  sisteme enzimático para la síntesis de ATP, 602-04
  visión general de, 587*f*
Fosforilasa, **528,** 531-33
Fosforilasa *b* quinasa, **531,** 533-34
Fosforilasa del almidón, **530**
Fosforilasa fosfatasa, **531**
Fosforólisis, 527-28
5-Fosforribosilamina (PRA), 895*f*
N′-5-Fosforribosil-AMP, 857*f*
N-5-Fosforribosil-antranilato, 855*f*
N′-5-Fosforribosil-ATP, 857*f*
5-Fosforribosil-1-pirofosfato. *Véase* PRPP (5-fosfo-α-D-ribosil-1-pirofosfato)
Fosforribosiltransferasas, 892-93, 913-15
Fosfoserina, 150, 866-67
Fotoexcitación, modos de transferencia energética tras, 674*f*
Fotofosforilación cíclica, **683**
Fotofosforilación no cíclica, **683**
Fotofosforilación, **505,** 668-69. *Véase también* Reacciones oscuras (fotosíntesis)
Fotones, **670,** 671*f*
6-4 fotoproducto, **1054**
Fotoproductos, 1053-57
  definición, **1054**
Fotoquímica en plantas y algas. *Véase* Fotosistema(s)
Fotorreactivación, **1055,** 1055-57
Fotorrecepción, 777-78, 779*f*
Fotorrespiración, **693**-98
Fotosíntesis artificial, 685-88
Fotosíntesis, **469,** 469*f*, 665-99
  cloroplasto, papel de, 668-71 (*véase también* Cloroplastos)
  ejemplos de reacciones fotosintéticas, 668*t*
  fotorrespiración y ciclo C4 como alternativa, 693-98
  procesos básicos de, 666-69
  reacción global y eficacia de, 690-92
  reacciones luminosas, 668*f*, 670-88
  reacciones oscuras, 668*f*, 686-91
  regulación de, 692-93
Fotosistema I (PSI), **676,** 677*f*
  estructura de, 681*f*
  producción de NADPH, 680-81, 681*f*
  reacción global y generación de ATP, 680-83*f*
Fotosistema II (PSII), **676,** 677*f*
  agrupamiento de manganeso en, 679*f*
  desdoblamiento del agua, 676-81
  reacción global y generación de ATP, 680-83*f*
Fotosistema(s), **673**-86
  desdoblamiento del agua, 676-81
  flujo electrónico cíclico y, 682-86
  producción de NADPH, 680-81, 681*f*
  reacción global y generación de ATP, 680-83*f*
Fragmentación de restricción, **1091**-93
Fragmentación tiolítica, **720,** 721-22
Fragmento Klenow, **1002**
Fragmentos C-terminales, 1002-03
Fragmentos de Okazaki, **989,** 1221
Fragmentos Fab, 274*f*, **275,** 441-42
  unión del antígeno por, 275*f*
Fragmentos S1, miosina, **288,** 290*f*
Fragmentos S2, miosina, 288-90
Fru.toquinasa, 526
β-D-Fructofuranos, *322f*
Fructosa, 316, 321-22, 526
Fructosa-1,6-bisfosfatasa, **631,** 637-39
Fructosa-1,6-bisfosfato (FBP), **505,** 508-09, 629-30, 630-32
Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, 508-09, 509-10
Fructosa-1-fosfato (F1P),**526**
Fructosa-2,6-bisfosfatasa, 639-40
Fructosa-2-6-bisfosfate, **521,** 637-39, 638-41
D-Fructosa-6-fosfato, 507-08
α-D-Fructosa-6-fosfato, 508-09
Fructosa-6-fosfato, 82, **507,** 575*f*, 575-76, 576-78, 629-30, 630-32, 648-49
Fructosabisfosfato aldolasa, 690
Fsostigmina, 433-34, 880-81
o-Ftalaldehido, 172
Fucosa, 650-52
α-L-Fucose, 344-45
Fuentes de electrones para la reducción del rNDP, 817-18, 910*t*
Fuerza electromotriz (fem), **587**
Fuerza iónica, macroiones y, **55**-57
Fuerza protónmotriz (fpm), **605**
Fuerza, 32-33
Fuerzas de dispersión, 33*f*-**36**
Fuerzas de van der Waals, 33*f*-36
Fumarasa, **561**
Fumarato hidratasa, **561**
Fumarato, 559-60, 560-61, 815*f*, 861-63, 862*f*

Fumarilacetoacetato, **863**
Función de unión de las proteínas, 237-59
  comportamiento alostérico de la hemoglobina, 253-59
  inmunoglobulinas y versatilidad en, 237-39
  mecanismos de unión del oxígeno por las hemoproteínas, 239-44
  transpore y almacenamiento del oxígeno, 238-40
  transporte del oxígeno por la hemoglobina, 243-54
Furanosa, **317,** 321-22

GABA (Ácido γ-aminobutírico), 840-41, 873-75, 881-82
β-D-Galactopiranosa, 322*f*
Galactoquinasa, **524**
Galactosa, 316, 524, 650-52
  β-D-, 331
  metabolismo de, 524-26
  operón, 1145-46
β-Galactosamina, 326
Galactosemia, **526**
β-Galactosidasa, **1106**
β-Galactósido permeasa, **1125**
Galactosilceramida, 362*f*
Galactosiltransferasa, **650**
Ganciclovir, **921,** 921-22
Ganglιósido GM_1, 766-68
Ganglιósido GM_2 de Tay-Sachs, 362*f*, 766-68
Ganglιósido Tay-Sachs, 362*f*, 765*f*
Gangliósidos, 361-63, 762-63, 766-68
Gases nerviosos, 432-34, 433*t*, 880-81
Gen del retinoblastoma, **971**
Gen *H-ras*, **970**
Gen *src*, 967-68
Gen(es), **7, 118,** *Véase también* Genomas
  amplificación de, 904-05, 1043-44, 1085-88
  causantes de cáncer (*véase* Oncogenes (genes causantes de cáncer))
  clonación, 22-23, 23-24, 121-22, 538-39, 1091-96
  convenios para un denominación, 993-95
  duplicación de funcionales, 1207-10
  duplicaciones y regrupamientos, 259-61 (*véase también* Regrupamientos génicos)
  elementos genéticos transponibles, 1077-84
  en sistemas de bacteriófagos, 1133-35
  estructura de los eucariotas, 257-59
  expresión precoz de, en el fago X, 1135-36
  expresión, 119, 482-83 (*véase también* Síntesis de proteínas; Transcripción; Traducción
  hemoglobina, 257-59, 259*f*
  información genética almacenada en la estructura del DNA, 105
  máquinas (Sintetizadores de DNA), 139
  mutaciones de (*véase* Mutaciones)
  productos, 994-95
  pseudogenes, 1211-12
  secuenciación, con didesoxinucleótidos, 1097-99
  síntesis de proteínas a partir de, 159-63
  talasemias de la hemoglobina, 268-71
  transcripción de los eucariotas, 1225-33, 1233*f*
  variantes múltiples de, 1211
Genes clonados, 22-23, 23-24, **121,** 538-39, 1091-96
Genes estructurales, 1228-33, 1233*f*
Genes eucariotas, 257-59
Genes heterozigotos, hemoglobina, 264, 265*f*
Genes homeóticos, **1253**
Genes homozigotos, hemoglobina, **264,** 265*f*
Genes *polA*, *polB* y *polC*, 993-94, 1003-04
Genes *ras*, 970-71
Genes reprimidos, **1125**
Genes supresores de tumores, **971**
Genética, 6*f*, **7,** 105, 104*f*
  DNA eucariota y desarrollo en, 1251-54
  terminología, 991-95
Genética inversa, **1100**
Genética molecular, 5, 7
Genomas, **992**
  almacenamiento de la información genética y, 118
  cartografiado de, 1091-93
  replicación de los lineales, 1026-29, 1028*f*, 1030*f*
  replicación de RNA vírico, 1031-34
  retrovíricos, 1031-34, 1084*f*
Genomas, eucariotas, 1205-12
  familias génicas en, 1211-12
  intrones de, 1208-10
  secuencias repetitivas en, 1206-10
  tamaño de, 1205-07
Genomas lineales, replicación de, 1026-29, 1028*f*, 1030*f*
Genotipo, **993**
Gentiobiosa, 328-29, 329*f*
Geranil pirofosfato, **771,** 772*f*, 781-82
Giberelinas, **768, 975**
Giro negativo, **116**
Glándulas endocrinas, **945,** 945*f*
Gliceraldehído, 313, 314-15
Gliceraldehído-3-fosfato (G3P), 415-16*f*, **505,** 508-09, 509-10, 511, 514-16, 690
  ruta de las pentosas fosfato y, 573-74, 574-75, 575-76, 576-78
Glicerofosfolípido(s), **359**-61, **747**
  estructura de, 360*f*
  grupos hidrófilos que los distinguen, 360*f*
  metabolismo de (véase Metabolismo de los glicerofosfolípidos)
Glicerol, 85*f*, **356**
  como sustrato gluconeogénico, 629-30, 634-35
  metabolismo, 527-28
Glicerol fosfato deshidrogenasa, **741**
Glicerol fosfato, 359-61, 527-28, 740-41, 741-42, 750*f*
Glicerol quinasa, **527, 741**
Glicerol-1-fosfato (G1P), 85*f*
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, **527**
Gliceroneogénesis, **636**
Glicilalanina, formación de, 151*f*
Glicina betaína, **848**
Glicina, 144*f*, 142-48, 151*f*, 773-75, 823-24, 840-41, 873-75
  metabolismo de, 864-68
  titulación de, 51-53
Glicinamida ribonucleótido (GAR), 895*f*
Glifosato, **852**
Glioxilato, 569-70, 693, 899-901
Glioxisoma, **509, 568**
Globinas, **237.** *Véase también* Hemoglobina; Mioglobina
  evolución de, 261, 262*f*, 262-64
  expresión de los genes humanos de globina en diferentes fases, 262*f*
  papel de, en el transporte y almacenamiento de oxígeno, 237*f*
Glóbulo, en el plegado proteico, 210-11
Glucagón, **484,** 640-41
  acciones de, en el metabolismo de los combustibles, 636-637, 937*t*, 937-40, 938*f*
Glucanos ligados por N, **343**
Glucanos ligados por O, **343,** 344-45
Glucanos, **333**
Glucanos, **343**
(α1,4→α1,4)Glucantransferasa, 529-30, 530*f*
D-Glucitol (sorbitol), 326
Glucocáliz, **346**
Glucocolato, **773**
Glucocorticoides, **775,** 967*f*
Glucoesfingolípidos, 361-63, 762-63
  ejemplos de, 362*f*
  síntesis de, 765*f*
Glucoforinas, **372**
Glucógeno, **333,** 899-901
  almacenamiento de, 332-33, 334*f*, 627
  biosíntesis de, a partir de UDP-glucosa, 640-41, 642*f*
  como depósito de combustible, 297, 932-34
  digestión de, 521-22, 528-30, 529*f*
  funciones de, en el músculo y el hígado, 646-47
  movilización de, 528-31, 642-46*f*
  regulación de la degradación de, 531-36
Glucógeno fosforilasa, 521, **530,** 531-33, 535*f*
Glucógeno sintasa, 640-44
  glucógeno sintasa D, 644-45, 645-46
  glucógeno sintasa I, 644-45
  reacción, 641-43, 642*f*
  regulación de, 642-46
Glucogenólisis, **484,** 531-36
Glucoglicerolípidos, 361-63
Glucolaldehído, **574,** 575-75
Glucolípidos, **345, 362,** 650-52
Glucólisis, 82, 445-46, **465,** 467*f*, 501-39, 563-65
  acción enzimática de la triosa fosfato isomerasa en, 509-10
  anaerobia y aerobia, 501-05
  catabolismo de polisacáridos y, 527-36
  como ruta catabólica y anabólica, 521, 523*f*
  destino metabólico del piruvato y, 514-18
  estrategia de, 504-07
  fase de generación de energía, 509-16
  fase de inversión de energía, 505-10
  hojas de balance energético y electrónico para, 517-18
  otros azúcares y, 523-28
  primeros experimentos sobre, 504-05
  reacciones de, 505-16
  regulación de, 519-23*f*, 637-39
  relación de, con otras rutas, 465-69, 501-04
  relación enzimática de la gluconeogénesis con, 629-32
  rendimientos energéticos, 614-15
  visión general de, 501-07
Glucólisis aeróbica, 501-05. *Véase también* Glucólisis
Glucólisis anaerobia, 502*f*, 501-04, 514-16, 516*f*. *Véase también* Glucólisis
Glucomananos, **336**
Gluconeogénesis, 627-37
  consumo de etanol y, 634-37
  definida, **469, 629**
  estequiometría y balance energético de, 631-32
  fructose-2,6-bisfosfato y regulación de, 638-41
  necesidad fisiológica de, en los animales, 627-30
  papeles de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa extrahepática, 636-37
  regulación de, 636-41
  relación enzimática de la glucólisis con, 629-32
  resúmen, 632*t*
  sustratos para, 631-35
D-δ-Gluconolactona, 325
β-D-Glucopiranosa, 320-21, 322*f*, 325
α-D-Glucopiranosa, 320-21, 332-33, 327-28
Glucoproteina ligadas por N, **651,** 652
Glucoproteínas, **343**-46, 652-59
  enlaces, 344*f*
  ligados por N, 343-45, 652-56
  ligados por O, 309, 581-82
  mitades hidratos de carbono de algunas, 344*t*
  procesamiento y destinos intracelulares de, 654-56
  síntesis de, 650-52
Glucoquinasa, **507**
Glucosa, 311, 312*f*, 316. *Véase también* Concentración sanguínea de glucosa
  α-D-, 505-07
  β-D-, 331
  como fuente de energía primaria para los músculos, 932-33
  conversión de glucosa-6-fosfato en, 631-32
  conversión de, a glucógeno, 640-41, 642*f*
  diabetes y concentraciones de, 941-45
  en el cuerpo humano, 629*f*
  fermentación de, a etanol, 75*f*
  fosforilación de, 445-46
  metabolismo de (*véase* Metabolismo)
  regulación del operón lac por, 1129-33
  ruta de las pentosas fosfato y oxidación de, 472-73, 570-79
  síntesis de (*véase* Gluconeogénesis)
Glucosa-1-fosfato, 690
Glucosa-6-fosfatasa, **531, 631,** 637-39, 934-35
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, **572,** 576-78, 578-79
α-D-Glucosa-6-fosfato, 505-07, 507-08
Glucosa-6-fosfato, 82, 445-46, 507-08, 572-73, 631-32
  conversión de galactosa a, 525*f*
  conversión de; a glucosa, 631-32
β-D-Glucosamina, 326
Glucosamina-6-fosfato, 649*f*
Glucosaminoglucanos, **338**
  estructuras repetidas de, 339*f*
α(l→6)-Glucosidasa, **529**
Glucosidasas, **351**
  utilizadas en la secuenciación de oligosacáridos, 350*t*
O-Glucósido, **327**
α-Glucosil-5-hidroximetilcitosina, 919-20
Glucosiltransferasa, 641-43, 652
Glucosiltransferasa, **920**
Glucosome, **505**
Glucotimina, **618**
Glutamata-piruvato transaminasa sérica (SGPT), 806-08
Glutamato, **149,** 566-68, 648-49, 806-07, 810-11, 835, 864-65, 873-75, 881-82, 883-84
  biosíntesis de ornitina a partir de, 837-40, 839*f*
  destinos metabólicos de, 840-42
  formación de glutamina a partir de, 799-800
  metabolismo intermediario de, 837-42
  síntesis y catabolismo de,798-800, 835-38
Glutamato deshidrogenasa, **568,** 636-37, 798-800, 835
Glutamato monosódico (MSG), 881-82

Glutamato sintasa, 799-800, 835
Glutamato-oxalacetato transaminasa sérica (SGOT), 806-08
Glutamil fosfato, 801-01
Glutamina, 144*f*, **150,** 637-39, 648-49, 835, 836-37, 893-94
  formación de, catalizada por la glutamina sintetasa, 799-803
  síntesis y catabolismo de, 835-38
Glutamina amidotransferasas, **893**
Glutamina sintetasa, 799-803, 836-37
  estructura de, 801*f*
  regulación de, 800-03
Glutamina: fructose-6-fosfato amidotransferasa, **694**
Glutaminasa, **817,** 836-37
Glutarredoxina, **910**
Glutatión, **578,** 578-79, 618-19, 619-20, 840-41, **844**-47
Glutatión peroxidasa, **578,** 619-20
Glutatión reductasa, **578**
Glutatión S-transferasas, **844**
Glyceraldehyde-3-fosfato deshidrogenasa, 370-72, 372, **510**-11*f*, 598-600, 637-39, 688-89, 692
Glycerate-2,3-bisfosfato, 254-55
GMP (guanosina 5′-monofosfato), 98*f*, 838-40, 892-93, 896-98
GMP cíclico (cGMP), 778-79, 956-58, 958-60
Gota, 620-21, 898-902
Gradiente electroquímico, **605**
Gradientes de protones, 584-85, 604-06, 606-08
Gradientes salinos, 168-69
Gramicidina A (antibiótico), 378-79, 1186-87
Grana, 669-70, 682-83, 683*f*
Grasas, 356-58, 701-16. *Véase también* colesterol
  almacenamiento de, 356-57, 357*f*
  biosíntesis de, 740-42
  como depósito de combustible, 932-34, 934-35
  digestión y absorción de, 703-06
  digestión, absorción, almacenamiento y movilización de grasas humanas, 704*f*
  emulsificación de, por las sales biliares, 705*f*
  jabones y detergentes producidos a partir de, 357-58
  movilización de grasas almacenadas, 713-16
  reservas energéticas en, 703-04
  transporte de, a los tejidos, 705-08
Grupo aceptor, 37
Grupo acil fosfato, **511**
Grupo amida en las proteínas, 182, 183*f*
Grupo donador, 37-38
Grupo prostético, **198**
Grupos acilo, activación de, 553
Grupos polares de cabeza, 749-50, 751*f*, 752-53
Grupos sanguíneos ABO, 345*f*
Grupos sanguíneos, humanos, 345-46, 650-52, 652*f*
GTP, 484-85, 630-31
  generación de, a partir del ácido inosínico, 896-98
  reacción de la succinil-CoA sintetasa y, 559-60, 561-62
GTPasa, 955-56, 970-71
GTPasa y, 955-56
  cuartetos, 1223-25
  en el proceso visual, 956-58
  en la transducción de señal, 484-86, 952-60
  estructuras de, 955-56, 858*f*
  molécula gp32, 1012-13
  propiedades de, 957*t*
  subunidades de, 956-60
  traducción y, 1178-80
GTPγS, **956**
Guanina, **98**
Guanina desaminasa, **899**
Guanosina, 98*f*, 891-92
Guanosina difosfato (GDP), 955-56
Guanosina 3′,5′-monofosfato (GMP cíclico o cGMP), 778-79, **956**
Guanosina 5′-monofosfato (GMP), 98*f*, 838-40, 892-93, 896-98
Guanosina 3′,5′-tetrafosfato (ppGpp), **1148**

H (entalpía), 68, **69,** 73-76
H_2-biopterin, 859*f*
H_4-biopterin, 859*f*
Hapteno, 282-83
H-DNA, 127, 128*f*
Helicasas, 987-89, **991,** 1013-16
Hélice 3_{10}, 183, 185*f*
Hélice de reconocimiento, **1140**
Hélice π, 183, 185*f*
Hélices, moleculares, 183-87
  idealizadas, 186*f*
  patrones de enlaces de hidrógeno para, 187*f*
Hemicelulosa, **336**
Hemo, **239,** 868-75
  biosíntesis de, 872*f*
  catabolismo de, 874*f*
  degradación de, en los animales, 871-75
  en los citocromos (véase Citocromo(s))
  estructura de, 240*f*
  lugar de unión del oxígeno sobre, 239-42
Hemofilia, **454**
Hemoglobina, 159, 227
  bisfosfoglicerato y, 254-59
  cambio alostérico en, 247-54
  cambios de la estructura de, durante la oxigenación, 249-51, 250*f*, 251-54
  como ejemplo de evolución proteica, 261-64
  déficit enzimáticos en, 576-79
  efecto Bohr en, 253-55
  efectp de otros ligandos sobre el comportamiento alostérico de, 253-59
  estructura tetramérica de, 240, 244
  lugar de unión del oxígeno y, 239-42
  mioglobina comparada con, 239*f*, 249*f*
  modelos de transición cooperativa de, 247, 248*f*, 249-51, 253*f*
  mutaciones en (*véase* Mutaciones)
  transición T a R en, 252*f*
  transporte del dióxido de carbono y, 254-55
  transporte del oxígeno por, visión general de, 213-14
  unión cooperativa y alosterismo, 243-47, 447-48
  unión del oxígeno y cambios estructurales en, 249-52
  variantes de, 264-71
Hemoglobina drepanocítica, 265-69
  Mutación y enfermedad asociada con, 266-67, 267*f*
Hemoglobina Hammersmith, 265-266*t*
Hemoglobina M, 265, 266*t*
Hemoglobina St. Lukes, 265, 266*t*
Hemolisina, formadora de canal, 378*f*
Hendidura sináptica, **877**
Heparina, **340**
Herbicidas, 852-56
Herramientas de la Bioquímica, 22-23, 23*f*
  análisis por electroforesis en gel de los topoisómeros de DNA, 1039-41
  cartografiado del genoma, 1091-93
  clonación génica, 1091-96
  determinación de huellas para laidentificación de los lugares de unión de proteínas al DNA, 1154-56
  determinación del peso molecular y de las subunidades proteicas, 233-35
  difracción de rayos X, 134-38
  electroforesis y enfoque isoeléctrico, 59-63
  estructuras macromoleculares, cartografiado de las complejas, 1198-1203
  interacciones proteína-proteína, detección y análisis, 537-39
  isótopos radiactivos y contador de centelleo líquido, 493-98
  membranas, técnicas para su estudio, 396-400
  métodos inmunológicos, 282-86*f*
  microscopía, 24-29
  mutagénesis de lugar dirigida, 1101-03
  oligonucleótidos, síntesis química de, 139-40
  proteínas y otras macromoléculas aislamiento y purificación, 165-70
  proteínas, análisis de aminoácidos de, 171-72
  proteínas, determinación de los factores de unión y las secuencias de unión de, 1257-58
  proteínas, determinación de los pesos moleculares y de las subunidades de, 233-35
  puntos de comienzo de la transcripción, cartografiado de, 1157-58
  radioinmunoanálisis (RIA), 980-82
  reacción en cadena de la polimerasa, 1037-40
  reacciones catalizadas por enzimas, medida de las velocidades de, 458-61
  secuenciación de oligosacáridos, 349-51
  secuenciación de proteínas, 172-76*f*
  secuenciación génica con didesoxinucleótidos, 1097-99
  síntesis de polipéptidos, 177-79
  técnica de transferencia Southern, 1099-1103
  técnicas espectroscópicas, 225-32
Heteroalosterismo, **447,** 448*f*
Heterocromatina, 1218
Heteropolímeros, **14, 97**
Heteropolisacáridos, **333**
Heterótrofos, **464**
Hexoquinasa, 445-46, **507,** 629-30, 637-39
  cambios conformacionales inducidos en, 412-13, 413*f*
  estructura de, 200*f*
Hexosas, **316**
  anillos, 320-23
  azúcares, 690
  diastereómeros, 316, 318*f*
  más comunes, 322*f*
Hibridación de colonias, **1094**
Hibridación en placa, **1094**
Hibridación in situ, 1216-17
Hibridación, 1094-95, 1108-10, 1216-17
Hibridomas, **285**
Hidolasas ácidas lisosómicas, 654-56
Hidratación de los productos de hidrlólisis, 86-87
Hidratos de carbono(s), **311**-349
  derivados de monosacáridos, 324-28
  glucoproteínas y, 343-46
  metabolismo (*véase* biosíntesis de los hidratos de carbono; ciclo del ácido cítrico; Glucólisis; Procesos oxidativos en el metabolismo; Ruta de las pentosas fosfato)
  monosacáridos, 312-23
  oligosacáridos, 328-33, 345-48
  polisacáridos, 332-44
  representativos, 312*f*
Hidrogenación, **357**
Hidrolasas, 438-39, 440*t*
Hidrólisis, 84-88
  de ATP
  de ésteres de N-alquilaminoácidos, 428*t*
  de péptidos, 155-56, 417-19, 418*f*
  de polisacáridos, 527-30
  de proteínas, 171
  de tioéstere y otros ésteres, 553*f*
Hidrólisis del ATP, 84, 85*f*, 86*f*, 293-94, 296
  replicación y, 989-91
  transporte ligado a, 380-85
Hidropesia fetal, 268-69
8-Hidroxi-5-desazaflavina, 1055-57
D-3-Hidroxiacil-ACP, 733*f*
3-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, **720**
L-3-Hidroxiacil-CoA, 719-20
β-Hidroxiacil-CoA, 737-38
β-Hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), **727,** 727-28
β-Hidroxibutirato, 727, 727-35
Hidroxicolesterol, 774*f*
Hidroxietil-TPP, **549**
p-Hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, 861
p-Hidroxifenilpiruvato, 855*f*
Hidroxilasa, 616-17, 775-77
δ-Hidroxilisina, 150-51
Hidroximetilcitosina, 919-20
Hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA), 710
3-Hidroxi-metilglutaril-CoA, 670-71
10-Hidroximetil-THF, 823-24
17-Hidroxipregnenolona, 776*f*
17-Hidroxiprogesterona, 776*f*, 775-77
Hidroxiprolina, 838-41
4-Hidroxiproline, 150
Hidroxiurea, **908**
Hidroxocobalamina, **825**
Hielo, transición entre agua y, 73-74
Hierro, estructura del hemo y, 240-41
Hígado, 563-65
  ácidos biliares producidos por, 771-75
  cetogénesis en, 728*f*
  función de los depósitos de glucógeno en, 646-47
  glucosa sanguínea y (*véase* concentraciones sanguíneas de glucosa)
  metabolismo de los combustibles por, 934-37
  reacciones del citocromo P450 en, 617-18
  regulación de la síntesis de ácidos grasos en, 739*f*
  transporte de amoniaco hacia, 816-17
*Hind*III, **1049**
Hipercolesterolemia familiar (FH), **710**
Hiperuricemia, **899**
Hipocromía, 130-31
Hipoglucemia, 634-37, 647-48, 899-901
Hipotálamo, **947**
Hipótesis de la cerradura y la llave, sustrato enzimático, 412-13, 413*f*

Hipótesis del bamboleo, 1162-63
Hipoxantina, 4*f*, **894,** 901-902
Histamina, 863-64, 865*f*, 873-75
Histidina, 143*f*, **149**
  biosíntesis de, 854-55, 857*f*
  catabolismo de, 863-64, 865*f*
  curvas de titulación de, 149*f*
  en el hemo, 240-41, 241-42, 253*f*, 253-54
  marcas, 1095-96
  titulación de resíduos de, por NMR, 231*f*
  toxina de la difteria y, 1244*f*
Histidina descarboxilasa, 732
Histidina distal, 241-42
Histidina proximal, **240**
Histidinol, 857*f*
Histidinol fosfato, 857*f*
Histonas, 47, **1213**-15
  en el remodelado de la cromatina, 1234-35
  propiedades de los principales tipos de, 1214*t*
  síntesis de, 1218-20
Hitos, 1095-96
HIV. *Véase* Virus de inmunodeficiencia humana (HIV)
HMG-CoA liase, **727**
HMG-CoA reductasa, 711-13, **770**
HMG-CoA sintasa, **727**
Hojas de balances electrónicos, 517-18
Hojuelas, membrana, 367-68
Holoenzima DNA polimerasa III, **1006**-08
Holoenzima, DNA polimerasa 125, 1006-08
Homoalosterismo, **447,** 448*f*
Homocisteína, **826,** 826-27, 829-31, 847-48
Homocistinuria, **844,** 845*f*
Homocitrato, 794-96
Homogentisato, 861-63
Homopolímero, **14**
Homopolisacáridos, **333**
Homoserina, **837,** 866-67
Hongos, 336
Hormona(s), **14, 483,** 935-67
  de plantas, 973-78
  esteroideas y tiroideas, 963-67
  mecanismos de acción de, esquema, 945-47, 948*f*
  naturaleza jerárquica del control por, 946-50
  neurohormonas, 883-84
  proteínas G de transducción de señal y, 952-60
  receptor de insulina y actividad proteína quinasa de los receptores, 962-65
  receptores de transducción de señal y, 951-55
  receptores, 1233-34
  regulación de los procesos metabólicos por, 478-79, 482-86
  regulación de, por retroacción, 948-49, 950*f*
  regulación del metabolismo de los combustibles por, 935-45
  síntesis de, 949-50
  sistemas de segundo mensajero y, 958-63
  transducción de señál, oncogenes, cáncer, y, 966-75
Hormona adrenocorticotrofa (ACTH), **775**
Hormona corticotrofa suprarrenal (ACTH), **948**
Hormona estimulante de los melanocitos (MSH), 949-50
Hormona liberadora de corticotropin (CRH), 773-75
Hormona pancreática, **937**
Hormona paratiroidea, **780**
Hormonas esteroideas, 482-83, 946-47
  biosíntesis de, 616-17, 773-75
  dominio de unión en los receptores de, 864-66, 965*f*
  órganos diana de, 964*t*
  receptores intracelulares de, 963-67
Hormonas tiroideas
  órganos diana de, 964*t*
  receptores intracelulares para, 963-67
  síntesis de, 861*f*
Hormonas trópicas, **948**-49
Horquilla de replicación, **987,** 1024-27
Hueco, **990**
Huella, 1114-16, 1116-18, 1155-56
Huellas dactilares, DNA, 1100-01
Hueso
  matriz, 194-95
  vitamina D y, 778-81
Hundimiento electrónico, 817-18
Huso mitótico, 305-06, 1218-20
Hypoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT), **900,** 901-02
Ibuprofeno, **785**-86
Ictericia, **873**-75
Imidazol acetol fosfato, 857*f*
Imidazol glicerol fosfato, 858
Imidazol, 252
Importinas, **1212**
In vitro, 6-7
In vivo, 6-7
Inanición, 940-43
Inanición, aminoácidos, 1146-50
Indol-3-glicerol fosfato, 855*f*
Inducción enzimática, 1106-07
Inducción, **479, 1106**
Inestabilidad de microsatélites, **1064**
Ingeniería molecular de las enzimas, 439-42
Inhibición competitiva de enzimas, 429*f*, 430*f*
Inhibición de enzimas, 428-34
  de la girasa, 1018-19
  de la neurotransmisión, 879-81
  de la traducción,1186-88*f*, 1242-44
  de la transcripción, 1109-11
  de los transportadores electrónicos respiratorios, 596-97
Inhibición irreversible de las enzimas, **429,** 431-34
Inhibición mixta de las enzimas, **432**
Inhibición reversible de las enzimas, **429**-33
Inhibidor basado en el mecanismo, **917**
Inhibidor controlado por el Hemo (HCI), 1242-45
Inhibidor de la fosfoproteína fosfatasa (PI-l), **646**
Inhibidor de la tripsina pancreática de buey (BPTI)
  desnaturalización térmica de, 208*f*
  espectro de RMN, 230*f*, 232*f*
  estructura terciaria de, 199*f*
  interacción de, con la tripsina, 222*f*
  predicción de la estructura secundaria de, 216*f*
  representación de Ramachandran de, 190*f*
Inhibidor pancreático secretor de la tripsina, 452-54
Inhibidores competitivos, **429**-31
Inhibidores enzimáticos irreversibles, **433**-34
Inhibidores metabólicos, 490-91
Inhibidores no competitivos, **431,** 432*f*
Inhibidores respiratorios, 596-97
Inhibidores suicidas, **434**
Iniciación, 986-87
  de la replicación, 1022-27
  de la traducción, 1177-80, 1241-43
  de la traducción, bloqueo, 1192-96
  de la transcripción, 1114-20, 1157-58, 1232-34
Inmunodeficiencia
  adenosina desaminasa y, 1095-96
  catabolismo defectuoso de las purinas y, 901-04
Inmunodifusión, **283**
Inmunoelectroforesis, **283**
Inmunoglobulinas, 12*f*, **238, 269**-79
  células T y respuesta celular, 276-79
  cinco clases de, 273-75
  clase IgG, 274*t*, 275*f*, 343*t*, 344-45, **1075**
  como señales de reconocimiento de la superficie celular, 346-47
  estructura de los anticuerpos, 273-76
  estructura de, 200*f*
  generación de la diversidad de anticuerpos, 275-78, 1074-79
  respuesta inmunitaria y, 269-75
  SIDA, respuesta inmunitaria y, 278-79
  síntesis de, y diversidad de anticuerpos, 1074-79
Inmunohistoquímica, **285**
Inmunoprecipitación, 538-39
Inmunotransferencia, 283-85
Inosina, 1163-64
Inosina monofosfato (IMP), 801*f*
Inosina-5′-monofosfato (IMP), **894**
Inositol 1,4,5-trisfosfato ($InsP_3$), **960,** 961-62
Inositol hexafosfato, **257**
Inserción equivocada, 1030-31
Inserciones, nucleótido, 232
Insulina, **159,** 481-82, 645-46
  acciones de, en el metabolismo de los combustibles, 636-37, 937-40, 939-40
  clonación génica y, 1095-96
  conversión de la preproinsulina en, 163*f*
  diabetes y, 941-45
  estructura de la de bovino, 159*f*
  localización de los enlaces disulfuro en, 175-77, 176*f*
  receptores de, 946-47, 962-63, 963*f*
  secuenciación de la cadena β de, 174*f*
  síntesis de ácidos grasos y papel de, 738-40
Integración, **998**
Integrasa, **1066**
Interacción carga-dipolo, 33*f*, 34-36
Interacciones carga-carga, 32-35, 204-06
Interacciones de dipolo inducido, **35**
Interacciones de van der Waals en el plegado proteico, 204-06
Interacciones débiles. *Véase* Interacciones no covalentes
Interacciones dipolares permanente, 34-**35**
Interacciones dipolo, **34**
Interacciones heterólogas, **218**
Interacciones heterótrofas, **218,** 221-22
Interacciones homotípicas, 217-22
Interacciones isólogas, **220**
Interacciones no covalentes, **31**-60
  carga-carga, 32-35
  covalentes frente a, 31-32*f*
  dipolos permanentes e inducidos, 34-36
  energía de, 37*f*
  enlaces de hidrógeno, 37-40
  equilibrios iónicos, 45-54
  función del agua en los procesos biológicos, 38-46
  interacciones de macriones en disolución, 53-57
  naturaleza y tipos de, 32-40
  radios de van der Waals y, 34-37
Intercalación, 1040
Intercambio de cadena, 1070*f*
Interfase, **1219**
Interferón, **1244,** 1251-52
Interleucina-2, 3, **271**
Intermediario quinonoide, 819*f*
Intermediarios
  aminoácidos relacionados con el ciclo del ácido cítrico, 835-42
  sustitución, en el ciclo del ácido cítrico, 563-69
Intermediarios acil-enzima, 417-19
Intermediarios enediol, 313, 507-08, 572-73, 687-88, 693
Intermediarios hidroperóxidos, 693
Intermediarios oligosacáridos ligados por lípidos, 616-17, 617-18, 654*f*
Intolerancia a la lactosa, **527**-28
Intrones, **257**
  autoescisión del rRNA de, 442-43, 444*f*
  corte y empalme, 1151-52
  en el gen de la hemoglobina, 257-59, 258*f*, 261
  en los genomas eucariotas, 1208-10
Invasión de cadena, **1067**
Ión estearato, 354-55
Ion férrico, 675
Ion litio, **961**
Ion oleato, 354-55
Ion perferrilo, 617-18
Ión sulfonio, **755**
Ion zinc, 437-38, 864-66
Ion(es)
  hidratación de, en disolución, 42*f*
  influencia de los pequeños, sobre las interacciones de los macroiones, 56*f*
  metálicos, en las enzimas, 437-39
Iones hidratados, **43**
Iones metálicos en las enzimas, 437-39
Ionóforos, **378, 607**
Isobutiril-CoA, 726*f*
Isobutirilo, 140
Isocitrato, 545-46, 556-57, 558, 569-70
Isocitrato deshidrogenasa, **557,** 558, 563-65
Isocitrato liase, **570**
Isoenzimas, **517**-18
Isoleucina, 144*f*, **147,** 835, 867-69
Isomerasas, 438-39, 440*t*
Isómero(s)
  conformacional, 321*f*, 323*f*
  de configuración, 320-21, 323*f*
  formas D y L de, 145-48
Isómeros conformacionales, **321**
Isómeros D, 145-46
Isómeros L, 145-46
Isómeros ópticos, **145**
Isoniazida (hidrazida del ácido isonicotínico), **818**
Isopentenil pirofosfato, **770,** 670-71, 772*f*, 781-82
Isoprenoides, 747, **768,** 777-82
Isoprenos, **768**
Isopropil tiogalactósido (IPTG), **1125**

Isoproterenol, 3, 4*f*, **952**
Isótopos
  estables, 494-96, 994-95
  radioisótopos, 493-98
  útiles, en bioquímica, 495*t*
Isótopos estables, 494-96
Isótopos radiactivos, 22-23, 493-98
  contaje de centelleo líquido para su detección, 494-97
  desintegración radiactiva y, 494-96
  isótopos estables y, 494-96
  utilización de, en bioquímica, 493-96, 496-98
Isozimas, 517

Jabones, 357-58
Jefferson, Thomas, 1038-39, 1100-01
Julio, **68**

K_a, 41-42
K_{cat} (número de recambio), **423**

α-Lactalbúmina, **526,** 658-59
Lactamasa, **659**
β-Lactamasa, 997-98
Lactasa, 526
Lactato
  como sustrato gluconeogénico, 629-30, 633-34
  -L, 501-04
  metabolismo de, 511-17, 518-19
Lactato deshidrogenasa (LDH), **504,** 516-18, 633-34, 632
Lactobacillus casei, thimidilato sintasa de, 917-19, 918*f*
β-Lactoglobulina, 53-54, 55*f*
Lactonas, **325, 573**
Lactonasa, **573**
Lactosa, 286*f*, 331, 613-14, 1125-26
  formación de, in vivo, 332*f*
  operón (véase Operón lactosa)
  síntesis de, 526
Lactosa sintasa, 331, **526, 650**
Lamelas de estroma, 669-70, 682-83
Lámina β, 183-87
  en las proteínas globulares, 200*f*, 201
  estructura de, 184*f*
  fibroina, 192, 193*f*, 194-95
Lámina β antiparalela, 186, 188*f*
Lámina β-paralela, 185, 188*f*
Láminas plegadas, 183-87
Lanosterol, 363-64, 771-73
Lanzadera malato/aspartato, 598-99, 600*f*
LDL Oxidada, **713**
Lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT), **709**
Lectinas, 346-47
Lectura de la información. *Véase* Transcripción
Lectura de pruebas
  carencia de, en el VIH, 1033-34
  carencia de, en la RNA replicasas, 1031-32
  carencia de, en la síntesis de DNA por PCR, 1038-40
  en la replicación, 1001-03, 1027-31
  en la traducción, 1170-72, 1180-83
  reparación y, 1053-54
  RNA polimerasas y, 1112-13
Leghemoglobina, **794**
Leptina, **742**
Leucina, 144*f*, **147,** 867-69
Leucocitos, 619-20
Leucotrienos, **781,** 786*f*, 944-45
Levaduras, 504-07
  complejo ácido graso sintasa de, 734*f*
  glucólisis en, 520*f*
  quitina en, 337-38
  secuencias de replicación autónoma (ARSs) de, 1223-25
Ley de Beer, **227**
Ley de Coulomb, 32-33
Ley de la desintegración radiactiva, **495**
Leyes de ka termodinámica. *Véase* Termodinámica
Liases, 438-39, 440*t*
Ligandos, **240**
  control de la actividad enzimática por, 479-81
  efectos de, sobre el comportamiento alostérico de la hemoglobina, 253-59
Ligasas, 122-23, 438-39, 440*t*. *Véase también* DNA ligasa
Lignina, **851**
Línea de caida, **135**
Lineas celulares clonales, **489**
Líneas Z, **291**
Linfocitos B, **270,** 273*f*
Linfocitos T, **270**
Lipasa pancreática, **705**
Lipasa sensible a las hormonas, **715**
Lipido(s), **14,** 353, 28-29
  ácidos grasos, 354-57
  ceras, 357-59
  colesterol, 361-64
  como constituyentes de las membranas biológicas, 358-64, 760-63 (*véase también* Membrana(s))
  esfingolípidos y glucoesfingolípidos, 359-61
  estructura molecular y comportamiento de, 353-59
  glicerofosfolípidos, 358-61
  glucoglicerolípidos, 361-63
  jabones y detergentes, 357-58
  metabolismo de, visión general de, 468*f* (*véase también* Metabolismo lipídico)
  peroxidación de, 618-19
  triacilgliceroles, 356-58
Lipoamida, **550,** 553-55
Lipooxigenasa, **785**
Lipoproteina lipasa, **707,** 707
Lipoproteína(s), 353, **704,** 705-08
  apoproteínas del plasma humano, 706*t*
  clasificación y funciones de, 705-07
  transporte y utilización de, 706-08, 709*f*
Lipoproteínas de densidad baja (LDL), **707,** 707-08, 708-10
  colesterol, aterosclerosis y, 711-14
  papel de, en la captación y metabolismo del colesterol, 712*f*
  receptor para, 710-13
Lipoproteínas de densidad elevada (HDL), **707,** 707-08, 713-14
Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), **707**
Lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL), 705*f*, **707**
Lipoproteínas plasmáticas, 706*f*, 707*f*
Lipotropina, 949-50
Lisine, 144*f*, **149,** 868-69
Lisogenia, **1065,** 1066*f*, 1133-34, 1136-37
Lisolecitina, **756**
Lisosomas, **19,** 809-10
  función anómala en, 655-56
  papel de, en la digestión intracelular, 654-56
  primarios, y degradación proteica, 1248-50, 1250*f*
Lisosomas autófagos, 1248-50
Lisosomas primarios, **1248,** 1250*f*
Lisozimas, **343**
Lovastatina, 711-13
Lugar acoplante (síntesis de ATP), **601,** 602*f*
Lugar activo, **412**
  de la carboxipeptidasa A, 438*f*
  de la timidilato sintasa, 313*f*
  de las serina proteasas, 417*f*
Lugar apirimidínico (AP), **1020, 1058**
Lugar de unión, represor *lac* represor, 1128-31, 1130*f*
Lugar operador, **1116**
Lugar promotor, 1113
Lugar(es)
  de unión del oxígeno, 239-42
  de unión proteica, 1154-56
  represor, 1128-31, 1132*f*
Lugares de actividad, de la ribonucleótido reductasa, **910**
Lugares de pausa, 1234-36
Lugares de unión de proteínas en el DNA, 1154-56
Lugares específicos, **910**
Lugares hipersensibles, 1233-34
Lupus eritematoso, 273-75
Lus
  energía de, 670-73
  espectro de absorción, 673*f*
  fotorrecepción de, 777-78, 779*f*
  pigmentos que absorben, 671-73, 672*f*
  polarización de, 228-29
Luz, 669-70
Luz despolarizada, 228-29
Luz polarizada, 228-29

Macrófagos, 27*f*, **270,** 275*f*
Macroiones, **54**-57
  efecto de los iones pequeños sobre, 55-57
  interacciones electrostáticas entre, 54*f*
  solubilidad de, 53-55
Macromoléculas, 11-15
  aislamiento y purificación, 165-70
  anfipáticas, 43-46
  cartografiado de las estructuras complejas de, 1198-1203
  con grupos ionizantes múltiples, 51-54
  definición, 10
  hidrófilas, 40-43
  hidrófobas, 43
  lípidos y estructura de, 353-59 (*véase también* Lípido(s))
  métodos espectroscópicos para su estudio, 225-32
Malaria, 268, 578-79, 923-25
Malato deshidrogenasa (descarboxilación:NADP+), **567**
Malato deshidrogenasa, **561,** 598-99, 630-31, 636-37
Malato sintasa, **570**
Malato, 560-61, 569-70, 570-71, 630-31, 815*f*
Maleato, 560-61
Malonato, 546-47
Malonil-ACP transacilasa, **731,** 731-32
Malonil-ACP, 731-36
Malonil-CoA, **719,** 728-30, 729-31, 737-38
Maltasa, 528-30
Malteado, 528-30
Maltosa, 311-312*f*, 328*f*, 526
D-Manitol, 326
β-Manopiranosa, 322*f*
Manosa, 316, 526, 660-61
Manosa-6-fosfato, 654-56
MAP quinasa (MAPK), **973**
Mapa de ligamiento, **992**
Mapa físico, **992**
Mapa genético, **992**
Mapas de restricción, 1048-49
Máquinas de replicación, reconstrucción de, 1020-23
Marcadores celulares, los oligosacáridos como, 345-48
Marcadores genéticos seleccionables, **925**-27
Marcadores genéticos, enzimas metabolizadoras de nucleótidos como, 925-27
Marcaje de equilibrio, **497**
Marcaje de pulso, **498**
Marcaje de spín, **762**
Marcajes de afinidad, **434**
Marco de lectura abierto, 1164-65
Margen de atomol, 172
Margen fisiológico de pH, **47**
Materia viva
  carácterísticas de, 14-18
  complejidad de, 4
  elementos químicos de, 8-12
  las células como unidades universales de, 15-21
  tamaños de, 16*f*
  vírus (*véase* Vírus)
Matriz nuclear, **1217**
Matriz, ósea, 194-95
MCPs (proteínas quimiotácticas metilables), **846**
Mecanismo de círculo rodante, **1022**
Mecanismo de corrección de errores. *Véase* Lectura de pruebas; Reparación de mal apareamiento
Mecanismos de unión, 1076-79
Medio dieléctrico, **32**
Medio HAT, **925**
Melanina negra, **861**
Melaninas rojas, **861**
Melaninas, **860**-73, 862*f*
Melanocitos, **861,** 875-76
Melatonina, **875**
Melitina, **784**
Mella, **989**
Membrana bicapa, **358**
Membrana plasmática, 18-19. *Véase también* Membrana(s)
Membrana(s), **14,** 353, 358-96
  anclaje proteico en, 759*f*
  asimetría de, 367-68, 367*f*
  bicapas, **45**
  constituyentes lipídicos de las biológicas, 358-64, 760-63 (*véase también* Lipido(s))
  contenido de proteínas, lípidos e hidratos de carbono de algunas, 369*t*
  difusión facilitada a través, 377-81
  difusión pasiva a través, 375-78
  equilibrio a través, 77-79
  eritrocito, 368-74
  estructura y propiedades de, 363-74
  fluidez de, 365*f*
  fosforilación oxidativa e interna, 605-07

gradientes de protones de, 604-06, 606-08
modelo del mosaico fluido de, 364-65
movimiento en, 364-68
potenciales de acción, 388-92
potenciles de reposo, 386-89
proteínas de, características de, 368-70
técnicas para su estudio, 396-400
termodinámica del transporte, 373-75
transmisión nerviosa, toxinas y, 391-93
transmisión nerviosa, velocidad de, 391-92
transporte a través de, 373-87
transporte activo a través de, 380-87
Membranas bicapa, **45,** 396-97
Membranas biológicas. *Véase* Membrana(s)
Membranas semipermeables, **170**
Membranas sintéticas, movimiento en, 364-66
Membranas tilakoides, 669-70, **673**-74, 674-76, 677*f*, 676-83, 683*f*
Memoria, respuesta inmunitaria, 269-71
Menaquinona, **780**
Mensajes policistrónicos, **1165**
β-Mercaptoetanol, 172, 173-75
β-Mercaptoetilamina, 553-55
β-Mercaptopiruvato, 849-50
6-Mercaptopurina, 3, 4*f*
Meromiosina ligera, **288**
Meromiosina pesada, **289**
Mescalina, **880**
Mestranol, **777,** 777-78
Metabolismo, **5,** 463-94
análisis experimental de, 486-92
bioenergética, 470-79
coordinación y control de, 931-67
de lípidos (*véase* Metabolismo de lípidos)
de nucleótidos (*véase* Metabolismo de nucleótidos)
del nitrógeno (*véase* Metabolismo del nitrógeno)
en los vertebrados (*véase* Metabolismo de los combustibles en los vertebrados)
fotosíntesis en, 596f (*véase también* Fotosíntesis)
hidratos de carbono (*véase* Biosíntesis de hidratos de carbono; Ciclo del ácido cítrico; Glucólisis; Procesos oxidativos del metabolismo; Ruta de las pentosas fosfato)
información (*véase* Metabolismo de la información)
intermediario frente a información, 985-86
mecanismos de control, 478-87
procesos oxidativos en (*véase* Procesos oxidativos en el metabolismo)
rutas de, 464-72
transducción de señal, 966-75
visión general de, 463-65
Metabolismo aerobio, **238**
Metabolismo de la información, **985**-87
metabolismo intermediario frente a, 985-86
reestructuración de la información
replicación (*véase* Replicación)
terminología genética y, 991-95
traducción (*véase* Traducción)
transcripción (*véase* Transcripción)
virus RNA, 1031-34
Metabolismo de las nucleótidos de desoxiuridina, 912-15, 914*f*
Metabolismo de los combustibles en los vertebrados, 931-75. *Véase también* Metabolismo
entradas y salidas de combustibles, 932-34, 933*f*
interdependencia de los órganos de los vertebrados en, 931-37
mecsnismos de la acción hormonal, 944-67
perfiles de los órganos de los vertebrados, 933*t*
regulación hormonal de, 935-45
transducción de señal y, 966-75
Metabolismo de los glicerofosfolípidos, 747-63
biosíntesis en las bacterias, 748-53
en eucariotas, 752-63
rutas de, 749*f*
Metabolismo de los nucleótidos de pirimidina, 902-05
Metabolismo de nucleótido de purina, 902-05
Metabolismo de nucleótidos, 889, 928-29
alteraciones dirigidas por los cirus de, 919-22
biosíntesis y metabolismo de desoxirribonucleótidos, 904-15
degradación de ácidos nucleicos y salvación de nucleótidos, 890-92
degradación de purinas y trastornos del metabolismo de purinas, 898-904
importancia biológica y médica de los análogos de nucleótidos, 921-27
metabolismo de pirimidinas, 902-05
PRPP y, 892-93
purinas, biosíntesis de novo de, 892-98
rutas de biosíntesis de novo y de salvación, 889-90
rutas de, descripción de, 794-97
timidilato sintasa y quimioterapia, 916-20
visión general de, 890*f*
Metabolismo del nitrógeno, 790-887
aminoácidos y metabolitos como neurotransmisores y reguladores biológicos, 873-84
ciclo del nitrógeno y utilización del nitrógeno inorgánico, 790-99
coenzimas en, 817-31
de la porfirina y el hemo, 868-75
de los aminoácidos aromáticos, 850-65
de los aminoácidos que contienen azufre, 841-51
de los aminoácidos relacionados con los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, 835-42
de los productos finales nitrogenados, degradación de los aminoácidos y, 812-17
de serina, glicina, y treonina, 864-68
de valina, leucina, isoleucina, and lisina, 867-69
orgánico e inorgánico, 793*f*
recambio proteico y, 807-13
síntesis y degradación de los aminoácidos y, 803-08
utilización del amoniaco y biogénesis del nitrógeno orgánico, 798-804
Metabolismo energético, **464**
Metabolismo intermediario, **464,** 985-86
Metabolismo lipídico, 468*f*, 701-89
biosíntesis de ácidos grasos, 727-41
biosíntesis de triacilgliceroles, 740-42
de compuestos isoprenoides, 777-82
de eicosanoides, 781-86
de esfingolípidos, 762-68
de esteroides, 766-78
de glicerofosfolípidos, 747-63
obesidad y, 741-43
oxidación de ácidos grasos, 716-28
transporte y utilización de grasas y colesterol, 701-16
Metaestabilidad, **100**
Metafase, 1218-20
Metahemoglobina, 241-42, 578-79
Metaloenzimas, **437**-39
Metarrodopsin II, 778*f*
Metenil, **823**
5,10-Meteniltetrahidrofolato (metenil-THF), 896*f*, 1055-57
Metidiopropil-EDTA-$Fe2^+$, **1156**
Metil fenidilacetato (Ritalina), 881-82
Metilación
de la fosfatidiletanolamina, 754-55
del DNA, 1043-44, 1044-47
trans dependiente de AdoMet, 846*t*
Metilación del DNA, 1044-44
Metilación del DNA, 1044-47
Metilaciones del DNA y, 1044
síntesis de poliaminas y, 847-50
transmetilaciones y, 846*t*, 847-48
N^6-Metiladenina (mA), 1044-47
Metilasa de mantenimiento, **1045,** 1046*f*
5-Metilcitosina (mC), 1044
N^4-Metilcitosina, 1045-47
Metilcobalamina, **826**
N-Metil-D-aspartato (NMDA), 883-84
5,10-Metilentetrahidrofolato deshidrogenasa, **824**
5,10-Metilentetrahidrofolato reductasa, **824**
5,10-Metilentetrahidrofolato, 822-23, 823-24, 896*f*
5,10-Metilen-THF, 823-24, 828, 914*f*, 917-19
Metil-α-D-glucopiranosido, 327-28
O^6-Metilguanina (mG), 1056*f*
Metilmalonil-CoA mutasa, 826-27, 828*f*
Metilmalonil-CoA, 723-24
Metilnitrosourea (MNU), 1055-57
N-Metil-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (MNNG), 1055-57
6-Metilpterina, 821-22
5-Metiltetrahidrofolato, 846-47
Metil-THF, 828, 829-31
5′-Metiltiorribosa-1-fosfato, **849**
Metionina, 144, 159-60, 755-56, 826-27, 828, 835, 847-48
biosíntesis de, 842-44
catabolismo de, 849-51
como fuente de azufre de cisteína, 843-44, 845*f*
como señal de partida, 1163-65
metilación biológica y, 846-48
Metionina sintasa, 828-31
Metmioglobina, **241**
Métodos cromatográficos en columna, 167-69
Métodos de análisis proteico basados en bibliotecas, 538-39
Métodos inmunológicos, 282-86*f*
Metotrexato, **821,** 922-23
Mevalonato, 670-73
Micelas, **44, 356**
Microcurio, **495**
Microchips, DNA, 1101*f*
Microscopía, 24-29
crioelectrónica, 1201-02
de barrido láser confocal, 25-28
de inmunofluorescencia, 285*f*
de tunelización de barrido, y fuerza atómica, 27-29
electrónica de barrido, 25-27
electrónica de transmisión, 24-27
inmunoelectrónica, 1199-1202*f*
luminosa, 24-25
Microscopía confocal de rastreo láser, 25-28
Microscopía crioelectrónica, 1173, 1176*f*, 1201-02
Microscopía de fuerza atómica, **28**
Microscopía de inmunofluorescencia, 285*f*
Microscopía de tunelización de barrido, **28**-29
Microscopía electrónica, 8, 396-97
Microscopía electrónica de barrido (SEM), **27,** 27*f*
Microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM), 25-27
Microscopía inmunoelectrónica, 1199-1202*f*
Microscopio electrónico de transmisión (TEM), **25**-27
Microscopio electrónico, **25**
Microscopio óptico, 24-25
Microscopios lumínicos, 24-25
Microsomas, **490**
Microtúbulos, **287,** 299-306
ensamblaje de, 300*f*
estructura de, 300*f*
mitosis y, 305-06
motilidad de cilios y flagelos y, 300-04
movimiento de la cinesina en, 302-04, 305*f*
transporte intracelular y, 302-05
Microtúbulos cinetocóricos, **305**
Microtúbulos polares, 305-06
Mielina, **392**
Milicurio, **495**
Mineralocorticoides, **775**
Miofibras, **290,** 295-96, 296*f*
Miofibrillas, **291**-93, 292*f*
Mioglobina, 196-98, **237**
aislamiento y purificación, 170*t*
como ejemplo de evolución proteica, 261-64
estructura de, 142*f*
hemoglobina compada con, 239*f*, 249*f*
liberación del oxígeno por, 244*f*
lugar de unión del oxígeno y, 239-42
plegado tridimensional de, 182*f*
secuencias de aminoácidos de la de cachalote y la humana, 156-57, 157*f*
transporte y almacenamiento del oxígeno por, 238-40
unión cooperativa y, 447
unión del oxígeno por, 242-44
Miohemeritrina, 200*f*
Miosina, **287**
cabeceros, 290*f*
estructura de, 288*f*
filamento grueso de, 289*f*
movimiento/fuerza generado por la interacdción de la actina y, 294*f*
muscular, 288-90
no muscular, 297-99
ruptura de, por las proteasas, 289*f*
Miotocondrias acopladas, **612**
Mitocondrias, 7, 18-19
control respiratorio y, 610-14
crestas, 544-46, 584-85, 586*f*, 602-03
diferencias entre en reposo y activas, 611*f*
espectro diferencial de, 596*f*
estructura de, 584-85, 586*f*
linaje humano y DNA de, 1091-93
oxidaciones biológicas en, 583-87
replicación unidireccional del DNA en, 1024-27
sistemas de transporte en la membrana interna de, 612-14

transferencia de transportadores electrónicos dentro de, 598-600
transportadores electrónicos respiratorios en, 587*f*
transporte de ácidos grasos dentro de, 716-19
Mitosis
actina-miosina y movilidad en la citocinesis y, 298-99, 299*f*
en el ciclo celular eucariota, 1211-12, 1213*f*, 1218-20, 1220*f*
microtúbulos y motilidad en, 305-06
Modelo de Holliday de la recombinación homóloga, 1068*f*
Modelo de la catálisis enzimática del ajuste inducido, 412-13
Modelo de la ruta para el plegado proteico, 209
Modelo de operón, **1107,** 1125-29
Modelo de recombinación homóloga de Meselson-Radding, 1068-69
Modelo de tunelización del plegado proteico, 210-11
Modelo del filamento deslizante, 291-96
Modelo del mosaico fluido, **364**
Modelo secuencial para la transición cooperativa de la hemoglobina, 247, 248*f*
Modelos concertados de la transición cooperativa de la hemoglobina, 248*f*, 249-51
Modelos de hoja de trebol, 1165-66, 1167*f*
Modelos multiestado de la transición cooperativa de la hemoglobina, 249-51
Modificación covalente, **450**-55
coagulación de la sangre, 452-55
control de las enzimas por, 479-81, 480*f*
proteasas pancreáticas, 450-54
regulaciónde la síntesis de proteínas por, 1191-94
Modificación covalente, 450-55
restricción y, para el DNA, 1046-52
transporte a través de membranas por, 385-87
Moldes, 985-87
conformación óptima de, 1012-15
DNA como, para la síntesis de RNA, 1106-10
transcripción y, 1105-06
Molécula de DNA recombinante, **1093**
Molécula de tropocolágeno, **194,** 195*f*
Molécula de unión, 1070*f*
Moléculas. *Véase* Macromoleculas
Moléculas adaptadoras, 1159-60
Moléculas anfipáticas, 43-46
Moléculas biológicas, 11-15. *Véase también* Macromoléculas
Moléculas de DNA circular, 113-15, 114*f*, 1006-07
Moléculas dipolares permanente, 29
Moléculas helicoidales, 134-35
Moléculas híbridas DNA-RNA, 109-10, 1108-10
Moléculas hidrófilas, 40-43
Moléculas hidrófobas, 43
Moléculas pigmento antena, 673-74
Moléculas polares, 34-35
Moléculas polarizables, **35**
Molibdeno, 797-98
Molibdopterina, **797**
Momento dipolar permanente, **34**
Momentos dipolares, 29*f*
Monensina, 379-80
Monoamina oxidasa (MAO), **882**
Monocapas, **44, 356**
Monogalactosil diglicérido, 361-63
Monómeros, **12,** 13*f*
Monómeros polimerizados, **12**
Mononucleótido, 889
Mononucleótido de flavina (FMN), **551,** 552*f*
Mononucleótido de nicotinamida (NMN), 1009
Monooxigenasas, 614-15, **616**
Monosacáridos, 311, 312-23
ácidos y lactonas, 325
alditoles, 326
aldosas y cetosas, 313
aminoazúcares, 326-28
cantidades de formas tautómeras de, 317*t*
con más de seis carbonos, 322-23
derivados de, 324-28
diastereómeros, 314-16
enantioómeros, 313-15
ésteres fosfato, 324-25
estructuras de anillo, 316-23
existencia y papeles bioquímicos de, 314-15, 315*t*
glucósidos, 327-28
metabolismo de, 524-26
resíduos comunes, abreviaciones de, 327*t*
Monoterpenos, **781**
Morfina, **884**
Motilidad, 12, 256-77. *Véase también* Movimiento celular, 298-99
proteínas rotatorias en las bacterias, 305-09
sistemas contráctiles actina-miosina, 288-99
sistemas de microtúbulos, 299-305
Motivo estructural hélice-vuelta-hélice, **1132,** 1139, 1142-43, 1228-31
Motores moleculares, 287, 302-04
Movilidad electroforética, 59-60
Movilidad libre, **61**
Movilización del glucógeno, **530**-31, 641-46*f*
Movimiento. *Véase también* Motilidad
en las membranas biológicas, 365-68
en las membranas sintéticas, 364-66
en las moléculas proteicas, 212-13, 214*t*, 214
Movimiento ameboide, 298-99
Movimiento rotatorio (en bacterias), 307-08
Movimientos de volteo (bacteria), 307-08
Mucinas, **345**
Mucopolisacáridos, 337-38
Muestras sombreadas, 26*f*, 25-27
Muestras teñidas negativamente, 26*f*, 25-27
Músculo
acumulación de lactato durante el ejercicio de, 514-17, 633-34
calcio en la contracción de, 293-94, 295-96, 295*f*
ciclo glucosa-alanina y transporte de amoniaco desde, 816-17
energética de la contracción en, 296-97
espectro de RMN del efecto del ejercicio sobre, 488*f*
estriado, estructura de, 288-93
función de los depósitos de glucógeno en, 646-47
metabolismo de los combustibles por, 932-35
modelo del filamento deslizante de la contracción en, 291-96
proteínas actina y miosina en, 288-90
Músculo blanco, 296, 297*t*
Músculo cardíaco, 290-91
Músculo estriado, 288-92
niveles de organización en, 291*f*
rojo y blanco, 296, 297*t*
Músculo loiso, 290-91
Músculo rojo, 296, 297*t*
Mutación por transición GC a AT, **1047**
Mutación somática, **1078**
como fuente de diversidad de anticuerpos, 276-78
Mutaciones, 259, 970-71
análogos de nucleótidos y, 923-25
como sondas bioquímicas, 490-91, 491*t*
como sondas metabólicas, 490-91
de las ribozimas, 445*f*
duplicaciones génicas y regrupamientos como, 259-61
en el sistema del bacteriófago λ, 1133-35
en la proteína hemoglobina, 257-61, 264*f*, 265, 266*t*, 267*f*
fenotipos silvestres y, 993-94
fidelidad de la replicación y, 1027-32
inserciones o pérdidas de nucleótidos como, 259-60
nulas, 901-02
por debajo y por encima del promotor, 1120-21
somáticas, 276-78, 1077-79
supresión de las sin sentido, 1186-87, 1187*f*
sustituciones de bases en el DNA como, 257-60
tipos de, 259*t*
transición, 1045-47
Mutaciones de desplazamiento de marco, **259**
Mutaciones Gibberish, 259-60
Mutaciones homeóticas, **1253**
Mutaciones por debajo del promotor, **1121**
Mutaciones por encima del promotor, **1121**
Mutaciones silenciosas, **993**
Mutaciones sin sentido, **259**
en la hemoglobina, 258-59, 259*f*
supresión de, 1186-87, 1187*f*
Mutaciones virulentas, **1134**
Mutagénesis
análogos de nucleótidos y, 923-25
dirigida, 438-39, 952-55, 1101-03
inducida, 258*t*, 1053-55
Mutagénesis de lugar dirigida, **209,** 952-55, **1102**-03
Mutágenos, 257-59, 258*t*, 970-71
análogos de nucleótidos como, 923-25, 924*f*
luz ultravioleta y, 258*t*, 1053-55
Mutarrotación, **318**
Mutarrotasas, **319**

NAD^+ (dinucleótido de nicotinamida y adenina), **435,** 436, 437-38, 547-48, 556-58, 571-72, 863-64
NADH deshidrogenasa, 591-93, 605-06
NADH, 514-16, 547-48
oxidación de, 436, 584-85, 591-93, 601-02
transferencia de los transportadores de electrones dentro de las mitocondrias y, 598-600
NADH-coenzima Q reductasa, **592**
$NADP^+$ (dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato), 473, 571-72, 680-81, 682-83, 684*f*
NADPH (dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato, reducido), **473**
como agente reductor en el ciclo de Calvin, 688-89
en la síntesis de desoxirribonucleótidos, 908-10
flujo electrónico cíclico y producción de, 683-86
fotosistemas y producción de, 674-76, 680-81, 681*f*
hidroxilación enzimática con participación del citocromo, 617*f*
reacciones de monooxigenasa y, 616-17
ruta de las pentosas fosfato y, 571-73, 573-74, 575-76
síntesis de ácidos grasos y, 739-41
Naturaleza complementaria de las cadenas del DNA, 106-07
Neurohormonas, **883,** 883-84
Neuronas, 386-87. *Véase también* Transmisión nerviosa
adrenérgicas, 880-82
estructura de la motora típica, 387*f*
redes de, 883*f*
sinspsis múltiples en únicas, 883*f*
Neuronas adrenérgicas, **880,** 82
Neuronas dopaminérgicas, **880**
Neurotensina, **883**
Neurotoxinas, **392**-93
Neurotransmisión, 873-84
biosíntesis de serotonina y catecolaminas, 873-76
catecolaminas y neuronas adrenérgicas en, 880-82
excitadoras en inhibidoras, 881-83
inhibición de, 879-81
neurohormonas, 883-84
potencial de acción y, 386-87, 388-92
receptor de acetilcolina nicotínico en, 879-80
receptores y psicofarmacología de, 883-84
sinapsis colinérgica en, 875-78*f*
toxinas que afectan la, 391-93
velocidad de, 391-92
Neurotransmisores, 392-93, **876,** 937-40, **946**
aminoácidos y metabolitos como, 873-84
péptidos que actúan como, 883*t*
receptores de, y psicofarmacología, 883-84
Neutrones, dispersión de ángulo bajo de, 1201-03*f*
Niacina, **435**
Nicotina, **877**
Nigericina, **607**
Nitrato reductasa, **797**
Nitrito reductasa, **797**
Nitrocelulosa, 1099-1100
Nitrogenasa, **795,** 795*f*
Nitrogenasa reductasa, **796,** 795*f*
Nitrógeno. *Véase* Metabolismo del nitrógeno
Nitrógeno, síntesis del orgánico, 798-804
asparagina sintetasa, 803-04
carbamoil fosfato sintetasa, 803-04
glutamato deshidrogenasa, 798-800
glutamina sintetasa, 799-803
Niveles energéticos cuantizados, **226**
Nm-23-antioncogen, 971-73
Nodulos de Ranvier, 391-92
Noradrenalina, 873-75, 875-76, 937-40
Noretinodrel, **777,** 777-78
Novobiocina, 1019
N-terminal (polipéptido), **151**
del mRNA, 1159-61
grupos que pueden bloquearse, en las proteínas, 152*f*
Nucleasa *Bam*HI, 1051*f*
Nucleasa de restricción *Not*I, **1091**
Nucleasa estafilocócica, 439-41
Nucleasas, **100,** 1001-03
Nucleo (celular), **19**
direccionamiento proteico para, 1244-45
estructura de la cromatina de orden superior en, 1216-18

resonancia magnetica nuclear y, 230*t*
Nucleo acumbens, **883**
Nucleoide bacteriano, **1211**
Nucleoides, 1211-12
Nucléolo, 19
Nucleósido(s), **98,** 889
análogos de, 921-22
Nucleósido difosfato quinasa, **477, 897**
Nucleósido fosforilasa, **891**
Nucleósido quinasa, **892**
Nucleósido trifosfato, 100-02, 101*f*, 889
Nucleosomas, **1214**-16*f*
ensamblaje de, 1221-23
partículas centrales, 1215-16, 1215*f*
Nucleotidasas, **891**
Nucleótido(s), **14, 98**
de energía elevada, 476-77
metabolismo (*véase* Metabolismo de nucleótidos)
pérdidas e inserciones en las mutaciones proteicas, 259-60
propiedades de, 98-99
salvamento de, 890-92
secuencia, 103-05
Nucleótidos de adenina, biosíntesis de coenzimas que los utilizan, 802
Número de copias, **993**
Número de ligamiento, **124**
Número de recambio (K_{cat}), **423**

Obesidad, 741-43
Oglucoproteínas ligadas por O, **651**-52
Oligomicina, **603, 606**
Oligonucleótidos, **99,** 139-40
Oligopéptidos cíclicos, **151**
Oligopéptidos, **151**
Oligosacáridos, 311, **328**-33
antígenos de los grupos sanguíneos, 650-52
como marcadores celulares, 345-48
enlace glucosídico de, 331-33
estructuras de, 328-31
ligados a lípidos, 653-54
ligados por N, 652
ligados, 650-52
procesamiento de, sobre las glucoproteínas, 653-56
secuenciación, 349-51
Oligosacariltransferasa, **654**
Oncogenes (genes que producen cáncer), **481, 967**-75
celulares y víricos, 967-69*f*
conversión de proto-oncogenes en, 967-68, 969*f*
en tumores humanos, 970-73
productos de, como elementos de las rutas de transducción de señal, 969*t*
proteína ras en, 759-60, 970-71
señalización celular y, 971-75
Oncogenes celulares, 967-69*f*
como elementos de la ruta de transducción de señal, 969*t*
Oncogenes víricos, 967-69*f*
elementos de la ruta de transducción de señal, 969*t*
Oncoproteínas, **967**
Onda, luz, 670-71
Operón(es), 854-56, **1107**
activación de múltiples, 1140-42
arabinosa, 1145-48
biosintético, 1141-45
galactosa, 1145-46
histidina, 854-56
lactosa
triptófano, 854-56
Operón arabinosa, **1146**
Operón galactose, **1145**
Operón histidina, **854**
Operón lactosa, 1123-50
aislamiento del represor y propiedades, 1128-29
estructura del complejo CAP-DNA, 1132-33
fenotipo, 1134*t*
lugar de unión del represor, 1128-31, 1130*f*
primera prueba del control transcripcional, 1123-33
regulación del represor por la glucosa, 1129-33
regulación en, 1125-29
Operón triptófano, **854,** 1141-45
Operón *trp*, 1141-45
Operones biosintéticos, 1141-45
Opiáceos, 883-84, 949-50
Opsina, **778**
Organismo, estudio del metaboloismo a nivel global, 487-90
Organismos aerobios, **465**
Organismos termófilos, **465**
Organismos ureotélicos, **814**
Órgano(s)
aislado y perfundido, para los estudios metabólicos, 488-90
diana, para las hormonas esteroideas y tiroideas, 864*t*
interdependencia de, en el metabolismo de los combustibles de los vertebrados, 931-37
Órganos perfundidos, **489**
Orgánulos, 18-19
Orígenes de replicación, **987,** 1221-25
Orígenes, replicación, **996**-98, 1023-26, 1221-25
Orina, 636-37
Ornitina carbamoiltransferasa, **814**
Ornitina descarboxilasa, 847-48
Ornitina, 813-14, 814-16, 815*f*, 837-40, 839*f*
Orosomucoide, 350-51
Orotato, 903*f*
Orotidina monofosfato (OMP), 902-04, 903*f*
Ortofosfato, **86,** 87*f*
Oscilaciones de intermediarios glucolíticos, 519-21
Ouabaína, 327-28
Ovotiol, **846**
Oxalacetato, **545,** 546-47, 630-31, 736, 815*f*, 835
ciclo del glioxilato y, 568-69, 570-71
en el ciclo del ácido cítrico, 555-56, 558-61, 565-66, 566-67
reacciones que reponen, 563-68
Oxalosuccinato, **557,** 558
Oxidación, **719**
Oxidación de los ácidos grasos, 716-28
activación y transporte de, al interior de las mitocondrias, 716-19
β-oxidación peroxisómica, 725-26
cetogénesis y, 725-28
control de, 723-26
de los ácidos grasos con cadenas carbonadas con un número impar, 723-24
de los ácidos grasos insaturados, 721-24
primeros experimentos sobre, 716
relación de, con la biosíntesis de ácidos grasos, 729*f*
rendimiento energético a partir de, 720-22
ruta α de, 725-26, 726*f*
ruta β de, 718-21, 723*f*
ruta de oxidación, 717*f*
α-oxidación de los ácidos grasos, 725-26, 726*f*
Oxidación del ácido perfórmico, 173-175
Oxidaciones biológicas, 465-69, 470-73, 583-621. *Véase también* Procesos oxidativos del metabolismo
cambios de energía libre en, 591-92
enfermedades humanas y, 620-21
fosforilación oxidativa, 599-614
generación de energía, 585-92
la mitocondria como lugar de, 583-87
oxidación de ácidos grasos, 716-28
oxígeno como sustrato en las reacciones metabólicas, 614-21
rendimiento energético, 472-73, 613-15
transporte electrónico, 591-600
Oxidante, 585-87
Oxidasas, 614-15
Oxidasas de función mixta, 583-84
Óxido nítrico (NO), **618, 838,** 839*f*
Óxido nítrico sintasa, 616-17, 838-40
Oxidorreductasas, 438-39, 440*t*
Oxihemoglobina, 250*f*, 252*f*, 255*f*
Oxilipina, 781
Oximioglobina, **241**
Oxitetraciclina, 740-41
Oxitocina, **945**
8-oxo-dGTP, 923-25, 1058-60
8-Oxoguanina, **618,** 1053-54, 1058-59, 1060*f*
Oxygen
como sustrato para las acciones metabólicas, 614-21
lugares de unión, 239-42
papel de las globinas en el transporte y almacenamiento de, 238-40
transporte de, por la hemoglobina, 243-54
unión de, por las hemoproteínas, 239-44
Oxygenasas, **544,** 614-17, 693, 694, 695-96

PABA (ácido p-aminobenzoico), **820**
Palmitato, 472-73, 728-30, 748-49
Palmitoil-CoA, 764*f*
Palmitoleato, 748-49
Paradoja de Levinthal, 209
Paratión, 433*t*, 880-81
Pared celular, **19**
bacteriana, 338-44, 656-63
vegetal, 335-37*f*
Parquinsonismo, **880**
Partículas de reconocimiento de la señal (SRPs), 1246-47
Partículas nucleosómicas centrales, 1215-16
Partículas ribonucleoproteicas nucleares pequeñas (snRNPs), 1236-37
Paso limitante de la velocidad, **408**
Patrón de difracción, **135**
Pelagra, 547-49, 863-64
Pelos, **18**
Penicilina, 433*t*, 656-58, 657-58, 658-59, 660*f*, 1186-87
N-Pentano, propiedades del agua líquida frente al, 41*t*
Pentosas, **316**
anillos, 317-21
diastereómeros, 316, 318*f*
Pentóxido de nitrógeno, 75*f*
Pepsina, 452-54
Peptidiltransferasa, 1180-83, 1242-44
Péptido(s), **151**-52
como neurohormonas o neurotransmisores, 883-84
como precursores hormonales, 946-47, 949-50
enlaces de (*véase* Enlace peptídico)
formación de, 151*f*
polipéptidos como polianfolitos, 151-54 (*véase también* Polipéptidos)
Peptidoglucano, **340,** 656-60*f*
Pérdidas, nucleótido, 259-60, 1101-03
Perforina, 277
Permeabilidad selectiva de la membrana, 353
Peroxidación lipídica, **618**
Peroxidasas, **620**
Peróxido de hidrógeno, 404-05, 619-20
Peróxidos, 619-20, 784*f*. *Véase también* Peróxido de hidrógeno
Peroxinitrito, **618**
Peroxisomas, 693, 694*f*, **725,** 759-60
Pesos moleculares, 167
determinación en las proteínas, 233-35
PGH sintasa, **784**
pH
efecto de los cambios en, sobre las proteínas, 152-53
efecto del, sobre la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno, 253-55
en la membrana tilacoide, 681-82
escala y margen fisiológico, 47*f*
estándar, en bioquímica, 587-88
gradiente, 604-05
solubilidad de los macroiones y, 53-55
solubilidad proteica y, 55*f*
Piel, 337-38, 1057-58
Pigmentos
cutáneos, 1057-58
de absorción de luz, 671-73, 673*f*
Pinza deslizante, **991,** 1006-07, 1012-13
Pinzamiento por congelación, **520**
Pinzas, deslizamiento, 989-91, 1006-07, 1012-13
Piranosa, **317,** 321-22
anillos, 322*f*
Piridoxal fosfato (PLP), 806-07, 817-20, 819*f*
Piridoxal, 817-18
Piridoxamina fosfato (PMP), 817-18, 819*f*
Piridoxina, 817-18
Pirimetamina, 822-23
Pirimidina(s), **98,** 889
bases, en el DNA y el RNA, 98*f*, 125, 127
dímeros como fotoproductos del DNA, 1053-57
metabolismo de, 902-05
puntos de control en la síntesis de, 449*f*
reutilización de, 890, 891*f*
síntesis, 803-04
Pirofosfato, 85*f*
5-Pirofosfomevalonato, 670-71
Pirrol, 868-69
Piruvato, 85*f*, 501-04, 513-14, 566-67, 612-14, 835
como cofactor de la descarboxilación de aminoácidos, 818-20
conversión de, a acetil-CoA, 546-47, 553-55
conversión de, a fosfoenolpiruvato, 630-31
destinos metabólicos de, 514-18
oxidación (*véase* Ciclo del ácido cítrico)

Piruvato carboxilasa, **566, 630,** 637-39, 638-39
Piruvato descarboxilasa, **517,** 567*f*, 566-68
Piruvato deshidrogenasa fosfatasa, **563**
Piruvato deshidrogenasa quinasa, **563**
Piruvato quinasa, **513**-16, 519-20, 629-30, 637-39
  control de, 521, 937-40
  estructura de, 200*f*
pK_a, 47-49
Placa, aterosclerótica, 711-13
Placa, bacteriófago, **1047**
Placas ateroscleróticas, **708**
Planta(s)
  almacenamiento de grasa en las semillas de, 703*f*
  biosíntesis de aminoácidos que contienen azufre en, 841-44
  biosíntesis de polisacáridos en, 647-49
  células típica en, 20*f*
  celulosa en la paredes celulares de, 335-36, 337*f*
  ciclo del glioxilato en, 568-71
  como autótrofos, 464-65
  fotoquímica en (*véase* Fotosistema(s))
  fotosíntesis en (*véase* Fotosíntesis)
  hormonas, 973-78
  ingeniería genética de, 1095-96
  plantas C4 frente a C3, 696*f*, 698-99, 699
  utilización de aminoácidos aromáticos en, 856-58
Plantas C3, 695-98
Plantas C4, **695**-98
Plasmalógenos, **761**
Plásmido Ti, **1096**
Plásmidos, **993**
  DNA en, 113-15, 116*f*
  replicación, 997-98, 1024-26
  vectores de clonación, 1093-95
Plasmina, 454-55
Plasminógeno, **454**
Plastocianina (PC), 676-78, 682-83
Plastoquinol, 676-78
Plastoquinona, 676-78, 682-83
Plegado de cadena. *Véase* plegado proteico
Plegado de histona, 1215-16
Plegado de inmunoglobulina, 276-78, 277*f*
Plegado proteico, 196-209
  cinética de la formación de enlaces disulfuro, 211-13
  cinética de, 209-11
  como parte final de la síntesis de proteínas, 1190-93
  conservación evolutiva de, en las globinas, 263*f*
  contribución de la energía libre a, 207*f*
  chaperonas y, 212-13
  enlaces disulfuro y, 207-09
  función y, 196-200
  información para, 202-06
  movimientos dentro de las proteínas globulares y, 212-14
  patrones de, 199-204
  plegado de dinucleótido, 1170-72
  priones y, 214-17
  simulación por ordenador de, 214-18
  termodinámica de, 204-08
Plegado. *Véase* plegado proteico
Pliege del dinucleótido, 1170-72
Poder reductor, 585-89
Polarización circular, **229**
Polarización de fluorescencia, 538-39
Polarización plana, 228-29
Polarización, fluorescencia, 538-39
Poliaminas, síntesis de, **838,** 847-50
Polianfolitos, **53**-54
  enfoque isoeléctrico de, 63*f*
  polipéptidos como, 151-54
Polianiones (policationes), 168-69
Polielectrolitos, **53**
Polilisina, 53-54
Polimerasa central, **1113**
Polimerasa *Taq*, **1038**
Polimerasa(s), **101**. *Véase también* DNA polimerasa(s)
Polímero(s), **12,** 13*f*
Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs), **1100**
Polinucleótido fosforilasa, **1110**
Polinucleótido(s), **14**. *Véase también* Ácidos nucleicos
  direccionalidad e individualidad de, 103
  estructura monocatenaria, 116, 117*f*
  formación de, 101*f*
  hélices de, 112*t*
Polipéptidos, **14,** 13*f*, **151**. *Véase también* Proteína(s)
  cadenas de, en las proteínas globulares, 201, 202*f*
  como polianfolites, 151-54
  conformación estéricamente no permitida de, 189*f*
  descripción de la hélice α y la lámina β de, 183-87
  descubrimiento de la estructura de, 181-83
  espectro de RMN de, 231*f*
  parámetros de las estructura secundarias de, 186*t*
  proteínas como, 156-59
  relación del DNA y el mRNA con las cadenas de, 160*f*
  representaciones de Ramachandran de, 187-90
  rotación alrededor de los enlaces en la cadena de, 183*f*
  síntesis de, 160-61, 161*f*, 177-79
  subunidades proteicas y, 217-22, 233-35
Poliposis adenomatosa familiar (FAP), 971-73
Poliprenoles, **781**
Poliquétidos, **740**
Polirribosomas, **1189**
Polisacárido(s), **14, 311, 328,** 332-44
  almacenamiento de, 332-35
  biosíntesis de, 647-49
  catabolismo de (*véase* Catabolismo de polisacáridos)
  estructurales, 333-36
  glucosaminoglucanos, 337-40
  pared celular bacteriana, 338-44, 656-63
Porfina, 240*f*
Porfiria intermitente aguda, **871**
Porfirina, **240,** 685-86
  estructura de, 240*f*
  metabolismo de, 868-73
Porfirinógeno, 869-70
Porfobilinógeno, 869-70, 872*f*
Poro iónico, 377-79
Poros nucleares, **1212**
Poros proteicos, transporte a través de, 377*f*
Potenciadores, **1231**
Potencial de reducción estándar, **588,** 589*t*, 595*f*
Potencial de reducción, **588**-89
Potenciales de acción, 387, 388-92
  diagrama de, 389*f*
  transmisión de, 391*f*
Potenciales de reposo, **387**-89
Potenciales de transferencia de fosfato, 90
Potenciales de transferencia, 88-90, 473-79
Potenciales eléctricos de membrana, 375
Potenciales químicos, **77**-79
Prealbumina, 200*f*, 221*f*
Preescualeno pirofosfato, **771,** 772*f*
Prefenato, 855*f*
Pregnenolona, 776*f*, **775**
Pre-mRNA, 257-59, 1150*f*, 1235-36
Prenilación, 758-59, 759-60
Preproinsulina, **163, 950**
Prepro-opiomelanocortina, 883-84
Pre-tRNA, 442*f*, 1150-52
Primaquina, 576-78, 578-79
Primasa, 987-89, **989,** 989-91, 1011-12
Primera ley de la termodinámica, **67**
Primosoma, **991,** 1011-12
Prión, 214-17
Problemas de fase, 137-38
Procarboxipeptidasa, 450-52
Procariotas, 15-18. *Véase también* Bacterias
  biosíntesis de fosfolípidos en, 752-53
  estructura del mRNA de, 1164-66
  fotosintetizadores, 669-70, 670*f*
  regulación de la sintesis de proteínas en, 1192-96
  traducción en (*véase* Traducción)
Procesividad, 1012-13
Proceso de desramificación en el metabolismo del glucógeno, 529-30
Proceso de Haber, 794-96
Proceso reversible, **70**
Procesos endergónicos, **73**
Procesos exergónicos, **73**
Procesos irreversiblea, **70**
Procesos oxidativos del metabolismo, 311-13, 465-69, 467*f*, 541-81. *Véase también* Oxidaciones Biológicas; Respiración
  cálculo de los rendimientos energéticos de, 472-73, 613-15
  ciclo del ácido cítrico (*véase* Ciclo del ácido cítrico)
  como fuente de energía, 470-73
  de los resíduos de aminoácidos, 810-11
  oxidación de ácidos grasos, 716-28
  ruta de las pentosas fosfato (*véase* Ruta de las pentosas fosfato)
Procesos, dirección de, 69-71
Procolágeno, 196, 840-41
Procolágeno prolina hidroxilasa, 840-41
Producción de azúcar, reacciones fotosintéticas oscuras, 686-90
Producción pre-estado estacionario, 427-28
Producto iónico del agua, 439-41
  definición, 46-47
Proelastasa, 450-52
Profago, 1072-74
Profase, 1218-20
Profiria eritropoyética congénita, 871-73
Progesterona, 775-77, 864-66
Progestinas, **775**
Proinsulina, **163, 950**
Prolactina, **948**
Prolina, 144*f*, 147-48, 810-11, 835, 838-41
Promotores, **1084**
  eucariotas, 1231-32, 1233*f*
  interacciones con, 1114-16, 1116*f*
  mutaciones en, 1120-21
  reconocimiento de, 1119-23
Promotores tumorales, **961**
Pro-opiomelanocortina, **950**
Propionato como sustrato de la gluconeogénesis, 629-30, 634-35
Propionil-CoA carboxilasa, **724**
Propionil-CoA, 634-35, 723-24, 727*f*
Propranolol, **952**
Prostaglandinas, **713, 781,** 944-45
  acciones biológicas de, 785-86
  biosíntesis y catabolismo de, 783-86
  estructura de, 781-83, 783*f*
Proteasas, **155**. *Véase también* Enzimas proteolíticas
  carboxipeptidasa A, 437-38, 438*f*
  disección de la miosina por, 289*f*
  inhibidores de, 919-20, 921-23
  lugares de recambio proteico y, 809-10
Proteasas pancreáticas, **450**-54
Proteasoma, **810**
Proteína(s), **141**
  aislamiento y purificación, 165-70
  análisis de aminoácidos de, 171-72
  anclaje de, en las membranas, 759*f*
  apoptosis, 1251-52
  asociadas a los microtúbulos (MAPs), 300-01
  como depósito de combustible, 932-34
  como enzimas, 438-40 (*véase también* Enzima(s))
  como polipéptidos de secuencia definida, 156-59
  de membrana, 368-70
  de unión al DNA (*véase* Proteínas de unión al DNA)
  degradación de eucariotas, 1248-52
  detección y análisis de las interacciones entre, 537-39
  determinación de los pesos moleculares y las subunidades de, 233-35
  direccionamiento (*véase* Direccionamiento proteico en eucariotas)
  en la recombinación homóloga, 1068-74
  en la regulación de la degradación del glucógeno, 533-35
  espectro de absorción en el ultravioleta cercano de una típica, 227*f*
  esqueletos, 370-72
  estructura (*véase* Estructura proteica, nivel primario; Estructura proteica, tridimensional)
  evolución (*véase* Evolución proteica)
  fibrosas,
  función en la respuesta inmunitaria (*véase* Inmunoglobulinas)
  G
  globulares
  integrales de membrana, 364-65, 368-72, 372-74
  metilaciones de, 846-48
  modifcación lipídica de, 757-60
  molécula, 11*f*
  multifuncionales, en la síntesis de ácidos grasos, 734-36, 735*f*
  mutaciones de, 257-60
  oxidación de (*véase* Procesos oxidativos en el metabolismo)
  pH y solubilidad de, 55*f*
  plegado (*véase* Plegado proteico)
  recambio (*véase* Recambio proteico)

replicación, 987-89, 1009-21
rotatorias, 305-09
secuenciación, 172-76*f*
síntesis (*véase* Síntesis proteica)
sistemas contractiles actina-miosina, 287-99
traducción del RNA a, 120-22 (*véase también* Traducción)
transportadora del acilo, 730-32
transporte electrónico, 605-07
Proteína p53, 970-71, 1221
Proteína activadora de catabolito (CAP), **1131**
Proteína de anclaje, **1246**
Proteína de canal iónico, 370-74, 377-78
Proteína de la banda, 4, 370-74, 377-78
Proteína de transporte de glucosa, 378-79
Proteína de transporte, 245*f*
Proteína de unión a TATA (TBP), 1228-31
Proteína de unión del elemento de respuesta al cAMP (CREB), 958-60
Proteína desestabilizadora de la hélice, **991,** 1012-13. *Véase también* proteínas de unión al DNA
Proteína férrica, **796**
Proteína molibdeno-hierro, **795**
Proteína periféricas de membrana, **364,** 368-72
Proteína quinasa(s), **481**
proteína quinasa A, 533-34
proteína quinasa C, 961-62
receptores y, 962-65
Proteína quinasa dependiente de cAMP, 639-40, 958-60
Proteína ras, 759-60, 970-71
Proteína Ras y, 971-73, 973*f*
Proteína RecA, 1069-72
Proteína receptora de cAMP (CRP), **1131**
Proteína relacionada con el prión (PrP), 214
Proteína terminal, **1026**
Proteína transportadora del acilo (ACP), **731**-32
Proteína tus, 1026-29
Proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs), **300**
Proteínas cromosómicas no histonas, **1214**
Proteínas de fusión, **440**
Proteínas de intercambio de fosfolípidos, **763**
Proteínas de los filamentos intermedios, **191,** 192*f*
Proteínas de membrana, 368-70
Proteínas de unión al DNA
cadena única, 987-89, 989-91, 1012-15
en la cromatina, 1212-15
estructuras de, 1136-41
factores de transcripción como, 1227
hallazgo de los factores de unión y las secuencias de unión, 1257-58
mantenimiento de la conformación óptima del model con, 1012-15
Proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), **277**
Proteínas fibrosas, 190-98
colágeno, 194 98
composición de aminoácidos de, 191*t*
elastina, 196-98
fibroína, 192-95
flagelina, 305-06
queratinas, 191-93
Proteínas G, **485**
acciones de, 955-56
disociación y reasociación de, 956*f*
Proteínas globulares, 190, 196-98. *Véase también* Estructura proteica, tri-dimensional
cinética de los enlaces disulfuro, 211-13
cinética del plegado, 209-11
chaperonas y, 212-13
enlaces disulfuro y plegado, 207-09
información para el plegado, 202-06
movimientos en, 212-14
patrones de plegado, 199-04
plegado de, ligado a la función, 196-200
priones y, 214-17
termodinámica del plegado, 204-08
Proteínas hierro-azufre, **592**
Proteínas integrales de membrana, **364,** 368-72, 372-74
Proteínas multisubunidades, 217-22
Proteínas rotatorias, 305-09
Proteínas transmembrana, 946-47
Proteínas transportadoras de oxígeno, 238-39
Protofilamentos, **300**
Protón(es)
donasdores y aceptores, 45-46
hidratados, 46-47
liberación de, en disoluciones tamponadas, 87-88
Protones hidratados, 46-47
Proto-oncogenes, **968**
Conversión de, en oncogenes, 967-68, 969*f*
Protoporfirina IX, 239-40, 240*f,* 593-95, 616-17, 872*f*
Protoporfirinógeno IX, 872*f*
Prototrofos, **856**
Protrombina, 453
Provirus, **1083**
Proyección de Fischer, **314**
Proyección de Haworth, 320*f,* **320,** 321-22
Proyecto Genoma Humano, 1091-99
Prozac, **881**
PRPP (5-fosfo-α-D-ribosil-pirofosfato), **854,** 858, **892,** 893-97
PRPP sintetasa, **892**
Prueba de Ames, **854**
Prueba de tolerancia a la glucosa, **488**
Pseudogenes, **1211**-12
Psicofarmacología, 883-84
Pteroilmonoglutamato, **821**
Pteroil-triglutamato, 821-22
Puentes cruzados, miosina y actina, 291-93, 293-94
Puentes salinos, **204**
Puertas de activación, **389**
Puertas de inactivación, **390**
P_{II}-UMP, 801-03
Punto de cruce, **597**
Punto isoeléctrico, **53**
Purina(s), **98,** 889
bases, en el DNA y el RNA, 98*f,* 125, 127
biosíntesis de novo de, 892-98
catabolismo de, a ácido úrico, 899*f*
inhibición del salvamento de, 922-23
precursores de bajo peso molecular de, 893*f*
reutilización de, 890, 891*f*
Purina nucleósido fosforilasa (PNP), **899**
Puromicina, 1188*f*
Putrescina, **838,** 847-48, 848*f*
Pyruvato deshidrogenasa, **547,** 549-52
reacción de, con tiamina pirofosfato, 550*f*
regulación de, 562-65

Quenodesoxicolato, 774*f*
Queratán sulfatos, 337-38, 339*f*
α-Queratina, **191,** 192*f*
β-Queratina, 192*f*
Queratinas del pelo, 191-92,192*f*
Quilomicrones, **705,** 706-07, 708*f*
Química, 8-15
elementos de la materia viva, 8-12
moléculas biológicas, 11-15
Química estructural, 5-7
Quimiotaxia, **307,** 308*f,* **846**
Quimioterapia, 899-901, **916**
análogos de nucleótidos como agentes para, 921-25
para los virus, 920-21, 921-22
RNA antisentido y, 1146-48
timidilato sintasa como enzima objetivo para, 916-20
Quimotripsina, 416-17
activación del quimotripsinógeno a, 450-52
catálisis de la hidrólisis del enlace peptídico por, 417-19, 418*f*
constantes de velocidad para la hidrólisis de dos ésteres de N-acil aminoácido por, 428*t*
estructura de, 417*f*
preferencias de, en la hidrólisis de ésteres metílicos de N-acetil aminoácidos, 423*t*
ruptura del sustrato por, 427-29
Quimotripsinógeno, 454-55, 452*f*
Quinasas dependientes de ciclina, 1220-21
Quinasas y regulación del ciclo celular, 1020-21
Quinona, 683-86
Quinurenina, **863**
Quitina, **332,** 337-38, 647-49

Radiación
cuanto de, 225-26
daño producido por, 620-21
Radiación ultravioleta, 99, 100*f,* 670-73
cáncer producido por, 1057-58
mutagénesis producida por, 258*t,* 1053-55
Radiactividad de fondo, **496**
Radiactividad específica, **496**
Radical hidroxilo, **618**
Radical libre tiilo, **908**-10
Radicales libres, 618-20, 908-10
Radio de van der Waals, 34-**37**
Radioinmunoanálisis (RIA), 944-45, **981,** 82
L-Ramnosa, 660-61
Raquitismo, 547-49, **780**
Rayas eléctricas y anguilas eléctricas, 879-80
Rayos X, difracción de ángulo bajo de, 1201-03*f*
Reacción de carbamación, 254-55
Reacción de cotraducción, **653**
Reacción de la ninhidrina, 171*f*
Reacción de precipitina, **283**
Reacción de segundo orden, **407**-08
Reacción de transferencia de resonancia, 674*f,* 675*f*
Reacción de transferencia electrónica, 674*f*
Reacción del bicarbonato en los eritrocitos, 253
Reacción del bromuro de cianógeno, 156*f*
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), 1037-40, 1257-58
Reacciones "Ping pong", 426-28
Reacciones de Hill, 674-76
Reacciones de oxidación-reducción, 585-92
cambios de energía libre, 588-92
potenciales de reducción estándar, 585-89
Reacciones de primer orden, 404-07
definición, **405**
determinación del orden y de la constante de velocidad de, 406*f*
Reacciones luminosas (fotosíntesis), 668-69, 670-88
en la fotosíntesis bacteriana, 683-85*f,* 686*f*
flujo electrónico cíclico como alternativa, 682-86
fotosíntesis artificial, 685-88
fotosistemss, 675-83
sistemas de recogida de luz, 670-75*f*
Reacciones multisustrato, 426-28
Reacciones oscuras (fotosíntesis), **668,** 686-91
fase de regeneración de, 690-91
fijación del dióxido de carbono y producción de azúcar, 686-90
Reacciones redox. *Véase* reacciones de oxidación-reducción
Reactivos funcionales de entrecruzamiento, 480-81
Reactivos, 283-85
de entrecruzamiento, 537-39, 1200*f*
Recambio proteico, 807-13
apoptosis, 1251-52
características cuantitativas de, 807-08
en el citosol, 1250-52, 1253*f*
importancia biológica de, 808-10
proteasas intracelulares y lugares de, 809-810
semividas y lugares intracelulares de degradación en, 808*t*
señales químicas para, 809-13
sistema lisosómico para, 1248-50, 1250*f*
Recambio, mRNA, 1148-50
Recambio, proteínas, 807-13
Receptor de acetilcolina muscarínico, 877-79, **882**
Receptor de eliminación, **714**
Receptor LDL, **711**-13. *Véase también* Lipoproteínas de baja densidad (LDL)
Receptor(es), **14,** 946-47, 947*f,* 951-55
adenilato ciclasa y, 952-55, 954*f*
adrenérgicos, 880-82
agonistas y antagonistss, 951-53
de acetilcolina muscarínico, 877-79, 881-82
de acetilcolina nicotínico, 879-80
de catecolaminas, 952-53
de escape, 713-14
de insulina y relacionados, con actividad proteína quinasa, 962-65
de LDL, 710-13
estudio especimental de, 951-52
hormonal, 484-85
intracelulares, 963-67
neurotransmisor, y psicofarmacología, 883-84
Receptores adrenérgicos, **952,** 952-55, 954*f*
Receptores de acetilcolina nicotínicos, **877,** 879*f*
Receptores intracelulares, 946-47
Receptores unidos a membranas, 946-47, 948*f*
Recombinación, **1064**-75*f*
características de los tipos de, 1067*t*
clasificación de los procesos en, 1064-67
específica de lugar, 1072-74, 1074*f*
homóloga, 1066-74

modelos de, 1066-69
rotura y unión de cromosomas, 1066-68
Recombinación de exón, 259-61
Recombinación específica de lugar, **1065,** 1072-74, 1074*f*
Recombinación genética, **261.** *Véase también* Recombinación
Recombinación homóloga, **1065,** 1066-74
cromosomas de ruptura y unión, 1066-68
modelo de la acción de RecBCD, lugares Chi, y RecA en, 1071*f*
modelos de, 1066-69
proteínas en, 1068-74
regrupamientos genómicos promovidos por, 1079*f*
Recombinación ilegítima, **1066**
Reconstitución, **490**
Reconstitución mixta, **1112**
Recuperación de fotoblanqueo de fluorescencia, 398-400
Reductor, **587**
Redundancia del código genético, 1160-62
Redundancia terminal, **1026**
Reestructuración de la información, **1043**-91
Regeneración, fotosintética, 690-91
Región teñida homogeneamente (HSR), **1086**
Regiones de unión a la matriz (MARs), 1217-18
Regla de Chargaff, 106-07
Regrupamientos génicos, 1072-85
elementos genéticos transponibles, 1077-84
en la síntesis de inmunoglobulinas, 1074-79
retrovirus, 1083-85
Regulación
de la actividad enzimática, 444-55
de la biosíntesis de colesterol, 771-73
de la biosíntesis de pirimidinas, 902-04, 904*f*
de la degradación del glucógeno, 531-36
de la fotosíntesis, 692-93
de la gluconeogénesis, 636-41
de la oxidación de ácidos grasos, 723-26
de la síntesis de ácidos grasos, 738-41
de la síntesis de glicerofosfolípidos en procariotas, 752-53
de la síntesis procariota de proteínas, 1192-96
de la traducción eucariota, 1242-45
de la transcripción (*véase* Transcripción, regulación de)
del metabolismo de los combustibles, 935-45
del metabolismo, 478-87
hormonal, 946-50 (*véase también* Hormona(s))
por aminoácidos (*véase* Neurotransmisión)
Regulación ácido-base, 636-37
Regulación alostérica, **447**
de la fosfofructoquinasa, 521-22
enzimas y, 445-50, 450*f*
Regulón SOS, 1140-42
Regulones, **1140**-42
Relación superficie/volúmen, 17*f*
Remodelación, cromatina, 1234-35
Reparación acoplada a la transcripción, **1058**
Reparación de malapareamiento, 1045-47, 1061-64
definición, **1031, 1053, 1062**
Mutación de sentido equivocado, 259, 259*f*, 265, 266*t*, 267*f*
Reparación de nucleótidos por excisión, **1053,** 1056-58
Reparación del DNA, 1051-64
amplificación génica, 1085-87
dímeros de pirimidina como fotoproductos del DNA, 1053-57
eliminación de uracilo, 1019-21
excisión de base, 1057-59, 1060f
excisión de nucleótido, 1056-58
mal apareamiento, 1061-64
posterior a la replicación, 1058-62
principales procesos en, resúmen de, 1044f
reagrupamientos génicos, 1072-85
recombinación, 1064-74
reparación directa de la base, 1055-57
restricción y modificación, 1046-52
tipos y consecuencias del daño, 1051-54
Reparación del hueco en la cadena hija, **1060**
Reparación directa, **1053,** 1055-57
Reparación por excisión
de bases, 1057-59, 1061*f*
de nucleótidos, 1056-58
Reparación por excisión de base, **1053,** 1057-59, 1061*f*
Reparación por recombinación, **1053, 1060**-62
Reparación propensa a errores (SOS), **1060,** 1061-62
Reparación SOS (propensa a errores), **1060,** 1061-62
Repeticiones directas, **1023,** 1081*f*
Repeticiones invertidas, **1023**
Repeticiones terminales largas (LTRs), **1083**
Replicación, 985-87, 986-1032
alivio de las fuerzas de torsión, 1016-20
conformación óptima del molde, 1012-15
de los genomas lineales, 1026-29, 1028*f*, 1030*f*
de los genomas RNA, 1031-34
desenrollamiento del DNA, 1013-16
discontínua, 1009-11
DNA polimerasas, papel de, 1000-09
eliminación de uracilo, 1019-21
eucariota, 999-1000
fidelidad de, 987-89, 1027-32
iniciación de, 1022-27
modelos de, 108*f*, 109*f*
origen y dirección de, 995-98
primeros conocimientos de, 994-1000
procesividad, pinzas, y cargadores de pinzas, 1012-13
proteínas, 1009-21
reconstrucción de las máquinas de replicación, 1020-23
reparación del DNA tras, 1058-62
replicones como unidades de, 997-1000
secuencial, 995-96
semiconservativa, 107-10, 110*f*, 994-96
síntesis de las cadenas conductoras de RNA, 1011-12
tasas, 999*t*
terminología genética relacionada con, 991-95
visión general de, 118, 986-93
Replicación bidireccional, **996**
Replicación conservativa, **109**
Replicación discontínua, 987-89, 988-89
Replicación dispersiva, **109**
Replicación ordenada, 987-89, 995-96
Replicación secuencial, 995-96, 997*f*, 987-89
replicación semiconservativa, **109**-10, 110*f*, **986**-89, 994-96
Replicación, cromatina, 1220-24*f*
ensamblaje de los nucleosomas, 1221-23
orígines de replicación y, 1221-25
replicación del DNA y, 1220-21
telómeros y, 1223-24*f*
Replicasas, **1032**
Replicones, 997-1000
definición, **999**
Replisomas, 1020-21
Representación de Eadie-Hofstee, **426**
Representación de Ferguson, **61,** 62*f*
Representación de hidrofobicidad, 369*f*, 368-70
Representación de Hill, **246,** 247*f*
Representación de Lineweaver-Burk, **425**
Representación doble invesrsa, **425**
Representaciones de Ramachandran, **188**-90
Represión, **479**
Represor cI, 1133-34
configuration *cis*, 154, 210-11
estructura de, 1136-41
interacciones entre el represor Cro y, 1135-38
operadores de, 1134-36
Represor cro, 1133-34
estructura de, 1138-41
interacciones entre el represor cI y, 1135-38
Represor lac, 1128-33
aislamiento y propiedades, 1128-29
estructura del complejo CAP-DNA, 1132-33
lugar de unión, 1128-31, 1130*f*
mRNA del, 1163-66
regulación de, por la glucosa, 1129-33
Represores, **1126**
activados por el ligando, 1141-45
cI, 1134-36
estructura de Cro y cI, 1136-41
interacciones entre Cro y cI, 1135-38
mRNA, 1106-08
operón lactosa (*véase* represor lac)
Represores activados por el ligando, 1141-45
Repulsión electrostática, 87
Reraso electroforético, 1257-58
Resfriado, 955-56
Residuo de aminoácido, **151,** 810-13
Residuo de aminoácido N-terminal, 725-26, 810-13
fragmentos terminales, 1002-03
Residuo de tirosina adenilado, 801-03
Residuo, **14,** 13*f*
Residuos de aminoácidos conservados en la familia de la globina, 262-63
Residuos hidrófilos en las proteínas globulares, 201*f*
Residuos hidrófobos en las proteínas globulares, 201*f*
Resina aniónica, 168-69
Resinas de intercambio iónico, 168-69
Resolución (microscopio), 24-25
Resolvasa, **1079**
Resonancia de espín electrónico (ESR), **397**
Resonancia de plasmón superficial, 538-39
Resonancia magnética nuclear (RMN), 8-9, **230**-32
estudios de células completas y órganos utilizando, 487-90
multidimensional, 230-32
nucleos utilizados con mas frecuencia en, 230*t*
principio de, 230*f*
unidimensional, 229-31
Respiración, 312*f*, **465,** 465-69, 504-05, 583-84. *Véase también* Ciclo del ácido cítrico; Procesos oxidativos en el metabolismo
síntesis de ATP y, 610-14
tres fases de, 541-46
Respuesta estructa, **1148**-50
Respuesta inflamatoria, supresión de, 967
Respuesta inmunitaria celular, **270**
Respuesta inmunitaria humoral, 270-78
Respuesta inmunitaria, **270, 1134**
antígenos O, 659-63
celular, 269-71, 276-79
humoral, 269-78
inmunoglobulinas y, 269-75
memoria de, 269-71
proteínas de, 318*f*
SIDA y, 278-79
supresión de, 967*f*
teoría de la selección clonal de, 271-72, 272*f*
Respuesta SOS, **1060**
Restricción y modificación inducidas por el hospedador, **1047,** 1048*f*
Restricción y modificación
biología de, 1046-49
cartografiado del genoma y, 1091-93
clonación de genes y, 1091-96
lugares, 1051*t*
propiedades de la enzimas implicadas en, 1048-52
Retardación en gel, **1257**
Retículo endoplásmico rugoso, **1245**
procesamiento de los oligosacáridos en, 653-54, 654-56, 655*f*
síntesis proteica en, 1244-45
Retículo endoplásmico, **18**
síntesis de proteínas en el rugoso, 1244-48
Retículo sarcoplásmico, **296**
trans-Retinal, **778,** 778*f*, 779*f*
11-*cis*-Retinal, **778,** 779*f*
Retinoides, **947**
Retorcimiento (molécula de DNA), **124**
Retorcimiento positico, **116**
Retroinhibición acumulativa, 801-03
Retroseguimiento en la transcripción, 1118-20
Retrotransposón, **1085**
Retrovirus, **968, 1031**-34
regrupamientos génicos y, 1083-85
replicación del genoma, 1031-34
Reversión, **993**
Reversión de segundo lugar, **993**
Ribitol, **551**
Riboflavina, **551**
α-Ribofuranosa, 320*f*, 320-21
β-Ribofuranosa, 320*f*, 320-21
Ribofuranose, 317, 317-19
Ribonucleasa
D, **1150**
desnaturalización térmica de, 202-04, 203*f*
H, **1002**
P, 441-42, 442*f*, **1150**
titulación de los resíduos de histidina en, 231*f*
Ribonucleósido difosfato (rNDP), 909*f*, 1109-10
Ribonucleósido trifosfato (rNTP), 904-05, 988-89, 1115-20
Ribonucleótido(s), 889
constante de ionización de, 99*t*
espectro ultravioleta de, 100*f*
incorporación de, en la transcripción, 1115-20
reducción de, a desoxirribonucleótidos, 904-12
Ribonucleótido de 5-aminoimidazol (AIR), 895*f*
Ribonucleótido de 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR), 857*f*, **893,** 895*f*

Ribonucleótido reductasa (rNDP reductasa), **905,** 906, 907*f*, 908, 909*f*, 910-12
Ribosa, **96**
Ribosa-1-fosfato, 891-92
Ribosa-5-fosfato, 571-72, 572-73, 573-74, 575-76, 892-93
Ribosoma(s), **18, 120,** 1159-60, 1170-78
  detección de la emergencia de la cadena polipeptídica en, utilizando anticuerpos, 1199-1201*f*
  ensamblaje de, in vitro, 1173-78
  estructura interna de, 1173-76, 1175*f*, 1176*f*
  eucariota, 1241-42
Ribozimas, **442**
α-D-Ribulosa, 316, 320-21
Ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP), **688,** 693, 694*f*
Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa, **688,** 692, 693-97. *Véase también* Rubisco
Ribulosa-5-fosfato quinasa, 690-91, 692
Ribulosa-5-fosfato, **573,** 573-74
Rifampicina, **1110,** 1186-87
Riñones, 636-37
Ritalina, **881**
RMN multidimensional, 230-32
RMN unidimensional, 229-31
RNA. *Véase* Ácido ribonucleico (RNA)
RNA antisentido, **1146**
  control de la replicación por, 1024-26
  control de la transcripción por, 1146-48
  iniciación de la traducción bloqueada por, 1194-96
RNA de transferencia (tRNA), **117**
  acoplamiento de, a los aminoácidoss, 1168-72
  bucle del anticodón en, 160-61
  como moléculas adaptadoras, 1159-60
  estructura de, 116, 117*f*, 126*f*, 1165-69, 1169*f*
  procesamiento posterior a la transcripción de, 1148-52
  propiedades de los naturales, 119*t*
  ruptura de los pre-tRNA, 442*f*
RNA guías, 1240-41
RNA mensajero (mRNA), **120**
  código genético como tripletes de, 159-60
  demostración de, 1107-09
  dirección del procesamiento, 1159-61
  estructura de los procariotas, 1164-66
  predicción de la existencia de, 1106-08
  procesamiento eucariota de, 1235-41
  propiedades de los naturales, 119*t*
  recambio de, 1148-50
  regulación de la síntesis de proteínas procariotas y, 1192-96
  relación del DNA y las cadenas polipeptídicas con, 160*f*
RNA mensajero policistrónico, **1126**
RNA nuclear pequeño (snRNA), 1236-37
RNA polimerasa dirigida por el DNA, **1110**
RNA polimerasa, 120, 287, 1109-14
  DNA polimerasas frente a, 1110-13
  en la transcripción eucariota, 1224-33, 1233*f*
  Estructura de, 1003, 1112-14
  papel biológico de, 1109-13
  RNA polimerasa I, 1225-27
  RNA polimerasa II, 1228-33, 1233*f*
  RNA polimerasa III, 1228*f*, 1227-31
RNA ribosómico (rRNA) en eucariotas, 1225-27
  auto-excisión por, 442-43, 444*f*
  procesado posterior a la traducción de, 1148-52
  subunidades ribosómicas y, 1170-78
RNA vírico (vRNA), 119*t*
rNDP reductasa, **905,** 906, 907*f*, 908, 909*f*, 910-12
Rodanasa, **849**
Rodopsina, **778,** 779*f*, **956**
Rotenona, **596**
Rotura exonucleolítica, 890
Rotura fosforolíticas, 527-28
Rotura proteolítica, 450-54
Roturas hidrolíticas, 527-30
RU486, **966**
Rubisco, **688**. *Véase también* Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilasa
Ruptura homolítica, **827**
Ruta(s), **463**. *Véase también* Rutas centrales del metabolismo
Ruta de Embden-Meyerhof, **505**. *Véase también* Glucólisis
Ruta de las pentosas fosfato, **473, 571**-79
  a medida, para necesidades específicas, 575-78
  alternativa, 577*f*
  estrategia global, 571*f*
  fase no oxidativa, 572-78
  fase oxidativa, 571-73
  síntesis de ácidos grasos y, 739-41
  tratornos genéticos humanos que implican, 576-79
Ruta del ácido D-aminoadípico, **868**
Ruta del ácido diaminopimélico, **868**
Ruta del ácido sikímico, 850-56, 855*f*, 856*f*
Ruta extrínseca, **454**
Ruta gluconeogénica, 629-30, 630*f*, 633*f*
Ruta intrínseca, **454**
Ruta succinato-glicina, 868-73
Rutas anapleróticas, **565**
Rutas centrales del metabolismo, **464**-72
  dentro de la célula ecucariota, 482*f*
  distintas, para la biosínntesis y la degradación, 469-72
  relación de la glucólisis con, 465-69
Rutas de novo, **890**
  a los nucleótidos de timina, 913*f*
  biosíntesis de nucleótidos de purina en, 889-90, 892-98
  biosíntesis del anillo de pirimidina en, 902-04, 903*f*
  degradación de ácidos nucleicos y, 890-92
  papel del metabolito PRPP en, 892-93
Rutas de salvamento, 753-54, **890**
  a la síntesis de desoxirribonucleótidos, 913-15
  a los nucleótidos de timina, 913*f*
  papel del metaboliso PRPP en, 892-93
  salvamento de purinas y análogos de nucleótidos, 922-23
  síntesis de fosfolípidos por, 753-54
  síntesis de pirimidinas por, 889-90, 904-05
rutas variantes hacia los antibióticos, 740-41

Sacáridos, **14, 311**. *Véase también* Hidratos de Carbono
Sacarosa, 328*f*, 526, 648-49
Sacarosa dextrano, **648**
Sacarosa fosforilasa, **527**
Sales biliares, **704,** 705*f*, **773**
Salmonella typhimurium, 659-60, 661*f*, 1045-47
Salting in, **56**
Salting out, **56**
Sangre
  factor activador de plaquetas, **760**
  factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), **962, 963,** 975*f*
  lipoproteínas plasmáticas, 706*t*, 706*f*
  metabolismo de los combustibles y, 935-37
Saponificación, **357**
Sarcómero, **291,** 291-93, 292*f*
Sarín, 432-34, 433*t*, 880-81
Saxitoxina, 392-93
Scrapie, 214
Secretina, **944**
Secuencia de inserción (IS), **1080**-81, 1081*t*
Secuencia origen ori^C, 1023-26
Secuenciación
  de DNA, 118, 1157-58
  de genes, 1097-99
  de oligosacáridos, 349-51
  de proteínas, 172-76*f*
Secuenciación de Sanger, 1097-99
Secuenciación del DNA de Maxam-Gilbert, 118, 1157-58
Secuenciación en fase gaseosa, 175-77
Secuenciador de pulso líquido en fase sólida, 175-77
Secuenciadores, 173-75
Secuencias
  de consenso, 1119-20, 1238*t*, 1257-58
  de Shine-Dalgarno, 1164-66, 1178-80
  determinación (*véase* Secuenciación)
Secuencias anapleróticas en el ciclo del ácido cítrico, 563-69, 630-31
  enzimas málicas, 566-68
  para reponer el oxalacetato, 565-68
  reacciones que implican a los aminoácidos, 566-69
Secuencias autónomas de replicación (ARSs), 1223-25
Secuencias de consenso, **1119,** 1238*t*, 1257-58
Secuencias de Shine-Dalgarno, 1164-66, 1178-80
Secuencias líder, **163,** 1011-12, 1191-93
Secuencias PEST, **810,** 810-11
Secuencias señal, **1192,** 1246-47
Secuencias señales de reconocimiento, 1076-77
Secuencias Stalling, 1143-45
Sedimentación, 1108*f*
α-Sedoheptulopiranosa, 322-23
Sedoheptulosa, 322-23
Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, 691*f*, 692
Sedoheptulosa-7-fosfato, **574,** 575*f*
Segunda ley de la termodinámica, **15, 72**
  en sistemas abiertos, 72-77
  entropía y, 70-71, 72
Segundos mensajeros, **484,** 945-47, 958-63
  AMP cíclico y calcio como, 958-60
  inositol trisfosfato como, 961-62
  óxido nítrico como, 838-40
  sistema fosfoinosítido de, 960*f*, 962*t*
Selenocisteína, 619-20, 1162-63
γ-Semialdehído glutámico, **838,** 838-40, 840-41
Semicélulas, **587**
Semillas, almacenamiento de grasa en, 703*f*
Semiquinona, **552,** 552*f*, 593-95
Semivida, **405, 495**
Sensación de quorum, 837-38
Señales ambientales, 1140-42
Señalización celular, oncogenes y, 971-75. *Véase también* transducción de señal
Señalización transmembrana, **759**
Serina, 144*f*, 147-48, 416-17, 764*f*, 810-11, 823-24, 841-42, 864-68
Serina proteasas, 416-20
  lugares activos de, 417*f*
  ruptura del sustrato por, 427-29
Serina transhidroximetilasa, **823,** 894-96
Serina-treonina deshidratase, **866,** 867*f*
Serotonina, **742, 875**-76, 880-81, 881-82
Sesquiterpenos, **781**
SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), **271**
  pruebas para, 1100-01
  respuesta inmunitaria y, 278-79
  tratamiento del, 915, 919-20, 921-23
Sikimato deshidrogenasa, 852-53
D-Sikimato, 853*f*
Simetría diédrica, **220**
Simetría helicoidal de las proteínas, **218,** 220*f*
Simetría punto-grupo, 219*f*, 218-20, 220-21
Simporte, **385,** 612-14
Simulación por ordenador del plegado proteico, 214-18
Sinapsis adrenérgicas, **880**
Sinapsis colinérgica, **876**-78*f*, 879-81
Sinapsis eléctricas, **883**
Sinapsis, 881-82, 882*f*
  colinérgica, 875-79, 878*f*
Sincronización, **911**
Síndrome de Bloom, 1015-16
Síndrome de Cockayne, **1058**
Síndrome de disfunción respiratoria, **756**
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida. *Véase* SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida)
Síndrome de inmunodeficiencia severa combinada, 901-02
Síndrome de Lesch-Nyhan, 563-65
Síndrome de Li-Fraumeni, 1220-21
Síndrome de Werner, 1015-16
Síndrome de Wernicke-Korsakoff, **579**
Síndrome de Zellweger, **760**
Sintasa-fosforilasa quinasa (SPK), **644**
Síntesis de desplazamiento de cadena, 1001-02, 1068-69
Síntesis proteica, 120, 159-63
  acoplamiento de los aminoácidos a los tRNA, 1168-72
  código genético y, 159-61
  en el citoplasma, 1244-47
  en eucariotas, 1244-48*f*, 1249*f*
  modificación covalente en, 1191-94
  papel del complejo de Golgi en, 1247-48*f*, 1249*f*
  plegado en (*véase* Plegado proteico)
  procesamiento posterior a la traducción, 161-63
  regulación de, en los procariotas, 1192-96
  sobre el retículo endoplásmico rugoso, 1244-48
  traducción del mRNA en, 160-61, 161*f*
Sintetizadores de DNA, **139**
Sirohemo, **797**
Sistema, **65**
  energía y abiertos, 65
  energía y estado de, 65-67
Sistema aislado, 65
Sistema cerrado, 65
Sistema contráctil actina-miosina, 287, 288-99
  actina y miosina no muscular, 297-99
  actina, miosina, y, 288-90
  calcio y contracción, 295-96, 296*f*
  energética y aportes energéticos, 296-97
  estructura muscular, 288-93

modelo de la contracción del filamento deslizante, 291-95*f*
Sistema de cotransporte sodio-glucosa, **384,** 384*f*
Sistema de ruptura de glicina, **823**
Sistema fosfotransferasa, **385**
Sistema lactosa permeasa, 385
Sistema sin células, estudios metabólicos de, 490-91
Sistemas abiertos, 65
energía libre y, 72-77
Sistemas de control positivo, 1128-29, 1129-33
Sistemas de cotransporte, 382-85
Sistemas fosfoinosítido, **485, 959,** 960*f,* 961-62
Sistemas lanzadera, metabólicos, 598-600
SNARES, 1247-48, 1249*f*
Solubilidad
Aislamiento y purificación de proteínas utilizando, 165-67
de macroiones, 53-55
Solución neutra, 46-47
Soluciones amortiguadoras, 50-53
Corrientes, utilizadas en, estudios bioquímicos, 51*t*
liberación de protones en, 87-88
Somatostatina, **883, 937**
Sondas metabólicas, 490-92
Sondas, metabólicas, 490-92
Sorbitol, 326
Spín, **229**
Staphylococcus aureus
pared celular de, 341*f*
síntesis de la molécula de peptidoglucano de, 656-58
Subtilisina, 439-41
Subunidad miristilada, **955**
Subunidad prenilada, **955**
Succinato, 546-47, 559-60, 569-70, 601-02, 840-41
Succinato deshidrogenasa, **560,** 592-93
Succinato-coenzima Q reductasa, **592**
Succinil-CoA sintetasa, **559**
Succinil-CoA, **546,** 558, 559-60, 634-35, 723-24
O-Succinilhomoserina, **843**-44
N-Succinylo-5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (SAICAR), 895*f*
Sulfamidas, 1186-87
Sulfanilamida, **822**
Sulfito reductasa, **842**
Superóxido, **618**
Superóxido dismutasa (SOD), **619,** 620-21
Supresión, **993**
Supresión intergénica, **1186**
Supresores de desplazamiento de marco, **1186**
Surco de ruptura, **298**
Surfactante pulmonar, 755-57
Sustancias proquirales, 436, **558**
Sustitución isomorfa, **137**
Sustrato(s), **403**
activado, 987-89
DNA como, 1043-44
DNA, para las reacciones de la, 1001-02
enzima, 403-04, 412-13, 413*f,* 422*f,* 426-29, 430*f,* 445-46
oxígeno como, 614-21
para la gluconeogénesis, 631-35
suicida, 556-57
Sustrato suicida, **557**
Sustratos activados, 987-89. *Véase también* Sustrato(s)

Talasemia, **268**-71
Tallo sináptico, **877**
Tamaño
celular, 15-18, 16*f,* 18*f*
del genoma eucariota, 1205-07
Tamoxifeno, **966**
Taurina, **773**
Taurocolato, **773,** 774*f*
Tautomerización, 87
Tautómeros, **99, 313**
Taxia, **307**
Técnica de fractura por congelación, 25-27, **396**
Técnica de gradiente de sacarosa, **167,** 1107-08
Técnica de transferencia Northern, **1099,** 1109-10
Técnica de transferencia Southern, 976-78, 984
Técnicas espectroscópicas, **225**-32
dicroismo circular, 227-30
espectroscopía de absorción, 225-28
fluorescencia, 227-28
resonancia magnética nuclear, 229-32
Tejido adiposo
como depósito de combustible, 356-58, 932-34, 934-35
metabolismo de los combustibles y, 934-35
Tejido conjuntivo, glucosaminoglucanos en, 337-40
Tejido nervioso, regulación de la gluconeogénesis y función adecuada de, 636-37
Telofase, 1218-20
Telomerasa, **1027,** 1223-24*f*
Telómeros, **1223**-24*f*
Temperatura
desnaturalización proteica y, 202-04, 208*f*
efecto de, sobre el DNA y los polinucleótidos, 130-31
transición, 365-66
Temperatura de transición, 365-66
Tempocolina, 398-400
Tensión superficial del agua, 39-41
Teñido con colorante, 1216
Teoría de la selección clonal, **271**
Teorías instructivas, **271**
Terminación
de la replicación, 986-87
de la traducción, 1184-87, 1242-44
de la transcripción, 1122-25, 1123-24
Terminación dependiente del factor, 1122-25
Terminación independiente del factor, 1122-23, 1124*f*
Término preexponencial, 409-10
Termodinámica, **65**
del ATP, 474-76
del plegado de las proteínas globulares, 204-08
del transporte a través de membranas, 373-75
primera ley de, 66-68
segunda ley de, en los sistemas abiertos, 72-77
segunda ley de, y entropía, 72
Terpenos, **768,** 779-81, 782*t*
Testosterona, 776*f*
Tetraciclina, 116*f*
1-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato, 961-62
Tetrahidrobiopterina, 838-40, **859**
5,6,7,8-tetrahidrofolato (THF), **821,** 823*f,* 894-96
Tetrametil-*p*-fenilen diamina (TMPD), 602-03
Tetrapéptido, 152*f,* 153*f*
Tetrapirroles, 868-73
Tetraterpenos, **781**
Tetrodotoxina, 391-92
3′-Tiacitidina (3TC), **922**
Tiahemiacetal, **511**-12
Tiamina, 547-49, 578-79
Tiamina pirofosfato (TPP), **517, 547,** 547-52, 573-74, 578-79
Tierra
atmósfera de, y fotosíntesis, 665-68
composición de, 10*f*
Tilakoides, **670**-71, 671-74, 682*f*
Timidilato sintasa, 825, **912**
como enzima diana para la quimioterapia, 916-20
orientación del sustrato y la coenzima en el lugar activo de, 919*f*
relación entre las enzimas de tetrahidrofolato y, 914*f*
Timidina, 4*f,* 496-98, 798-99, 913-15
Timidina monofosfato (dTMP), 911-12, 914*f*
Timidina quinasa (TK), 913-15
Timidina quinasa citosólica (TKI), 915
Timina, **98**
estructura de, 97*f*
reparación, 1057-62
Timina desoxirribonucleótidos, 911-13, 914*f*
Timitaq, 917-19, 919-20
Tioesterasa (TE), 741*f*
Tioésteres, 553*f,* 553-55
Tiogalactósido transacetilasa, **1125**
6-Tioguanina, **925**
Tiolasa, **720**
Tiorredoxina reductasa, **910**
Tiorredoxina, 692, **842, 909,** 910*t*
Tiroglobulina, **861**
Tirosina, 13*f,* 144*f,* 148-50, 850-51, 855*f,* 859*f,* 876*f*
biosíntesis de, 858-61
catabolismo de, a fumarato y acetoacetato, 862*f*
fluorescencia y espectro de emisión de, 229*f*
radical libre sobre tirosina, 137-38, 908*f*
resíduo de tirosina adenililado, 801-03
rutas biosintétivas a las melaninas desde, 862*f*
utilización y catabolismo, 860-63, 862*f*
Tirosina aminotransferasa, **861**
Tirosina hidroxilasa, 961-62
Tirosinasa, 861-63
Tiroxina, **861**
Titulación automática, 458-59
Titulación
análisis de las reacciones catalizadas por enzimas utilizando titulación automática, 458-59
de ácidos débiles, 48-51
α-Tocoferol (vitamina E), 619-20, **780**
Todo-*trans*-retinal, 778*f*
Topoisomerasas, **116,** 115*f,* 987-89, **992,** 1016-20
acciones de las tipo I y tipo II, 1016-19
análisis por electroforesis en gel del DNA, 1039-41
de *E. coli*, 1018-20
Topoisómeros de DNA, 116, 115*f,* 1039-41
Topoisómeros, **116,** 1039-41
N-tosil-L-fenilalaninaclorometil cetone (TPCK), 432-34, 433*t*
Toxina de la difteria, 1242-44
Toxinas
bloqueo de la neurotransmisión por, 391-93
glucósidos como, 327-28
que afectan a la traducción eucariota, 1242-44
que afectan a las enzimas, 431-34, 555-57
que afectan a las proteínas G, 955-56
que afectan a los transportadores electrónicos respiratorios, 596-97
que afectan al RNA, 1110-11
sustancias cancerígenas, 616-17
veneno de cobra, 756-57
Trabajo, **66**
intercambio de calor y, 68*f*
útil, 75-77
Traducción, **120,** 985-87, 1159-99
código genético y, 1160-65
control de, 1242-45
del mRNA a proteína, 160-61, 162*f*
elongación, 1178-86, 1242-44
estructura del mRNA, 1164-66
estructura del tRNA, 1165-69
eucariota, 1241-45
eucariota, frente a procariota, 1211-12, 1241-44
formación de los tRNA aminoacilados, 1168-72
inhibdores de, 1242-44
inhibición de los antibióticos de la, 1186-88*f*
iniciación, 1177-80, 1241-43
mecanismos de, 1177-87
plegado de la cadena proteica y modificación covalente, 1190-94
principios básicos de, 121*f*
procesamiento de las proteínas tras, 161-63
regulación de la síntesis proteica en los procariotas, 1192-96
ribosomas, 1170-78
supresión de las mutaciones, 1186-87, 1187-89
terminación, 1184-87, 1242-44
velocidades y energética de, 1188-91
visión general de, 120-22
Tranportadores de proteínas, 584-85
Transaldolasas, **573,** 575*f,* 690-91
Transaminación, **567,** 804-08, 819*f*
Transaminasas, **23, 806**
Transcarboxilasa, **730**
transconfiguración, 154-56, 210-11
Transcetolasas, **573,** 578-79, 690
Transcripción, **119,** 985-87, 1105-06, 1154-55
cartografiado de los puntos de comienzo de, 1157-58
DNA como molde para la síntesis de RNA, 1106-10
efecto de las hormonas esteroideas sobre, 482-85
eucariota (véase Transcripción, eucariota)
identificación de los lugares de unión de las proteínas, 1154-56
iniciación y elongación, 1115-20
iniciación, 1114-16, 1117*f*
mecanismo de, 1114-25
principio básico de, 119*f*
procesamiento posterior a la transcripción, 1148-52
reconocimiento del promoter, 1119-23
RNA polimerasa, papel en la síntesis del RNA, 1109-14
técnica de huellas y, 1114-16, 1116-18, 1154-56
terminación, 1122-25
velocidades de, 1188-89
visión general de, 119-20
Transcripción, eucariota, 1224-36
de los genes estructurales, 1228-33, 1233*f*
de los pequeños genes de RNA, 1228*f,* 1227-31

de los principales genes de RNA ribosómico, 1225-27
elongación, 1234-36
factores de iniciación, 1231*t*
iniciación, 1232-34
operón *trp*, 1141-42
remodelado de la cromatina, 1234-35
selectiva, 120
terminación, 1235-36
Transcripción, regulación de, 1123-50
bacteriófagos, 1132-38
complejos proteicos y, 1105*f*
operón arabinosa, 1145-48
operón galactosa, 1145-46
operón lactosa, 1123-33
regulón SOS, 1140-42
represores activados por el ligando y atenuación, 1141-45
represores Cro and cI, 1136-41
repuesta estricta, 1146-50
RNA antisenitido, 1146-48
Transcriptasa inversa, **968, 1032**
Transducción, **1065**
Transducción de señal, 431. *Véase también* Neurotransmisión
en plantas, 973-78
hormonas esteroideas y tiroideas como receptores intracelulares, 963-67
oncogenes, cáncer, y, 966-75
proteínas G en, 952-60
receptor de insulina y receptores con actividad proteína quinasa, 962-65
receptores, 951-55
sistemas de segundos mensajeros en, 484-86, 958-63
Transductina, **778, 956**
Transductor (transducción de señal), **484**
Transductores de energía, **287-88**
Transfecto, 970-71
Transferasas, 438-39
Transferencia de ion hidruro, **436**
Transferencia del peptidilo, **1182**
Transferencia sin radiación, **228**
Transferencia Southern y, 1099-1103
Transferencia Western, **284,** 284*f,* 1199-1200
Transformación oncogénica, 1084
Transformilasa, **894,** 1178-80
Transhidrogenasa, **592**
Transiciones cooperativas, **130**
en la hemoglobina, 243-47, 447-48
Translocación, **1182**-83, 1191-93
Translocasa, **648**
Transmetilaciones, **846**-48
Transmisión nerviosa, 391-93. *Véase también* Neuronas; Transducción de señal
a lo largo de la sinapsis colinérgica, 875-79, 878*f*
toxinas y, 391-93
velocidad de, 391-92
Transpeptidación, **658**
Transpeptidasa, inhibición de, 658-59, 660*f*
Transportador de acetilcolina, **877**
Transportador de glucosa, 640-41, **935**
Transportadores electrónicos. *Véase* Cadena de transporte electrónico
Transportadores electrónicos respiratorios, 593-99
determinación de la secuencia de, 593-99
potenciales de reducción estándar de, 533*f*
transferencia, a las mitocondrias, 593-600
Transporte
ácidos grasos a las mitocondrias, 716-19
colesterol, 707-14
de amoniaco al hígado, 816-17
de grasa a los tejidos, 705-08
dióxido de carbono, 254-55
electrónico, 465-69
lipoproteínas, 706-08
oxígeno, 243-54
sistemas mitocondriales de, 612-14
Transporte a lo largo de membranas, 77-79, 373-87
activo, 380-87
de fosfolípidos, 760-63
difusión facilitada, 377-81
difusión pasiva, 375-78
termodinámica de, 373-75
Transporte activo, 375, **380**-87
bombas iónicas, 380-85
por modificación, 385-87
sistemas de cotransporte, 382-85
Transporte electrónico, **468**
Transporte facilitado (difusión facilitada), 377-81
distinción de los tipos de, 379-81
facilitado por poros, 377-80
facilitado por un transportador, 379-80
Transporte facilitado por un poro, 377-80
Transporte facilitado por un transportador, 377*f,* 379-80
Transporte intracelular.
glucoproteinas y, 654-56
microtúbulos, 302-05
receptores de homonas tiroideas y esteroideas y, 963-67
Transporte pasivo (difusión pasiva), 375-78, 380*f*
Transposasa, **1079**
Transposición replicativa, **1083**
Transposición simple, **1083**
Transposición, **1065,** 1066-67
simple frente a replicativa, 1080-84
Transposón compuesto, **1080**
Transposones, 1080-83, 1081*f*
Transversión, **1047**
Traqueas, **238**
Traslación de mella, **989**
Traslación, de mella, 989-91
Trazadores, radiactivos, **494**
α,α-Trealosa, 328*f*
Treonina aldolasa, **867**
Treonina, 144*f,* **148,** 810-11, 835, 864-68
Treose, 315-16
Triacilglicerol lipasa, **715**
Triacilglicerol(es), **357**-58, 634-35, 701-03, 703-04, 704*f,* 707-08. *Véase también* Grasas
biosíntesis de, 740-42
como depósitos de combustible, 932-34, 934-35
Triestearina, estructura de, 356*f*
Trifluorocarbonilcianuro fenilhidrazona (FCCP), **606**
Trifosfatos, 100-02
Triglicéridos. *Véase* Triacilgliceroles
11,3,18,21-Trihidroxiprogesterona, 776*f*
3,7,12-Trihidroxiprostanoato, 774*f*
Trimetilisina, 846-47
Trimetoprima, **822, 924**
Triosa fosfato isomerasa (TPI), 415-16, **509,** 690
estructura de, 415*f*
Triosa fosfato, 508-10
Triosas, **313**
Triple hélices (DNA), 126-28*f*
Triplete del anticodón, 1165-66
Tripsina, interacción de BPTI con, 222*f*
Tripsinógeno, 450-52
Triptófano, 144*f,* 148-50, 172, 614-15, 616-17, 850-51, 854-56, 855*f,* 858-59, 873-75
metabolismo de, 861-64
regulación de la transcripción y, 1141-45
Triptófano 2,3-dioxigenasa, 614-15, 616-17, 861-63
Triptófano oxigenasa, 614-15, 861-63
Triptófano sintasa, **854,** 856*f,* 1091-93
Triterpenos, **781**
Tritio, **495**
Tritón X-100, 112-13, 357-58
Triyodotironina, **861**
Trombina, coagulación de la sangre y, 452-54, 453, 454*f*
Tromboxano sintasa, 616-17, 783-84, 784-85
Tromboxanos, **713, 781,** 783*f,* 785-86, 944-45
Tronco aceptor, 1165-67
Tropinas, **948**
Tropomiosina, **295,** 1240-41
Troponinas I, C, y T, **295**
Tuberculosis, 817-18
Tubocurarina, 880-81
Tubulina, **287, 299,** 300*f*
Túbulos transversos, **296**
Tumores, oncogenes en los humanos, 970-73
Tunicados, 336
Tunicamicina, 653-54

Ubiquinona, 592-93
Ubiquitina, **810,** 811*f,* 1251-52
Ubiquitinación, 809-11
UDP-, 684, 1145-46
UDP-galactosa, 765-66, 1145-46
UDP-galactosa-4-epimerasa, 437*f,* **525,** 526*f*
UDP-Glc pirofosforilasa, **525,** 640-42*f*
UDP-glucosa pirofosforilasa, **641**-42*f*
UDP-glucose (uridina difosfato glucosa), 524, 525-26, 640-44, 647-48, 765-66
UDP-glucuronato, **873**
UDP-*N*-acetilgalactosamina, 650*f,* 765-66
UDP-*N*-acetilglucosamina, 648-49, 650*f,* 656-58
UDP-*N*-acetilmuramilpentapéptido, 656-58, 657-58
Ultracentrífuga analítica, **168**
Ultrafiltración, **170**
Ultramicrotomo, **25**
UMP (uridina 5′-monofosfato), 98*f*
UMP sintasa, **904**
Undecaprenol fosfato, **658**
Unidad Svedberg, **167**
Unión aleatória del sustrato, 426-27
Unión cooperativa, 243-47, 447-48, 1012-13, 1134-35
Unión de Holliday, **1067**-69, 1069*f,* 1071-74
Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), Comisión de Enzimas, 438-39, 439-40
Unión no productora, **431**
Unión ordenada de los sustratos, 426-27
Universo, composición de, 10*f*
Uracilo, **98,** 904-05
eliminación de, en la replicación, 912-13, 1019-21
estructura de, 97*f*
Uracilo-DNA-glucosilasa, **1020**-21
Urea, 5-7, 233-34, **814,** 815*f,* 816*f,* 899-901
β-Ureidopropionato, 891-92
Uridilil transferasa, **803**
Uridina difosfato galactosa, **524**
Uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa), **524,** 640-44, 647-48
Uridina monofosfato (UMP), 903*f*
Uridina 5′-monofosfato (UMP), 98*f*
Uridina trifosfato, 902-04
Uridina, 98*f,* 904-05
Urocanato, 864-65
Uroporfirinógeno I sintasa, **871**
Uroporfirinógeno I, **871**
Uroporfirinógeno III cosintasa, **871**
Uroporfirinógeno III, **871,** 872*f*
Utilización de nitrato, 797-99

cis-Vacenato, 748-49
Vacuola, **19**
Vacuolas fagocíticas, 1248-50
Vaina de mielina, 765-66
Valina, 141, 143*f,* 144*f,* **147,** 867-69
Valinomicina, 379*f,* 606-07, 1186-87
Vampiros, 871-73
Vancomicina, 657-58
Variantes. *Véase* Variantes de hemoglobina
Variantes de hemoglobina, 264-71
efectos patológicos de, 265-69
herencia de, 264 65
talasemias de, 268-71
Vector de clonación pBR322, 1094-96
Vectores, **1094**-96
Vectores de expresión, **1095**
Velocidad (V), **405**
de la transmisión nerviosa, 391-92
Velocidad de reacción, **405**-13, 419-29
análisis de los datos, 426-27
de las reacciones con varios sustratos, 426-28
de las reacciones de varios pasos, 421-24
de las reacciones simples, 419-22
de reacciones complejas, 427-29
estados de transición y, 407-08
función del catalizador y, 409-13
medida, 458-61
orden de reacción y, 404-08
parámetros, 423-26
Velocidad máxima (Vmax), 421-22
Velocidades
de replicación, 999*t*
de traducción, 1188-91
Veratridina, 392-93
Vertebrados. *Véase* Metabolismo de los combustibles en los vertebrados
Vesícula biliar, 771-73
Vesículas (membrana), **368**
asimetría en, 367-68
preparación de, 396-97
Vesículas autófagas, 1248-50
Vesículas bicapa, **45**
Vesículas sinápticas, **877**
Viagra, 838-40
Viriones, **1032**

Virus, 21, 22*f*
alteraciones del metabolismo de los nucleótidos por, 919-22
elementos de la ruta de transducción de señal, 969*t*
función celular y, 19-23
interferones antivíricos, 1244-45
oncogenes, 967-69*f*
quimioterapia para, 920-21, 921-23
RNA, 917-19 (*véase también* Retrovirus)
Virus colaborador, **1084**
Virus de cadenas negativas, **1032**
Virus de inmunodeficiencia humano (VIH), 147, 269-71, 915
modelo de, 278*f*
retrovirus y, 1031-32
SIDA y, 278-79
transcriptasa inversa del, 1032-34
tratamiento de, 915, 919-20, 921-23
Virus del mosaico del tabaco, 200*f*
Virus del sarcoma de Rous, **967,** 1083-85
Virus Herpes, 920-21
Virus RNA, 1031-34
Viscosidad del agua, 39-41
Visión
proteínas G y, 956-58
vitaminas y, 777-79
Vitalismo, **7**
Vitamina(s), **548**
A, 619-20, 777-79
B_{12}, 825-31
B_6, 817-18
C, **195,** 618-19, 619-20, 840-41
coenzimas y relacionadas, 435*t* (*véase también* Coenzima(s))
D, 778-81
E, 618-19, 619-20, 779-81
K, 779-81
liposolubles, 777-81
riboflavina (B_2), 549-52
tiamina (B_1), 547-52
Vitaminas liposolubles, 777-81
vRNA (RNA vírico), 119*t*
Writhe (molécula de DNA), **124**

Xantina oxidasa, **899**
Xantina, 896-97
Xantosina monofosfato (XMP), **896**
Xenobióticos, **617, 844**
Xeroderma pigmentosum (XP), **1058**
Xilanos, **336**
Xilulosa, 316
Xilulosa-5-fosfato, 573-74, 575-76, 1145-46

5-yododesoxiuridina, **921,** 921-22

Z-DNA, 110-11, 112*t,* **125**-26*f*
Zeatina, 975-77
Zimógenos, **451**
coagulación de la sangre y activación de, 452-55
ruptura proteolítica y activación de, 451*f*
Zona H, **291,** 291-93, 292*f*
Zwitterion, 51-53

AMINOÁCIDOS

Nombre	Símbolo		Palabras del código genético					
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAU				
Ácido glutánico	Glu	E	GAA	GAG				
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU				
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU				
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU				
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG				
Glicina	Gly	G	GCA	GGC	GGG	GGU		
Histidina	His	H	CAC	CAU				
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
Leucina	Leu	L	CUA	CUC	CUG	CUU	UUA	UUG
Lisina	Lys	K	AAA	AAG				
Metionina	Met	M	AUG					
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Triptófano	Trp	W	UGG					
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU				
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		

CÓDIGO GENÉTICO (mRNA)

Primera posición	Segunda posición: U	Segunda posición: C	Segunda posición: A	Segunda posición: G	Tercera posición
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
	UUA Leu	UCA Ser	UAA Parada	UGA Parada	A
	UUG Leu	UCG Ser	UAG Parada	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
	AUG Met/inicio	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

ALGUNOS PREFIJOS USADOS EN EL SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES

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

FACTORES DE CONVERSIÓN

Energía: 1 joule = 10^7 ergs = 0.239 cal
1 cal = 4.184 joule

Longitud: 1 nm = 10 Å = 1×10^{-7} cm = 1×10^{-9} m

Masa: 1 kg = 1000 g = 2.2 lb
1 lb = 453.6 g

Presión: 1 atm = 760 torr = 14.696 psi
1 torr = 1 mm Hg

Temperatura: °K = °C + 273
°C = (5/9)(°F − 32)

Volumen: 1 L = 1×10^{-3} m^3 = 1000 cm^3

CONSTANTES FÍSICAS

Nombre	Símbolo	Unidades SI	Units cgs
Carga electrónica	e	1.602177×10^{-19} culombio[b]	4.80321×10^{-10} esu
Constante de Boltzmann	k	1.38066×10^{-23}J/°K	1.38066×10^{-16} erg/°K
Constante de Faraday	F	96485 J/V · mol	9.6485×10^{11} erg/V · m
Constante de Planck	h	6.626075×10^{-34} J · s	6.626075×10^{-27} erg · s
Constante de los gases[a]	R	8.31451 J/°K · mol	8.31451×10^{7} erg/°K · m
Curie	Ci	3.7×10^{10} d/s	3.7×10^{10} d/s
Número de Avogadro	N	6.022137×10^{23}/mol	6.022137×10^{23}/mol
Velocidad de la luz (vacío)	c	2.99792×10^{8} m/s	2.99792×10^{10} cm/s

[a]Otros valores de R: 1.9872 cal/K · mol = 0.082 L · atm/°K · mol
[b]culombio = 1 J/V

ECUACIONES ÚTILES

Ecuación de Henderson-Hasselbalch	$\text{pH} = \text{p}K_a + \log([\text{A}^-]/[\text{HA}])$
Ecuación de Michaelis-Menten	$V = V_{max}[\text{S}]/(K_M + [\text{S}])$
Cambio de energía libre en condiciones no estándar	$\Delta G = \Delta G° + RT \ln([\text{C}][\text{D}]/[\text{A}][\text{B}])$
Cambio de energía libre y potencial de reducción estándar	$\Delta G°' = -nF\Delta E'_0$
Potenciales de reducción en una reacción redox	$\Delta E'_0 = E'_0(\text{acceptor}) - E'_0(\text{donor})$
Fuerza protón motriz	$\Delta p = \Delta\Psi - 2.3RT\,\Delta\text{pH}/F$
Difusión pasiva de una muestra cargada	$\Delta G = \text{G}_2 - \text{G}_1 = RT \ln(\text{C}_2/\text{C}_1) + ZF\Delta\Psi$

a	año
Ac	anticuerpo
Ac-CoA	acetil-coenzima A
ACP	proteína transportadora de acilo
ADH	alcohol deshidrogenasa
AdoMet	*S*-adenosilmetiomina
ADP	adenosindifosfato
Ag	antígeno
Ala	alanina
AMP	adenosinamonofosfato
Arg	arginina
ARS	secuencia de replicación autónoma
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
atm	atmósfera
ATP	adenosinatrifosfato
BPG	bisfosfoglicerato
cal	caloría
cAMP	3′,5′-adenosinamonofosfato cíclico
cDNA	DNA complementario
CDP	citidinadifosfato
Chl	clorofila
CMP	citidinamonofosfato
CoA o CoA-SH	coenzima A
CoQ	Coenzima Q
cpm	contaje por minuto
CRP	proteína receptora de cAMP (proteína activadora de catabolitos)
CTP	citidinatrifosfato
Cys	cisteína
d	desoxi
Da	dalton
DC	discroísmo circular
dd	didesoxi
DEAE	dietilaminoetil
dfMet	*N*-formilmetionina
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
DHF	dihidrofolato
DHFR	dihidrofolato reductasa
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNP	dinitrofenol
dopa	dihidroxifenilalanina
dTDP	timidinadifosfato
dTMP	timidinamonofosfato
dTTP	timidinatrifosfato
E	potencial de reducción
EF	factor de elongación
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EPR	resonancia paramagnética electrónica
F	fenilalanina
F	constante de Faraday
F_{AB}	fragmento de la molécula de anticuerpo que une el antígeno
FAD	dinucleótico de flavina y adenina
$FADH_2$	dinucleótido de flavina y adenina reducido
FBP	fructosa-1,6-bisfosfato
FBPase	fructosa bisfosfato
Fd	ferredoxina
FMN	mononucleótido de flavina
F1P	fructosa-1-fosfato
F6P	fructosa-6-fosfato
G	energía libre de Gibbs
GABA	ácido γ-aminobutírico
Gal	galactosa
GDP	guanosinadifosfato
GLC	cromatografía en gas-líquido
Glc	glucosa
Gln	glutamina
Glu	ácido glutámico
Gly	glicina
GMP	guanosinamonofosfato
G1P	glucosa-1-fosfato
GS	glutamina sintetasa
GSH	glutatión (glutatión reducido)
G6P	glucosa-6-fosfato
GSSG	glutatión disulfuro (glutatión oxidado)
G3P	gliceraldehído-3-fosfato
GTP	guanosinatrifosfato
h	hora
h	constante de Planck
Hb	hemoglobina
HDL	lipoproteína de densidad elevada
hnRNA	RNA nuclear heterogéneo
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HX	hipoxantina
Hyl	hidroxilisina
Hyp	hidroxiprolina
IDL	lipoproteína de densidad intermedia
IF	factor de iniciación
IgG	inmunoglobulina G
Ile	isoleucina
IMP	inosina monofosfato
$InsP_3$	inositol 1,4,5-trisfosfato
IPTG	isopropiltiogalactósido
IR	infrarrojo
ITP	inosina trifosfato
J	julio
k	kilo (10^3)
k_{cat}	número de recambio
K_M	constante de Michaelis

kb	kilobase
kDa	kilodalton
L	litro
LDH	lactato deshidrogenasa
LDL	lipoproteína de baja densidad
Leu	leucina
Lys	lisina
M	molar (mol/L)
m	mili (10^{-3}
Man	manosa
Mb	mioglobina
Met	metionina
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar (mmol/L)
mmol	milimol
μ	micro (10^{-6})
μm	micrómetro
μM	micromolar (μmol/L)
μmol	micromol
mol	mol
mRNA	RNA mensajero
mV	milivoltio
N	número de Avogadro
n	nano (10^{-9})
NAD^+	dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADH	dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
$NADP^+$	dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina
NADPH	dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina reducido
nm	nanómetro
P	fosfato
p	pico (10^{-12})
P_i	fosfato inorgánico
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	par de bases
PBG	porfobilinógeno
PC	fosfatidilcolina
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PE	fosfatidiletanolamina
PEP	fosfoenolpiruvato
PG	prostaglandina
Phe	fenilalanina
PI	fosfatidil inositol
PK	piruvato quinasa
PKU	fenilcetonuria
PLP	piridoxal-5-fosfato
Pol	polimerasa
PP_i	ion fosfato
PQ	plastoquinona
Pro	prolina
PRPP	5-fosforribosil-1-pirofosfato
PS	fosfatidilserina
PTH	feniltiohidantoína
QH_2	coenzima Q reducida (ubiquinol)
R	constante gaseosa
RE	retículo endoplásmico
RER	retículo endoplásmico rugoso
RF	factor de liberación
R5P	ribosa-5-fosfato
RFLP	polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción
RM	resonancia magnética
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosómico
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfato
S	unidad Svedberg
S	coeficiente de sedimentación
s	segundo
SDS	dodecilsulfato sódico
Ser	serina
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
snRNA	RNA nuclear pequeño
snRNP	ribonucleoproteína nuclear pequeña
SRP	partícula de reconocimiento de señal
T	temperatura absoluta
TCA	tetrahidrofolato
Thr	treonina
3PG	3-fosfoglicerato
TMV	virus del mosaico del tabaco
TPP	tiamina pirofosfato
tRNA	RNA de transferencia
Trp	triptófano
2PG	2-fosfoglicerato
Tyr	tirosina
UDP	uridina difosfato
UDPG	UDP-glucosa
UMP	uridina monofosfato
UTP	uridina trifosfato
UV	ultravioleta
V	voltio
$V_{máx}$	velocidad máxima
Val	valina
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
VLDL	lipoproteína de muy baja densidad
XMP	xantosina monofosfato
YAC	cromosomas artificiales de levadura

booksmedicos.org