



# Colaboradores

## **SYLLABUS**

**Guillermo Álvarez Llera** (agua, ciclo de Krebs, oxidación de los aminoácidos, química y metabolismo de carbohidratos, química y metabolismo de lípidos).

**Patricia del Arenal Mena** (ciclo celular).

**Alicia Cea Bonilla** (fundamentos del metabolismo, proteínas, enzimas y coenzimas, estructura de carbohidratos, metabolismo de carbohidratos, regulación de la glucemia, regulación del metabolismo de lípidos, síntesis y degradación de fosfolípidos, regulación e integración metabólica, biología molecular).

**Leonor Fernández Rivera Río** (nucleótidos).

**Óscar Flores Herrera** (figuras: ciclo energético, vías que siguen los protones en las levaduras, ciclo de Krebs y esquema de un potenciómetro).

**Alberto Hamabata Nishimuta** (aspectos básicos de fisicoquímica, niveles de regulación de la expresión genética)

**Noemí Meraz Cruz** (síntesis y degradación de fosfolípidos, regulación del metabolismo de lípidos), Aspectos Médicos de la enzimología

**Rebeca Milán Chávez** (equilibrio hidroelectrolítico).

**Sara Morales López** (agua, química y metabolismo de carbohidratos, química y metabolismo de lípidos).

**Juan Luis Rendón Gómez** (Regulación ácido-base)

**Celia Virginia Sánchez Meza** (tabla periódica, enlaces, fundamentos del metabolismo, equilibrio hidroelectrolítico, proteínas, radicales libres, descarboxilación del piruvato, regulación de la glucemia, síntesis y degradación de fosfolípidos, metabolismo del colesterol, estructura y metabolismo de lípidos).

**Haydée Torres Guerrero** (modificaciones postraduccionales).

**Aída Uribe Medina** (características de la materia viva).

**Alejandro Zentella Dehesa**(virus, oncogenes y transformación).

**Eugenia Flores Robles**(Mecanismos de señalización)

# UNIDAD TEMÁTICA I

## TEMAS:

- 1.-AGUA
- 2.-EQUILIBRIO ÁCIDO BASE
- 3.-AMINOÁCIDOS Y PROTEÍNAS
- 4.-ENZIMAS Y COENZIMAS

### 1.-AGUA

Uno de los compuestos más abundantes en nuestro planeta es el agua. Se cree que fue en los océanos primitivos donde se originaron los primeros indicios de vida. El agua constituye el medio en el cual se realizan la mayoría de los procesos celulares (de hecho podría decirse que la conformación que toman las moléculas dentro de las células depende del agua). Es por ello que el agua es una molécula muy importante para sostener la estructura de las células y los organismos.

Las características peculiares del agua derivan de su estructura química particular, en la cual los dos hidrógenos y el oxígeno se encuentran formando un tetraedro irregular en el que el oxígeno ocupa el centro y los hidrógenos, junto con los dos orbitales del oxígeno no compartidos, están dirigidos hacia los vértices. La diferencia de electronegatividad entre el oxígeno y los hidrógenos hace que los enlaces entre ellos sean covalentes polares, dando cargas parciales positivas y negativas a la molécula, y la convierten en un dipolo. Esta característica permite que exista una fuerza de atracción entre los extremos cargados opuestamente de las moléculas vecinas.

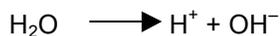
La atracción entre las moléculas de agua permite que se establezcan enlaces débiles llamados puentes de hidrógeno que configuran redes transitorias cuya existencia continuada confiere al agua sus propiedades fisicoquímicas características: ser líquida a temperatura ambiente, alto punto de fusión, alto punto de ebullición, elevada tensión

superficial, alta constante dieléctrica, alta capacidad calorífica y baja tensión de vapor.

Todas esas propiedades permiten que el agua desempeñe muy variadas funciones en los seres vivos; por ejemplo, servir como medio universal de solución, de suspensión y de reacción para todas las moléculas, o intercambiar cantidades importantes de calor sin mucha variación de su temperatura, lo cual le permite mantener constante la temperatura del organismo y controlarla mediante los fenómenos de vasoconstricción y de sudoración. El transporte de sustancias entre los diversos órganos y tejidos del cuerpo humano se hace por el plasma y los líquidos extracelulares, ambos de naturaleza acuosa. Las interacciones del agua con las diversas moléculas permiten el mantenimiento de las estructuras celulares. La presencia de partículas en solución va a modificar las propiedades características del agua y da origen a lo que se conoce como propiedades coligativas de las soluciones (propiedades que dependen del número de partículas en la solución y no de su naturaleza). Entre éstas, la más notable es la aparición de la presión osmótica.

Una molécula de agua tiene la capacidad de ceder un protón a la molécula vecina y esto ocasiona que la molécula que cedió su protón quede con una carga neta negativa y la molécula de agua que lo acepta quede con una carga positiva. Esto indica que el agua se ioniza, ya que actúa como un ácido al donar protones ( $H^+$ ) y como una base al aceptarlos, según la teoría de Brønsted y Lowry. Así, el agua puede encontrarse en dos especies iónicas: el

hidronio  $\text{H}_3\text{O}^+$ , que funcionaría como ácido, y el hidroxilo  $\text{OH}^-$ , que es la especie que queda al ceder la molécula de agua su protón, y que funciona como una base, ya que puede aceptar protones. Para facilitar la expresión de la ionización del agua se simplifica así:



A las sustancias que tienen esta capacidad se las llama anfóteras o anfólitos.

La velocidad de las reacciones químicas depende de la concentración de las moléculas implicadas en ellas, así como de una constante de velocidad de la reacción ( $k$ ), que es una medida indirecta de la capacidad intrínseca de las moléculas para reaccionar entre sí. En la reacción:



la velocidad ( $v$ ) es igual a  $k [\text{A}][\text{B}]$ .

Como la mayoría de las reacciones son reversibles, existen dos constantes de velocidad, una correspondiente a la reacción directa y una a la reacción inversa. Cuando la velocidad de la reacción directa es igual a la velocidad de la reacción inversa se establece una condición de equilibrio en la que hay una relación particular del producto de las concentraciones de los productos entre el producto de las concentraciones de los reactivos. Esta relación es lo que se conoce como constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ) y es igual a  $k_i/k_d$  o  $[\text{C}] [\text{D}] / [\text{A}] [\text{B}]$ . La constante de equilibrio es característica para cada reacción y permite conocer si la reacción es más favorable hacia los productos (a la derecha), en cuyo caso el valor será siempre mayor a la unidad, o más favorable a la aparición de los reactantes (a la izquierda) cuando el valor de la constante será menor a la unidad. Si el valor es igual a uno no hay una tendencia clara en ninguna de las direcciones.

En el caso del agua, la  $K_{eq}$  tiene un valor de  $1.8 \times 10^{-16}$  mol/l, que es mucho menor a la unidad, lo cual indica que la molécula tiende a estar asociada; la concentración del agua sin disociar es tan elevada que puede considerarse constante. Cuando el valor de esta concentración se multiplica por la  $K_{eq}$  se obtiene el valor del producto de la concentración de ambos iones  $\text{H}^+$  y  $\text{OH}^-$ , lo que se conoce como  $K_w$  o

producto iónico del agua, donde  $K_w = [\text{H}^+] [\text{OH}^-] = 1 \times 10^{-14} \text{mol}^2/\text{l}^2$ . Aquí la concentración de ambos iones es de  $1 \times 10^{-7}$ . A partir de esta constante ( $K_w$ ) se puede deducir el carácter de una solución diluida respecto a su grado de acidez o basicidad; se ha elegido al ion hidronio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ), simplificado como  $\text{H}^+$ , como valor numérico para expresarla. Como las concentraciones que se manejan son tan pequeñas, aun expresadas matemáticamente como submúltiplos de 10 (potencias negativas de 10), su manejo puede resultar "complicado" por lo que se utiliza el  $-\log$  de base 10 para expresarlo. Esto es lo que se conoce como "p" y referido a la concentración de  $\text{H}^+$  se denomina pH. El pH, entonces, corresponde al  $-\log$  de la concentración de hidrogeniones, o sea:  $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$  o bien  $\text{pH} = \log 1/[\text{H}^+]$

Nótese que la "p" es minúscula, ya que se trata de una sigla que indica potencial.

Si se considera que el valor de la concentración de protones es de  $1 \times 10^{-7}$ , se tiene que:

$$\text{pH} = \log 1 / (1 \times 10^{-7}) = \log 1 - \log 1 \times 10^{-7} = 0 - (-7) = 7$$

Es a partir del agua que se define la escala de pH, por lo cual se habla de soluciones ácidas cuando tienen valores de concentración de hidrogeniones mayores de  $1 \times 10^{-7}$  o pH menores de 7 y de soluciones alcalinas con concentraciones de hidrogeniones menores de  $1 \times 10^{-7}$  y pH mayores a 7.

Cuando la concentración de hidrogeniones en solución acuosa es de 1.0 M, el valor del pH es 0, ya que el  $\log_{10} 1$  es 0. En el otro extremo, cuando la concentración de  $\text{H}^+$  es ( $1 \times 10^{-14}$ ) el pH es de 14. El punto de neutralidad es de  $\text{pH} = 7$  o en concentración de  $\text{H}^+$  de  $1 \times 10^{-7}$ . El intervalo de pH para indicar la acidez de una solución va del 0 al 7, mientras que el correspondiente a la basicidad o alcalinidad de una solución va del 7 al 14.

## 2.-EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE

Entre los mecanismos de regulación de que dispone el organismo para mantener la integridad fisiológica, aquellos involucrados en la homeostasis del pH en los fluidos extracelulares desempeñan un papel crucial para la supervivencia del individuo. En este sentido cabe señalar que, como resultado de la oxidación de los alimentos, un humano adulto promedio produce alrededor de 20 moles de  $\text{CO}_2$  al día. Al difundir a la sangre, gran parte de dicho gas se combina con el agua en el interior de los eritrocitos, produciendo ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) que se disocia para producir el anión bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y un ión hidrógeno ( $\text{H}^+$ ). Dado el carácter de ácido débil del  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , la fracción disociada del mismo es pequeña; sin embargo, considerando la gran cantidad de  $\text{CO}_2$  que produce el organismo, la acidificación de los fluidos extracelulares sería considerable en ausencia de mecanismos reguladores. En el hombre, la intervención de los pulmones y los riñones evita que ocurra tal acidificación, lo que permite mantener en un nivel constante la concentración de  $\text{H}^+$  y, por consiguiente, el pH.

Para entender el papel que juegan ambos órganos en la homeostasis del equilibrio ácido-base, debe tenerse presente que el sistema del ácido carbónico implica la participación de un componente gaseoso o volátil (el  $\text{CO}_2$ ) y dos componentes no volátiles (el  $\text{HCO}_3^-$  y el  $\text{H}^+$ ). En la sangre, el equilibrio entre dichos componentes determina el valor del pH sanguíneo, que puede evaluarse mediante la bien conocida ecuación de Henderson-Hasselbach. En el individuo normal, dicho valor fluctúa en un promedio de 7.4, siendo la sangre venosa – enriquecida en  $\text{CO}_2$  – ligeramente más ácida en relación con la sangre arterial. Ahora bien, ya que a temperatura ambiente el  $\text{CO}_2$  existe en estado gaseoso, la concentración de  $\text{CO}_2$  disuelto en la sangre dependerá de la presión parcial ( $P_{\text{CO}_2}$ ) ejercida por el mismo a

nivel de los alvéolos pulmonares. En el humano, la magnitud de dicha  $P_{\text{CO}_2}$  es de aproximadamente 40 mmHg, lo que se traduce en una concentración de  $\text{CO}_2$  sanguíneo de aproximadamente 1.2 mEq/L. Si se incluye además al ácido carbónico y el bicarbonato, el  $\text{CO}_2$  total disuelto es de 25.2 mEq/L. Al considerar el pH sanguíneo normal en sangre venosa (7,4) y el pKa del sistema bicarbonato-ácido carbónico (6.1), la ecuación de Henderson-Hasselbalch da un cociente  $[\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2]$  igual a 20. Es precisamente la  $P_{\text{CO}_2}$  la que es controlada por los pulmones, ya que durante el proceso de la exhalación se elimina  $\text{CO}_2$ , manteniendo constante la  $P_{\text{CO}_2}$  en los alvéolos y evitando así que aumente el nivel de  $\text{CO}_2$  disuelto en la sangre. Todo proceso o patología que se manifieste en una alteración en la frecuencia y/o profundidad del proceso de inhalación-exhalación, dará como resultado una alteración de la  $P_{\text{CO}_2}$  alveolar – aumentándola o disminuyéndola – con la consecuente modificación del nivel de  $\text{CO}_2$  disuelto en sangre y, por consiguiente, del pH.

Por lo que respecta a los riñones, su participación en el mantenimiento de un pH extracelular constante se da a través de dos mecanismos: la excreción de equivalentes ácidos ( $\text{H}^+$ ) hacia la orina y la regulación de la cantidad de  $\text{HCO}_3^-$  reabsorbido hacia la sangre desde el filtrado glomerular. A diferencia del intercambio gaseoso en los pulmones, los mecanismos de regulación renal son de largo plazo, por lo que su efecto será manifiesto en cuestión de horas o incluso días. Su importancia se enfatiza en situaciones patológicas donde se altera el intercambio de gases pulmonar (es decir, en la acidosis y alcalosis respiratorias), en cuyo caso es necesario aumentar o disminuir la tasa de reabsorción del  $\text{HCO}_3^-$ , o bien en estados fisiológicos que producen cantidades importantes de ácidos orgánicos (por ejemplo, en la diabetes no controlada o durante el

ejercicio intenso) donde se incrementa la excreción de  $H^+$ . Gran parte de este último aparece en la orina acompañado con el amoníaco en forma de ión amonio ( $NH_4^+$ ), o asociado con el fosfato en forma de fosfato monobásico de sodio ( $NaH_2PO_4$ ), representando este último la llamada acidez titulable. En general, el pH de la orina será un reflejo de la producción de ácidos no volátiles por el organismo, por lo que su valor dependerá de diversos factores, pudiendo alcanzar un mínimo de 4.5. El resultado final de los mecanismos fisiológicos que participan en el mantenimiento del equilibrio ácido-base es el de mantener el pH extracelular en un intervalo compatible con el funcionamiento adecuado del organismo.

Es importante recordar que un ión es una especie química (átomo o conjunto de átomos) con carga eléctrica positiva (catión) o negativa (anión) por ganancia o pérdida de electrones; los iones disueltos en agua pueden conducir la electricidad. El paso de la electricidad a través de una solución con iones se llama electrólisis. Los solutos que pueden liberar iones en el agua por disociación o ionización y que forman una solución conductora de electricidad se llaman electrolitos.

El agua es el mayor constituyente de los seres vivos; su cantidad debe mantenerse dentro de un margen estrecho ya que tanto su carencia como su exceso producen problemas clínicos que se conocen como desequilibrios hídricos.

El agua corporal la encontramos en diferentes compartimentos y su cantidad en éstos, depende de las concentraciones de ciertos electrolitos como  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , fosfatos y proteinatos. Las concentraciones de estos electrolitos se mantiene dentro de ciertos límites que al alterarse, producen desequilibrios que pueden llegar hasta la muerte.

En la práctica médica está indicada la cuantificación de electrolitos en cualquier paciente con síntomas neuromusculares. El tratamiento de las alteraciones hidroelectrolíticas se basa en la evaluación del agua corporal total y su distribución,

así como en las concentraciones de electrolitos y en la osmolaridad del suero.

## **AGUA CORPORAL**

El agua en el cuerpo humano ocupa cerca de 70% del peso corporal dependiendo de la edad, el sexo y la grasa corporal. La cantidad de agua puede variar desde alrededor de un 40% en personas mayores a más de un 75% en niños recién nacidos. Su porcentaje también es mayor en personas delgadas que en obesas, así como un hombre tendrá mayor cantidad de agua que una mujer. La cantidad de agua presente en los diferentes tejidos varía de acuerdo con las funciones y características de cada uno, siendo más abundante en células metabólicamente muy activas (~ 90%) y de menos del 10% en el tejido adiposo o aún menor, en estructuras relativamente inactivas como el esqueleto.

El agua se encuentra distribuida en el líquido intracelular (30-40% del peso corporal total) y el líquido extracelular que, a su vez, está conformado por el líquido intersticial y la linfa (15%), el plasma (4.5%) y los fluidos transcelulares que incluyen los fluidos gastrointestinales, peritoneal, sinovial, líquido cefalorraquídeo, entre otros.

## **ELECTROLITOS**

La composición electrolítica del líquido intracelular (LIC) y del líquido extracelular (LEC) difiere en forma sustancial. Para fines prácticos el LIC tiene al  $K^+$  como el principal catión y como aniones al fosfato y a las proteínas, mientras que en el LEC, el  $Na^+$  es el catión más importante y el cloruro como anión.

La concentración total de cationes presentes en el plasma es aproximadamente de 150 mmol/l, siendo la concentración de sodio de 140 mmol/l. Los aniones presentes en el plasma más abundantes son el cloruro, con una concentración aproximada de 100 mmol/l y el bicarbonato, con una concentración de 25 mmol/l. Dado que en cualquier sistema biológico la suma de los cationes debe ser igual a la suma de los aniones, el resto de los aniones que constituyen la diferencia o brecha aniónica del plasma son el fosfato, el sulfato, las proteínas y los ácidos

orgánicos como son el lactato, el citrato, el piruvato, el acetoacetato y el 3-β-hidroxibutirato.

En la práctica, esta brecha aniónica se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Brecha aniónica} = [\text{Na}^+] - \{[\text{Cl}^-] + [\text{HCO}_3^-]\}$$

Calculada de esta forma, la brecha aniónica es de aproximadamente 12 mmol/l. Puede aumentar muchas veces en ciertos desórdenes como cuando los ácidos inorgánicos y los aniones orgánicos se acumulan, por ejemplo, en la cetoacidosis diabética y en la insuficiencia renal.

El potasio es el principal catión en el LIC, cuya concentración es de 110 mmol/l, es aproximadamente 30 veces más alta que la que se encuentra en el LEC. La concentración de sodio y cloruro en el LIC es de 10 mmol/l y 4 mmol/l, respectivamente.

La movilización y el metabolismo de los principales cationes extra e intracelulares depende de la actividad celular así como de transportadores específicos, entre los cuales se encuentra la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Los cambios en la concentración de iones conlleva a cambios en la osmolaridad del medio.

### OSMOLARIDAD

Las diferentes moléculas disueltas en el agua corporal contribuyen a la presión osmótica, la cual es proporcional a la concentración molar de la solución. Un cambio en la concentración iónica en cualquiera de los compartimentos celulares crea un gradiente de presión y como consecuencia, existe un cambio en la cantidad de agua que fluye del compartimiento que presenta una menor osmolaridad hacia el de mayor.

Para determinar la concentración osmolar de una solución que contiene una mezcla de electrolitos y no electrolitos hay que tener en cuenta las concentraciones individuales de todos sus componentes. Una fórmula sencilla para cuantificar la osmolaridad del suero y que ofrece una utilidad clínica es:

$$\begin{aligned} \text{Osmolaridad} &= 2(\text{Na}^+ \text{ mmol/l}) + \text{glucosa mmol/l} + \text{BUN mmol/l} \\ &= 280 \text{ a } 320 \text{ mOsm} \end{aligned}$$

$$\text{Osmolaridad} = 2(\text{Na}^+ \text{ meq/l}) + \frac{\text{glucosa mg/dl}}{18} + \frac{\text{BUN mg/dl}}{2.8}$$

18

2.8

donde el factor 2 se debe a que se consideran los aniones asociados al  $\text{Na}^+$  ( $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ ); 1 mOsm de glucosa equivale a 180 mg/l (18 mg/dl) y 1 mOsm de nitrógeno ureico (NUS o BUN de sus siglas en inglés) a 28 mg/l (2.8 mg/dl) que corresponde a la masa molecular de 2 átomos de nitrógeno en la urea.

Los electrolitos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ , contribuyen con más del 92% a la osmolaridad del suero; los otros electrolitos, junto con las proteínas séricas, glucosa y urea son responsables del restante 8%.

El mantenimiento del agua extracelular depende básicamente de la concentración del  $\text{Na}^+$ . El organismo mantiene esta concentración por medio de la hormona antidiurética. Cambios de hasta 2 meq de sodio en sangre estimulan los receptores osmolares y causan retención renal de agua cuando aumenta y su eliminación cuando la osmolaridad disminuye.

### 3.-AMINOÁCIDOS Y PROTEÍNAS

Las proteínas están formadas por una o varias cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales está constituida por 20 diferentes aminoácidos unidos por enlaces tipo amida (enlaces peptídicos) en una secuencia específica para cada proteína. La masa molecular de una proteína varía desde cerca de 6 000 (>50 aminoácidos) hasta 1 000 000 Da o más. (Da o Dalton es la unidad de masa atómica y es igual a  $1.6605655 \times 10^{-27}$  kg).

Las proteínas pueden dividirse, según su composición, en dos grupos principales: proteínas simples y proteínas conjugadas. Las proteínas simples están constituidas sólo por aminoácidos, mientras que las proteínas conjugadas presentan, además de los aminoácidos, otro componente, que puede ser de diferente naturaleza química y en ciertos casos es llamado grupo prostético. Algunos ejemplos de proteínas conjugadas son las glucoproteínas (contienen azúcares como grupo prostético), las lipoproteínas (contienen triacilglicéridos, fosfolípidos y colesterol), las nucleoproteínas (asociadas a ácidos nucleicos) y las metaloproteínas (que pueden unir iones metálicos como en el grupo hemo).

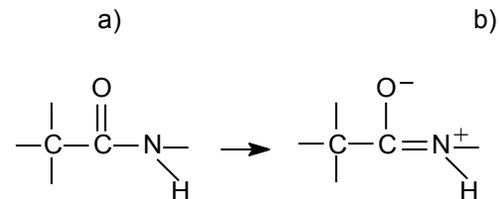
Los aminoácidos son compuestos alifáticos, aromáticos o heterocíclicos que contienen por lo menos un grupo amino y un grupo carboxilo. En los aminoácidos biológicamente activos, el grupo amino se encuentra en el átomo de carbono alfa con respecto al grupo carboxilo. Este carbono alfa es un carbono asimétrico (con excepción de la glicina) porque presenta cuatro grupos funcionales diferentes: el grupo amino, el grupo carboxilo, un hidrógeno y una cadena lateral. Los aminoácidos proteicos pueden clasificarse en función de las cadenas laterales que presentan. Así, tenemos aminoácidos no polares, aminoácidos polares sin carga y aminoácidos polares con carga, la que puede ser negativa o positiva a pH neutro. Todos los aminoácidos (con excepción de la glicina) son ópticamente activos y pertenecen a la serie L en los organismos superiores. Los aminoácidos tienen por lo menos dos grupos ionizables: el grupo alfa amino y un carboxilo. Cada aminoácido en solución tiene un pH característico en el que no se mueve en un campo eléctrico, es decir, tiene un pH en el que se presenta en forma de ion dipolo o zwitterion, donde tanto el grupo alfa amino como el grupo carboxilo se encuentran ionizados y, por lo tanto, tiene el mismo número de cargas positivas y negativas (punto isoelectrico). Junto a los grupos ionizables principales, algunos aminoácidos contienen otros grupos que pueden ionizarse: grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo, hidroxilo o imidazol. A pH fisiológico, estos grupos pueden estar ionizados y confieren al aminoácido que los contiene cargas positivas o negativas, según sea la naturaleza del grupo ionizado. Las proteínas, como los aminoácidos, se encuentran cargadas en solución; la magnitud de la carga depende del tipo de proteína y del pH. Cada proteína posee un punto isoelectrico característico; a pH por arriba del punto isoelectrico presenta carga negativa, mientras que a pH por abajo del punto isoelectrico tiene carga positiva.

### ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS PROTEÍNAS

La función de las proteínas sólo puede entenderse en términos de la estructura de la proteína, es decir, de las relaciones tridimensionales entre los átomos

que componen las proteínas. Se han descrito cuatro niveles de organización:

1. La estructura primaria es la secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica unidos mediante enlaces peptídicos.
2. La estructura secundaria es el arreglo espacial local de los átomos del esqueleto de un polipéptido sin considerar la conformación de sus cadenas laterales. La estructura secundaria es mantenida por puentes de hidrógeno entre el oxígeno y el nitrógeno involucrados en los enlaces peptídicos de aminoácidos. El enlace peptídico tiene una estructura plana, rígida, que es consecuencia de interacciones de resonancia (a) que le dan 40% de carácter de doble enlace entre los átomos de C y N (b), esta última estructura es la que le permite establecer puentes de hidrógeno.



Pauling y Corey determinaron que los grupos peptídicos asumen una configuración trans, es decir, los carbonos alfa sucesivos están en lados opuestos del enlace peptídico que los une.

Pueden existir varios tipos de estructura secundaria; entre ellos destacan dos: la alfa hélice, en la que los aminoácidos de la cadena polipeptídica se presentan formando una especie de cilindro orientado a la derecha y la lámina beta plegada, en la que los aminoácidos se acomodan de manera paralela o antiparalela, uno respecto al otro y se conectan entre sí por puentes de hidrógeno.

3. La estructura terciaria se refiere al arreglo tridimensional de un polipéptido y está determinada por las estructuras primaria y secundaria. Se forma espontáneamente y depende del tamaño, forma y polaridad de los aminoácidos que forman la proteína, los que interactúan entre sí y con el medio en el que se encuentran. Esta estructura puede estar estabilizada por enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas, los enlaces covalentes disulfuro, etcétera. Por ejemplo,

las cadenas peptídicas de las proteínas globulares se organizan en una forma muy compacta en la que los aminoácidos hidrofílicos se encuentran en la superficie externa mientras que los residuos hidrofóbicos permanecen enterrados en el interior de la molécula.

4. La estructura cuaternaria es el arreglo espacial de las diversas subunidades polipeptídicas que componen algunas proteínas.

### **DESNATURALIZACIÓN**

Se dice que una proteína se desnatura cuando pierde sus diversos niveles de organización estructural. Algunos agentes que desnaturan las proteínas son: el calor, los pH extremos, los rayos X, la luz UV, o la agitación vigorosa. La desnaturalización es causada por un colapso de la estructura original con la ruptura de los enlaces de hidrógeno, de los enlaces iónicos y de las interacciones hidrofóbicas, sin cambios en la estructura primaria. La desnaturalización va acompañada de la disminución de la solubilidad, cambios en la rotación óptica, pérdida de la función biológica y una mayor susceptibilidad al ataque de las enzimas digestivas. En algunos casos, al eliminar los agentes que causan la desnaturalización, la proteína recupera su conformación original; a este fenómeno se le conoce como renaturalización.

Una mezcla de proteínas puede separarse a partir de las diferentes movilidades en un campo eléctrico (electroforesis), por cromatografía de distintos tipos o por su diferente solubilidad.

### **CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS**

Las proteínas pueden ser clasificadas en función de aspectos tan diversos como su composición, su disposición espacial, su función biológica y su localización.

Atendiendo a su composición las proteínas pueden ser:

- Simples: aquellas compuestas únicamente de aminoácidos.
- Conjugadas: cuando además de aminoácidos poseen un componente no proteico, el que puede ser de origen orgánico o inorgánico y que se denomina grupo prostético. Algunos ejemplos son:

nucleoproteínas, formadas por la asociación de la cadena polipeptídica con ácidos nucleicos; las glucoproteínas, cuyo grupo prostético son carbohidratos; las fosfoproteínas, asociadas con fósforo o como las metaloproteínas, cuando un ión metálico está enlazado directamente a la proteína, entre otras.

Con base en su disposición espacial, las proteínas pueden clasificarse en globulares y fibrosas. Las proteínas globulares son de forma esférica y solubles en agua. La mayor parte de las enzimas, hormonas y anticuerpos tienen estructura globular.

Las proteínas formadas por cadenas polipeptídicas dispuestas paralelamente a un eje, reciben el nombre de proteínas fibrosas, como la colágena y la fibrina. Estas proteínas son de forma alargada, baja solubilidad en agua y resistentes a la tracción.

Clasificación de las proteínas de acuerdo a su función. Las proteínas desempeñan una amplia variedad de funciones muy importantes en el organismo. La lista siguiente, aunque no es exhaustiva, da una idea de la diversidad de las funciones biológicas en las cuales se sabe que intervienen las proteínas:

- Catalítica: las enzimas catalizan casi todas las reacciones que se efectúan en los organismos vivos.
- Estructural: las proteínas proporcionan a las células forma y soporte mecánico (como la colágena y las proteínas contráctiles).
- Reguladora: algunas proteínas son hormonas o sirven como receptores de las hormonas (insulina y glucagón).
- Protectora: por ejemplo las inmunoglobulinas que defienden al organismo contra las infecciones virales y bacterianas.
- Transporte: las proteínas se pueden unir a otras moléculas a fin de transportarlas en el organismo (albúmina, transferrina).
- Trabajo mecánico: por ejemplo la contracción de los músculos, el movimiento de los flagelos y la separación de cromosomas en la mitosis (miosina y actina).

Entre las funciones que son comunes a todas las proteínas encontramos:

- Capacidad amortiguadora: debido a que las proteínas son compuestos anfóteros y poseen muchos grupos ionizables (con valores diferentes de pK), funcionan como amortiguadores para reducir al mínimo cambios súbitos en el pH.
- Energética: liberan 4 kcal/g de proteína oxidada hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Los aminoácidos pueden ser desaminados para formar cetoácidos, los cuales pueden movilizarse para producir energía calórica o transformarse en carbohidratos y lípidos.
- Participan en el mantenimiento del equilibrio osmótico entre los diferentes compartimentos del organismo. Las proteínas, por ser grandes moléculas coloidales, no son difusibles, esto es, no pueden atravesar las membranas y ejercen una presión osmótica coloidal, la cual sirve para mantener un volumen normal de sangre y un contenido normal de agua en el líquido intersticial y los tejidos.
- Fuente de nutrición para los tejidos (sobre todo, la albúmina): por constituir una fuente de los aminoácidos indispensables para el organismo, las proteínas son una forma de almacenamiento de aminoácidos.

Por último, en función de su localización, las proteínas pueden clasificarse en:

- Hísticas o tisulares: son las proteínas de los tejidos.
- Plasmáticas o hemáticas: son las proteínas de la sangre.

Las proteínas de la sangre (la hemoglobina en los eritrocitos y las proteínas plasmáticas), por su gran accesibilidad, son muy utilizadas en el laboratorio clínico.

#### 4.-ENZIMAS Y COENZIMAS

En termodinámica un sistema se define como la parte del Universo en estudio. Por lo tanto, un sistema puede ser un tubo de ensayo, una máquina, una planta o el hombre.

El resto del Universo se conoce como ambiente. El organismo humano es un sistema abierto porque es capaz de intercambiar materia y energía con el ambiente que lo rodea; toma los

nutrimentos, oxígeno y agua del ambiente; elimina productos de desecho, y genera trabajo y calor.

La primera ley de la termodinámica, o ley de la conservación de la energía, dice que la energía no se crea ni se destruye, sólo se transforma.

$$\Delta U = U_{\text{final}} - U_{\text{inicial}} = q - w \quad (1)$$

Esta expresión matemática muestra que el cambio de energía, pérdida o ganancia que sufre un sistema ( $\Delta U$ ) corresponde a la diferencia entre el contenido de energía al principio ( $U_{\text{inicial}}$ ) y al término ( $U_{\text{final}}$ ) del estudio.

La segunda relación matemática: ( $\Delta U = q - w$ ) significa que parte de ese cambio de energía se utiliza para hacer trabajo ( $w$ ) sobre el ambiente y el resto se libera en forma de calor ( $q$ ). Los procesos en los cuales el sistema libera calor se llaman exotérmicos ( $q$  con signo negativo por convención), y a los que absorben calor se les llama endotérmicos ( $q$  con signo positivo).

La medida de este intercambio de calor, liberado o absorbido con el ambiente, se llama entalpía ( $\Delta H$ ):

$$H = q_p \quad (2)$$

donde  $q_p$  representa el calor a presión constante.

La segunda ley de la termodinámica dice que el Universo tiende hacia el máximo desorden. Esta ley provee un criterio para determinar si un proceso es espontáneo. Un proceso espontáneo ocurre en una dirección que aumentaría el desorden del sistema y del ambiente. La medida del desorden del sistema se llama entropía ( $S$ ) y el cambio puede ser en el sentido de aumentar el desorden ( $\Delta S$  con signo positivo) o de disminuir el desorden ( $\Delta S$  con signo negativo).

La tercera ley de la termodinámica o ley cero dice que a una temperatura de 0°K (-273 °C) la entropía de un sistema es igual a cero.

J. Willard Gibbs (1878) formuló el concepto de energía libre ( $G$ ) que engloba los dos indicadores de espontaneidad de un proceso a temperatura y presión constantes:

$$G = H - TS \quad (3)$$

y los cambios quedarían indicados como:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

De esta manera, un cambio en la energía libre sería la suma algebraica del cambio de la entalpía y el cambio de la entropía multiplicada por la temperatura (°K).

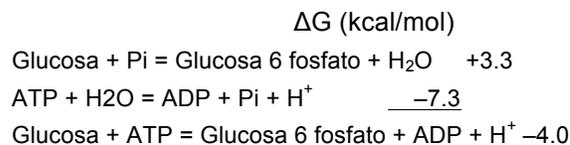
Un proceso con  $\Delta G$  negativo (espontáneo y exergónico) puede darse por una disminución en la entalpía (liberación de calor) o por un aumento en la entropía (aumento de desorden). Por el contrario, un proceso endergónico, no espontáneo, tiene un  $\Delta G$  positivo, caracterizado por un aumento en la entalpía (absorción de calor) o por una disminución en la entropía. El  $\Delta G$  representa la energía que se emplea para ejercer un trabajo.

En muchos sistemas, entre ellos los biológicos, un valor negativo grande predice que la reacción se puede llevar a cabo de manera espontánea, pero no dice nada acerca de la velocidad del proceso, ni del camino que éste sigue. Por ejemplo, en algunas reacciones químicas, el  $\Delta G$  puede ser negativo, y esto predice que la reacción será espontánea, pero como el camino ocurre a través de un estado energizado (de mayor contenido de energía) de los reactivos, el proceso no se lleva a cabo a menos que se introduzca energía al sistema para que se alcance ese estado energizado (energía de activación); entonces, el proceso se realizaría de manera espontánea. La introducción de enzimas para realizar una reacción, tiene el efecto de disminuir la energía de activación de dicha reacción (debido a la formación del complejo enzima-sustrato).

Una estrategia que se sigue en los sistemas biológicos para lograr que las reacciones no espontáneas, con  $\Delta G$  positivo, se lleven a cabo, consiste en acoplarlas a otras reacciones relacionadas que tengan un  $\Delta G$  muy negativo. De esta manera, en las vías metabólicas las reacciones exergónicas "empujan" o "jalan" a las reacciones endergónicas y desplazan el equilibrio químico. Por

ejemplo, la fosforilación de la glucosa por ATP catalizada por la hexocinasa:

Ecuación:



Las enzimas son proteínas especializadas de actividad catalítica. Algunas de ellas están formadas únicamente de aminoácidos mientras que otras presentan algún otro componente de naturaleza no aminoácida. La parte proteica se denomina apoenzima, mientras que la parte no proteica se denomina coenzima; cuando se encuentran aisladas, ambas son no funcionales, pero juntas forman una proteína funcional denominada holoenzima.

Las coenzimas funcionan a menudo en la transferencia de electrones o de grupos funcionales. Generalmente son derivados de vitaminas, las cuales no pueden ser sintetizadas en las células de los organismos superiores, por lo que deben ser adquiridas en la dieta.

Las enzimas presentan algunas características que las diferencian de los catalizadores químicos, como:

1. Mayor velocidad de reacción, ya que las reacciones catalizadas enzimáticamente alcanzan velocidades de reacción de 10<sup>6</sup> a 10<sup>12</sup> veces mayores que las reacciones no catalizadas y de varios órdenes de magnitud mayor que las catalizadas químicamente.
2. Condiciones de reacción más suaves, ya que trabajan a temperaturas relativamente bajas, a presión atmosférica y en condiciones de pH neutro.
3. Mayor especificidad de reacción, ya que presentan una gran selectividad por la identidad de los grupos químicos de sus sustratos y productos, de tal manera que rara vez se obtienen productos colaterales o secundarios.
4. Capacidad de regulación, es decir, que sus actividades varían de acuerdo con la concentración de otras moléculas diferentes de sus sustratos. Los mecanismos de regulación incluyen la inhibición,

control alostérico, modificación covalente de la enzima y variación en la cantidad de enzima sintetizada.

Las enzimas aceleran las reacciones biológicas al disminuir la energía de activación de una reacción dada sin alterar su equilibrio. Su mecanismo de acción consiste en la formación de un complejo entre la enzima y el sustrato (ES), el cual realiza la reacción química adecuada y permite la recuperación de la enzima original en el momento en que el complejo enzima-producto se rompe para liberar al producto.

El sustrato se une a la enzima en el sitio activo, el cual consiste en un arreglo espacial de algunos aminoácidos de la proteína donde se encuentran generalmente el grupo prostético o la coenzima y que tienen la capacidad de interactuar con el sustrato. Hay algunas enzimas que se sintetizan directamente en su forma activa, otras se sintetizan en forma de proenzimas inactivas o zimógenos y deben ser activadas por procesos especiales para llegar a ser funcionales. Algunas otras enzimas presentan sitios diferentes del sitio activo donde se asocian moléculas que modulan su actividad. Estas enzimas se conocen como enzimas alostéricas y el sitio donde interactúan con el modulador se llama sitio alostérico.

La velocidad de las reacciones enzimáticas depende de:

a) La concentración y la actividad de la enzima. La velocidad de las reacciones enzimáticas se ve modificada por la cantidad de enzima y por su capacidad de interactuar con su sustrato. Una enzima puede atacar, dado que interactúa con su sustrato, por un reconocimiento espacial, tridimensional o estereoespecífico. Si la especificidad es absoluta, la enzima puede actuar sobre un único compuesto, mientras que, si es relativa, puede usar como sustrato varios compuestos relacionados. La estereoespecificidad indica que una enzima acepta sólo un cierto estereoisómero (L ó D). Un sustrato puede ser transformado por una o varias reacciones teóricamente posibles catalizadas por diferentes enzimas. Esto es importante en algunos procesos de control metabólico.

Las unidades con que se mide la velocidad de una enzima se determinan como unidades internacionales (UI). Una UI es la cantidad de enzima en miligramos que convierte un micromol de sustrato por minuto, en katal (kat), que es la cantidad de enzima que convierte un mol de sustrato por segundo. La actividad específica de una enzima se expresa en unidades por mg de proteína.

- b) La concentración del sustrato. A bajas concentraciones de sustrato la reacción enzimática sigue una cinética de primer orden, es decir, la velocidad de la reacción es proporcional a la concentración del sustrato. A altas concentraciones de sustrato, la reacción es de orden cero, es decir, la enzima está saturada por su sustrato y, por lo tanto, se encuentra en su velocidad máxima. Cada enzima tiene su característica constante de Michaelis o  $K_m$ , que define la concentración de sustrato a la que la reacción enzimática alcanza la mitad de la velocidad máxima.
- c) El pH y la composición de la solución en que se lleva a cabo la reacción. Toda reacción catalizada enzimáticamente tiene su pH óptimo.
- d) La temperatura. Toda reacción catalizada enzimáticamente tiene una temperatura óptima.
- e) La presencia de activadores e inhibidores. La actividad enzimática puede ser modificada positiva o negativamente por algunos compuestos. Los activadores aumentan la reacción enzimática propiciando la formación de un sitio activo funcional y a menudo son iones metálicos como  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , etcétera. La activación de las enzimas alostéricas que están compuestas por subunidades es de gran importancia en el control de los sistemas multienzimáticos y se realiza generalmente por varias moléculas orgánicas.

Los inhibidores enzimáticos pueden ser de varios tipos; los más importantes son los competitivos y los no competitivos. Los inhibidores competitivos interactúan con el sitio activo de la enzima y se parecen al sustrato en su estructura, por lo que compiten con él para unirse al sitio activo. En general, se remueven con un exceso de sustrato.

Los inhibidores no competitivos reaccionan con otra estructura importante de la molécula enzimática. La inhibición puede ser reversible o irreversible en el caso de que el inhibidor realice un cambio permanente de un grupo funcional de la enzima. El efecto de un inhibidor no competitivo no puede revertirse por un exceso de sustrato.

El comportamiento cinético de las enzimas, así como el efecto de los diferentes tipos de moléculas sobre la actividad enzimática, puede ser estudiado mediante diversas técnicas cinéticas y gráficas. Así, al graficar la velocidad de la reacción enzimática contra la concentración de sustrato se obtiene una hipérbola rectangular (fig. II.1), descrita matemáticamente por la ecuación de Michaelis-Menten. Las enzimas alostéricas presentan un comportamiento sigmoidal y los moduladores positivos desplazan la curva hacia la izquierda, mientras que los moduladores negativos hacen más pronunciado el efecto sigmoidal (fig. II.2).

Otra manera de estudiar el comportamiento cinético de las enzimas, es graficar la inversa de la velocidad inicial contra la inversa de la concentración de sustrato, lo que genera una línea recta, descrita matemáticamente por la ecuación de Lineweaver-Burk. En la figura II.3 se observa este comportamiento lineal de la enzima con y sin inhibidores.

In vivo, la mayoría de las enzimas se organiza en sistemas multienzimáticos, los cuales se unen a estructuras celulares o están libres en diversos compartimientos celulares y son una forma de hacer más eficiente la acción de las enzimas involucradas en una vía, así como su regulación.

Las enzimas pueden clasificarse en seis grandes grupos según el tipo de reacción que llevan a cabo:

**OXIDORREDUCTASAS.** Transfieren electrones o hidrógenos.

**TRANSFERASAS.** Transfieren grupos funcionales entre dos moléculas.

**HIDROLASAS.** Realizan reacciones de ruptura de enlaces con entrada de la molécula de agua.

**LIASAS.** Realizan reacciones de adición a dobles enlaces y ruptura no hidrolítica del sustrato.

**ISOMERASAS.** Realizan interconversiones de isómeros.

**LIGASAS.** Realizan reacciones de formación de enlaces con gasto de ATP.

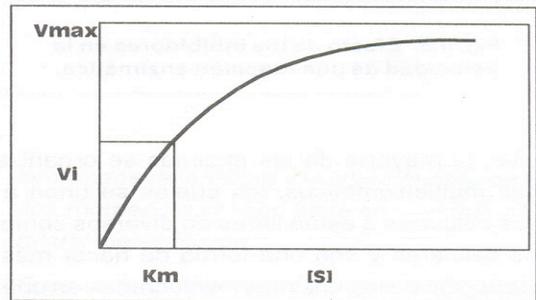


Fig. II.1. Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de la reacción enzimática.

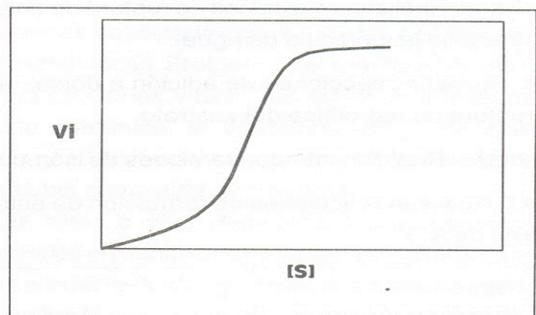


Fig. II.2. Cinética de una enzima alostérica.

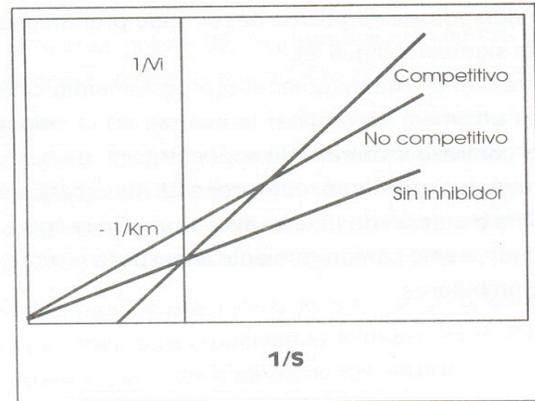


Fig. II.3. Efecto de los inhibidores en la velocidad de una reacción enzimática.

### ASPECTOS MÉDICOS DE LA ENZIMOLOGÍA

Aplicará el concepto de enzimas de escape en el diagnóstico clínico de las siguientes enfermedades: hepatitis, infarto al miocardio, cáncer óseo, cáncer de próstata.

La cuantificación de ciertas enzimas citosólicas que son liberadas en sangre, ha sido de gran apoyo para el diagnóstico y el pronóstico de diversas entidades nosológicas, fundamentalmente las relacionadas con procesos que afectan hígado, corazón, hueso, músculo, páncreas y próstata. La presencia de estas enzimas, denominadas de escape puede ser el resultado de:

- a) Una necrosis celular, que incrementa la permeabilidad de la membrana y provoca la liberación de numerosas enzimas al medio, como la lactato deshidrogenasa (LDH).
- b) Un incremento del recambio metabólico hístico, tal y como ocurre en la proliferación celular (cáncer).
- c) Una obstrucción de la secreción celular, tal y como ocurre en la pancreatitis ( $\alpha$ -amilasa).

La velocidad de acceso a la circulación es variable y depende de la irrigación del tejido y del tamaño de la enzima. La diferente localización tisular de las enzimas es útil en la identificación del órgano alterado. Por ejemplo, la elevación de las transaminasas hepáticas: AST (aspartato aminotransferasa, antes llamada transaminasa glutámico-oxalacética –TGO-), y ALT (alanina aminotransferasa, antes llamada transaminasa glutámico-pirúvica –TGP-) en el suero, refleja daño a la membrana plasmática de las células del hígado como resultado del proceso inflamatorio.

En el infarto del miocardio, generalmente causado por una obstrucción ateromatosa o por un espasmo grave en una arteria coronaria que impide el flujo sanguíneo a un área del músculo cardíaco. Las células en esta región presentan insuficiencia de oxígeno y del combustible movilizado por la sangre. Debido a que las células no pueden generar ATP, las membranas se lesionan y las enzimas escapan de las células incluidas en la sangre. La creatina cinasa (CK o CPK) es una de estas enzimas. Es conveniente mencionar que existen dos proteínas que se ven alteradas también durante un infarto del miocardio (IM) agudo, la mioglobina y la isoforma de la troponina T cardíaca (cTn), una proteína que participa en la contracción

muscular. La CK se utilizaba en el pasado para el diagnóstico temprano de ésta enfermedad, ya que era una de las primeras proteínas liberadas en la sangre desde el tejido cardíaco dañado. Ahora se sabe que cTn es el marcador más específico como evidencia de daño del músculo cardíaco aunado a los valores de CK. Existen algunas enzimas como la fosfatasa alcalina cuya concentración elevada puede inferir daño en hueso, hígado e intestino. Principalmente tiene dos aplicaciones clínicas muy útiles: en la enfermedad obstructiva hepática y en la enfermedad metabólica ósea, asociada a incrementos de la actividad osteoblástica.

En el caso de la fosfatasa ácida y sobre todo la fracción tartrato – labil (PAP) se ha utilizado principalmente como prueba de ayuda para el diagnóstico del carcinoma prostático metastatizado y para la monitorización del tratamiento tanto quirúrgico como estrogénico del cáncer de próstata. En la ausencia de metástasis el nivel sérico de fosfatasa ácida no aumenta o lo hace discretamente. En enfermedades metabólicas óseas, constituye prácticamente la única enzima que tiene utilidad diagnóstica. Se encuentra elevada principalmente en la enfermedad de Paget, en el raquitismo, osteomalacia y en el hiperparatiroidismo con implicación ósea. En metástasis óseas sólo se produce elevación de la fosfatasa alcalina en aquellas metástasis que dan lugar a lesiones osteoescleróticas. En las metástasis osteolíticas la fosfatasa alcalina permanece sin cambio.

González Hernández A. 2010. Principios de Bioquímica clínica y patología molecular. Elsevier 473 pags.

Laguna J., et al., 2013 7ª. Edición. Bioquímica de Laguna. Manual Moderno 704 pags.

Marks A.D. y Lieberman M. 2013 4ª. Edición. Bioquímica médica básica. Wolters Kluwer/ Lippincott Williams & Wilkins. 1014 pags.

## Principales enzimas séricas y significado clínico

Nombre	EC	Tejido donde predomina	Límite de Referencia a 37°C (UI/L)	Utilidad clínica
Aldolasa	4.1.2.13		7.6	Enfermedad muscular
α-Amilasa	3.2.1.1	Glándula salival, páncreas	220	Pancreatitis aguda
ALT	2.6.1.2	Hígado, Corazón Músculo esquelético Riñón	H: 41 M:31	Enfermedad hepática
AST	2.6.1.1	Hígado, músculo esquelético Corazón	H: 37 M:31	Enfermedad hepática
CK	2.7.3.2	Corazón Músculo esquelético	H: 195 M:170	Infarto del miocardio Miopatías
ACP	3.1.3.2	Próstata	H: 4.5-12.9 M:3-11.4	Carcinoma de próstata Enfermedad ósea
ALP	3.1.3.1	Hígado Hueso Intestino Placenta	H:80-228* M:72-204	Enfermedad hepática y ósea
γ-GT	2.3.2.2	Hígado	H: 11-50 M:7-32	Enfermedad hepática
LDH	1.1.1.27	Corazón Músculo esquelético	230-460	Necrosis Infarto del miocardio
Lipasa	3.1.1.3	Páncreas	10-28	Pancreatitis aguda
Seudocolinesterasa	3.1.1.8	Hígado Páncreas Corazón	5.3-12.9	Intoxicación por organofosforados Variantes fenotípicas

ALT (Alanina aminotransferasa), AST (Aspartato aminotransferasa), CK (Creatina cinasa), ACP (Fosfatasa ácida), ALP (Fosfatasa alcalina), LDH (Lactato deshidrogenasa), γ-GT (γ-Glutamil-transpeptidasa)

\*Los valores normales pueden variar de un laboratorio a otro, al igual con la edad y el sexo.

# **UNIDAD TEMÁTICA II**

## **TEMAS:**

- 1.-FUNDAMENTOS DEL METABOLISMO CELULAR**
- 2.-CARBOHIDRATOS**
- 3.-METABOLISMO ENERGÉTICO**
- 4.-MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN**
- 5.-OTRAS VÍAS METABÓLICAS DE LOS CARBOHIDRATOS.**
- 6.-LÍPIDOS**
- 7.-METABOLISMO DE LÍPIDOS**
- 8.-METABOLISMO DE COMPUESTOS NIITROGENADOOS**
- 9.-REGULACIÓN E INTEGRACIÓN METABÓLICA**

# 1.-FUNDAMENTOS DEL METABOLISMO CELULAR

El metabolismo puede definirse como el conjunto de todas las reacciones químicas que ocurren en el organismo. Los organismos se caracterizan por poseer miles de reacciones catalizadas por enzimas, constituyendo las vías metabólicas. El objetivo del metabolismo es mantener las funciones vitales del organismo tales como el trabajo mecánico, el transporte activo de moléculas contra gradientes de concentración y la biosíntesis de moléculas complejas, entre otras.

Las rutas o vías metabólicas son secuencias de reacciones en donde un precursor o sustrato se convierte en un producto final a través de una serie de intermediarios metabólicos. El término metabolismo intermediario se aplica a las actividades combinadas de todas las vías metabólicas que interconvierten sustratos, metabolitos y productos. Por ejemplo, la secuencia consecutiva de  $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow E$  tiene el mismo efecto neto que  $A \rightarrow E$ .

Toda esta actividad celular muy coordinada y dirigida tiene como objetivo el que los sistemas multienzimáticos cooperen para cumplir cuatro funciones básicas:

1. Obtener energía química a partir de la energía solar en los organismos fotótrofos o de la energía contenida en los nutrientes obtenidos del ambiente en los organismos quimiótrofos.
2. Convertir las moléculas nutrientes en las moléculas características de la propia célula, incluidos los precursores macromoleculares.
3. Transformar los precursores monoméricos en polímeros (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos y otros componentes celulares).
4. Sintetizar y degradar las biomoléculas requeridas en las funciones celulares especializadas.

## EL METABOLISMO SE DIVIDE EN CATABOLISMO Y ANABOLISMO

El catabolismo, del griego katá, "abajo" es la fase degradativa del metabolismo en la que nutrientes orgánicos como carbohidratos, lípidos y

proteínas se convierten en productos más pequeños y sencillos ( $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $NH_3$ ). Las rutas catabólicas generan transportadores electrónicos reducidos (NADH,  $FADH_2$  y NADPH) y liberan energía, parte de la cual se conserva en la molécula del ATP.

En el anabolismo, del griego aná, "arriba", también llamado biosíntesis, los precursores pequeños y sencillos se transforman en moléculas más grandes y complejas propias de cada célula (polisacáridos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos). Las reacciones anabólicas requieren un aporte energético, que proviene generalmente de la hidrólisis del ATP y del poder reductor del NAD(P)H.

En el siguiente cuadro aparece el resumen de las características de estos dos tipos de procesos.

Catabolismo	Anabolismo
Biodegradativa.	Biosintética.
Oxidativa.	Reductora.
Generador de energía.	Consumidor de energía.
Variedad de materiales iniciales, pero productos finales bien definidos (convergente)	Materiales iniciales bien definidos y variedad en los productos (divergente)

Dentro de la gran complejidad del metabolismo es posible distinguir algunos puntos de convergencia:

1. La mayoría de las vías metabólicas son irreversibles y exergónicas.
2. Cada vía tiene una etapa obligada. Generalmente, al principio de cada vía existe una reacción exergónica irreversible que permite que el intermediario que produce continúe a lo largo de la vía.
3. Todas las vías metabólicas están reguladas. La regulación tiene el objeto de ejercer un control enzimático sobre el flujo de metabolitos a través

de una vía metabólica. En toda vía existe una reacción enzimática que funciona tan lentamente que impide que sus sustratos y productos se equilibren. Dado que la

mayoría de las otras enzimas funcionan próximas al equilibrio, esta reacción enzimática es la que determina la velocidad de la vía, y por lo tanto, su regulación. Esta es la forma más eficaz de ejercer el control porque evita la síntesis innecesaria de metabolitos de la vía.

Una manera de controlar la actividad de la enzima limitante es regulando su actividad catalítica, mediante interacciones alostéricas (como en la inhibición por producto) o por modificaciones covalentes. Otra manera sería controlando la velocidad de la síntesis de enzimas particulares.

El hecho de que las vías de síntesis y degradación de moléculas sean diferentes, contribuye también a la regulación metabólica.

4. En las células eucarióticas, la compartimentalización permite la localización específica de las vías metabólicas y su control.

## 2.-CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos, o sacáridos, son las biomoléculas más abundantes en la naturaleza y son indispensables en los organismos vivos. Se les llama carbohidratos debido a que su estructura química semeja formas hidratadas del carbono y se representan con la fórmula  $(CH_2O)_n$ ; químicamente se definen como derivados aldehídicos y cetónicos de alcoholes polivalentes y no puede haber menos de 3C para constituir un carbohidrato.

Se clasifican según el número de unidades sacáridas en monosacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos, según el número de carbonos en su molécula, se dividen en triosas (3C), tetrasas (4C), pentosas (5C), hexosas (6C), heptosas (7C), etcétera. Según su función carbonilo pueden ser aldosas o cetosas, por ejemplo, la glucosa es una aldohexosa y la fructosa una cetoheptosa. Los polisacáridos son carbohidratos que resultan de la unión de varias moléculas de monosacáridos. Este grupo se puede clasificar en disacáridos, con dos unidades monosacáridas, como la sacarosa, la maltosa, la lactosa y la celobiosa; oligosacáridos, con 3 a 10 unidades de monosacárido y polisacáridos, con más de 10 unidades de

monosacárido, que tienen alto peso molecular, como el almidón, el glucógeno y la celulosa.

Transportador	Distribuidor	Propiedades
GLUT 1	Eritrocitos, barrera hematoencefálica, placenta, retina, riñón y cerebro.	Ingreso basal de glucosa. Km 1.6 mM.
GLUT 2	Hígado, páncreas e intestino delgado	Transportador de glucosa, galactosa y fructosa. Sensor de glucosa en páncreas. Km de 15 mM o más.
GLUT 3	Cerebro, placenta, hígado, riñón y corazón.	Ingreso basal de glucosa. Km 2 mM. Transportador de glucosa y galactosa
GLUT 4	Tejido adiposo, corazón y músculo esquelético.	Dependiente de insulina. Km de 5 mM.
GLUT 5	Yeyuno, espermatozoides, riñón, cerebro.	Transportador de fructosa.

Los carbohidratos provienen de la dieta; se encuentran en los cereales (maíz, trigo y arroz), hortalizas (bulbos, raíces, verduras), legumbres (frijol, garbanzo, lenteja), tubérculos (papa, yuca), frutas, leche y productos lácteos, así como en algunos productos procesados como dulces, jaleas, mermeladas y pastas. Los carbohidratos son los componentes más abundantes de la dieta del humano, aportan aproximadamente el 55% de las calorías de la dieta.

Los carbohidratos tienen diversas funciones en el organismo son: a) La fuente principal de energía (1 g de carbohidrato produce 4 Cal); b) Precursores en la bio-síntesis de ácidos grasos y algunos aminoácidos; c) Constituyentes de moléculas complejas importantes como glucolípidos, glucoproteínas, ácidos nucleicos y nucleótidos.

## ESTRUCTURA DE LOS MONOSACÁRIDOS

Los alcoholes y los aldehídos o cetonas pueden reaccionar entre sí para producir hemiacetales y hemicetales. Cuando existen estos grupos hidroxilo y carbonilo en una misma molécula provocan que la molécula se ciclice. La naturaleza del ciclo depende de la posición del grupo hidroxilo que participa. Si el compuesto es una aldosa y tiene 5 carbonos será el C 4 el que reaccione y el anillo formado es un furano. De la misma manera, si el compuesto tiene 6 carbonos, será el C 5 el que reaccione y se formará un anillo de pirano. La transferencia de un protón del grupo hidroxilo al oxígeno del carbonilo ocasiona un nuevo carbón asimétrico. La posición del hidroxilo en este carbono determina dos formas isoméricas alfa o beta que, en solución, guardan un equilibrio con la forma lineal (forma carbonilo).

## GLUCÓSIDOS

Son los compuestos resultantes de la unión covalente de azúcares con varias moléculas. Se clasifican en homoglicósidos, si se unen exclusivamente carbohidratos (osas) mediante enlaces glucosídicos, y en heteroglicósidos, si forman enlaces con otro tipo de moléculas como proteínas o lípidos. Los homoglicósidos pueden clasificarse según el número de unidades en: disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los polisacáridos, también llamados poliósidos, pueden clasificarse en homopolisacáridos, que pueden ser de reserva, como el almidón, el glucógeno, la inulina, o estructurales, como la celulosa, la lignina y la quitina, y en heteropolisacáridos, que pueden dividirse en no nitrogenados, como las pectinas, el agar y la goma arábiga, o nitrogenados, como los glucosaminoglucanos.

Muchos de los alimentos que se ingieren a diario contienen almidón y glucógeno que son polisacáridos de reserva. El almidón forma gránulos en las células de las plantas y el glucógeno se encuentra en el citoplasma de las células musculares y hepáticas de los animales. El azúcar que constituye la unidad estructural de estas moléculas es la glucosa, la cual se encuentra formando dos tipos de enlaces: los enlaces  $\alpha$  1-4 se encuentran en la amilosa (formada por unidades de maltosa) y el enlace  $\alpha$  1-6 conecta a la

estructura llamada amilopectina. La estructura del glucógeno es similar a la del almidón, pero con una mayor cantidad de ramificaciones. El almidón está compuesto por 3 000 residuos de glucosa y tiene un peso molecular cercano a  $5 \times 10^5$ ; el glucógeno tiene un peso molecular de 1 a  $4 \times 10^6$ . La degradación de estos polisacáridos es diferente si se realiza en el aparato digestivo o en el interior de las células; es hidrolítico en el primer caso y fosforolítico en las células.

Durante la digestión, la amilosa es hidrolizada por una alfa amilasa, la cual rompe los enlaces  $\alpha$  1-4. Los productos primarios son oligosacáridos con 6 a 7 residuos; los últimos productos son una mezcla de maltosa y glucosa. En la cadena de amilopectina, la alfa amilasa rompe los enlaces  $\alpha$  1-4, pero no los  $\alpha$  1-6; éstos son hidrolizados por una  $\alpha$  1-6 glucosidasa. El resultado de la acción de las dos enzimas es la hidrólisis de la amilopectina hasta glucosa y maltosa.

Existe también otra enzima llamada maltasa (alfa amilasa), que hidroliza los enlaces  $\alpha$  1-4 glucosídicos de la malto-sa; la acción de esta enzima facilita la formación de la dextrina límite. Esta partícula está constituida por moléculas de amilopectina que tienen una gran cantidad de ramificaciones. Las dextrinas límite son degradadas por la  $\alpha$  1-6 glucosidasa y se obtiene una mezcla de glucosa y maltosa.

Los productos de la digestión de los carbohidratos se absorben en el intestino a través de GLUT2 y GLUT5 o por cotransporte con sodio y pasan a la circulación portal.

## 3.-METABOLISMO ENERGÉTICO

Las células de los organismos heterótrofos obtienen su energía de reacciones oxidativas en las cuales los electrones de un sustrato donador se transfieren a un aceptor. Bajo condiciones anaeróbicas, un compuesto orgánico sirve como aceptor de electrones; bajo condiciones aeróbicas, el oxígeno es el aceptor final.

Los sustratos preferidos por la célula para obtener la energía requerida para sus funciones vitales son los azúcares (mono, di y homopolisacáridos). Asimismo, las células son capaces de usarlos también como intermediarios para la formación de otros compuestos importantes en biología.

La glucólisis es la vía metabólica por la que se degrada la glucosa; filogenéticamente, es la vía más antigua y consiste en una secuencia de reacciones enzimáticas en las cuales se degrada la glucosa. La glucólisis puede dividirse en dos fases: una de activación y una oxidativa. La fase de activación consiste en la transferencia de fosfatos a la glucosa con gasto de dos ATP y en su ruptura en dos moléculas de gliceraldehído 3 fosfato; en la fase oxidativa, el gliceraldehído 3 fosfato es transformado en piruvato con la obtención de cuatro moléculas de ATP por fosforilación a nivel de sustrato.

Las reacciones de la glucólisis ocurren en el citoplasma y no están ligadas a estructuras celulares.

El producto de la vía es el piruvato, el cual puede seguir diversos destinos según las condiciones de la célula. En condiciones anaeróbicas, el piruvato se transforma en lactato por acción de la lactato deshidrogenasa en presencia del  $\text{NADH} + \text{H}^+$  obtenido en la oxidación del gliceraldehído 3 fosfato. En las levaduras, el piruvato se descarboxila a acetaldehído y se forma etanol por la reducción del acetaldehído con el NADH mediante la acción de la deshidrogenasa alcohólica. Bajo condiciones aerobias, el piruvato se descarboxila en las mitocondrias y produce NADH y acetilCoA, la cual es el sustrato principal del ciclo de Krebs.

Sólo una pequeña parte de la energía almacenada en la molécula de la glucosa se libera en la glucólisis (2 ATP netos por cada molécula de glucosa). En estricta anaerobiosis, la glucólisis es la única fuente de energía de la célula.

La regulación de la vía glucolítica se realiza a nivel de la transformación de la fructosa 6 fosfato en

fructosa 1,6 bisfosfato. Esta reacción es catalizada por la fosfofructocinasa I, la que es una enzima alostérica cuya actividad se estimula por AMP, ADP y fructosa 2,6 bisfosfato y se inhibe por ATP y citrato. La deshidrogenasa de gliceraldehído 3 fosfato también desempeña un papel importante en la regulación de la glucólisis.

La respiración celular es una secuencia de reacciones de óxidorreducción de la que los organismos obtienen energía para formar compuestos como el ATP. La base molecular de este proceso es una oxidación, paso a paso, de los compuestos orgánicos hasta  $\text{CO}_2$  y la transferencia de hidrógeno (protones más electrones) al oxígeno con la formación de una molécula de agua. La energía obtenida por la respiración celular es, por tanto, una parte de la energía liberada en la reacción del hidrógeno con el oxígeno. Todos estos procesos se realizan en las mitocondrias de los organismos eucariotes y en las membranas plasmáticas de los organismos procariotes.

Las mitocondrias son orgánulos relativamente autónomos cuya estructura está adaptada a su función principal, es decir, a la conversión de la energía de oxidación en aquella de los compuestos de reserva con un alto contenido energético. Una mitocondria está constituida por dos membranas separadas: una membrana externa lisa y muy permeable y una membrana interna con plegamientos irregulares (crestas) y selectivamente permeable. El interior de la mitocondria está constituido por la matriz. Cada compartimiento tiene un contenido característico de enzimas y moléculas de acuerdo con los procesos que se realizan en ellos. La cadena de transporte de electrones (cadena respiratoria) y la generación de enlaces de alta energía asociada a esta transferencia de electrones tiene lugar en la membrana interna. La mitocondria contiene además un DNA circular específico y todos los componentes necesarios para la síntesis de proteínas, lo que podría indicar que el origen de la mitocondria pudo ser una bacteria que estableció una simbiosis con una célula eucariótica a la que infectó.

En los organismos aeróbicos el piruvato, producto de la glucólisis, entra a la mitocondria para ser oxidado a acetil CoA y CO<sub>2</sub>. Este proceso oxidativo irreversible es realizado por la piruvato deshidrogenasa, un complejo de tres enzimas y cinco diferentes coenzimas o grupos prostéticos: pirofosfato de tiamina (TPP), lipoato, flavin adenin dinucleótido (FAD), CoA y nicotin adenin dinucleótido (NAD).

En la primera reacción se forma CO<sub>2</sub> y un grupo α-hidroxietilo derivado del piruvato, el cual se une covalentemente al TPP de la piruvato deshidrogenasa (E1). En el siguiente paso el grupo α-hidroxietilo es oxidado a acetato y se transfiere al lipoato unido covalentemente a la dihidrolipoil transacetilasa (E2). El TPP se regenera en este paso.

La siguiente reacción consiste en transferir el grupo acetato del lipoato a la CoA para formar acetil CoA. El lipoato permanece reducido. Los siguientes pasos tienen como finalidad regenerar la forma oxidada de este lipoato. Para ello, el FAD unido a la dihidrolipoil deshidrogenasa (E3) remueve los electrones del lipoato y los entrega al NAD<sup>+</sup> reduciéndolo a NADH + H<sup>+</sup>.

La actividad del complejo de la piruvato deshidrogenasa es regulada por tres mecanismos:

1. Inhibición por producto: tanto el acetil CoA como el NADH + H<sup>+</sup> actúan como moduladores alostéricos negativos.
2. Por disponibilidad de sus sustratos: deben existir concentraciones adecuadas de piruvato, CoA y NAD<sup>+</sup>.
3. Por modificación covalente: la piruvato deshidrogenasa (E1) existe en dos formas: una fosforilada (inactiva) y otra desfosforilada, que es activa. La fosforilación es llevada a cabo por una proteína cinasa dependiente de Mg<sup>2+</sup> y ATP, mientras que la desfosforilación la realiza una fosfoproteína fosfatasa, cuya actividad es estimulada por altas concentraciones de Ca<sup>2+</sup>. Este último evento ocurre cuando existe una concentración elevada de ADP, el cual es indicador de carencia energética.

Los individuos que tienen deficiencia de tiamina, como ocurre en el beriberi, presentan problemas a nivel neurológico debido a que el cerebro obtiene toda su energía por oxidación aeróbica de la glucosa.

La mayor parte del ATP generado en los organismos aerobios se produce en el proceso de la fosforilación oxidativa en el cual, los hidrógenos extraídos de los metabolitos mediante las reacciones de deshidrogenación son cedidos a la cadena respiratoria, en donde se genera el potencial protonmotriz que sirve de fuerza impulsora para la síntesis del ATP. La mayoría de las deshidrogenaciones de los metabolitos se llevan a cabo en una secuencia cíclica de reacciones conocida como ciclo de Krebs, ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarbóxicos. El ciclo de Krebs se lleva a cabo por enzimas solubles (a excepción de la succinato deshidrogenasa que es parte integral de la membrana interna) de la matriz mitocondrial y durante él se oxidan los residuos de acetato activo (acetil CoA) provenientes de la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos, hasta CO<sub>2</sub> y coenzimas reducidas. Aproximadamente dos tercios del ATP utilizado por los organismos aerobios se genera como resultado de la oxidación de los restos de acetato en el ciclo de Krebs.

El ciclo de Krebs es una vía de confluencia para el catabolismo celular (fig. III.1) que, en una secuencia de ocho reacciones oxida al residuo acetato de la acetil CoA conforme a la ecuación siguiente:



En el ciclo ocurren dos reacciones en las que se desprende CO<sub>2</sub> y hay cuatro deshidrogenaciones, de las cuales tres donan sus hidrógenos al NAD<sup>+</sup> y una al FAD.

a) La *oxidación de la Acetil CoA* derivada de la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos es la función primaria del ciclo de Krebs, el cual la procesa en una serie de reacciones que se inician y terminan con el oxaloacetato; en cada vuelta del ciclo de Krebs se produce un GTP por fosforilación a nivel del sustrato y se liberan cuatro pares de

hidrógeno que alimentan la cadena respiratoria con la producción de 9 ATP en la fosforilación oxidativa. Además de su papel central en la oxidación de la acetilCoA, el ciclo de Krebs participa en los siguientes procesos metabólicos:

b) *Gluconeogénesis*. Reúne numerosos sustratos que se convierten en oxaloacetato. Este compuesto sale de la mitocondria en forma de malato, citrato o aspartato y se transforma en el citosol, primero en fosfoenol piruvato y después en glucosa.

c) *Biosíntesis de los ácidos grasos*. Aporta la molécula de citrato que, al salir de la mitocondria, es transformada con gasto de un ATP por la citrato liasa en oxaloacetato y acetil CoA, que es el alimentador inicial de la biosíntesis de los ácidos grasos. El oxaloacetato se reduce a malato, el cual es oxidado por la enzima málica para la producción de NADPH, coenzima indispensable en la biosíntesis de los ácidos grasos.

d) *Interconversión de Aminoácidos*. Numerosos aminoácidos entregan sus carbonos al ciclo de Krebs al transformarse, por reacciones sucesivas, en alguno de los metabolitos clave del ciclo:  $\alpha$ -cetogluturato, succinil-CoA, fumarato y oxaloacetato; una vez ahí, mediante las reacciones del ciclo de Krebs, pueden transformarse en algún otro aminoácido que se derive de otro intermediario del ciclo.

e) *Biosíntesis de Purinas y Pirimidinas*. El ciclo de Krebs alimenta la síntesis de bases púricas y pirimídicas aportando, de manera indirecta, aspartato y glutamina.

f) *Biosíntesis de Porfirinas*. El ciclo de Krebs aporta uno de los sustratos iniciales necesarios para que se lleve a cabo esta vía: la succinil-CoA.

**REGULACIÓN DEL CICLO DE KREBS.**

Por el hecho de que entrega NADH y FAD<sub>2</sub> a la cadena respiratoria y recibe de ella las mismas

coenzimas oxidadas, el ciclo de Krebs funciona bajo el control de la cadena respiratoria y depende en última instancia de la fosforilación oxidativa. Sin embargo, el ciclo de Krebs responde a moduladores

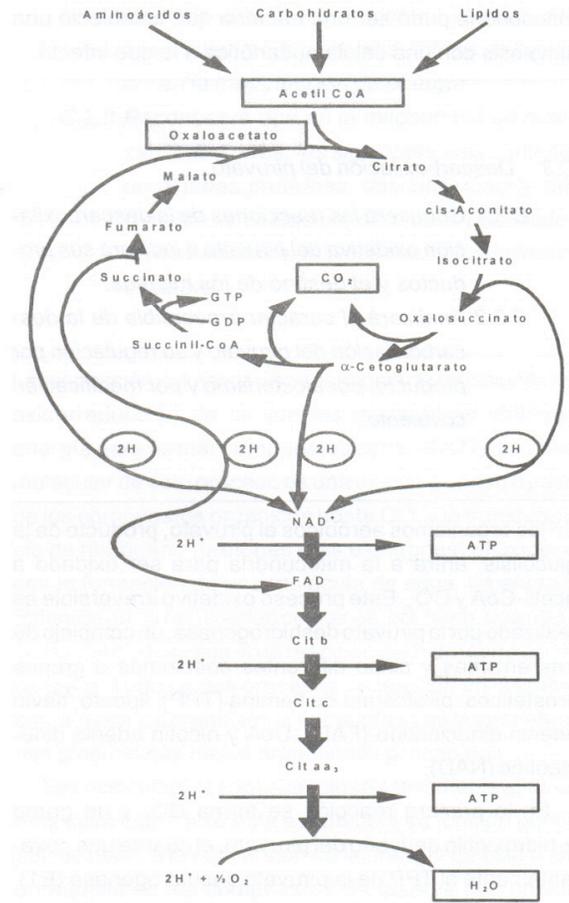


Fig. III.1. Relación del ciclo de Krebs con el catabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas.

alostéricos generados en el propio ciclo y también en otras vías del metabolismo; son moduladores negativos NADH, ATP, citrato, succinilCoA y oxaloacetato y moduladores positivos ADPy Ca<sup>2+</sup>. Las enzimas citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa y  $\alpha$ -cetogluturato deshidrogenasa son las enzimas reguladoras del ciclo.

Mientras que el CO<sub>2</sub> se forma por la oxidación del sustrato durante el ciclo del ácido cítrico en la matriz mitocondrial, la secuencia de las reacciones que participan en la transferencia de hidrógenos y electrones (la cadena respiratoria) se localiza en la

membrana interna de la mitocondria. La cadena se puede dividir en cuatro complejos: el complejo I o NADH deshidrogenasa (que cede sus electrones a la coenzima Q); el complejo II o las deshidrogenasas que ceden sus electrones al  $\text{FADH}_2$  (como la succinato deshidrogenasa) y a través de él a la misma coenzima Q; el complejo III o citocromo c reductasa, y el complejo IV o citocromo c oxidasa, que transfiere los electrones al oxígeno, que es el aceptor final.

Los componentes de la cadena respiratoria están arreglados de acuerdo con potenciales de oxidorreducción crecientes (de valores negativos a positivos). La energía liberada en el curso de la transferencia de hidrógeno y electrones a través de la cadena respiratoria se utiliza para la formación de ATP por la llamada fosforilación oxidativa. La energía requerida para la formación de un ATP a partir de un ADP es equivalente a una diferencia de potencial redox de 0.15 V. En promedio, la oxidación de una molécula de NADH da origen a 2.5 moléculas de ATP, mientras que se forman 1.5 moléculas de ATP cuando se oxida  $\text{FADH}_2$  vía succinato (no involucra NADH). El rendimiento de energía de la fosforilación oxidativa es alrededor de 40% del valor teórico de la energía liberada en la reacción del hidrógeno con el oxígeno.

El transporte de los electrones entre los diferentes componentes de la cadena respiratoria puede ser inhibido por diversos compuestos, entre ellos: los barbituratos, la rotenona, la antimicina, el CO, las azidas, el  $\text{H}_2\text{S}$  y el cianuro, los que actúan en distintos sitios de la cadena respiratoria.

Las reacciones de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa están acopladas; si se desacoplan, la energía se pierde como calor y no hay síntesis de ATP. Pueden desacoplarse in vitro por 2,4-dinitrofenol o compuestos similares e, in vivo, por la termogenina presente en tejido adiposo pardo, el que es abundante en recién nacidos.

La membrana interna de la mitocondria debe estar intacta para generar ATP. Las moléculas de ATP formadas en el interior de la mitocondria son

translocadas al exterior en intercambio con moléculas de ADP presentes fuera de la mitocondria por medio de un acarreador altamente específico presente en la membrana mitocondrial: la translocasa de los adenin-nucleótidos.

Hay otro mecanismo de síntesis de ATP no asociado al transporte de electrones en el que los donadores de la energía y del fosfato final del ATP son compuestos con enlaces fosfato de alta energía. Este tipo de fosforilación se conoce como fosforilación a nivel de sustrato.

Los sustratos metabolizados dentro de la mitocondria son transportados al exterior por mecanismos específicos (transporte de ácidos dicarboxílicos, de aminoácidos, de iones, etcétera). Este transporte, como el del ATP, se convierte en uno de los factores de control en la función mitocondrial.

Dado que la membrana interna de la mitocondria es impermeable para el  $\text{NAD}^+$  y el NADH y a que una forma eficiente, energéticamente hablando, de reoxidar al NADH que se obtiene en la glucólisis es un proceso mitocondrial, existen lanzaderas que son sistemas de transporte de los hidrógenos citoplasmáticos (equivalentes reductores) a través de la membrana mitocondrial. Las dos lanzaderas más importantes son la del glicerol fosfato y la del malato.

Un gran número de enfermedades, como el Parkinson, aterosclerosis, enfisema pulmonar y cáncer, entre otras, tienen su origen en una producción excesiva o anormal de derivados del oxígeno, químicamente muy activos: los radicales libres.

Un radical libre es cualquier especie química, molécula o átomo, portadora de uno o más electrones desapareados. Se llama electrón desapareado al electrón que se encuentra solo en un orbital. La presencia de un electrón desapareado hace que los radicales libres sean muy reactivos, pues buscan con avidez completar su par electrónico. No obstante, existen radicales libres relativamente estables, como las moléculas con estructuras resonantes (con múltiples enlaces

dobles), que permiten la deslocalización del electrón desapareado. La colocación de un punto, generalmente al final de la fórmula química, indica el carácter de radical libre de una molécula ( $\bullet$ ).

Los radicales libres son capaces de alterar reversible o irreversiblemente compuestos bioquímicos de todo tipo y pueden modificar en forma importante su estructura y, como consecuencia, alterar la capacidad funcional de las sustancias atacadas. El principal blanco de los radicales libres son las insaturaciones de los lípidos de membrana en los cuales provocan una peroxidación. La presencia de lípidos peroxidados en las membranas biológicas disminuye su fluidez, lo que se traduce en alteraciones de la permeabilidad a sustancias o, incluso, su integridad, lo que provoca la lisis celular. Los radicales libres también son capaces de inactivar o destruir enzimas y otras proteínas y atacar a los ácidos nucleicos. El daño al DNA puede causar mutaciones y dar origen a cánceres. La acción sobre los carbohidratos puede alterar su función como receptores (de hormonas o neurotransmisores). Es decir, los radicales libres influyen sobre actividades celulares tanto a nivel de la membrana como en las vías metabólicas y en la expresión genética.

Una de las características más importantes de las reacciones de los radicales libres es que se forman por reacciones en cadena; esto significa que un radical libre puede dar lugar a la formación de otro, de manera que este mecanismo permite que la actividad se propague y que el daño se generalice.

### LOS RADICALES DERIVADOS DEL OXÍGENO

Las especies reactivas del oxígeno son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el hidroxilo y el singulete de oxígeno.

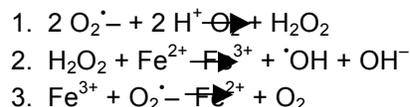
**Anión superóxido.** La transformación del oxígeno en radical libre puede efectuarse cuando el oxígeno acepta un electrón que transforma este elemento en un radical con carga negativa, el anión superóxido:  $O_2^{\bullet-}$ .

Probablemente la fuente más importante de producción de radicales superóxido sea el estallido

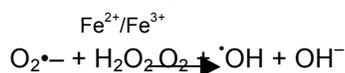
respiratorio (aumento súbito del consumo de oxígeno) de los macrófagos y de los leucocitos polimorfonucleares en respuesta a una señal inmunitaria provocada por alguna infección.

**Peróxido de hidrógeno.** El anión superóxido sufre espontáneamente, o bajo la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), una reacción de dismutación: dos radicales libres reaccionan entre sí, uno de ellos perdiendo electrones y el otro ganándolos. Esta dismutación produce agua oxigenada, que no es realmente un radical libre, pero este compuesto por captación de un electrón y de un protón, puede dar lugar a la formación de especies oxigenadas muy activas, especialmente al radical hidroxilo.

**Radical hidroxilo.** El  $\bullet OH$  es un oxidante extremadamente reactivo que interactúa con casi todas las moléculas a velocidades sólo limitadas por su difusión. El radical hidroxilo es formado por la ruptura de una molécula de agua bajo el efecto de una radiación gamma o en el ciclo de Haber-Weiss:



el ciclo global se expresa:



1. La dismutación del radical anión superóxido produce peróxido de hidrógeno.
2. El peróxido de hidrógeno se descompone en el radical hidroxilo con intervención del  $Fe^{2+}$  (reacción de Fenton).
3. La regeneración del  $Fe^{2+}$  por medio del radical anión superóxido.

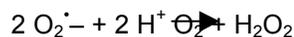
**Singulete de oxígeno.** El singulete de oxígeno, representado gráficamente como  $^1O_2^*$ , se caracteriza por tener un par electrónico antiparalelo en su última órbita; no es realmente un radical, sin embargo, es incluido aquí por ser un derivado muy oxidante del oxígeno. Se forma principalmente en reacciones en las que los pigmentos biológicos,

como el retinal, las flavinas o las porfirinas, son expuestos a la luz en presencia de oxígeno.

### ANTIOXIDANTES

Para controlar los efectos devastadores de los radicales libres existen mecanismos protectores. Estos sistemas tienen la función de neutralizar el efecto de los radicales libres o evitar su aparición. El nivel primario de defensa lo constituyen tres enzimas especializadas.

1. Superóxido dismutasa. Existe en las mitocondrias (SOD de  $Mn^{2+}$ ) y en el citosol (SOD de  $Cu^{2+}$  y de  $Zn^{2+}$ ). Cataliza la dismutación del radical anión superóxido para dar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno:

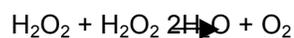


2. Glutatión peroxidasa. Existe principalmente en el citosol y contiene selenio. Cataliza la siguiente reacción:



(donde: GSH-glutatión reducido y GSSG-glutatión oxidado).

3. Catalasa. Existe principalmente en los peroxisomas y su función es destruir el agua oxigenada por dismutación:



Otro tipo de protección contra los radicales libres es la que prestan unas sustancias capaces de neutralizar a los radicales o limitar su reactividad, llamadas atrapadoras. Entre ellas cabe mencionar:

Vitamina E (tocoferol) y beta caroteno. Reaccionan con los radicales peróxido y suspenden la cadena de reacciones radicalares. Son liposolubles y por eso pueden proteger las membranas.

Vitamina C. Reacciona directamente con los superóxidos, con el singulete de oxígeno y con el radical hidroxilo; regenera la vitamina E al reaccionar con el radical tocoferilo y lo convierte en radical ascorbilo, también muy estable.

Algunos minerales como el selenio, el cinc, el cobre y el manganeso, constituyentes de las enzimas antes mencionadas; proteínas y péptidos como el glutatión, la albúmina, la ceruloplasmina, la ferritina, la transferrina, etcétera y, por último, sustancias quelantes que evitan que el hierro, cobre y otros metales de transición catalicen reacciones de oxidación.

### 4.-MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN

El sistema nervioso, el endocrino y el inmunitario, son los tres principales sistemas de señalización del organismo que emplean mensajeros químicos. Aunque existen determinados mensajeros como el calcio, que funciona como mensajero intracelular en la activación de células o que funciona como mensajero en las sinapsis neuronales, que es difícil colocarlos en una sola de estas tres categorías.

El Sistema nervioso, secreta dos tipos de mensajeros, neurotransmisores que son moléculas de bajo peso molecular contienen nitrógeno y que pueden ser aminoácidos o derivados de ellos un ejemplo de estas moléculas son la acetilcolina y el  $\gamma$ -aminobutirato. Los otros mensajeros para este sistema son neuropeptidos pequeños entre 4 a 35 aminoácidos, que son secretados por las neuronas.

En cuanto al sistema endocrino, sus mensajeros son las hormonas que se definen como aquellos compuestos secretados por células específicas situadas en glándulas endocrinas, que llegan a las células diana transportadas por la sangre, un claro ejemplo es la insulina secretada por las células  $\beta$  del páncreas.

En el sistema inmunitario, los mensajeros de este sistema, se denominan citocinas, son proteínas pequeñas. Regulan una red de respuestas diseñadas para eliminar organismos invasores. Las diferentes clases de citocinas como las interleucinas, factores de necrosis tumoral, interferones y factores estimuladores de colonias son secretadas por células del sistema inmune, activando la transcripción de genes que codifican proteínas de la respuesta inmunitaria.

Otras moléculas que pueden actuar como mensajero desencadenando una respuesta en el

organismo aunque no sean secretadas por los sistemas anteriormente mencionados se encuentran los eicosanoides, que incluyen las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos, que controlan la función celular en respuesta a una lesión. Proceden todos del ácido araquidónico.

Los factores de proliferación, son polipéptidos que actúan mediante estimulación de la proliferación celular.

Todos los mensajeros químicos tienen su propio receptor específico, el cual generalmente no unirá ningún otro mensajero. La mayoría de los receptores pertenecen a dos categorías generales: intracelulares o de membrana plasmática. Los mensajeros que utilizan receptores intracelulares deben ser hidrófobos capaces de atravesar la membrana plasmática llegando así al interior de la célula, no así las moléculas polares como hormonas peptídicas, las citocinas y las catecolaminas que deben unirse a receptores ya que no pueden atravesar la membrana plasmática.

Las rutas de transducción de señales de los receptores de la membrana plasmática tienen dos tipos de efectos sobre la célula que son:

a) Efectos rápidos e inmediatos sobre la concentración celular de iones o activación/inhibición de las enzimas.

b) Variaciones más lentas de la velocidad de la expresión de los genes de un conjunto específico de proteínas.

Para que una célula responda al estímulo dado por su efector o molécula señalizadora cuenta con diferentes tipos de receptores entre los que se encuentran los de la membrana plasmática, que son proteínas caracterizadas por tener un dominio extracelular que une al mensajero, uno o varios dominios que se expanden por la membrana, que son hélices  $\alpha$  y un dominio intracelular que inicia la transducción de la señal, cuando se une el ligando al dominio extracelular del receptor presenta una modificación conformacional que comunica al dominio intracelular a través de la hélice rígida del dominio transmembranal, activando al dominio intracelular y de esta manera inicia la ruta de transducción de señales intracelulares.

Debido a la presencia de diferentes moduladores los receptores de membrana plasmática se agrupan en las categorías de receptores canales iónicos, receptores que son quinasas o unen quinasas y que actúan a través de segundos mensajeros.

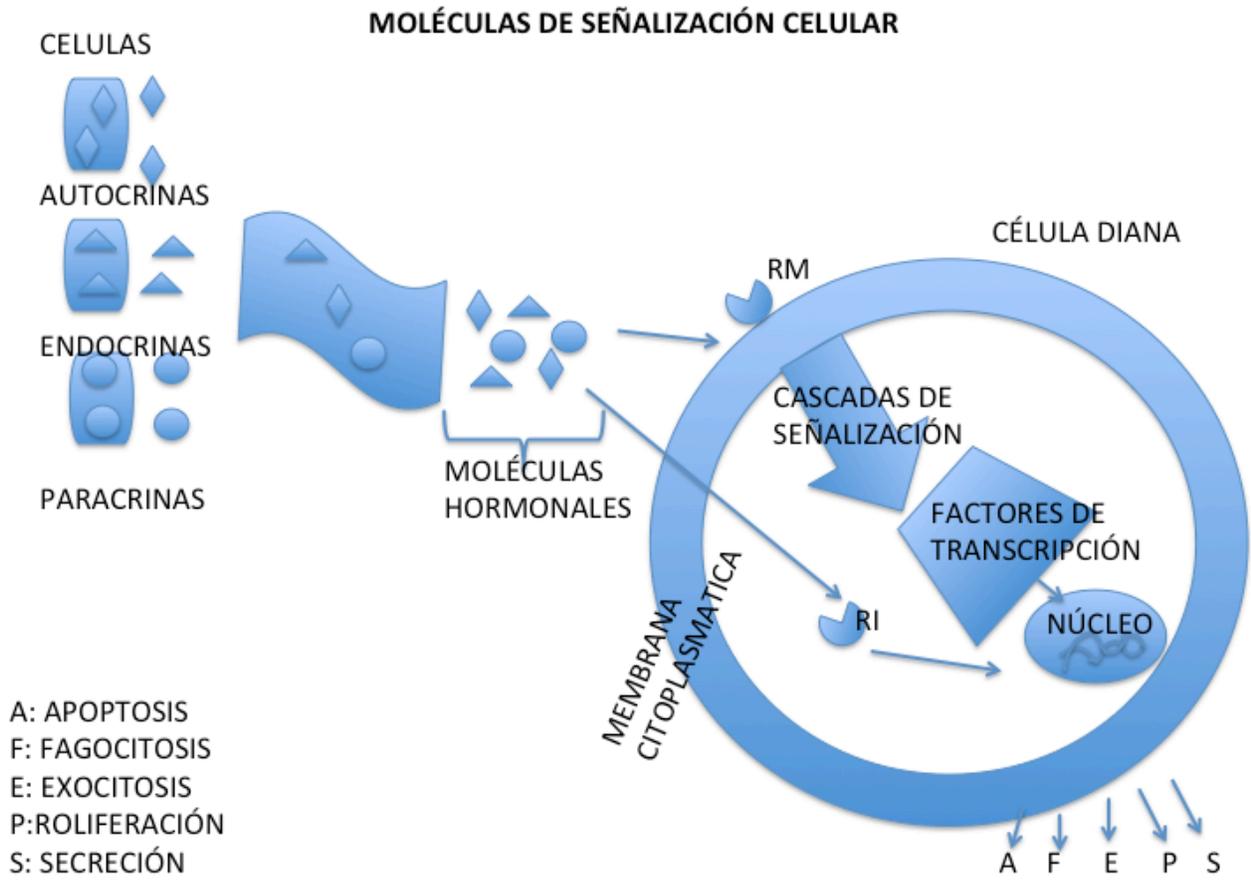
**Receptores canales iónicos:** tiene una estructura semejante al receptor nicotínico de acetilcolina. La transducción de señal se da como resultado por la variación conformacional cuando se une al ligando. En su gran mayoría las moléculas pequeñas de neurotransmisores y neuropeptidos utilizan estos receptores.

**Receptores que son cinasas o unen a cinasas.** Presentan una característica común que es el dominio intracelular del receptor es una quinasa que se activa cuando se une el mensajero al dominio extracelular. La cinasa del receptor fosforila un residuo de aminoácido del receptor, es decir se autofosforila o de una proteína asociada. El mensaje se propaga por las proteínas transductoras de la señal que se unen al complejo mensajero-receptor activado.

**Receptores heptahélices,** como su nombre lo dice poseen siete hélices  $\alpha$  que atraviesan la membrana y es el tipo más común de receptores. Actúan utilizando segundos mensajeros, que son moléculas no proteicas como el AMPc, el diacilglicerol o el inositol trifosfato. Los segundos mensajeros continúan con transmisión del primer mensaje como la hormona, citoquina o neurotransmisor además de que se encuentran en bajas concentraciones para que con ello su mensaje sea rápido.

**Receptores hormonales:** Son mensajeros químicos que ayudan a integrar las respuestas de las células del organismo, son sintetizadas por tejidos específicos y distribuidas al torrente sanguíneo, ya que de esa manera son transportadas a las células donde se requieran.

**Esquema**



## 5.-OTRAS VÍAS METABÓLICAS DE LOS CARBOHIDRATOS

Al finalizar esta subunidad, el alumno podrá analizar en forma integral el metabolismo de los carbohidratos, identificar su papel como combustible celular y como generador de intermediarios de otras vías metabólicas y podrá explicar en forma integral la regulación de la glucemia.

Es el proceso por el cual se sintetiza la glucosa a partir de diversos sustratos como son:

- a) Lactato o piruvato.
- b) Aminoácidos glucogénicos (Ala, Arg, Cys, Asp, Glu, Gly, His, Met, Pro, Ser, Tre, Val).
- c) Cualquier otro intermediario que pueda ser metabolizado vía piruvato (o que entre al ciclo de Krebs).

La gluconeogénesis no puede verse como la vía en sentido contrario de la glucólisis ya que algunas de las reacciones de esta última son muy exergónicas, lo que las hace irreversibles. Tal es el caso de las reacciones catalizadas por la piruvatocinasa (transforma al fosfoenolpiruvato en piruvato), la fosfofructocinasa (paso de fructosa 6fosfato a fructosa 1,6 bisfosfato) y la hexocinasa (glucosa a glucosa 6 fosfato). Estas reacciones se evitan por medio de las siguientes alternativas:

1. La formación del fosfoenolpiruvato a partir de oxaloacetato. El oxaloacetato se forma en la mitocondria por carboxilación del piruvato con una enzima dependiente de biotina y ATP llamada carboxilasa del piruvato. También se puede obtener el oxaloacetato en el citoplasma por carboxilación del piruvato y reducción con NADPH para formar el malato, el cual se deshidrogena para producir el oxaloacetato.

Estas reacciones son llevadas a cabo por la enzima málica. La fosforilación del oxaloacetato con GTP o ITP y su descarboxilación simultánea por la fosfoenolpiruvato carboxicinas producen el fosfoenolpiruvato.

2. La degradación hidrolítica de la fructosa 1,6 bisfosfato a fructosa 6 fosfato catalizada por la fructosa 1,6 bisfosfatasa.
3. La degradación de la glucosa 6fosfato a glucosa por la glucosa 6 fosfatasa.

La síntesis de una molécula de glucosa a partir de dos moléculas del piruvato requiere seis moléculas de ATP.

La posibilidad de que la gluconeogénesis proceda completamente (es decir, que su producto final sea glucosa) depende de la presencia de todas las enzimas clave en un tejido determinado. Se lleva a cabo con facilidad en el hígado y en los riñones; no ocurre en el cerebro ni en el músculo esquelético ya que la glucosa 6 fosfatasa se encuentra ausente en estos tejidos. Es por esto que el producto de la degradación del glucógeno muscular (glucosa 6 fosfato) no puede servir como una fuente para mantener el nivel de la glucosa sanguínea. En el músculo, el glucógeno se degrada hasta lactato que sale a la circulación sanguínea y se transfiere al hígado donde se transforma en glucógeno hepático o en glucosa libre por la vía de la gluconeogénesis. Esta contribución indirecta del lactato del músculo a la glucosa sanguínea se conoce como el ciclo de Cori. El músculo también contribuye a mantener la glucemia, al transformar el piruvato en alanina, la que sale a la circulación y en el hígado se convierte otra vez en piruvato para entrar a la gluconeogénesis.

El glucógeno es un polisacárido de reserva localizado en forma de gránulos en el citoplasma de las células; es osmóticamente inactivo y facilita la rápida y reversible transformación de la glucosa en una molécula de reserva, según la situación energética de la célula. La degradación del glucógeno se conoce como glucogenólisis y su síntesis como glucogénesis (glucogenogénesis).

La glucogenólisis se inicia por una ruptura fosforolítica del glucógeno por la fosforilasa. En presencia de fosfato, se separa una glucosa del glucógeno como glucosa 1 fosfato y ésta, por acción de una fosfoglucomutasa, se transforma en glucosa 6 fosfato, la que puede entrar entonces a la vía glucolítica. La energía invertida para la inclusión de una molécula de glucosa en el glucógeno y su regreso a glucosa 6fosfato es de dos moléculas de ATP.

La síntesis de glucógeno se inicia con la fosforilación de la glucosa para formar glucosa 6 fosfato que se transforma posteriormente en glucosa 1 fosfato por acción de la fosfoglucomutasa. Esta molécula reacciona con UTP por acción de la

UDP-glucosa pirofosforilasa y origina UDP-glucosa, que es el sustrato de la glucógeno sintetasa. Las numerosas ramificaciones presentes en el glucógeno son introducidas por la acción de una enzima ramificante.

La degradación y la síntesis de glucógeno están finamente reguladas por el AMP cíclico a través de la actividad de la proteína cinasa. En una secuencia de reacciones, este compuesto se involucra en la conversión de la fosforilasa b (inactiva, no fosforilada) en fosforilasa a (activa, fosforilada). Inversamente, la glucógeno sintetasa que está en su forma activa (no fosforilada o forma I) cambia a su estado inactivo (fosforilado o forma D). La concentración intracelular de AMP cíclico (AMPc) es regulada por las hormonas epinefrina y glucagon, las que aumentan la concentración de AMPc, y por la insulina, que la disminuye.

El ciclo de las pentosas es una vía colateral a la glucólisis. Presenta dos fases: una oxidativa y una no oxidativa. En la fase oxidativa, una molécula de glucosa es gradualmente degradada y se forma el NADPH; en la fase no oxidativa, la ribosa 5-fosfato y la eritrosa 4-fosfato son formadas por una interconversión de ésteres fosfóricos de azúcares de 3C, 4C, 5C, 6C y 7C.

En el sentido biosintético, las reacciones del ciclo de las pentosas sirven para la fijación de bióxido de carbono durante la fotosíntesis.

Algunos de los intermediarios de esta vía están relacionados con la glucólisis como la glucosa 6-fosfato, la fructosa 6-fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato. Las enzimas del ciclo de las pentosas, al igual que las de la glucólisis, son solubles en el citoplasma.

El ciclo de las pentosas no es una vía principal para el metabolismo de la glucosa y sus relaciones con la glucólisis pueden variar de acuerdo con el tipo de tejido y sus funciones biológicas.

Las reacciones de este ciclo no pueden ser utilizadas en la obtención de energía, ya que la oxidación del NADPH no forma ATP directamente.

El ciclo de las pentosas es importante en todas las células ya que es la principal forma de obtener el NADPH necesario en los procesos de síntesis (reductoras); asimismo, es la fuente de la ribosa 5-fosfato, la cual es precursora de la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos.

La concentración sanguínea de la glucosa o glucemia debe mantenerse dentro de límites muy estrechos debido a que algunas células como las nerviosas y los eritrocitos utilizan a la glucosa como única fuente de energía, lo que las hace especialmente sensibles a la disminución de la glucemia. Por otro lado, el aumento de las concentraciones de glucosa en sangre se asocia a problemas de hiperosmolaridad y a la aparición de proteínas glucosiladas que se asocian a algunas patologías, como la diabetes y sus consecuencias.

La concentración normal de glucosa en sangre en ayunas es de 80-100 mg/dl, y sus límites extremos son 65 y 120 mg/dl. Los niveles superiores a los valores normales se conocen como hiperglucemia, mientras que los inferiores se designan como hipoglucemia.

La glucosa sanguínea puede provenir de dos fuentes: una exógena (la dieta) y una endógena (glucogenólisis y gluconeogénesis hepática). En el primer caso, después de una comida que contenga carbohidratos, la glucemia se incrementa para volver en unas dos horas a los niveles basales. Si por el contrario, el individuo está en ayunas la glucosa desciende pero nunca por debajo de 60 mg/dl. Esto hace un contraste notable con las grandes variaciones en la concentración de los ácidos grasos que pueden aumentar hasta 10 veces y en el caso de los cuerpos cetónicos hasta 100 veces.

La principal regulación de la glucemia se realiza por hormonas. Las principales son: glucagon, insulina, epinefrina, gluco-corticoides y las hormonas tiroideas.

Cuando la concentración de glucosa disminuye, como en el ayuno, el páncreas secreta glucagón. El resultado neto es que en el hígado se detienen las vías de utilización de la glucosa (glucogénesis y glucólisis) y se activan las vías productoras de

glucosa (glucogenólisis y gluconeogénesis). Por otra parte, la disminución en el consumo de glucosa por los tejidos insulino-dependientes (músculo y tejido adiposo), causada por la disminución en los niveles de esta hormona, contribuye a preservar la glucosa para que pueda ser utilizada por el cerebro, ya que la glicemia inferior a los 60 mg/dl, provoca que este órgano no reciba las cantidades de glucosa suficientes para obtener la energía necesaria para realizar adecuadamente sus funciones, por lo que, si esta situación se prolonga, pueden sobrevenir el coma y la muerte. Otras hormonas que intervienen para aumentar la glucemia en el caso de ayunos prolongados son los glucocorticoides, quienes provocan la hidrólisis de proteínas musculares a fin de proveer de sustratos gluconeogénicos al hígado, mientras que las hormonas tiroideas estimulan la glucogenólisis hepática.

Por otro lado, cuando la glucemia aumenta, como después de una dieta rica en carbohidratos, los islotes de Langerhans detectan este aumento y secretan insulina. Esta hormona produce un incremento en el transporte de glucosa al interior del músculo y del tejido adiposo, por los receptores GLUT 4 y, activa la glucógeno sintasa, tanto muscular como hepática. De esta manera, la glucemia disminuye y los depósitos de glucógeno hepático y muscular aumentan.

El aumento de los valores de glucosa en sangre presenta algunos efectos fisiológicos que pueden explicarse por las propiedades osmóticas y químicas de la glucosa. Entre dichos efectos se encuentran la deshidratación de los tejidos y el envejecimiento de proteínas. En el primer caso, la salida del agua al torrente circulatorio causa que los tejidos pierdan, además del agua, algunos iones importantes, como el potasio. En el segundo caso, las concentraciones altas de glucosa sanguínea (superiores a 120 mg/dl) aceleran el envejecimiento proteínico por glucosilación no enzimática o glicación. La glucosa reacciona con los grupos amino expuestos de las proteínas y cambia las propiedades catalíticas y estructurales de las mismas. La hemoglobina, la colágena, las proteínas del cristalino y muchas más sufren glicación en proporción a la concentración de glucosa en la circulación. Este efecto permite comprender el origen de algunas de las complicaciones que

aparecen en el caso de los diabéticos, como la aparición de cataratas por la glicación irreversible de las proteínas del cristalino, o los elevados niveles de hemoglobina glicada (hemoglobina A1c), que en los diabéticos llegan a ser de dos a tres veces mayores que en los individuos normales. El nivel de hemoglobina A1c revela la concentración de glucosa en sangre durante un período de varias semanas, por lo que su determinación puede ser muy útil para comprobar si los pacientes diabéticos han sido tratados adecuadamente.

## 6.-LÍPIDOS

Los lípidos son sustancias biológicas solubles en solventes orgánicos, pero escasamente solubles en el agua. Pertenecen a este grupo moléculas tan diversas como las grasas, los aceites, algunas vitaminas y hormonas, así como todos los componentes no proteicos de las membranas.

Los lípidos pueden clasificarse en dos grandes grupos: los saponificables y los no saponificables. Los primeros tienen la característica de que, en soluciones alcalinas, se hidrolizan produciendo ésteres de ácidos grasos, mientras que los segundos no son objeto de hidrólisis alcalina. A los lípidos saponificables pertenecen los acilgliceroles, los fosfoacilgliceroles, los esfingolípidos y las ceras, mientras que en el grupo de los lípidos insaponificables encontramos los terpenos, los esteroides y las prostaglandinas, así como los compuestos relacionados con éstos. Asimismo, existen lípidos con un grupo extremo polar y otro grupo opuesto no polar. Este grupo se conoce como lípidos anfipáticos y son los responsables de estabilizar las emulsiones o forman parte de la bicapa lipídica de las membranas.

Los ácidos grasos biológicamente importantes son ácidos monocarboxílicos con cadenas alifáticas de diverso tamaño, con un número par de átomos de carbono, que pueden ser saturados o insaturados. En el caso de los insaturados, los de origen natural son isómeros geométricos cis; pueden ser monoinsaturados o poliinsaturados y son líquidos a temperatura ambiente. Los ácidos grasos poliinsaturados no son sintetizados en el organismo por lo que se consideran esenciales. En soluciones fisiológicas se encuentran en forma ionizada formando sales o "jabones". Los ácidos grasos de

cadena larga son insolubles en agua, pero los jabones forman micelas. Los ácidos grasos forman ésteres con alcoholes y tioésteres con la coenzima A. Las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos son derivados de ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos, especialmente del ácido araquidónico.

Los acilglicérols son compuestos en los que uno o más de los grupos hidroxilo del glicerol están esterificados. Pueden dividirse en monoacilglicérols, diacilglicérols y triacilglicérols. En los triacilglicérols los tres grupos hidroxilo están esterificados con ácidos grasos, que pueden o no ser iguales. Las propiedades de los triacilglicérols están determinadas por la naturaleza de sus ácidos grasos componentes y se dividen en aceites (líquidos) o grasas (sólidos) de acuerdo con la longitud de sus cadenas o con su grado de saturación. Los triacilglicérols son hidrofóbicos y no forman micelas.

Los fosfoacilglicérols o fosfoglicéridos son derivados del ácido fosfatídico, es decir, del L-glicerolfosfato esterificado con dos ácidos grasos. El ácido fosfatídico se esterifica, a su vez, a través de su grupo fosfato, con un alcohol y forma las diversas familias de fosfoglicéridos, las cuales poseen un carácter anfipático.

Los plasmalógenos son glicerofosfolípidos en los que la posición 1 del glicerol fosfato está combinado con un alcohol de cadena larga mediante una unión tipo éter.

Los esfingolípidos son lípidos complejos derivados de un alcohol insaturado llamado esfingosina, el que se une con un ácido graso de cadena larga por medio de un enlace amida para formar una ceramida. Las esfingomielinas contienen una ceramida esterificada con fosforilcolina o fosfoiletanolamina. Cuando la ceramida se combina con un azúcar forma los glucoesfingolípidos, que pueden subdividirse en cerebrósidos (si sólo contienen una unidad de azúcar), sulfátidos (contienen un sulfato esterificado en la unidad de azúcar) y gangliósidos (contienen oligosacáridos con uno o más ácidos N-acetilneuramínicos).

Los esteroides son derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno. El núcleo esteroide es una estructura rígida, casi plana, no polar. Los esteroides más importantes son el colesterol y sus derivados (los ácidos biliares, las hormonas esteroideas –estrógenos, progestágenos, glucocorticoides, mineralcorticoides y andrógenos– y la vitamina D que, aunque no es propiamente un esteroide, deriva del colesterol).

Los terpenos son polímeros de dos o más unidades de isopreno, que pueden ser lineales o cíclicos, con dobles enlaces trans en su mayoría. Las vitaminas A y K, así como el escualeno, pertenecen a este grupo.

En la dieta, la grasa constituye cerca de 60 g, de los cuales 90% son triacilglicérols. Es de todos conocida la dificultad para digerir la grasa, que en mucho está determinada por su casi nula solubilidad en agua. Esto ocasiona que se aglomere la grasa y que forme vacuolas, lo que impide que sea atacada fácilmente por las enzimas digestivas. Para facilitar su hidrólisis, durante el proceso digestivo que se inicia en la boca la lipasa lingual hidroliza algunos triacilglicéridos y produce ácidos grasos libres y monoacilglicéridos que, junto con otros ácidos grasos libres, posibilitan que las vacuolas de grasa se hagan más pequeñas y formen gotitas. Tanto los monoacilglicéridos como los fosfolípidos funcionan como factores tensoactivos. La acción de esta lipasa lingual es muy breve ya que, al llegar al estómago, es inhibida por el pH ácido y es hasta llegar al duodeno donde se continúa el proceso de digestión. Puede considerarse que la dificultad de la digestión de los lípidos se supera si se aumenta el área entre la fase acuosa y la lipídica y se logra un aumento en la solubilización de los productos de hidrólisis con detergentes (sales biliares). El aumento del área y la solubilización suceden cuando en el duodeno, por efecto de la colecistocinina, que es una hormona secretada por la llegada de los lípidos al duodeno, se estimula la contracción de la vesícula biliar con la consecutiva salida de sales biliares y otros lípidos, que forman agregados que reciben el nombre de micelas mixtas; éstas son diferentes a las gotitas emulsionadas. La acción de las sales biliares es romper la tensión superficial de la gotita de grasa favoreciendo la interacción con el agua y su fragmentación; así se origina la micela. Este

proceso también recibe el nombre de emulsificación. Al mismo tiempo, la lipasa pancreática, que es secretada como proenzima, hidroliza, al igual que la lingual, la unión alfa éster de los triacilglicéridos y deja libres dos ácidos grasos y un monoacilglicérido que también serán emulsificados por las sales biliares.

Además de la lipasa, el jugo pancreático contiene otras esterasas que actúan sobre los ésteres de colesterol, monoacilglicéridos y los ésteres de vitamina A. Los fosfolípidos son hidrolizados por fosfolipasas específicas, pero la más abundante en el jugo pancreático es la fosfolipasa A2 que hidroliza la unión éster beta del ácido graso. La presencia de sales biliares es necesaria para la absorción de otros lípidos, como el colesterol y las vitaminas A y K.

Se ha calculado que una persona sana absorbe cerca de 70 a 90% de los lípidos, tanto exógenos como endógenos; otro de los productos derivados de la hidrólisis de los acilglicéridos, el glicerol, se absorbe por difusión facilitada. Las sales biliares son absorbidas en forma muy eficaz por el intestino y son llevadas por la vena porta nuevamente al hígado, de ahí a la bilis y una vez más al intestino; a esta circulación de las sales biliares se le llama circulación enterohepática.

En la célula intestinal los lípidos son resintetizados formando triacilglicéridos por efecto de una enzima que activa a los ácidos grasos y los une a los monoacilglicéridos; también se forman fosfolípidos y ésteres de colesterol. La absorción de los lípidos y la actividad del retículo endoplásmico liso de la célula intestinal dan como resultado la formación de vesículas que se enriquecen con proteínas (apoproteínas), lo que genera los quilomicrones, partículas ricas en triacilglicéridos.

## 7.-METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS

Los ácidos grasos almacenados en los tejidos son utilizados por la célula para la producción de energía en magnitudes que varían de tejido a tejido, así como del nivel metabólico del organismo. Son los músculos, principalmente el cardíaco y el

esquelético, los que más dependen de los ácidos grasos como fuente de energía.

La mayoría de los ácidos grasos que se oxidan en los tejidos provienen de los triacilglicéridos del tejido adiposo, desde donde son liberados por la acción de la enzima lipasa sensible a hormonas y transportados en la circulación como complejos albúmina-ácidos grasos. Al llegar al hígado y a las células de otros tejidos, el ácido graso es activado en el citosol mediante la acción de la acil coenzima A sintetasa (tiocinasa) con gasto de ATP, en esta reacción se produce un acil coenzima A (acilCoA) y AMP. El proceso de oxidación del ácido graso se realiza dentro de la mitocondria; sin embargo, su membrana es impermeable a los ácidos grasos y derivados del acil CoA, por lo que se requiere de un transportador: la molécula de carnitina es la encargada de llevar al ácido graso al interior de la mitocondria. Una vez dentro de la mitocondria, el acil CoA sufre una serie de cambios que permiten obtener un fragmento de dos carbonos, la acetilCoA. Los cambios preparan al acilo para quedar nuevamente activado y éstos son realizados por: a) Una deshidrogenasa que requiere de FAD y transforma al grupo acilo en uno enoilo (molécula con un doble enlace entre el carbono alfa y beta); b) Una hidratasa que elimina la doble ligadura y deja un hidroxilo en el carbono beta. Esta molécula se llama  $\beta$ -hidroxiacil-CoA; c) Otra deshidrogenasa específica, cuya coenzima es el  $\text{NAD}^+$ , transforma el grupo hidroxilo de la posición beta en un grupo ceto; d) Una tiolasa que requiere de una coenzima A (HSCoA) para unirle al carbono que tiene la nueva función cetona y romper entre el carbono beta y alfa para producir una molécula de acetil-CoA. Estas cuatro enzimas siguen trabajando con el acilCoA que en cada vuelta pierde dos carbonos como acetil CoA. Al mismo tiempo, el  $\text{FADH}_2$  y el  $\text{NADH}$  obtenido en cada ciclo de la oxidación generan 4 ATP en la cadena respiratoria y las acetilCoA entran al ciclo de Krebs para ser totalmente oxidadas con la ganancia de 10 ATP netos por cada acetil CoA que entra al ciclo. Así tenemos que, por ejemplo, un palmitato (16C) genera 108 ATP al oxidarse hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Si consideramos el gasto de la fase de

activación del ácido graso, obtenemos una ganancia neta de 106 ATP.

Cuando bajan los niveles de glucosa se estimula la gluconeogénesis a partir del oxaloacetato y se incrementa la vía de oxidación de los ácidos grasos, lo que provoca el aumento concomitante de los niveles de acetilCoA. En el hígado, el exceso de acetilCoA se transforma en un grupo de moléculas conocidas genéricamente como cuerpos cetónicos. La vía de síntesis de los cuerpos cetónicos (cetogénesis) se inicia con la condensación de dos moléculas de acetil coenzima A; al producto de la reacción, acetoacetilCoA, se le une una tercera molécula de acetilCoA para formar el  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metil glutaril CoA. Esta molécula, al romperse por una liasa (HMGCoA liasa), produce una acetil CoA y un ácido acetoacético o acetoacetato. Este producto se reduce con  $\text{NAD}^+$  y forma el  $\beta$ -hidroxi-butirato; el acetoacetato, por una descarboxilación no enzimática, produce la acetona.

El acetoacetato es utilizado por otros órganos, como el músculo cardíaco y el cerebro, donde, por acción de una transferasa en presencia de succinil coenzima A, se transforma en acetoacetil-CoA, molécula que se rompe por una tiólisis, en presencia de otra CoA para formar dos acetil CoA; la enzima responsable de esta reacción es una tiolasa. Las dos acetilCoA resultantes son oxidadas para la obtención de energía en los órganos mencionados.

Al incremento de acetoacetato en la sangre se le llama cetonemia. Puede deberse a una deficiencia en el metabolismo de los carbohidratos con el consiguiente aumento en el catabolismo de las grasas y la desviación de la acetilCoA a la síntesis de cuerpos cetónicos. Algunos ejemplos de situaciones en las que ocurre lo anterior son: la diabetes, el ayuno prolongado y la dieta deficiente en carbohidratos.

Cuando el requerimiento de energía en la célula ha sido satisfecho y existen suficientes sustratos oxidables, procede su almacenamiento bajo la forma de triacilglicéridos que constituyen la reserva de energía a largo plazo más importante de las

células y del organismo. El primer paso de este proceso es la biosíntesis de los ácidos grasos, la cual se realiza en el citoplasma celular a partir de la acetilCoA, el ATP y el NADPH proveniente del ciclo de las pentosas y de otros sistemas generadores de poder reductor.

La biosíntesis de los ácidos grasos se inicia con la salida de la acetil-CoA desde la mitocondria en forma de citrato y su transformación en malonilCoA mediante la fijación del  $\text{CO}_2$  por una sintetasa dependiente de biotina, que utiliza ATP. Tanto la acetil CoA como la malonil-CoA se unen a un complejo multienzimático llamado sintetasa de los ácidos grasos. Este complejo está formado por un conjunto de proteínas enzimáticas dispuestas alrededor de la proteína transportadora de acilos (PTA). En pasos sucesivos ocurre la condensación de la acetil y la malonil CoA con desprendimiento de  $\text{CO}_2$  y el resto del acetoacetilo de cuatro carbonos es llevado por el brazo central de la PTA a los sitios activos de las enzimas del complejo para transformarlo, sucesivamente, en hidroxiacilo, enoilo y acilo saturado, mediante el gasto de dos NADPH. El ciclo se repite al incorporar dos carbonos del malonil-CoA en cada vuelta, hasta que se completa el ácido palmítico, un ácido graso saturado de 16 C.

El citrato desempeña un papel muy importante en la síntesis de los ácidos grasos ya que al salir al citoplasma se convierte en acetilCoA y oxaloacetato. Este proceso alimenta con carbonos a la síntesis de los ácidos grasos y aporta NADPH por la acción de la enzima málica sobre el sistema oxaloacetato-malato-piruvato. Por otra parte, el citrato es un modulador positivo de la malonilCoA sintetasa (también llamada acetil CoA carboxilasa), que es la principal enzima reguladora de la síntesis de los ácidos grasos.

Una vez formados los ácidos grasos procede la lipogénesis o síntesis de los triacilglicéridos: dos ácidos grasos activados como acil CoA reaccionan con una molécula del glicerol fosfato para formar el ácido fosfatídico. Esta última molécula es precursora de los triacilglicéridos y de los fosfolípidos. Para sintetizar los primeros se hidroliza

el fosfato, con producción del diacilglicerol, el cual recibe enseguida otra molécula de acilCoA, con la cual se completa el triacilglicérido. La mayoría de las enzimas participantes en este proceso son aciltransferasas y tiocinasas.

En el organismo humano la acción de la insulina estimula todo el proceso de la lipogénesis al favorecer la entrada de la glucosa a los adipocitos, el ciclo de las pentosas, la descarboxilación del piruvato, la biosíntesis de los ácidos grasos y la acumulación de los triacilglicéridos.

La hidrólisis de los triacilglicéridos en el tejido adiposo, llamada también lipólisis, es estimulada a nivel de la triacilglicérido lipasa en una acción mediada a través de AMP cíclico, por numerosas hormonas entre las cuales se cuentan: la epinefrina, el glucagón, los glucocorticoides, la tiroxina y el ACTH; mientras que es inhibida por la insulina y por el incremento de la concentración de ácidos grasos libres. La hidrólisis se completa por la acción de la diacilglicérido lipasa y la monoacilglicérido lipasa que en conjunto liberan un glicerol y tres ácidos grasos de cada triacilglicérido.

La síntesis de los fosfoglicéridos es similar en los pasos iniciales a la síntesis de los TAG: el glicerol 3-fosfato se esterifica con dos acilCoA para formar ácido fosfatídico. Este compuesto es el precursor de todos los fosfoglicéridos. Existen dos estrategias para la obtención de los fosfolípidos que contienen glicerol, según la naturaleza de la cabeza polar.

En la formación de fosfatidilinosoles y de cardiolipina, el ácido fosfatídico reacciona con CTP para formar CDP-diacilglicerol, el cuál reacciona con la cabeza polar (inositol o fosfatidilglicerol) para formar el fosfoglicérido correspondiente.

El fosfatidilinositol puede ser fosforilado para formar la familia de los fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato. Estos compuestos son hidrolizados por la fosfolipasa C en respuesta al estímulo de algunas hormonas y producen dos segundos mensajeros muy potentes:  $IP_3$  y el diacilglicerol, los cuales causan movilización de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico y proveen de

ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

En la síntesis de fosfadiletanolamina y de fosfatidilcolina, el ácido fosfatídico pierde su fosfato y el diacilglicerol resultante reacciona con CDP-colina o CDP-etanolamina.

La fosfatidiletanolamina también puede obtenerse por descarboxilación de fosfatidilserina y la fosfatidilcolina por metilación de fosfatidiletanolamina, utilizando S-adenosil metionina como donador de metilos. La fosfatidilserina se obtiene por recambio de la cabeza polar de la fosfatidiletanolamina por una serina.

Las fosfatidilcolinas proporcionan ácidos grasos para la síntesis de los ésteres de colesterol de las HDL por la reacción de LCAT, mientras que la dipalmitoilfosfatidilcolina es el principal componente del surfactante pulmonar.

## **DEGRADACIÓN DE FOSFOGLICÉRIDOS**

Los fosfoglicéridos son hidrolizados por diversos tipos de fosfolipasas que se clasifican según su sitio de acción: la fosfolipasa A1 libera los ácidos grasos de la posición de 1; la fosfolipasa A2 los libera de la posición 2. La fosfolipasa C libera la cabeza polar fosforilada que se encuentra en la posición 3 del glicerol, mientras que, la fosfolipasa D libera la cabeza polar.

## **SÍNTESIS DE ESFINGOLÍPIDOS**

Los esfingolípidos contienen una molécula de esfingosina en lugar del glicerol. Sus precursores son serina y palmitoilCoA. Los ácidos grasos activados (acil CoA) reaccionan con el grupo amino de la esfingosina para formar las ceramidas, quienes son las precursoras de esfingomielinas, cerebrósidos y gangliósidos.

Las esfingomielinas se obtienen de la reacción de la ceramida con CDP-colina.

Los cerebrósidos se obtienen por la unión directa de galactosa o glucosa a la ceramida. El donador del azúcar es UDP-galactosa o UDP-glucosa.

Los gangliósidos se forman por la adición secuencial y ordenada de residuos de azúcar a la ceramida. Los donadores de estos azúcares son UDP-azúcares o el CMP-NeuAc (ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico).

Los esfingolípidos son degradados por enzimas lisosomales (hexosaminidasas,  $\alpha$ -galactosidasa, la sialidasa o la esfingomielinasa) hasta dar ceramidas y los azúcares correspondientes. Existen una serie de defectos genéticos en los que faltan estas enzimas lo que conduce a una acumulación de gangliósidos que causan graves consecuencias a la salud.

El colesterol es una molécula muy importante por su interés clínico y el gran número de compuestos que a partir de él se sintetizan, como las hormonas esteroidales, las sales biliares y la vitamina D.

La síntesis del colesterol (colesterogénesis) es una vía citoplásmica que se inicia a partir de la unión de tres moléculas de acetil CoA, las que forman el  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA, precursor del mevalonato. La enzima que produce este último compuesto en la colesterogénesis es la  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metil glutaril-CoA reductasa, dependiente de NADPH. Después de tres fosforilaciones para activar la molécula, el mevalonato se descarboxila para formar el isopentenil pirofosfato, unidad isoprenoide de todos los terpenos. El isopentenil pirofosfato se une con uno de sus isómeros para formar el geranil pirofosfato, de 10 átomos de carbono que, por combinación con otra molécula de isopentenil pirofosfato, forma el farnesil pirofosfato, de 15 carbonos. Dos moléculas de farnesil pirofosfato se unen por un enlace especial (cabeza-cabeza) para formar el escualeno, de 30 carbonos.

El escualeno se cicliza y, por cambios sucesivos de oxidación, descarboxilación y reacomodo de electrones y grupos químicos, forma el lanosterol, el zimosterol y finalmente el colesterol. La vía de la colesterogénesis se regula principalmente por colesterol endógeno o el que se obtiene a partir de la dieta a nivel de la enzima  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA reductasa.

El colesterol puede seguir diversos caminos: a) Migra a la membrana, donde regula la fluidez de la misma; b) Se transforma químicamente para producir ácidos biliares por oxidación de su cadena lateral; c) Pierde una cadena de seis átomos de carbono para producir la pregnenolona, el precursor de todas las hormonas esteroidales, sean progestágenos (como la progesterona), mineralcorticoides (como la aldosterona), glucocorticoides (como el cortisol), andrógenos (testosterona) y estrógenos (estrone y estradiol); d) El colesterol también es precursor de la vitamina D, que se obtiene por la ruptura del anillo B.

El colesterol se excreta principalmente como sales biliares, aunque una parte puede eliminarse en las heces como coprostanol, producto de la degradación bacteriana del colesterol en el intestino grueso.

Los lípidos son compuestos prácticamente insolubles en agua que se transportan en el torrente circulatorio mediante las lipoproteínas.

Las lipoproteínas son partículas globulares de alto peso molecular con un núcleo formado por lípidos hidrofóbicos –TAG y ésteres de colesterol–, los cuales aportan la mayor parte de la masa de la partícula, y por una sola capa superficial de moléculas de fosfolípidos, colesterol y proteínas o polipéptidos que rodean al núcleo y estabilizan la partícula para que permanezca en solución dentro del plasma.

La fracción proteica de las lipoproteínas se conoce como apolipoproteína o apoproteína, de las que se han aislado y caracterizado seis clases principales: A, B, C, D, E y (a). Algunas de éstas son integrales y no pueden ser removidas, en tanto que otras pueden ser transferidas a otras lipoproteínas.

Las lipoproteínas principales que circulan en el plasma humano se clasifican con base en su densidad en quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (LMBD o –según la sigla inglesa– VLDL), las lipoproteínas de baja densidad (LBD o

LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (LAD o HDL). La densidad de las lipoproteínas refleja la relación existente entre la cantidad de lípidos y de proteínas.

Los quilomicrones transportan los lípidos de la dieta desde el enterocito al tejido adiposo, la glándula mamaria, el músculo y el hígado. Los lípidos endógenos, principalmente los triacilglicéridos y el colesterol se transportan desde el hígado a los tejidos mediante las lipoproteínas VLDL. Las apoproteínas características de las VLDL son la apo B-100, apo-C y apo-E, de las cuales las dos últimas son compartidas con los quilomicrones, los que tienen además la apo-B48 y la apo-A. Tanto los quilomicrones como las VLDL son llevados hasta los capilares de los tejidos en donde su apo-CII activa a la lipoproteína lipasa, quien hidroliza la mayor parte de los triacilglicerol de estas lipoproteínas hasta glicerol y ácidos grasos, los que son tomados por los tejidos para ser oxidados o almacenados en el tejido adiposo.

Los restos de VLDL, que han perdido la mayor parte de sus triacilglicerol y algunas apoproteínas y fosfolípidos, se convierten en LDL. Las LDL contienen apo B-100 y transportan colesterol a los tejidos.

Las lipoproteínas más pequeñas son las HDL; éstas son ricas en fosfolípidos y proteínas y dentro de sus funciones se cuenta el intercambio de apoproteínas A, C y E con las demás lipoproteínas y el transporte del colesterol extrahepático al hígado (transporte inverso del colesterol).

El colesterol es transportado en la sangre por tres diferentes lipoproteínas: las LDL (60 a 75%), las HDL (15 a 35%) y las VLDL (10%). Las LDL y las HDL tienen una función combinada en la

conservación del equilibrio del colesterol; las LDL llevan el colesterol hacia las células y regulan la síntesis de novo del colesterol en ellas; las HDL lo eliminan de las células, es decir, captan el colesterol liberado en el plasma procedente del recambio de membranas y de células que mueren y lo llevan al hígado para su metabolismo o excreción.

Además de las clases ya mencionadas de lipoproteínas existe la lipoproteína (a) [Lp(a)], la cual tiene una composición lipídica muy similar a la LDL, contiene apoB-100 y una glucoproteína llamada apo(a). La apo(a) es polimórfica (de longitud y secuencia) y tiene una gran homología con el plasminógeno. Esta homología es importante porque la Lp(a) se asocia con el bloqueo de la activación del plasminógeno y la consiguiente lisis de los coágulos de fibrina, así como con la estimulación de la proliferación de células musculares lisas, procesos que pueden estar en el origen de lesiones ateroscleróticas. Además, la apo(a) dificulta el catabolismo mediado por el receptor de LDL al que se fija e interfiere, de esta manera, con el metabolismo y transporte del colesterol. La concentración de Lp(a) en sujetos normales es de ~5 mg/dl; las cifras >30 mg/dl constituyen otro valor de predicción de un alto riesgo de aterosclerosis y trombosis.

Los lípidos son compuestos que se han relacionado con varias patologías.

La regulación del metabolismo lipídico se ejerce en respuesta a las diferentes necesidades energéticas y los estados de la dieta de un organismo (ayuno-alimentación). La síntesis y la degradación de los TAG y del colesterol son procesos que afectan a todo el organismo, con sus órganos y tejidos formando una red interdependiente conectada por la

corriente sanguínea. La sangre transporta los TAG en forma de quilomicrones y VLDL, los ácidos grasos en forma de complejos con albúmina y el colesterol asociado a VLDL, LDL y HDL. Las células pancreáticas perciben los estados de la dieta del organismo y responden liberando hormonas (insulina o glucagon) que regulan la velocidad de las rutas opuestas del metabolismo de lípidos y controlan si se han de degradar o sintetizar los ácidos grasos, los TAG, los fosfolípidos o el colesterol.

La regulación metabólica se puede ejercer a corto plazo (disponibilidad de sustratos, interacciones alostéricas y modificaciones covalentes) o a largo plazo (control de la síntesis y degradación de las enzimas). Otro nivel de regulación se relaciona con el transporte de los lípidos de un tejido a otro.

Los lípidos más abundantes del organismo son los TAG almacenados en el tejido adiposo, los cuales se hidrolizan por la acción de una lipasa sensible a hormonas como el glucagon, la epinefrina y los glucocorticoides, obteniendo glicerol y ácidos grasos que salen a la circulación. Estos últimos se asocian a albúmina y se transportan al hígado, corazón y músculo para ser oxidados hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , con la producción consecuente de ATP. Las condiciones fisiológicas y metabólicas que determinan la movilización de grasas del tejido adiposo pueden ser alteradas por situaciones de estrés (dolor, fiebre, infecciones, miedo, hemorragia, hipoglucemia) en las que se estimula la adenohipófisis, que secreta ACTH, induciendo la secreción de glucocorticoides. La ACTH y los glucocorticoides aceleran la hidrólisis de los TAG.

La concentración de los TAG almacenados en los adipocitos depende de la velocidad de su recambio (síntesis e hidrólisis). Cuando el almacenamiento de energía en forma de TAG en el tejido adiposo es excesivo, se establece una condición llamada obesidad, la cual correlaciona con un promedio de vida menor y con un aumento en problemas de salud, principalmente de tipo cardiovascular. Muchos factores conducen a ella, pero la causa básica es una ingesta calórica por encima de los requerimientos energéticos estándar.

El apetito se regula por la presencia de compuestos antianoréxicos. La síntesis de estos compuestos se ve afectada por la presencia de una proteína pequeña que se libera por las células adiposas: la leptina. La ausencia de esta proteína o de su receptor en las células del hipotálamo implicadas en la regulación del apetito se asocia con la aparición de obesidad en ratones. Su papel está actualmente en estudio en humanos.

Existen otras alteraciones de los lípidos asociadas al metabolismo de las lipoproteínas. Estas alteraciones se conocen en general como dislipoproteinemias, en las que hay modificaciones de los niveles de colesterol y/o TAG en sangre.

En las hipercolesterolemias familiares, los receptores celulares para lipoproteínas de baja densidad (LDL) son deficientes. Por lo tanto las LDL no pueden ser captadas por las células y degradadas por las enzimas lisosomales. El consecuente incremento de LDL en sangre se asocia con xantomas (depósitos de lípidos, frecuentemente encontrados bajo la piel) y enfermedades de arterias coronarias. En las hipertriacilgliceridemias se encuentran bajos niveles

de lipoproteína lipasa (LPL) o apo CII (el activador de LPL) y TAG aumentados. Estas deficiencias se asocian con xantomas característicos e intolerancia a comidas ricas en grasas. El tratamiento involucra dietas bajas en ácidos grasos saturados y colesterol y el uso de agentes hipolipemiantes como las resinas secuestradoras de ácidos biliares, la niacina y los inhibidores de la 3-hidroxi-3 metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa.

En condiciones de estrés metabólico, la capacidad para secretar VLDL no es suficiente para la síntesis aumentada de TAG. Esto ocasiona que el depósito de AG y TAG en el tejido hepático se vuelva excesivo estableciéndose una condición tóxica llamada hígado graso. Sin embargo, el hígado graso ocurre especialmente en condiciones tóxicas graves, cuando la síntesis de las apolipoproteínas, requeridas para la formación de VLDL, es inferior a la disponibilidad de ácidos grasos, ocasionando su acumulación. Esta situación se observa frecuentemente en las personas que ingieren constantemente grandes cantidades de etanol y una dieta hipoproteica. La oxidación del etanol proporciona la energía necesaria para mantener las funciones celulares, pero también favorece la síntesis de ácidos grasos debido a un aumento en la disponibilidad de NADH y al aumento en la actividad de la fosfatidato fosfohidrolasa.

Finalmente la obesidad, sobre todo el patrón masculino de depósito centripeto o visceral de la grasa, favorece una dislipidemia aterogénica que se caracteriza por el aumento de los TAG plasmáticos, la disminución de HDL y la intolerancia a la glucosa. La aterosclerosis involucra la formación de placas ricas en lípidos en la íntima de las arterias. Las placas empiezan como rayas grasas conteniendo células espumosas, las cuales son

inicialmente macrófagos llenos de lípidos, particularmente ésteres de colesterol. Estas lesiones primarias desarrollan placas fibrosas que pueden ocluir la arteria y causar un infarto cerebral o al miocardio. La formación de estas placas está frecuentemente asociada como se mencionó anteriormente, con anomalías en el metabolismo de lipoproteínas plasmáticas. En contraste con estas lipoproteínas, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) tienen un efecto protector. Como parte de la estrategia general para limitar la aterosclerosis hay que controlar la hipertensión, si fuera necesario con farmacoterapia. La mayoría de los enfermos con diabetes mellitus fallece a consecuencia de aterosclerosis o sus complicaciones. El control riguroso de la glucemia en estos enfermos disminuye las complicaciones microvasculares de la diabetes, por lo que se recomienda prestar atención al control de la glucemia.

La leptina es una hormona de naturaleza proteica constituida por 167 aminoácidos que circula en el plasma sanguíneo y regula el peso corporal y los depósitos de grasa, a través de sus efectos en el metabolismo y el apetito. En general, induce una disminución en el apetito y un incremento en el gasto energético.

La leptina es producida y liberada por el tejido adiposo blanco fundamentalmente como una señal de saciedad, aunque se ha visto también que se produce en tejido adiposo marrón, en la placenta y en algunos tejidos fetales, como el corazón, hueso y cartílago.

La síntesis y la secreción de leptina están directamente relacionadas con la cantidad de grasa corporal y el tamaño del adipocito. Aunque factores

como la edad, el sexo, el índice de masa corporal, la actividad física, el fumar, la hipertensión, el colesterol en HDL, la concentración plasmática en ayuno de triacilglicérols, de glucosa y de insulina también afectan la secreción de leptina. Así por ejemplo, la concentración de la hormona es hasta cuatro veces mayor en mujeres que en hombres. El fumar puede traer cambios en el peso corporal, al modificar la sensibilidad de los receptores del hipotálamo a la leptina y en consecuencia modular la síntesis de hormona, reduciendo el peso corporal.

El hipotálamo es el sitio de mayor acción de leptina. La acción más importante de la leptina en este órgano es la disminución en la producción del neuropéptido Y (NPY). Las implicaciones de estos cambios son las siguientes:

Incremento en el NPY (disminución de leptina)	Incremento en la leptina (disminución en el NPY)
Se presenta hiperfagia Aumento en la secreción de insulina mayor respuesta a la insulina en tejido adiposo  Aumento de peso	Hipofagia  Incremento en el gasto energético  Pérdida de peso

En general podemos decir que la concentración de la leptina aumenta después de la ingesta de alimento y disminuye durante el ayuno y la diabetes. La insulina y los glucocorticoides aumentan la síntesis de esta hormona, mientras que las catecolaminas, los andrógenos y los ácidos grasos de cadena larga la inhiben.

## 8.-METABOLISMO DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS

Al finalizar esta subunidad, el alumno describirá los procesos más importantes del metabolismo de los compuestos nitrogenados.

Los aminoácidos son el sustrato más importante del metabolismo nitrogenado en los organismos superiores pues de ellos derivan proteínas, purinas, pirimidinas, porfirinas, péptidos y hormonas, entre otros compuestos y, además, sus esqueletos carbonados se oxidan para liberar energía.

Todos los aminoácidos de los sistemas vivos se encuentran como parte de un "pool" o poza (reserva) metabólica cuya magnitud se mantiene constante mediante un equilibrio entre la entrada y la salida de aminoácidos. Desde la poza, los aminoácidos son llamados hacia sus diferentes destinos metabólicos:

1. Participar en el proceso de la nutrición por medio de la síntesis de nuevas proteínas.
2. La síntesis de compuestos nitrogenados no proteicos.
3. Su entrada a la gluconeogénesis para sintetizar glucosa.
4. Su degradación oxidativa para la producción de energía.

1. *Nutrición.* Los aminoácidos son oxidados constantemente en los animales y el nitrógeno excretado tiene que ser repuesto para mantener un balance nitrogenado que, en los adultos normales, se encuentra en equilibrio; en los jóvenes, las embarazadas y los convalecientes es positivo y en los ancianos, los enfermos y los desnutridos el balance nitrogenado es negativo.

Los aminoácidos ingresan al organismo humano formando parte de las proteínas de la dieta que, por lo general, aportan alrededor de 10% de las kilocalorías diarias; sin embargo, el valor principal de los aminoácidos recibidos reside en el aporte de las estructuras moleculares que el organismo humano no puede sintetizar por sí mismo y que son los aminoácidos indispensables o esenciales cuya presencia determina en gran parte la calidad de la dieta; ellos son: ARGinina, LISina, METionina, HISTidina, TREonina, VALina, FENilalanina, LEUCina, IsoLEucina y TRIPtofano (ALM-HTV-FLIT).

2. *Compuestos nitrogenados.* Los aminoácidos participan en la síntesis de numerosos compuestos nitrogenados que no son proteínas, por ejemplo, los oligopéptidos glutatión y carnosina; las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos y los fosfolípidos; las hormonas derivadas de aminoácidos como la epinefrina, tiroxina y serotonina; las hormonas peptídicas como el glucagón, la ACTH y la oxitocina; los neurotransmisores como la dopamina y el aminobutirato gamma; los neuropéptidos como las endorfinas y los factores liberadores; las porfirinas como el grupo hemo; los pigmentos como la melanina; las aminas como la histamina y varios compuestos más.

3. *Gluconeogénesis.* Una porción considerable de la síntesis diaria de glucosa que se realiza en el hígado se hace a partir de los aminoácidos que reciben, por esto, el nombre de aminoácidos glucogénicos. Con la excepción de la leucina y la lisina, todos los aminoácidos tienen la capacidad de aportar todo o parte de su esqueleto carbonado para que se incorpore a la síntesis de la glucosa y

esto se logra, en un primer paso, mediante la pérdida del grupo amino por transaminación, lo cual deja libre la cadena carbonada bajo la forma de un cetoácido.

Los cetoácidos mitocondriales resultantes:  $\alpha$ -cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato, oxaloacetato y piruvato confluyen hacia la formación del oxaloacetato citoplásmico que ingresa al eje central del metabolismo y se transforman en fosfoenol piruvato que alimenta la gluconeogénesis. Dos moléculas de este último siguen el reverso de la vía glucolítica hasta su transformación en glucosa.

3. *Oxidación.* Para la oxidación de su esqueleto carbonado los aminoácidos pierden primero al grupo amino, lo cual se lleva comúnmente a cabo mediante la transaminación acoplada a la desaminación oxidativa (transdesaminación), proceso reversible en el cual un aminoácido transamina primero con el alfa-cetoglutarato y le transfiere su grupo amino para formar glutamato y éste es desaminado enseguida por la glutamato deshidrogenasa con producción de NADH y liberación de amonio. El metabolismo del esqueleto de carbono se aparta entonces de la ruta seguida por el grupo amino ya que, para el primer caso, los carbonos pueden ser llevados hacia la oxidación en el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria, o bien, incorporarse a la gluconeogénesis en el hígado para la síntesis de glucosa; en tanto que el ion amonio será transportado hasta el hígado en donde será tomado por la vía metabólica del ciclo de la urea.

La oxidación del esqueleto carbonado de los aminoácidos procede mediante su agrupación en

“familias” o grupos de aminoácidos que, al transformarse en el metabolismo, confluyen hacia alguno de los intermediarios de la glucólisis, la descarboxilación del piruvato o del ciclo de Krebs.

Los glucogénicos son de la familia del:

Piruvato: Tre, Gli, Ser, Ala, Met, Cis y Tri

Alfa-cetoglutarato: Pro, His, Arg, Gln y Glu

Succinil-CoA: Ile, Val, Met

Fumarato: Tir, Fen, Asp

Oxaloacetato: Asn, Asp

Y los cetogénicos son de la familia del:

Acetoacetato: Leu, Tir, Fen

Acetoacetyl-CoA: Tri, Lis

Acetyl-CoA: Tre, Leu, Ile

## EL CICLO DE LA UREA

El mecanismo de la transdesaminación permite el acopio de los grupos amino de los diferentes aminoácidos en la molécula del glutamato, la cual, al ser desaminada oxidativamente por la deshidrogenasa del glutamato, libera el ion amonio. Dado que este compuesto es muy tóxico para el sistema nervioso central, se elimina mediante la síntesis de urea. Esta síntesis se lleva a cabo en el hígado mediante un proceso metabólico denominado el ciclo de la urea, la primera parte del cual se realiza en la mitocondria y el resto en el citoplasma de la célula hepática.

El ciclo de la urea (fig. III.2) que permite mantener una muy baja concentración de amonio libre, se inicia con la síntesis del carbamil fosfato a partir del amonio y el  $\text{CO}_2$  con un gasto de 2 enlaces de alta energía. El carbamil fosfato entrega el grupo carbamino a la molécula de ornitina, la cual actúa como portadora de grupos en las cuatro reacciones del ciclo:

1. Transferencia del carbamino a la ornitina para formar citrulina: ornitina transcarbamilasa.
2. Condensación de la citrulina con el aspartato. Se forma el arginino-succinato con gasto de 2ATP: arginino-succinato sintetasa.
3. Ruptura del arginino-succinato. Se desprende fumarato y se produce arginina: arginino-succinato liasa.
4. Hidrólisis de la arginina para regenerar a la ornitina y liberar urea: arginasa.

En resumen, para formar una molécula de urea se requiere de un ion amonio, un  $\text{CO}_2$  y un aspartato. Se produce una molécula de fumarato y una de urea, con gasto de cuatro enlaces de alta energía provenientes del ATP.

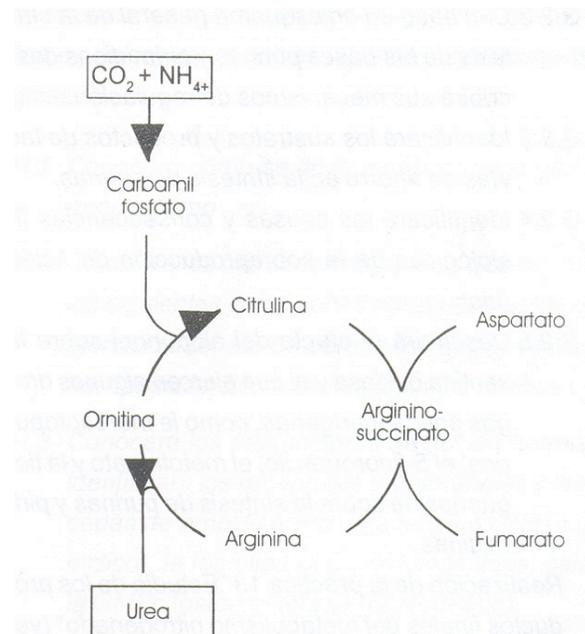


Fig. III.2. Ciclo de la urea

Los nucleótidos están formados por ribosa o desoxirribosa, una base nitrogenada que puede

ser una purina o una pirimidina, y una, dos o tres moléculas de ácido fosfórico. Dependiendo del número de grupos de fosfato presentes, los nucleótidos pueden ser mono, di, o trifosforilados.

#### Ácidofosfórico—Ribosa—Base nitrogenada

Los nucleósidos se diferencian de los nucleótidos en que no tienen ácido fosfórico.

#### Ribosa — Base nitrogenada

Las bases nitrogenadas pueden ser purinas o pirimidinas. Las purinas están formadas por dos anillos heterocíclicos (formados por diferentes tipos de átomos), uno con seis miembros y otro con cinco miembros, y son la adenina y la guanina. Las pirimidinas están formadas por un anillo heterocíclico de seis miembros y las más importantes son: uracilo, timina y citosina.

Los nucleótidos y nucleósidos púricos tienen funciones muy variadas en los seres vivos; entre las más importantes están la de servir como sustratos acarreadores de energía, segundos mensajeros, neurotransmisores, coenzimas, etcétera.

Los nucleótidos pirimídicos intervienen como acarreadores en la biosíntesis de polisacáridos y de fosfolípidos. Los nucleótidos púricos y pirimídicos forman parte de los ácidos nucleicos y desoxirribonucleicos.

La síntesis de purinas se lleva a cabo en el citoplasma celular y comprende las siguientes tres fases:

1. Activación, en la que la ribosa 5 fosfato adquiere dos moléculas de fosfato que se asocian al carbono 1 de la molécula; esta reacción es llevada a cabo por la fosforribosil pirofosfato sintetasa, la cual es una de las enzimas reguladoras de la síntesis de purinas y de pirimidinas.

2. Formación de los anillos heterocíclicos, en donde varias enzimas intervienen añadiendo los diferentes átomos que componen al anillo purínico hasta formar inosina monofosfato.

La primera reacción, catalizada por la enzima fosforribosilglicinamida sintetasa, es reguladora de la síntesis de purinas y su velocidad depende de las concentraciones de sus sustratos.

3. A partir de la inosina monofosfato se sintetizan la guanosina monofosfato y la adenosina monofosfato por medio de dos vías metabólicas que se regulan mutuamente. Las altas concentraciones de GTP estimulan la síntesis de AMP y las altas concentraciones de ATP estimulan la síntesis de GMP.

La síntesis de pirimidinas también se lleva a cabo en el citoplasma y se inicia con la síntesis de carbamilsfosfato a partir de glutamina,  $\text{CO}_2$  y ATP en una reacción catalizada por la enzima carbamilsfosfato sintetasa citoplasmática que es una reacción parecida a la que ocurre en la mitocondria para la biosíntesis de la urea; posteriormente, se adiciona ácido aspártico para producir ácido orótico al cual se une una molécula de fosforribosilpirofosfato y se descarboxila para dar la uridina monofosfato. A partir de ésta se sintetizan la citidina monofosfato y la timidina monofosfato.

Las purinas se catabolizan por dos caminos metabólicos:

1. En la vía del ahorro de las purinas, la adenina, la hipoxantina o la guanina son reaprovechadas y, por medio de la enzima fosforribosiltransferasa correspondiente, se vuelve a formar el AMP, IMP o GMP.

2. En una secuencia de reacciones cuyo producto final es el ácido úrico, que es la forma en la que se excretan las bases púricas.

El catabolismo de las pirimidinas se lleva a cabo por una serie de reacciones cuyos productos finales son la malonil-CoA y la metilmalonilCoA; estos dos productos se catabolizan hasta  $\text{CO}_2$  y agua. El exceso en el catabolismo de purinas genera una sobreproducción de ácido úrico que tiende a acumularse en las articulaciones distales, lo que produce el síndrome de gota. Esto se debe a que el ácido úrico es insoluble en ambientes con un pH menor a 6.0, lo que hace que no se pueda eliminar por la orina. Este síndrome se produce cuando las concentraciones de purinas son altas, ya sea por aporte elevado o por exceso en el catabolismo de las mismas.

Los análogos de los nucleótidos se han utilizado como inhibidores de algunas enzimas; por ejemplo, la azaserina y la acivicina, análogos de la glutamina, se usan como inhibidores de la enzima glutamina amino transferasa que interviene en la síntesis de purinas. El metotrexato y el 5-fluorouracilo se usan como inhibidores de la síntesis de dTMP. La aplicación de estos inhibidores en pacientes con procesos neoplásicos da como resultado la

disminución de la síntesis del DNA y del crecimiento celular.

El alopurinol se usa en el tratamiento del síndrome de gota porque es un análogo de la hipoxantina y actúa como inhibidor de la enzima xantina oxidasa y de la producción de ácido úrico.

## **9.-REGULACIÓN E INTEGRACIÓN METABÓLICA**

Las células y los organismos son sistemas relativamente aislados en un estado casi estacionario. Las funciones de los organismos vivos como un todo o como sus partes están reguladas con el objetivo de asegurar un máximo de supervivencia. Ya que los sistemas vivos reaccionan en el espacio y el tiempo, se emplea tanto una regulación en el espacio y en el tiempo.

La regulación espacial se expresa a través del grado de organización de las estructuras; el mantenimiento de la estabilidad estructural de las proteínas, en la asociación de las enzimas que cooperan en los complejos multienzimáticos, su localización en compartimentos definidos (mitocondria, retículo endoplásmico) y por la especialización de células y tejidos mediante procesos de diferenciación.

El tiempo está involucrado en la regulación principalmente en términos de modificación de las velocidades de reacción (metabólica, de transporte y otras). En la práctica, se utilizan ambas dimensiones simultáneamente.

En bioquímica una de las principales señales para regular los procesos metabólicos es la concentración de moléculas. Los

mecanismos regulatorios son efectivos a diferentes niveles de organización pero sus bases son siempre moleculares. Las funciones de un organismo pueden regularse a través de reacciones que se realizan en las células (regulación metabólica) y a nivel de todo el organismo (control hormonal y nervioso). En una célula, los procesos metabólicos están controlados principalmente por regulación de la actividad de las enzimas individuales.

Las enzimas pueden regularse de varias maneras:

1. Cambiando la concentración de los sustratos (como una señal metabólica) lo que resulta en cambios en la actividad enzimática, permaneciendo constante la cantidad de enzima involucrada. Los cambios en la concentración de un compuesto señal se logran muchas veces a través de la compartimentalización, es decir, a través de membranas que separan la célula del medio extracelular y por los pequeños compartimentos en el interior de la célula, éstas siendo separadas espacialmente (por membranas) o funcionalmente (por acarreadores).
2. Cambiando la concentración de los efectores (activadores o inhibidores) en las enzimas alostéricas. Al interactuar con el sitio alostérico de la enzima, estos efectores pueden aumentar o disminuir la actividad enzimática con base en los cambios cooperativos de la conformación de las subunidades que componen a la enzima. La cantidad de la enzima alostérica no cambia durante el proceso.
3. Por inducción o por represión cuando, en contraste con los dos mecanismos anteriores,

la cantidad de enzima y, por tanto, su actividad total en el sistema cambian. La cantidad de enzima por célula depende de la presencia de una proteína represora que es codificada por un gen regulador y que, en su forma activa, se une a una región del DNA (operador) e impide la unión de la RNA polimerasa al promotor. De esta manera, inhibe la síntesis de algunas enzimas (represión). Algunos compuestos de bajo peso molecular (inductores) pueden interactuar con el represor y cambiarlo a una forma inactiva que no puede inhibir la síntesis de una enzima dada -esto es la inducción de su síntesis. Fundamentalmente, no se abren nuevas vías metabólicas, simplemente se liberan o se bloquean las ya existentes, principalmente por el principio de retroalimentación, en el que la regulación se ejerce sobre la actividad de la enzima en una forma prácticamente instantánea y reversible.

Los sistemas multienzimáticos son aquellos en los cuales las enzimas individuales están organizadas de tal manera que el producto de una reacción sirva como sustrato de la siguiente enzima. Aquí, la regulación por retroalimentación juega un papel importante, ya que el producto de una secuencia de reacciones controla la actividad de una de las enzimas precedentes, generalmente la primera de la secuencia. El control por retroalimentación generalmente es negativo, es decir, un aumento en la concentración del producto inhibe a la enzima regulatoria. En los sistemas multienzimáticos, una de las reacciones parece ser la reacción limitante de la velocidad, es decir, procede a su velocidad

máxima posible. Otra manera de regular los procesos es a través de isoenzimas.

La regulación al nivel de un organismo requiere la existencia de células y de estructuras diferenciadas especiales con una función de control (células nerviosas, glándulas endócrinas). Se sabe que estas células producen ciertos compuestos que pueden ser considerados como portadores de información, señales que se transportan de una parte del organismo a otra.

La regulación del metabolismo celular puede llevarse a cabo por las hormonas, moléculas de diversa naturaleza química que pueden alcanzar a algunas células del organismo -quienes presentan receptores para ellas (tejidos blanco)- y afectar su función, Para aumentar la eficiencia de la regulación, las hormonas se transportan a menudo de la célula que las origina hasta el tejido blanco en asociación con una proteína específica. Se ha asumido que el proceso básico de la regulación hormonal es la unión de la hormona a su receptor, el que puede encontrarse en la superficie celular o en el citoplasma.

En el primer caso la hormona no penetra en la célula sino que, en algunos casos, reacciona con una proteína asociada a la adenilato ciclasa, que a su vez cataliza la formación de AMP cíclico a partir de ATP. Por eso el AMP cíclico se conoce a menudo como el "segundo mensajero" porque afecta a un gran número de reacciones intracelulares (por ejemplo, la activación de la proteína cinasa A). La fosforilación de proteínas produce cambios en la actividad de algunas enzimas claves en el metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos. Otras hormonas, al interactuar con su

receptor extracelular activan a la fosfolipasa C, produciendo los «segundos mensajeros» Inositol trifosfato y diacilglicerol, los cuales regulan la concentración de calcio citoplásmico, quien es una nueva señal de regulación metabólica. Una tercera molécula que actúa como segundo mensajero intracelular es el GMP cíclico.

Existe otro mecanismo por el que actúan las hormonas cuyo receptor se encuentra en la membrana. En este caso, la interacción de la hormona con el receptor, provoca que éste se autofosforile y una vez ocurrido este evento, el receptor fosforila a otras proteínas blanco. El proceso secuencial fosforilación de proteínas, se convierte en la manera en la que la señal se transmite a las moléculas implicadas en la regulación de algunas vías. La hormona insulina actúa mediante este mecanismo.

Otras hormonas –como las esteroidales y las tiroideas– cruzan la membrana celular y reaccionan con una proteína receptora en el citoplasma. El complejo viaja entonces hasta el núcleo donde, a nivel del DNA, aumenta la producción del RNAm y del RNAr específicos. Éstos controlan entonces la síntesis de las enzimas que intervienen en la regulación de los procesos metabólicos.

# TERCERA UNIDAD TEMÁTICA

## 1.-ORGANIZACIÓN DEL GENOMA

## 2.-FLUJO DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA

## 3.-NIVELES DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

## 4.-VIRUS, ONCOGENES Y TRANSFORMACIÓN

## 5.-TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DEL DNA

### 1.-ORGANIZACIÓN DEL GENOMA

Al finalizar esta unidad el alumno conocerá la estructura de los ácidos nucleicos y sus diferentes niveles de organización.

La información genética es el conjunto de datos que determinan la estructura y propiedades funcionales en las células. La información genética es almacenada en el núcleo de los eucariotos en estructuras llamadas cromosomas. En el caso de los procariotos, el cromosoma se encuentra disperso en el citosol. El núcleo es un orgánulo separado del citoplasma por la membrana nuclear, que de hecho, es una doble membrana que presenta poros con un diámetro de 30 a 100 nm, a través de los cuales las macromoléculas pueden intercambiarse entre el citoplasma y el núcleo. La membrana nuclear, además, participa directamente en la duplicación del DNA y permite la comunicación directa del núcleo con el medio que lo rodea. La mayoría del material nuclear está formado por nucleoproteínas cuyo principal componente es el ácido desoxirribonucleico (DNA); en un núcleo en interfase las nucleoproteínas forman filamentos de grosor variable (30 nm en promedio). El grosor de estos filamentos depende de la presencia o la ausencia de proteínas que interactúan con la doble hélice del DNA, mientras que su longitud depende del peso molecular de las cadenas del DNA. Así, un cromosoma contiene moléculas del DNA de varios centímetros de longitud y tiene aproximadamente  $10^{10}$  de peso molecular.

Además del ácido desoxirribonucleico, existe otro tipo de ácido nucleico: el RNA. Se conocen tres tipos diferentes del RNA: los RNA

mensajeros (RNAm), que llevan la información para una cadena polipeptídica; los RNA ribosomales (RNAr), que forman parte de la estructura de los ribosomas y que son de diferente tamaño (16S, 5S y 23S, en el caso de procariotos; 18S, 5S, 5.8S y 28S, en el caso de eucariotos; los RNA 16S y 18S se encuentran en la subunidad pequeña de los ribosomas, mientras que los otros se encuentran en la subunidad grande de los mismos) y los RNA de transferencia (RNAt), que sirven de adaptadores en el proceso de síntesis de proteínas porque traducen el mensaje codificado en nucleótidos a un lenguaje de aminoácidos. En los organismos eucariotos, los ácidos ribonucleicos (RNA) se sintetizan en el núcleo.

Las moléculas del DNA son polinucleótidos, o sea, cadenas compuestas de mononucleótidos en las que la parte externa de la estructura está constituida por los esqueletos de desoxirribosa fosfato unidos entre sí por enlaces fosfodiéster, de tal manera que el grupo 5'-fosfato de la desoxirribosa de un nucleótido está esterificado con el grupo 3'-OH de la desoxirribosa del nucleótido vecino. Las moléculas de DNA contienen dos tipos de bases nitrogenadas, dos bases pirimídicas (timina T y citosina C) y dos bases púricas (adenina A y guanina G). Estas bases se unen entre el C<sup>1</sup> de la desoxirribosa y el N<sup>1</sup> de las pirimidinas o el N<sup>9</sup> de las purinas por enlaces N-glucosídicos. La secuencia de bases es altamente específica para cada molécula del DNA.

Las moléculas del DNA en solución presentan la estructura de una doble hélice que

gira a la derecha alrededor de un eje común. Las dos cadenas son complementarias, corren de manera antiparalela entre ellas. Se conectan entre sí a través de puentes de hidrógeno que se forman entre bases yuxtapuestas A-T (dos puentes de hidrógeno) y C-G (tres puentes de hidrógeno); las bases se mantienen perpendicularmente al eje longitudinal de la molécula del DNA. Además, se estabilizan por interacciones hidrofóbicas entre bases vecinas de la misma hebra.

Las bases son hidrofóbicas y están colocadas en forma muy empaquetada y prácticamente no entran en contacto con el agua. El agua interacciona con la parte hidrofílica de la molécula formada por residuos de azúcar y grupos fosfato cargados negativamente. Dependiendo del contenido de agua del medio, las moléculas de DNA pueden existir en tres formas: A, B y Z. Las diferentes formas difieren en el número de nucleótidos por vuelta y en sus características estructurales. Se supone que la forma B es la predominante de las moléculas del DNA *in vivo*.

Aparte del DNA lineal, existen moléculas de DNA en forma de círculos cerrados que pueden arreglarse en estructuras similares a eslabones de una cadena (en mitocondrias, bacterias y virus).

Dado que el tamaño del núcleo impediría la existencia de los cromosomas en forma extendida, el DNA se compacta formando estructuras superenrolladas que se asocian a proteínas básicas (histonas) para formar superestructuras cada vez más complejas como son: los nucleosomas, el solenoide o fibra de 30 nm, las fibras de 300, 700 y 1 400 nm y, finalmente, las macroestructuras de los cromosomas mitóticos en donde se alcanza la máxima condensación posible, como se ve en el microscopio electrónico.

Las proteínas nucleares pueden dividirse, en general, en proteínas del tipo de las histonas y proteínas no histonas. Las histonas son proteínas de peso molecular entre 10 000 y 25 000 con un alto contenido de

aminoácidos básicos como arginina y lisina, los cuales pueden representar de 23 a 30% de todos los aminoácidos que componen a la proteína.

Las histonas pueden clasificarse en cinco diferentes grupos según su tamaño y su composición de aminoácidos. La función de las histonas consiste en organizar los largos filamentos de DNA en formas más compactas que permitan su empaquetamiento en el núcleo. Esto se lleva a cabo a través de las interacciones electrostáticas de las histonas con las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA. Además de las histonas existen proteínas no histonas que interactúan con el DNA.

Las no histonas son una gran variedad de proteínas que difieren en abundancia, tamaño y composición de aminoácidos. Algunas de ellas presentan dominios que son muy comunes como los dedos de cinc y los *zippers* o cremalleras de leucina. Estas proteínas son responsables de la selectividad e inhibición transitoria en la transcripción del RNA a través de su unión a ciertos segmentos de DNA implicados en su regulación o a través de la modificación de la organización del DNA. Además, regulan la transcripción de los genes de las mismas histonas.

Cuando se analiza el contenido del DNA que se expresa como preRNAm, RNAr, RNAt y otros tipos de RNA, se observa que éste constituye sólo 10% del DNA total (este DNA se conoce como DNA informativo); el restante 90% contiene pseudogenes, DNA espaciador y DNA repetitivo. Todo esto constituye el genoma. De todo el DNA, el repetitivo constituye 30 a 40% y está compuesto de secuencias de longitud variable que pueden estar repetidas diez, mil o más veces. Las secuencias repetidas pueden agruparse, como el caso del DNA satélite asociado al centrómero del cromosoma, o presentarse disperso, como la secuencia ALU, de la cual existen  $\pm$  500 000 copias dispersas en todos

los cromosomas y que está posiblemente relacionada con los orígenes de la duplicación. Del DNA celular, 0.1% es mitocondrial. En él hay 13 genes que codifican para proteínas de gran importancia para la bioenergética celular. Este DNA es de origen materno y constituye la llamada "herencia de Eva".

La mayoría de los genes para preRNA (RNAhn) son genesúnicos, pero pueden ser transcritos miles de veces. Los RNAm resultantes de la maduración de estos preRNA pueden traducirse cientos de veces, lo que provoca la aparición de una gran cantidad de proteína codificada en dichos genes.

## 2.-FLUJO DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA

Las moléculas del DNA son sintetizadas a partir de desoxirribonucleótidos en presencia de un molde de DNA y de varios tipos de enzimas, entre las que se encuentran dos DNA polimerasas, con diferente función en el proceso: una RNA polimerasa (primasa), una topoisomerasa de tipo II denominada DNA girasa y una serie de proteínas que catalizan la separación de las dos hebras del DNA, entre las que destacan las helicasas.

Las DNA polimerasas son enzimas que pueden unir desoxirribonucleótidos sólo en la dirección 5'→3', aunque también tienen actividad de exonucleasas en la dirección 5'→3' y en la dirección 3'→5'. Esta capacidad de polimerización sólo en la dirección 5'→3' se conoce como direccionalidad de la duplicación y es la responsable de algunas peculiaridades del proceso.

Dado que las DNA polimerasas no pueden iniciar la síntesis del DNA a menos que posean un extremo 3'OH terminal al que puedan añadir el desoxirribonucleótido entrante, se hace necesaria la actividad de una RNA polimerasa (primasa) que genere dicho extremo 3' OH terminal. Tomando como molde una de las hebras, la primasa cataliza la formación de un pequeño segmento (5-20 ribonucleótidos) de RNA que sirve como "cebador" para la síntesis de la nueva cadena

de DNA por la DNA polimerasa III. Las cadenas formadas *de novo* son antiparalelas a la cadena que les sirve de molde. Después de la sustitución del "cebador" del RNA a cargo de la DNA polimerasa I, los segmentos de la cadena formada de DNA son unidos por la DNA ligasa. El papel de la DNA polimerasa I, además de la función de sustitución de los "cebadores" del RNA, se encarga de la reparación de las hebras del DNA.

Diversos experimentos han demostrado que una de las cadenas del DNA resultante proviene del progenitor y la otra es la que se sintetizó *de novo*, la cual indica que la duplicación del DNA es semiconservativa. Este mecanismo permite la transmisión de la información genética de una generación a la siguiente.

A consecuencia de la direccionalidad de la actividad de la DNA polimerasa III se descubrió que hay una diferencia en la velocidad de síntesis entre las dos cadenas del DNA, encontrándose que hay una cadena líder y una retardada. Esto permitió determinar que la duplicación de la cadena retardada se realiza en forma discontinua, apareciendo una serie de secciones pequeñas de DNA (entre 100 y 1 000 pares de bases), conocidas como fragmentos de Okazaki, y que son posteriormente unidas por la DNA ligasa para formar la hebra completa.

Durante su vida, las células realizan diversas funciones, a veces se dedican principalmente a crecer, otras a dividir su material genético, o a repartirlo en lo que serán, dos nuevas células hijas. Estas diferentes etapas constituyen lo que se conoce como el ciclo celular, integrado por 4 fases bien definidas: **M** (mitosis), **G<sub>1</sub>** (unión 1), **S** (síntesis) y **G<sub>2</sub>** (unión 2). Morfológicamente sólo se han definido dos etapas de división e interfase, en esta última están incluidas G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>.

Durante la etapa G<sub>1</sub>, la célula crece, lo que implica un gran gasto energético y síntesis de sus componentes. El paso a la etapa S, requiere de señales precisas para que se inicie

la síntesis del DNA, de tal forma que, al terminar esta etapa, la célula tiene ya un contenido equivalente al doble de DNA. Para poder distribuir este DNA entre dos células hijas y dividirse (fase M), la célula pasa por una etapa de preparación para la mitosis llamada  $G_2$ . Numerosos genes se prenden y apagan durante cada etapa del ciclo celular en forma específica y altamente precisa.

Cuando una célula se diferencia, como es el caso de las neuronas, al llegar a la etapa  $G_1$ , la célula toma un camino alternativo a S, dejando de dividirse para estacionarse en una etapa llamada  $G_0$ . Durante esta etapa, un gran número de genes tejido-específico se prenden dando a la célula la identidad de acuerdo a la estirpe a la cual pertenece.

Todas las moléculas del RNA son sintetizadas en el núcleo mediante transcripción de la información genética codificada en la secuencia de las bases del DNA mediante la acción de una RNA polimerasa dependiente de DNA.

La RNA polimerasa dependiente del DNA es una enzima que está compuesta de 6 subunidades:  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\theta$  y una proteína ácida designada como  $\sigma$  que se requiere para la identificación y unión al promotor, es decir, el sitio donde debe iniciarse la transcripción. Esta enzima utiliza un molde de DNA para sintetizar una cadena de RNA, la cual crece en la dirección 5'3' hasta llegar a una señal de terminación en el DNA, lo que provoca la entrada de la proteína rho la cual separa la RNA polimerasa de la cadena molde del DNA.

En el caso de los organismos eucariotes, sus RNA polimerasas son diferentes, aunque el proceso es básicamente el mismo. Una de las diferencias en la transcripción entre procariotes y eucariotes es que los RNAm de los procariotes suelen ser policistrónicos, es decir, llevan la información para más de una cadena polipeptídica, mientras que los de eucariotes son monocistrónicos.

Los productos de la transcripción en eucariotes sufren, a su vez, una serie de modificaciones postranscripcionales. Los RNA mensajeros adquieren en su extremo 5' terminal un "casquete", es decir, un nucleótido poco común con un enlace especial (7 metilguanosina unida por un enlace 5'5') que lo protege de la acción de las nucleasas. Asimismo, adquieren una cola de poli A en el extremo 3' terminal y pierden algunas secuencias que no llevan información para ninguna cadena polipeptídica (intrones). El producto de este proceso de edición es el que será leído en los ribosomas durante la traducción o síntesis de proteínas.

Los RNA ribosomales se sintetizan principalmente en el nucleolo, se asocian a las proteínas ribosomales y las nucleoproteínas formadas son transportadas al citoplasma donde llevan a cabo su función.

Los RNA de transferencia también son editados, es decir, se modifican hasta adquirir la estructura funcional. Pierden secuencias o algunas de sus bases sufren modificaciones (por ejemplo, se reducen para producir dihidouridina, se metilan para producir ribotimina, etcétera) lo que les confiere resistencia a las nucleasas.

La síntesis de proteínas es un proceso complejo en el que intervienen de manera coordinada más de cien macromoléculas para unir los residuos de los 20 aminoácidos en una secuencia codificada en el RNA mensajero. Asimismo, la síntesis de proteínas requiere de grandes cantidades de energía y se regula rigurosamente. En este proceso participan los tres diferentes tipos de RNA (el mensajero, el ribosomal y el de transferencia); cada uno contribuye, de manera específica, a la obtención de una proteína funcional.

El lenguaje codificado en nucleótidos en los ácidos nucleicos es traducido a un lenguaje de aminoácidos mediante una serie de RNAs de transferencia (RNAt) cargados cada uno con un aminoácido determinado, el

que es especificado por el asa del anticodón, según un código de lectura: el código genético. Este código presenta cuatro características:

1. Está basado en tripletas, es decir, una secuencia de 3 nucleótidos determina un aminoácido.
2. El código no se sobrepone y no tiene espacios, es decir, que la información se almacena en tripletas de bases seguidas.
3. El código es universal. Es el mismo para todos los organismos.
4. El código es degenerado. Esto significa que más de una tripleta puede codificar para un aminoácido. Sin embargo, los primeros dos nucleótidos de una tripleta son generalmente los mismos para un aminoácido determinado.

El proceso de la síntesis de proteínas puede dividirse en diferentes etapas:

- a) La activación de los aminoácidos, es decir, la formación de los aminoacil RNAt por sintetasas específicas.
- b) La iniciación es la primera fase del proceso; en ella se requiere la presencia de tres proteínas conocidas como factores de iniciación necesarios para disociar los ribosomas en sus subunidades y para acarrear el aminoacil RNAt inicial (generalmente metionil RNAt o su análogo formilado). Además, se necesita la asociación del RNA mensajero con la señal de inicio de la traducción (generalmente la tripleta AUG) a la subunidad pequeña del ribosoma y del aminoacil RNAt inicial al sitio peptidilo (P) del ribosoma. Todo este complejo de proteínas, de RNAs y de la subunidad pequeña del ribosoma constituye el complejo de iniciación, al que se une la subunidad grande para formar el ribosoma activo.
- c) El alargamiento de la cadena polipeptídica se realiza a partir de este momento por la llegada del siguiente aminoacil RNAt al sitio aminoacilo (A) del ribosoma con la ayuda de un factor de alargamiento asociado a GTP, que lo coloca en el sitio adecuado con gasto de un enlace de alta energía. Enseguida se forma el enlace

peptídico por la acción de la peptidil transferasa que se encuentra asociada a la subunidad grande del ribosoma y el movimiento del ribosoma sobre la molécula de RNAm para colocar al nuevo peptidil RNAt en el sitio P y dejar libre el sitio A del ribosoma y continuar el alargamiento de la cadena. El movimiento del ribosoma se realiza por la acción de otro factor de alargamiento (factor G) con hidrólisis de una nueva molécula de GTP.

- d) La terminación se realiza cuando los factores de terminación (factores R) encuentran una tripleta sin sentido (UAA, UGA, UAG), lo que provoca la activación de la peptidil transferasa que hidroliza el enlace peptidil RNAt y libera a la cadena polipeptídica. El RNAt y el RNAm se liberan al igual que el ribosoma, que ahora puede volver a disociarse para iniciar un nuevo ciclo de traducción. El polipéptido liberado adquiere sus estructuras secundaria y terciaria correspondientes.

Esta descripción de la síntesis de proteínas corresponde a proteínas que permanecerán intracelularmente. En el caso de los organismos eucarióticos, las proteínas que serán excretadas, o que forman parte de la membrana plasmática, del retículo endoplásmico, del aparato de Golgi o de los lisosomas, se forman en ribosomas firmemente unidos al retículo endoplásmico. Conforme el polipéptido se va sintetizando, entra en cisternas endoplásmicas y es transportado al aparato de Golgi donde se concentra y se modifica, por ejemplo, con adición de azúcares. Más tarde estas proteínas son englobadas en vesículas que viajan a la superficie celular y se fusionan con la membrana para verter su contenido al espacio extracelular. Las proteínas cuyo destino son los organelos intracelulares se sintetizan en retículo endoplásmico y se transportan a su destino mediante una señal interna que es reconocida en dicho organelo.

Las modificaciones postraduccionales de las proteínas pueden incluir desde el plegamiento

de los polipéptidos con la ayuda de proteínas como las chaperonas y chaperoninas, cambios en el extremo amino-terminal y en aminoácidos específicos, procesamiento proteolítico, formación de puentes disulfuro y otras como la unión de carbohidratos, metales, grupos prostéticos, etcétera.

Una de las modificaciones más comunes en el extremo amino terminal que se da en las células eucarióticas es el de remover los residuos de metionina, con las que se inicia la síntesis de la misma; en las células bacterianas se remueve la formilación presente en la metionina y, en algunos casos, ésta también es recortada. Además de este tipo de modificaciones que ocurren en la secuencia del extremo amino terminal de una proteína, los aminoácidos presentes en la proteína también se pueden modificar; por ejemplo, los aminoácidos serina, treonina y tirosina pueden unir grupos fosfatos a sus cadenas laterales, es decir, son susceptibles de ser fosforilados en sus cadenas laterales. Este tipo de transformaciones se usa por la célula para comunicar cambios en el medio ambiente que tienen como respuesta modificaciones en la regulación de vías metabólicas. Algunos aminoácidos, como la lisina, puede metilarse, otros como la cisteína, añadir grupos isoprenílicos u otros lípidos a su cadena lateral, lo cual facilita la unión de la proteína con la membrana. Los residuos de cisteína pueden formar de manera específica puentes disulfuro. Finalmente, muchas de las proteínas son sintetizadas de tal forma que requieren que se les realice un corte de tipo proteolítico para que adquieran su forma activa, como es el caso de los zimógenos y las prohormonas. El corte de la preproteína hacia su forma biológicamente activa se realiza por una proteasa específica y se encuentra regulado por los diferentes eventos celulares.

¿Qué determina la estabilidad de las proteínas?

Todas las células contienen gran cantidad de proteasas con diferente especificidad. Estas las podemos dividir en tres grupos generales:

1. Algunas proteasas cortan a la proteína en sitios específicos dando origen a proteínas maduras que son de menor tamaño que su proteína precursora. Estas proteasas participan en diferentes procesos que incluyen el corte de la secuencia señal de una proteína de exportación y el procesamiento de proteínas citosólicas para dar origen a sus formas maduras.
2. La internalización de proteínas de membrana (algunos receptores) en respuesta a la unión del ligando genera como primer evento la unión de clatrina alrededor de la membrana; ésta se invagina al citoplasma y forma vesículas rodeadas de clatrina. El destino de estas vesículas son los endosomas temprano, tardío y finalmente el lisosoma que es el responsable de la degradación de macromoléculas por medio de enzimas hidrolíticas.
3. Finalmente, la vida media de las proteínas varía entre algunos segundos, días y excepcionalmente toda la vida (cristalino). Para ser degradadas, las proteínas son marcadas para ser reconocidas por el proteosoma, el cual es un complejo de alto peso molecular que se encarga de la degradación de proteínas citosólicas. Los sustratos de este sistema son principalmente proteínas que están alteradas en su plegamiento, por lo que el proteosoma actúa como un sistema de control de calidad. También está involucrado en la degradación de proteínas como un mecanismo de regulación, por ejemplo en el caso de las ciclinas para que se complete el ciclo celular. El primer paso en este sistema es el marcar a la proteína alterada (proteína blanco) para que sea degradada. La marca es una pequeña proteína llamada ubiquitina, la cual

se une covalentemente a la proteína blanco. Son tres los componentes del sistema de ubiquitinación:

- a) E1 enzima activadora de la ubiquitina, dependiente de ATP
- b) E2 enzima que conjuga a la ubiquitina con la proteína blanco
- c) E3 ligasa de ubiquitina, selecciona a la proteína blanco
- d) El complejo multiproteico del proteosoma (20S) degrada rápidamente a las proteínas unidas a la ubiquitina. Este complejo está formado por 14 subunidades apiladas una sobre otra y que son las responsables de la actividad proteolítica.

Para que la proteína sea degradada necesita tener varias ubiquitinas unidas.

Durante la duplicación puede ocurrir espontáneamente un número pequeño de errores en el orden o tipo de las bases nitrogenadas. La probabilidad de uno de estos errores puede incrementarse bajo la influencia de diferentes agentes mutágenos (químicos o físicos). Estos cambios en la secuencia de bases nitrogenadas en el DNA se conocen con el nombre de mutaciones.

Existen varios tipos de mutaciones: las que cambian una base por otra (sustitución) y pueden ser de una base púrica por otra base púrica o de una pirimidina por otra pirimidina; lo que se conoce como

transición. Si el cambio es de una purina por una pirimidina, o viceversa, la mutación se conoce como transversión. Existe otro tipo de mutaciones en las que hay un cambio de marco de lectura para la traducción. Hay dos tipos de mutaciones de este tipo: la inserción, en la que la entrada de uno o dos nucleótidos modifica el marco en que se leerá el mensaje por los ribosomas, y la supresión (delección), en la que la pérdida de uno o dos nucleótidos provoca el mismo efecto.

En el caso de las mutaciones puntuales, en las que sólo hay cambio de una

base, la información genética es cambiada casi imperceptiblemente y las mutantes pueden sobrevivir. Cuando cambia un mayor número de bases, ocurren alteraciones importantes en la secuencia de un gen, lo que puede ser incompatible con la existencia de esa mutante.

Con el fin de sobrevivir, la célula tiene mecanismos para reparar el DNA dañado. En ese sentido la actividad exonucleasa 3'→5' de las DNA polimerasas, la de los productos de algunos genes, como los uvr ABC, los de la fotoliasa y la de la uracilo-DNA glucosidasa desempeñan un papel importante.

## **NIVELES DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA**

Al finalizar esta subunidad el alumno conocerá los diferentes niveles de regulación genética (en procariotes y en eucariotes), así como los diversos mecanismos implicados en ella.

Las bacterias son capaces de controlar la expresión de las enzimas necesarias para utilizar nutrientes del medio, o bien, aquellas enzimas requeridas para la síntesis de biomoléculas que intervienen en su funcionamiento y proliferación. Estos cambios de expresión ocurren con gran rapidez y precisión y fueron el primer ejemplo claro de la manera en que se regula la expresión génica. Cuando una enzima se expresa en respuesta a una necesidad bacteriana se habla de un proceso de inducción génica, mientras que, cuando su expresión se apaga, se habla de represión génica.

Los cambios en la expresión de un gen están controlados por la interacción de su región reguladora con diversas proteínas nucleares que favorecen o interfieren con la unión de la RNA polimerasa al sitio de iniciación de la transcripción. El ejemplo más sencillo de esta regulación es la manera como se controla la expresión de un conjunto de genes, llamado operón de lactosa, cuya expresión depende de la presencia de lactosa

en el medio; normalmente, la expresión de este operón se encuentra reprimida. El gen regulador codifica para una proteína que se une con gran afinidad a la región del DNA que controla la expresión del operón y que previene que la RNA polimerasa pueda iniciar la transcripción. Por su función, a esta proteína se le denomina el represor del operón de lactosa. La presencia de lactosa, en ausencia de otros nutrientes, favorece que una pequeña porción de dicha lactosa sea transformada enzimáticamente a un metabolito que puede unirse al represor con gran afinidad; el resultado de esta unión es una inactivación alostérica del represor. A este metabolito de la lactosa se le denomina inductor del operón ya que, al disminuir la cantidad de represor funcional, favorece de manera indirecta la iniciación de la transcripción de los otros genes del operón. Un nivel más de control queda de manifiesto cuando las bacterias reprimen la expresión del operón de lactosa cuando en el medio aparecen otros nutrientes como la glucosa. A este efecto represor de la glucosa se le conoce como represión catabólica y ocurre gracias a que la presencia de glucosa reduce los niveles intracelulares de AMP cíclico (cAMP). Normalmente, el cAMP se une a una proteína denominada proteína receptora de cAMP (CRP, también denominada CAP) y forma un complejo que se une a la región reguladora de los operones y favorece su transcripción. Por tanto, cuando la glucosa reduce los niveles de cAMP, la proteína CRP pierde su afinidad por la región reguladora del operón y se interrumpe la expresión.

Una forma alternativa de regular la expresión génica es acoplar la transcripción a la traducción lo cual favorece la terminación temprana de la transcripción. Este proceso se conoce como atenuación y el operón de triptofano constituye un buen ejemplo. Cuando hay triptofano en el medio se favorece la terminación de la transcripción y el operón nunca logra expresarse; sin embargo, cuando el triptofano se agota, la transcripción continúa

y se expresan las enzimas necesarias para su síntesis. La expresión de otros operones necesarios para la síntesis de aminoácidos, como histidina, fenilalanina, leucina, treonina e isoleucina, es controlada por atenuación.

Mientras que en las bacterias cualquier individuo puede expresar todos sus genes, en las células animales esto no siempre es cierto. Por ejemplo, todas las células del cuerpo humano poseen la misma información genética codificada aproximadamente en  $10^5$  genes distintos; sin embargo, no hay ningún tipo celular que exprese todos estos genes simultáneamente. De hecho, cualquier célula expresa sólo un número reducido de estos genes, la gran mayoría de los cuales codifica para proteínas necesarias para las funciones generales de cualquier tipo celular. La expresión de estos genes es lo que hace similares a los distintos tipos celulares; un ejemplo claro de este tipo de genes lo constituye los que codifican para las enzimas glucolíticas, proteínas que se expresan de manera constitutiva como resultado de que las regiones reguladoras de estos genes responden a factores de transcripción presentes en todas las células. Los transcritos primarios son editados inmediatamente para dar origen al RNA mensajero maduro que es traducido por ribosomas libres para sintetizar un péptido que, al adquirir su conformación nativa, posee actividad enzimática. Así como la expresión de los genes constitutivos confiere similitudes a los distintos tipos celulares, la expresión de genes tejido específico es la que le da a cada tipo celular sus características. Los hepatocitos, por ejemplo, expresan albúmina, pero no miosina, como lo hacen las células musculares, ni tampoco expresan las enzimas que permiten la síntesis de neurotransmisores como lo hacen las neuronas. La expresión de estos genes tejido-específico está controlada por sus regiones reguladoras las cuales requieren de factores de transcripción especiales que aparecen en dos etapas. En la primera, la expresión de estos

factores ocurre en respuesta a estímulos hormonales o de factores de crecimiento durante la diferenciación celular. En la segunda, la presencia de estos factores de transcripción se hace independiente del estímulo hormonal y de factores de crecimiento o diferenciación y se convierte en proteínas que se expresan de manera permanente en la célula diferenciada. Muchas de las hormonas que activan este proceso requieren de receptores de membrana y sistemas de transducción que llevan la señal al núcleo a través del citoplasma. Otros, como las hormonas esteroides, se unen a receptores nucleares que sirven como factores de transcripción.

En algunas ocasiones la regulación implica un cambio de la secuencia del DNA, como se ejemplifica a continuación. En el humano, como en todos los organismos diploides, la mayoría de los genes está presente en dos copias, una de origen paterno y una de origen materno. Algunas veces, el origen paterno o materno del gen determina que este gen pueda ser transcrito o no, fenómeno al que se le denomina "impronta genética". El resultado de esta inactivación es que la expresión del gen se reduce a la mitad, ya que sólo una de las dos copias es activa, como es el caso de los genes localizados en el cromosoma X. En contraposición, existen genes que pueden estar presentes en un mayor número de copias como resultado de una amplificación; tal es el caso de los genes que codifican para los RNA ribosomales, de los cuales las células requieren muchas copias. En genes que codifican para los anticuerpos en células B y los receptores de las células T ocurre un rearreglo de las secuencias primarias del DNA, lo que es responsable de la gran diversidad de antígenos naturales y artificiales que pueden ser reconocidos por el sistema inmune. Este proceso es controlado por los distintos factores que regulan la maduración de las células B y las células T.

Además de la capacidad de transcribir o no ciertos genes con mayor o menor eficiencia, existen otros niveles en los que se puede regular la función del producto final por medio de la modulación tanto en cantidad como en calidad. El primer nivel de regulación se refiere al control de la vida media de los RNA mensajeros determinada por la existencia de secuencias en los extremos no codificantes que regulan su velocidad de degradación. Durante el proceso de maduración de los mensajeros, en el cual se eliminan intrones, también pueden eliminarse uno o varios exones y dar lugar a una mayor diversidad de proteínas; a este proceso se le denomina edición alternativa. Una vez que el mensajero ha madurado, existen varios mecanismos que pueden aumentar o disminuir la eficiencia con la que los ribosomas traducen la información a un péptido. En muchas ocasiones la proteína tiene un destino final diferente al citoplasma, el cual puede ser mitocondrial, lisosomal, de membrana celular o una proteína de secreción; esta información se encuentra codificada en el extremo amino terminal del péptido naciente y puede constituir un punto más de control. El último punto de regulación consiste en aumentar o disminuir la velocidad de degradación de las proteínas por el sistema de la ubiquitina; este mecanismo nuevamente contribuye a controlar la cantidad del producto génico. A pesar de la diversidad de los niveles de regulación de la expresión génica, los mecanismos más comunes son los que modulan la eficiencia de la transcripción y los que modulan la actividad biológica por modificaciones postraduccionales, entre los que destacan la fosforilación y la desfosforilación.

Hemos mencionado los rasgos más sobresalientes de la manera en que las células regulan la expresión génica, pero aún es poco lo que se sabe con respecto a cómo se integran e interaccionan. Por ejemplo, aún resulta difícil explicar cómo distintos factores de crecimiento, con diferentes receptores de

membrana y sistemas de transducción, estimulan a los mismos factores de transcripción, pero conducen a respuestas celulares diversas. El gran número de niveles a los cuales se puede regular la expresión génica y las múltiples combinaciones y secuencias en las que pueden presentarse sugiere una gran complejidad. El resultado final de esta complejidad determina al tipo de genes que participan y la secuencia en la que se expresan para dar origen a los diferentes tipos celulares.

### **VIRUS ONCOGENES Y TRANSFORMACIÓN**

Los virus son partículas subcelulares constituidas por ácidos nucleicos en forma de DNA o de RNA de cadena doble o sencilla, proteínas y, en ocasiones, membranas lipídicas. Su genoma compacto está constituido por un reducido número de genes que codifican para proteínas estructurales de la cápside, enzimas de duplicación, así como enzimas y secuencias de DNA que permiten la inserción del genoma viral al genoma de la célula huésped, entre otros.

Los virus son incapaces de multiplicarse de manera autónoma, pero pueden hacerlo cuando se encuentran en el interior de una célula. En la mayoría de los casos la infección viral conduce a la multiplicación viral a expensas de la célula infectada. El daño ocasionado al destruir las células es responsable de una gran variedad de enfermedades de menor gravedad, como la influenza, o enfermedades más serias, como la viruela, e incluso enfermedades mortales, como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. En algunos casos la infección viral se asocia a una mayor frecuencia en el desarrollo de tumores y cáncer, como es el caso del virus del papiloma y el cáncer cervicouterino. Es interesante notar que un tipo de virus sólo puede infectar a un restringido tipo de células y a ninguna otra, por ejemplo, el virus del herpes infecta las células de los nervios periféricos. A este fenómeno de especificidad de infección se le denomina tropismo y se debe a que el virus y su célula

blanco interactúan por la unión de una proteína de la envoltura viral con un antígeno presente en la membrana celular.

Las enfermedades por virus son difíciles de tratar debido a que, fuera del momento en que las partículas virales viajan hasta sus células blanco y penetran en su interior, no pueden ser neutralizadas por anticuerpos.

El problema del reconocimiento de antígenos virales por anticuerpos se dificulta si uno considera que en poco tiempo emerge un gran número de partículas virales de una célula infectada y que el tiempo en que se logran títulos protectores de anticuerpos es relativamente largo. A estas dificultades se suma una característica genética de los virus que les permite tolerar cambios de secuencias o incluso eliminar o adquirir nuevos genes a lo largo de su multiplicación, lo que les confiere una gran diversidad genética. Estos cambios en secuencias son particularmente nocivos cuando ocurren en regiones del DNA que codifican para los antígenos que son reconocidos por anticuerpos.

Las proteínas virales que se seleccionan son aquellas que continúan teniendo la función requerida por el virus, pero que no pueden ser reconocidas por los anticuerpos. La velocidad con la que estos cambios se propagan a toda la población viral es sorprendentemente rápida y previenen el uso eficaz de vacunas contra varias enfermedades virales. Además de los anticuerpos, el organismo produce factores proteicos solubles llamados *interferones* que aceleran la muerte de la célula infectada e interrumpen la expresión de proteínas virales. El que los virus se aislen del sistema inmune, su ciclo de vida y su gran diversidad genética, son responsables de que no haya medidas eficaces para su eliminación y son la causa de su gran impacto, tanto en la salud pública, como en la economía agropecuaria y agrícola.

En su mayoría, los virus son capaces de activar la maquinaria de síntesis del DNA de

la célula infectada, evento ligado al ciclo celular y al control mismo de la proliferación; al interferir con este aspecto de la vida celular los virus aseguran su multiplicación. No es sorprendente entonces que en ocasiones los virus hayan incorporado a su reducido genoma versiones de genes celulares que controlan la proliferación celular. Un ejemplo de este tipo de genes es *ras*, que codifica para una proteína G monomérica que transduce la señal proliferativa de diversos factores de crecimiento. La versión celular de *ras* (*c-ras*) posee homólogos virales (*v-ras*), la mayoría de los cuales presenta alteraciones que dan lugar a una proteína permanentemente activa y que no está sujeta a la regulación celular. Así, mientras que *c-ras* sólo entra en función cuando los receptores o factores de crecimiento son activados, *v-ras* constantemente obliga a la célula a proliferar. Cuando los virus, en lugar de lisar a una célula, integran su genoma al material genético de ésta, los genes virales pueden expresarse de manera constitutiva; si esto ocurre con genes como *v-ras*, se favorece una proliferación celular descontrolada y se dice que la célula ha sido transformada. Hay proteínas virales que pueden interferir con la proliferación celular, como el antígeno grande T del adenovirus o las proteínas E7 del virus del papiloma.

No sólo la integración viral puede dar origen a la expresión de genes que promueven la proliferación celular, también la aparición de mutaciones espontáneas puede dar origen a versiones de *c-ras* que al igual que *v-ras* estimulan continuamente la proliferación. A estas versiones mutadas se les denomina oncogenes, ya que están asociadas al desarrollo de neoplasias, tumores y diversos tipos de cáncer. A los genes celulares que al ser mutados pueden dar origen a oncogenes se les denomina protooncogenes; a éstos pertenece una larga lista de receptores y proteínas de transducción de diferentes factores de crecimiento y proteínas que controlan el ciclo celular. Mientras que los

protooncogenes son todos parte de las señales que activan la proliferación, también existen genes cuyos productos sirven para frenarla. A estos frenos de la proliferación se les denomina genes supresores de tumores o *antioncogenes*. Si un gen supresor de tumores se muta y pierde su función, el resultado puede compararse con la pérdida de un freno de la proliferación celular. Cuando esto ocurre también puede presentarse un crecimiento descontrolado, ahora como resultado de la falta de un mecanismo de freno.

Las células transformadas poseen mutaciones, tanto en protooncogenes como en genes supresores de tumores, lo que da como resultado una señal permanente de proliferación, por un lado, y la falta de mecanismos de freno, por el otro. Esta combinación hace que estas células presenten una duplicación descontrolada y mucho más veloz que las células normales, lo que, en parte, es responsable del crecimiento desmesurado de las masas tumorales.

Las técnicas modernas de biología molecular han permitido un gran control sobre la caracterización y manipulación del material genético tanto de DNA como de los distintos tipos de RNA. Debido a su especificidad y gran capacidad de detección, estas técnicas han tenido un gran impacto en la medicina. Inicialmente, la biología molecular se ha aplicado al diagnóstico de entidades patológicas y para determinar la presencia de agentes infecciosos como microorganismos y virus. En la actualidad se estudia con gran interés la posibilidad de una terapéutica génica que pueda corregir alteraciones fisiopatológicas derivadas de la pérdida de la función parcial o total de un gen; esto abre una nueva era en las aplicaciones de la biología molecular en la medicina.

La biología molecular recibió un gran impulso con el descubrimiento de entidades circulares de DNA llamadas plásmidos que, además de poseer genes que confieren

resistencia a los antimicrobianos, pueden contener y expresar muchos otros genes.

Dos herramientas cruciales de la biología molecular son la posibilidad de cortar el DNA con enzimas de restricción, endonucleasas que sólo cortan secuencias específicas, y el uso de ligasas, que generan un enlace covalente entre los extremos obtenidos por la acción de las enzimas de restricción. Estos dos principios básicos permiten remover o insertar cualquier porción de DNA contenida entre dos sitios de restricción y se dice que se ha clonado esta secuencia de DNA. La clonación hace posible introducir en un plásmido, no sólo secuencias de DNA de otros plásmidos, sino también de cualquier origen: viral, bacteriano, animal o vegetal. La reciente aplicación de transcriptasas reversas de origen viral, enzimas que sintetizan DNA complementario mediante RNA como molde, y de polimerasas termostables que permiten "amplificar" un segmento de DNA, ha simplificado aún más el uso de técnicas de biología molecular.

El tener secuencias de DNA o DNA complementario al RNA mensajero ha resultado de gran utilidad para el estudio de genes y RNA mensajeros. Los fragmentos de DNA obtenidos de la clonación en plásmidos, o por transcripción reversa y amplificación, pueden unirse a nucleótidos marcados con el isótopo radiactivo del fósforo  $^{32}\text{P}$ , o "derivatizados" con moléculas fluorescentes; la marca permite seguir a estas moléculas que sirven como sondas para localizar a sus secuencias complementarias. La gran especificidad y elevada capacidad de detección de la hibridación de la sonda con su secuencia complementaria permite el análisis de DNA para detectar la presencia y número de copias de un gen (técnica denominada Southern); también se aplica en la identificación y la cuantificación de RNA mensajeros (técnica a la que se le denomina Northern).

Los segmentos de DNA cuyo estudio ha resultado de mayor interés son aquellos que contienen toda la información de un gen o de

las regiones reguladoras. Sin embargo, introducir un gen o un promotor a unas cuantas moléculas de plásmido sería problemático para estudios bioquímicos, genéticos y estructurales por la reducida cantidad de material. Esta limitación había sido resuelta previamente, ya que los plásmidos pueden ser introducidos a bacterias a través del proceso de transformación. Normalmente los plásmidos contienen secuencias que les permiten multiplicarse una vez que están dentro de una bacteria; a estas secuencias se les denomina origen de duplicación. Gracias a que los plásmidos contienen genes que confieren resistencia a los antimicrobianos, las bacterias que han sido transformadas con un plásmido pueden distinguirse de las que no lo han sido al hacerlas crecer en medio de cultivo que contiene al antimicrobiano en cuestión; los antimicrobianos más utilizados son la ampicilina y la kanamicina. Este simple proceso de selección logra dos resultados prácticos: por una parte, elimina a las bacterias no transformadas y, por otra, asegura la multiplicación masiva del plásmido que se duplica junto con el genoma bacteriano. El resultado es un cultivo de bacterias con un alto contenido de plásmidos y, por tanto, del segmento de DNA que se desea estudiar. La multiplicación del segmento de DNA por estudiar asegura suficiente material para cualquier otro propósito.

A los plásmidos que sirven para insertar DNA ajeno al plásmido y permiten su multiplicación se les denomina vectores de clonación, pero existen también plásmidos más complejos en los que el sitio en el que se puede insertar el DNA exógeno se encuentra frente a una región reguladora que permite la síntesis de RNA mensajero. A estos plásmidos se les llama vectores de expresión, ya que permiten que el DNA sea transcrito a RNA; estos plásmidos pueden presentar regiones reguladoras reconocidas por bacterias o por células de animales. Hemos dicho que la transformación consiste en introducir el DNA a

una bacteria y expresarlo; cuando esto ocurre en una célula eucariótica: levadura, célula animal o vegetal, el proceso se denomina transfección. Una aplicación particularmente útil de la biología molecular se ha derivado del uso de vectores de expresión en bacterias y células animales. La expresión de proteínas exógenas por bacterias y levaduras ha permitido obtener cantidades suficientes para estudios bioquímicos, estructurales e, incluso, ha sido la principal fuente para la cristalización. La transfección y la expresión de proteínas exógenas en células de mamíferos y en células vegetales ha permitido identificar versiones de genes que contienen alteraciones en sus secuencias que dan como resultado proteínas con una función alterada. Con esta aproximación se han identificado mutaciones responsables de enfermedades como el cáncer y la diabetes. Una aplicación sorprendente ha sido la de identificar la función de genes recién descubiertos que al ser insertados en vectores de expresión no sólo han permitido obtener proteínas puras en cantidades suficientes para su caracterización bioquímica, sino también han dado la oportunidad de conocer su función, al expresarlas en un ambiente celular normal.

