

# BIOS. NOTAS INSTANTÁNEAS DE BIOQUÍMICA

Cuarta edición

David **Hames**  
Nigel **Hooper**

**BIOS. NOTAS INSTANTÁNEAS DE  
BIOQUÍMICA**



# BIOS. NOTAS INSTANTÁNEAS DE BIOQUÍMICA

Cuarta edición

David Hames y Nigel Hooper  
Faculty of Biological Sciences, University of Leeds

*Traducción*  
Héctor Raúl Planas González



MÉXICO • BOGOTÁ • BUENOS AIRES • CARACAS • GUATEMALA  
MADRID • NUEVA YORK • SAN JUAN • SANTIAGO • SÃO PAULO  
AUCKLAND • LONDRES • MILÁN • MONTREAL • NUEVA DELHI  
SAN FRANCISCO • SIDNEY • SINGAPUR • ST. LOUIS • TORONTO

**Director editorial:** Javier de León Fraga  
**Editor sponsor:** Edgar Emilio Salas Castillo  
**Editor de desarrollo:** Héctor F. Guerrero Aguilar  
**Supervisor de producción:** Juan José Manjarrez de la Vega

#### NOTA

La medicina es una ciencia en constante desarrollo. Conforme surjan nuevos conocimientos, se requerirán cambios de la terapéutica. El (los) autor(es) y los editores se han esforzado para que los cuadros de dosificación medicamentosa sean precisos y acordes con lo establecido en la fecha de publicación. Sin embargo, ante los posibles errores humanos y cambios en la medicina, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación de la obra garantizan que la información contenida en ella sea precisa o completa, tampoco son responsables de errores u omisiones, ni de los resultados que con dicha información se obtengan. Convendría recurrir a otras fuentes de datos, por ejemplo, y de manera particular, habrá que consultar la hoja informativa que se adjunta con cada medicamento, para tener certeza de que la información de esta obra es precisa y no se han introducido cambios en la dosis recomendada o en las contraindicaciones para su administración. Esto es de particular importancia con respecto a fármacos nuevos o de uso no frecuente. También deberá consultarse a los laboratorios para recabar información sobre los valores normales.

## BIOS. NOTAS INSTANTÁNEAS DE BIOQUÍMICA

Cuarta edición

Prohibida la reproducción total o parcial de esta obra,  
por cualquier medio, sin autorización escrita del editor.



DERECHOS RESERVADOS © 2014, respecto a la primera edición en español por,  
McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. DE C.V.

Prolongación Paseo de la Reforma 1015, Torre A,  
Piso 17, Colonia Desarrollo Santa Fe,  
Delegación Álvaro Obregón,  
C.P. 01376, México, D. F.  
Miembro de la Cámara Nacional de la Industria Editorial Mexicana, Reg. Núm. 736

**ISBN: 978-1-4562-2378-6**

MAC 04/2014

Translated from the fourth English edition of:  
Biochemistry, David Hames and Nigel Hooper, 4<sup>th</sup> ed. (BIOS instant notes).  
Copyright © 2011, by Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.  
All Rights Reserved  
ISBN: 978-0-415-60845-9

1234567890

2356789014

Impreso en México

*Printed in Mexico*

# Comité asesor para la revisión científica de la edición en español

## **MC Rosa María Dávila Márquez**

Maestra en Ciencia y Tecnología de los Alimentos  
Profesor Investigador Titular "A" de tiempo completo  
Facultad de Ciencias Químicas  
Benemérita Universidad Autónoma del Estado de Puebla

## **Dra. Marina Gavilanes Ruiz**

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

## **MC Ariadna González Solís**

Departamento de Bioquímica. Conjunto E  
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

## **Dr. Javier Plasencia de la Parra**

Profesor titular. Departamento de Bioquímica  
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

## **Dra. Sobeida Sánchez Nieto**

Departamento de Bioquímica. Conjunto E  
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Información adicional disponible en el  
Centro de aprendizaje en línea  
(On-line Learning Center)  
**[www.mhhe.com/medicina/hames\\_bioquimica4e](http://www.mhhe.com/medicina/hames_bioquimica4e)**

# Contenido

|   |            |
|---|------------|
| Prefacio .....  | ix         |
| <b>Sección A – Células .....</b>                            | <b>1</b>   |
| A1 Células procariotas .....                                | 1          |
| A2 Células eucariotas .....                                 | 4          |
| A3 Crecimiento celular .....                                | 9          |
| A4 Imágenes de las células .....                            | 11         |
| A5 Fraccionamiento celular .....                            | 16         |
| <b>Sección B – Aminoácidos y proteínas .....</b>            | <b>20</b>  |
| B1 Estructura de los aminoácidos .....                      | 20         |
| B2 Estructura y función de las proteínas .....              | 26         |
| B3 Mioglobina y hemoglobina .....                           | 36         |
| B4 Colágena .....   | 42         |
| B5 Motores moleculares .....                                | 47         |
| B6 Anticuerpos .....  | 54         |
| <b>Sección C – Estudio de las proteínas .....</b>           | <b>60</b>  |
| C1 Purificación de proteínas .....                          | 60         |
| C2 Electroforesis en gel .....                              | 66         |
| C3 Secuenciación de proteínas y síntesis de péptidos .....  | 71         |
| C4 Inmunodetección .....                                    | 77         |
| <b>Sección D – Enzimas .....</b>                            | <b>81</b>  |
| D1 Introducción .....                                       | 81         |
| D2 Termodinámica .....                                      | 87         |
| D3 Cinética enzimática .....                                | 90         |
| D4 Inhibición enzimática .....                              | 94         |
| D5 Regulación de la actividad enzimática .....              | 97         |
| <b>Sección E – Membranas y señalización celulares .....</b> | <b>103</b> |
| E1 Lípidos de la membrana .....                             | 103        |
| E2 Estructura de la membrana .....                          | 108        |
| E3 Transporte de membrana: moléculas pequeñas .....         | 115        |
| E4 Transporte de membrana: macromoléculas .....             | 120        |
| E5 Transducción de señales .....                            | 124        |
| E6 Función nerviosa .....                                   | 132        |
| <b>Sección F – Estructura y replicación del DNA .....</b>   | <b>136</b> |
| F1 Introducción al DNA .....                                | 136        |
| F2 Genes y cromosomas .....                                 | 140        |
| F3 Replicación del DNA en las bacterias .....               | 145        |
| F4 Replicación del DNA en los eucariotas .....              | 150        |
| <b>Sección G – Síntesis y procesamiento del RNA .....</b>   | <b>154</b> |
| G1 Introducción al RNA .....                                | 154        |
| G2 Transcripción en procariotas .....                       | 156        |
| G3 Operones .....   | 160        |



|   |   |            |
|---|---|------------|
| G4  | Transcripción en eucariotas: descripción .....                            | 166        |
| G5  | Transcripción de los genes que codifican proteínas en los eucariotas..... | 168        |
| G6  | Regulación de la transcripción por la polimerasa II de RNA.....           | 172        |
| G7  | Procesamiento del pre-mRNA eucariota .....                                | 179        |
| G8  | Transcripción y procesamiento del RNA ribosómico .....                    | 189        |
| G9  | Transcripción y procesamiento del RNA de transferencia .....              | 195        |
| <b>Sección H – Síntesis de proteínas .....</b>          |   | <b>199</b> |
| H1  | El código genético .....  | 199        |
| H2  | Traducción en procariotas .....   | 204        |
| H3  | Traducción en eucariotas .....  | 210        |
| H4  | Direccionamiento de proteínas.....  | 213        |
| H5  | Glucosilación de proteínas .....  | 220        |
| <b>Sección I – Tecnología del DNA recombinante.....</b> |   | <b>224</b> |
| I1  | El poder de los métodos de DNA recombinante.....                          | 224        |
| I2  | Enzimas de restricción .....  | 227        |
| I3  | Hibridación de ácidos nucleicos .....                                     | 232        |
| I4  | Clonación del DNA.....  | 236        |
| I5  | Secuenciación del DNA.....  | 240        |
| I6  | Reacción en cadena de la polimerasa .....                                 | 243        |
| I7  | Mutagénesis dirigida al sitio.....  | 247        |
| <b>Sección J – Metabolismo de carbohidratos.....</b>    |   | <b>252</b> |
| J1  | Monosacáridos y disacáridos .....   | 252        |
| J2  | Polisacáridos y oligosacáridos .....                                      | 257        |
| J3  | Glucólisis .....  | 260        |
| J4  | Gluconeogénesis .....   | 268        |
| J5  | Vía de la pentosa fosfato .....   | 275        |
| J6  | Metabolismo del glucógeno .....   | 278        |
| J7  | Control del metabolismo del glucógeno.....                                | 281        |
| <b>Sección K – Metabolismo de lípidos .....</b>         |   | <b>285</b> |
| K1  | Estructura y función de los ácidos grasos.....                            | 285        |
| K2  | Descomposición de los ácidos grasos .....                                 | 288        |
| K3  | Síntesis de ácidos grasos .....   | 294        |
| K4  | Triacilgliceroles.....  | 299        |
| K5  | Colesterol .....  | 303        |
| K6  | Lipoproteínas .....   | 308        |
| <b>Sección L – Respiración y energía .....</b>          |   | <b>311</b> |
| L1  | Ciclo del ácido cítrico .....   | 311        |
| L2  | Transporte de electrones y fosforilación oxidativa .....                  | 315        |
| L3  | Fotosíntesis .....  | 326        |
| <b>Sección M – Metabolismo del nitrógeno .....</b>      |   | <b>335</b> |
| M1  | Fijación y asimilación del nitrógeno .....                                | 335        |
| M2  | Metabolismo de los aminoácidos .....                                      | 338        |
| M3  | Ciclo de la urea .....  | 343        |
| M4  | Hemos y clorofilas .....  | 348        |
| <b>Lecturas recomendadas.....</b>                       |   | <b>352</b> |
| <b>Abreviaturas.....</b>                                |   | <b>357</b> |
| <b>Índice .....</b>                                     |   | <b>360</b> |

# Prefacio

Transcurrieron cinco años desde que se publicó la tercera edición de *Notas instantáneas de bioquímica*. Muchos cambios se produjeron en el tema desde entonces, y realmente ha sido un periodo emocionante para el descubrimiento en numerosas áreas de esta materia. No es de extrañar que, por lo tanto, los autores enfrenten el mismo deseo experimentado por los escritores de libros de texto de todo el mundo: poder describir a los estudiantes todo sobre los nuevos avances logrados. Sin embargo, la razón por la que se redactó la primera edición, hace ya muchos años, fue destacar la información fundamental que un alumno de primer ingreso tiene que saber para contar con una base sólida para los años de estudio por venir. Esta nueva edición se mantiene fiel a ese objetivo original, pero a lo largo del proceso se aprovechó la oportunidad de actualizar el contenido de manera significativa.

La convicción de los autores es que, como en ediciones anteriores, este libro proporcione a los lectores una forma rápida de reconocer y comprender los principales hechos y conceptos que integran la piedra angular de esta rama de la ciencia. Para aquellos que deseen conocer más, la sección de “Lecturas recomendadas” proporciona información de algunos de los textos convencionales líderes en bioquímica, que pueden llevar al alumno a la vanguardia de la materia, además de revisiones más detalladas de temas específicos.

Como se hizo notar en el prefacio de la tercera edición, si bien este libro está dirigido a apoyar a los estudiantes —sobre todo en los primeros años de la carrera—, los autores saben por su experiencia personal como docentes que puede convertirse con rapidez en un compañero valioso y que, a largo plazo, podrá consultarse siempre que exista la necesidad de refrescar la memoria, lo que lo convierte en un útil apoyo para la revisión.

En la redacción de ésta, su cuarta edición, se actualizaron todos los temas primordiales, con el objetivo principal de elaborar un libro que tuviera aproximadamente la misma extensión que la edición previa, tomando en cuenta que gracias a la retroalimentación de los estudiantes (y también del personal académico), los autores confirmaron que su formato y claridad de enfoque son una fortaleza importante en comparación con los grandes textos que están disponibles en general.

Por último, unas palabras dirigidas al alumno. Como cualquier tema que se estudia a un nivel avanzado, la bioquímica al principio puede parecer intimidante (aunque intelectualmente muy gratificante). Este libro está organizado de tal forma que no es necesario leerlo de principio a fin. Puede echarse mano de él de acuerdo con el plan de estudios, en busca de comprensión y orientación aquí y allá a medida que los cursos progresan, y conviene mantenerse en estrecho contacto con él conforme se acercan los temidos exámenes, donde sin duda demostrará ser una herramienta rápida de revisar —y que permita tranquilidad al constatar que se conocen los aspectos fundamentales—. Esperamos que lo encuentren tan útil como muchos estudiantes de cursos anteriores encontraron las ediciones previas.

David Hames

Nigel Hooper



# A1 Células procariotas

## Notas clave

### Origen y evolución de las células

En la Tierra, todos los organismos evolucionaron desde un ancestro común. En la era prebiótica, las moléculas orgánicas simples se formaron y polimerizaron de manera espontánea en macromoléculas. Después, tales macromoléculas adquirieron la capacidad de autorreplicarse y catalizar otras reacciones, antes de encerrarse dentro de una membrana para formar la primera célula. En el presente, las células se dividen en tres grupos principales: bacterias, arqueas y eucariotas.

### Procariotas

Las procariotas son los organismos más abundantes en la Tierra y se dividen en dos grupos distintos, las bacterias (o eubacterias) y las arqueas (o arqueobacterias). Una célula procariota no contiene un núcleo envuelto por una membrana.

### Estructura de la célula procariota

Cada célula procariota está rodeada por una membrana plasmática. La célula carece de organelos subcelulares. El ácido desoxirribonucleico (DNA) está condensado dentro del citosol, donde forma el nucleóide.

### Paredes de la célula bacteriana

El peptidoglucano (proteína y oligosacárido) de la pared celular protege a la célula procariota de la presión mecánica y osmótica. Algunos antibióticos como la penicilina se dirigen contra enzimas que participan en la síntesis de la pared celular. Las bacterias grampositivas tienen una pared gruesa que rodea a la membrana plasmática, mientras que las bacterias gramnegativas tienen una pared celular más delgada y una membrana externa, entre las cuales está el espacio periplásmico.

### Flagelos bacterianos

Algunas procariotas tienen flagelos similares a colas. Por rotación de tal flagelo, las bacterias pueden moverse a través del medio que las rodea en respuesta a estímulos químicos (quimiotaxis). Los flagelos bacterianos están formados por la proteína flagelina, la cual forma un largo filamento cuya rotación es dirigida por un flujo de protones a través de las proteínas motoras flagelares.

### Temas relacionados

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| (A2) Células eucariotas            | (E2) Estructura de la membrana                        |
| (B1) Estructura de los aminoácidos | (F2) Genes y cromosomas                               |
| (B5) Motores moleculares           | (L2) Transporte electrónico y fosforilación oxidativa |
| (E1) Lípidos de la membrana        |   |

## Origen y evolución de las células

Pese a la gran variedad de sistemas vivos, todos los organismos de la Tierra son bastante uniformes a nivel molecular, lo que indica que todos ellos evolucionaron a partir de un **ancestro común**. La vida emergió por primera vez hace cuando menos 3 800 millones de años, aunque cómo se originó la vida y cómo surgió la primera célula son asuntos que aún se desconocen. Los experimentos muestran que las moléculas orgánicas simples pueden formarse y polimerizarse de manera espontánea en macromoléculas bajo las condiciones que se supone existían en la atmósfera de la Tierra primitiva, en la llamada **era prebiótica**. El siguiente paso crítico fue la capacidad

de las macromoléculas de **autorreplicarse** como se ve con los ácidos nucleicos del presente y catalizar otras reacciones, como se demuestra con el ácido ribonucleico (RNA) (sección G1). Se supone que la primera célula debe haberse originado por el cierre del RNA de autorreplicación en una **membrana** compuesta por **fosfolípidos** (sección E1), por lo cual el interior de la célula se separó del ambiente externo. Las macromoléculas encapsuladas deberían haberse mantenido como una unidad capaz de autorreproducirse y luego evolucionar hasta dar origen a la gran variedad de formas de vida que se encuentran en la Tierra hoy en día. El análisis de las secuencias de ácido desoxirribonucleico (DNA) (sección

F1) de diferentes organismos ha permitido visualizar una posible vía evolutiva a partir de una célula ancestral común hacia las células y organismos de la actualidad (figura A1-1).

Por tanto, el mundo vivo tiene tres divisiones o dominios principales: **bacterias, arqueas y eucariotas** (sección A2). Las bacterias son las procariotas más comunes en el suelo y el agua y viven en o sobre organismos más grandes; entre las mismas se incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*) y especies de *Bacillus*, así como las cianobacterias (algas fotosintéticas azul-verdes). Sobre todo las arqueas habitan en ambientes inusuales como la salmuera, los manantiales de aguas ácidas y calientes y en la profundidad de los océanos, e incluyen las bacterias azufradas y metanógenas, aunque otras se encuentran en ambientes menos hostiles.

### Procariotas

Las procariotas son los organismos más numerosos y dispersos en la Tierra y se clasifican así debido a que no tienen un núcleo rodeado de membrana. Las procariotas incluyen dos grupos relacionados pero separados: las bacterias (o eubacterias) y las arqueas (o arqueobacterias). Estos dos grupos de procariotas divergen temprano en la historia de la vida en la Tierra (figura A1-1).

### Estructura de la célula procariota

En general, las procariotas varían en tamaño desde 0.1 a 10  $\mu\text{m}$  y tienen una de tres formas básicas: esférica (cocos), tipo bastón (bacilos) o helicoidal (espirilos). Como todas las células, una célula procariota está rodeada por una **membrana plasmática** que encierra por completo el citosol y separa a la célula de su ambiente externo (figura A1-2). La membrana plasmática, la cual es de alrededor de 8 nm de grosor, consiste en una bicapa lipídica que contiene proteínas (secciones

E1 y E2). Las procariotas carecen de los organelos subcelulares membranosos característicos de las eucariotas (sección A2). El citosol acuoso contiene las macromoléculas (enzimas, ácido ribonucleico mensajero (mRNA), RNA de transferencia (tRNA) y ribosomas), compuestos orgánicos e iones necesarios para el metabolismo celular. Asimismo, el citosol contiene «el cromosoma» procariótico, que consiste en una molécula de DNA circular, la cual está condensada para formar un cuerpo conocido como el **nucleoide** (figura A1-2) (sección F2).

### Paredes de la célula bacteriana

Para proteger a las células de insultos mecánicos y de la presión osmótica, la mayoría de las procariotas está rodeada de una **pared celular** rígida de 3 a 25 nm de grosor (figura A1-2). La pared celular está compuesta de **peptidoglucanos**, un complejo de **oligosacáridos** y **proteínas**. El componente oligosacárido consiste en cadenas lineales alternantes de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido *N*-acetilmurámico (NAM) con uniones  $\beta$ 1-4 (sección J1). Unido mediante un enlace amida al grupo del ácido láctico del NAM está un tetrapéptido que contiene un **D-aminoácido**. Cadenas de peptidoglucanos paralelas adyacentes forman uniones covalentes que se entrecruzan a través de las cadenas laterales del tetrapéptido con otros péptidos cortos. El extenso entrecruzamiento de los peptidoglucanos de la pared celular les proporciona su fuerza y rigidez. La presencia de D-aminoácidos en los peptidoglucanos otorga la resistencia de la pared celular a la acción de las **proteasas**, las cuales actúan sobre los L-aminoácidos, que son más comunes (sección F1), pero proporcionan un objetivo exclusivo para la acción de ciertos **antibióticos** como la **penicilina**. La penicilina actúa al inhibir la enzima que forma los entrecruzamientos covalentes de los peptidoglucanos y en consecuencia debilita la pared celular. Los enlaces glucosídicos  $\beta$ 1-4 entre la GlcNAc

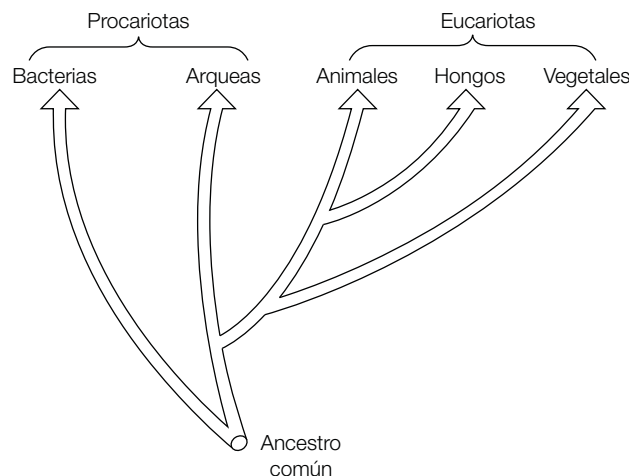


Figura A1-1. Evolución de las células.

y el NAM es susceptible de hidrólisis por la enzima **lisozima**, la cual está presente en las lágrimas, moco y otras secreciones corporales.

Las bacterias pueden clasificarse como **grampositivas** o **gramnegativas** según si se colorean o no con la tinción de Gram. Las bacterias grampositivas (p. ej., *Bacillus polymyxa*) tienen una pared celular gruesa (25 nm) que rodea su membrana plasmática, en tanto que las bacterias gramnegativas (p. ej., *E. coli*) tienen una pared celular más delgada (3 nm) y una segunda **membrana externa** (figura A1-3). En contraste con la membrana plasmática, esta membrana externa es muy permeable al paso de moléculas relativamente grandes (peso molecular > 1 000 Da) debido a las **proteínas porinas**, las cuales forman poros en la bicapa lipídica (sección E3). Entre la membrana externa y la pared celular está el **periplasma**, un espacio ocupado por proteínas que secreta la célula.

## Flagelos bacterianos

Muchas células bacterianas tienen uno o más apéndices semejantes a una cola conocidos como **flagelos**. Al hacer **rotar** sus flagelos, las bacterias pueden moverse a través del medio extracelular hacia atrayentes y alejarse

de repelentes por la llamada **quimiotaxis**. Los flagelos bacterianos son diferentes de los cilios y flagelos eucarióticos por dos razones: 1, cada flagelo bacteriano está elaborado con la proteína **flagelina** (subunidad de 53 kDa) en oposición a la tubulina (sección B5) y 2, el flagelo bacteriano **rota** en lugar de incurvarse. Una bacteria *E. coli* tiene alrededor de seis flagelos que surgen de posiciones aleatorias sobre la superficie de las células. Los flagelos son filamentos helicoidales delgados, de 15 nm de diámetro y 10  $\mu\text{m}$  de largo. El microscopio electrónico revela que el **filamento flagelar** contiene 11 subunidades en dos vueltas helicoidales, las cuales, cuando se ven desde el extremo final, tienen el aspecto de un propelente de 11 hojas con un hueco central. Los flagelos crecen a través de la adición de nuevas subunidades de flagelina en el extremo más alejado de las células, que se difunden a través del hueco central. En su base, situada en la membrana plasmática, está el **motor flagelar**, un ensamble intrincado de 40 o más proteínas. La rotación de los flagelos es dirigida por un flujo de protones a través de ciertas proteínas del motor flagelar. Un motor similar dirigido por protones se encuentra en la trifosfatasa de adenosina (ATP-asa)  $F_0F_1$  que sintetiza el trifosfato de adenosina (ATP) (sección L2).

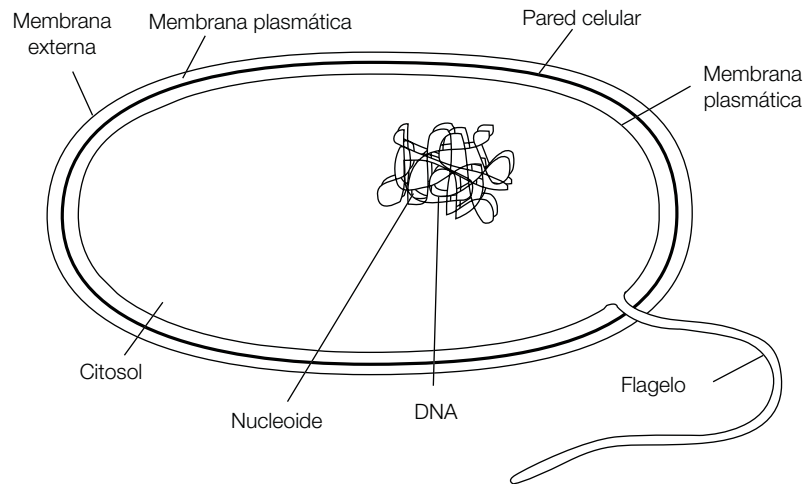


Figura A1-2. Estructura de la célula procariota.

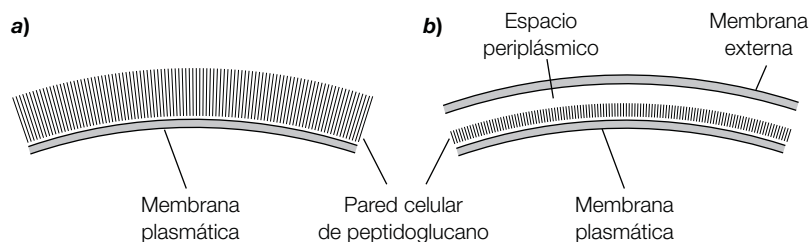


Figura A1-3. Estructura de la pared celular de a) una bacteria grampositiva, y b) una bacteria gramnegativa.

# A2 Células eucariotas

## Notas clave

|                              |   |
|------------------------------|---|
| <b>Eucariotas</b>            | Las células eucariotas tienen un núcleo rodeado por una membrana y varios organelos subcelulares (internos) rodeados de membrana, cada uno de los cuales desempeña una función específica.  |
| <b>Membrana plasmática</b>   | La membrana plasmática rodea las células y las separa del ambiente externo. La membrana plasmática es una barrera con permeabilidad selectiva debido a la presencia de proteínas de transporte específicas y tiene también proteínas receptoras que se unen a ligandos específicos. También se relaciona con los procesos de exocitosis y endocitosis.  |
| <b>Núcleo</b>                | El núcleo almacena la información genética de las células a través del DNA en los cromosomas. Está rodeado por una doble membrana, pero la existencia de poros en ésta permite que las moléculas se muevan hacia dentro y hacia fuera del núcleo. El nucleolo que se encuentra dentro del núcleo es el sitio donde se sintetiza el RNA ribosómico.  |
| <b>Retículo endoplásmico</b> | Esta red de vesículas membranosas interconectadas se divide en dos partes distintas. El retículo endoplásmico rugoso (RER), el cual está tachonado con ribosomas, es el sitio de biosíntesis de la membrana y de las proteínas secretorias y de su modificación postraducción. El retículo endoplásmico liso (SER) interviene en la biosíntesis de fosfolípidos y en la desintoxicación de compuestos tóxicos.                                  |
| <b>Aparato de Golgi</b>      | El aparato de Golgi es un sistema de sacos aplanados unidos a la membrana. Recibe vesículas membranosas del RER, a las que les modifica las proteínas que contienen y a las que después empaqueta en otras vesículas, las cuales acaban por fusionarse con la membrana plasmática u otros organelos subcelulares.   |
| <b>Mitocondrias</b>          | Las mitocondrias tienen una membrana interna y una externa separadas por el espacio intermembranoso. La membrana externa es más permeable que la membrana interna debido a la presencia de proteínas porinas. La membrana interna, la cual está plegada para formar crestas, es el sitio de la fosforilación oxidativa, la que produce ATP. La matriz central es el sitio de la degradación de los ácidos grasos y del ciclo del ácido cítrico. |
| <b>Cloroplastos</b>          | Los cloroplastos de las células vegetales están rodeados por una membrana doble y tienen un sistema de membranas interno de vesículas tilacoides que están apilados para formar granos. Las vesículas tilacoides contienen clorofila y son el sitio de la fotosíntesis. La fijación del dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ) tiene lugar en el estroma, la materia soluble que rodea las vesículas tilacoides.                                 |
| <b>Lisosomas</b>             | En las células animales, los lisosomas están rodeados por una membrana simple. Tienen un pH ácido interno (pH 4 a 5), que mantienen proteínas de la membrana que bombean iones H <sup>+</sup> hacia dentro. En el interior de los lisosomas hay enzimas hidrolasas ácidas que intervienen en la degradación de las macromoléculas, entre otras aquellas que se internalizan mediante endocitosis.   |
| <b>Peroxisomas</b>           | Los peroxisomas contienen enzimas que participan en la degradación de los aminoácidos y los ácidos grasos, un bioproducto de los cuales es el peróxido de hidrógeno. La enzima catalasa, que también se encuentra dentro de los peroxisomas, degrada con rapidez este compuesto tóxico.   |
| <b>Citosol</b>               | El citosol es la parte soluble del citoplasma donde tiene lugar un gran número de reacciones metabólicas, por ejemplo glucólisis, gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos. Dentro del citosol está el citoesqueleto.   |

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| <b>Citoesqueleto</b>                | El citoesqueleto es una estructura interna que controla la forma y movimiento de la célula y de los organelos internos. El citoesqueleto consiste en microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos. Los microfilamentos son polímeros helicoidales de 5 a 9 nm de diámetro de la proteína actina que tienen una función mecánica de soporte dentro de las células. Los filamentos intermedios son fibras semejantes a cuerdas de 7 a 11 nm de diámetro elaborados a partir de una familia de proteínas filamentosas intermedias que proveen la fuerza mecánica y la resistencia a la tensión de cizallamiento. Los microtúbulos son cilindros huecos de 25 nm de diámetro elaborados de la proteína tubulina. El huso mitótico que interviene en la separación de los cromosomas durante la división celular está hecho de microtúbulos. La colchicina y la vimblastina inhiben la formación de microtúbulos, mientras que el taxol los estabiliza. Al interferir con la mitosis, algunos de estos compuestos se usan como fármacos anticancerosos. |
| <b>Pared de la célula vegetal</b>   | La pared celular que rodea a una célula vegetal está hecha del polisacárido celulosa. En la madera, el polímero fenólico denominado lignina da a la pared celular una fuerza y rigidez adicionales.  |
| <b>Vacuola de la célula vegetal</b> | La vacuola rodeada de membranas usada para almacenar nutrientes y productos de desecho tiene un pH ácido y, debido al influjo de agua, crea presión de turgor dentro de la célula cuando ésta se empuja contra la pared celular.   |
| <b>Temas relacionados</b>           | (A1) Células procariotas<br>(E4) Transporte de membrana: macromoléculas<br>(F2) Genes y cromosomas<br>(H4) Proteína de direccionamiento  |

## Eucariotas

Los eucariotas incluyen especies tan diversas como animales, plantas, hongos y mohos del cieno. En todos los eucariotas, la célula está rodeada por una **membrana plasmática**, tiene un **núcleo rodeado por una membrana** y contiene diversos **organelos subcelulares** (figura A2-1). Estos organelos son estructuras rodeadas de membranas, cada uno con una función exclusiva y también con un complemento específico de proteínas y otras moléculas. Las diferencias clave entre las células eucariota y procariota (sección A1) se listan en el cuadro A2-1. Las células animal y vegetal tienen la misma estructura básica, aunque algunos organelos y estructuras se encuentran en una y no en la otra (p. ej., cloroplastos, vacuolas y pared celular en las células vegetales, lisosomas en las células animales).

**Cuadro A2-1. Diferencias clave entre células eucariotas y procariotas**

| Características                   | Procariota                        | Eucariota                           |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Diámetro                          | Aprox. 1 $\mu\text{m}$            | 10 a 100 $\mu\text{m}$              |
| Núcleo                            | Ausente                           | Presente                            |
| Organelos citoplásmicos           | Ausentes                          | Presentes                           |
| Contenido de DNA (pares de bases) | $1 \times 10^6$ a $5 \times 10^6$ | $1.5 \times 10^7$ a $5 \times 10^9$ |
| Cromosomas                        | Una molécula de DNA circular      | Múltiples moléculas lineales de DNA |

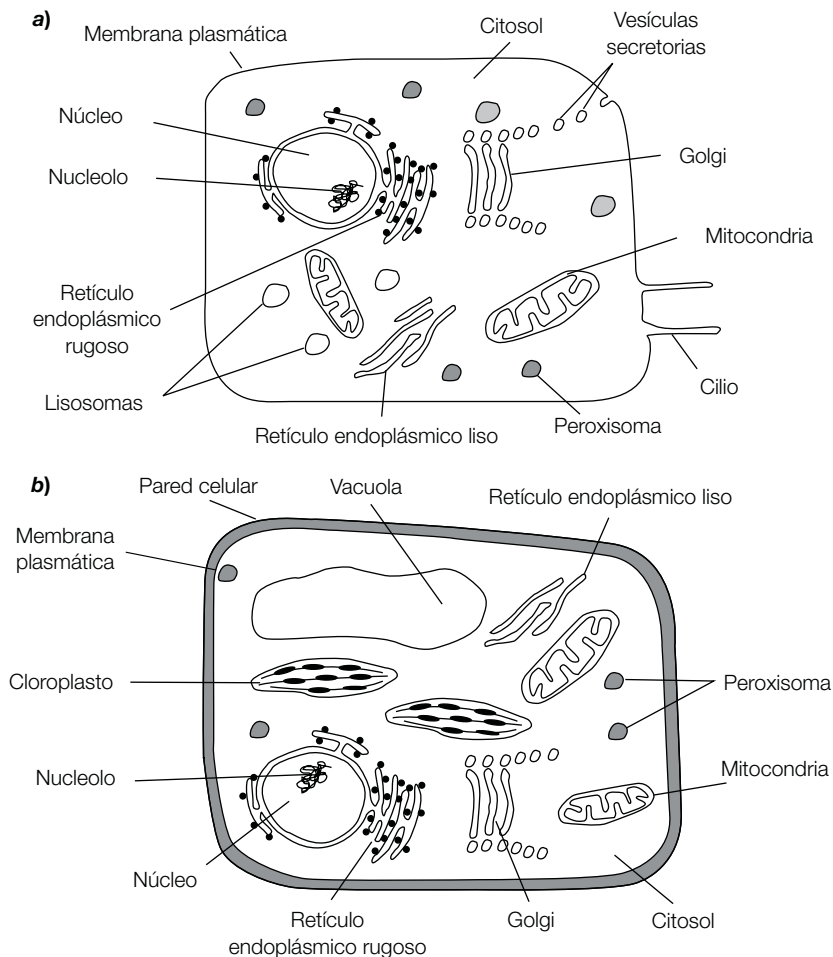
## Membrana plasmática

La membrana plasmática envuelve la célula, y de ese modo la separa del ambiente externo al mismo tiempo que mantiene la composición iónica y la presión osmótica correctas en el citosol. La membrana plasmática, como todas las membranas, goza de **permeabilidad selectiva** para ciertas moléculas debido a la presencia de proteínas específicas en ella (sección E3). La membrana plasmática también participa en la comunicación con otras células, en particular a través de la unión de ligandos (moléculas pequeñas como las hormonas, neurotransmisores, etc.) a **proteínas receptoras** sobre su superficie (sección E5). La membrana plasmática también interviene en la **exocitosis** (secreción) y **endocitosis** (internalización) de proteínas y otras macromoléculas (sección E4).

## Núcleo

El núcleo está rodeado por dos membranas, las **membranas nucleares interna y externa**. Estas dos membranas se fusionan en los **poros nucleares**, a través de los cuales las moléculas (mRNA, proteínas, ribosomas, etc.) pueden moverse entre el núcleo y el citosol. Otras proteínas, por ejemplo las que participan en la regulación de la expresión genética, pueden pasar a través de los poros desde el citosol al núcleo. La membrana nuclear externa es con frecuencia continua con el retículo endoplásmico rugoso (RER). Dentro del núcleo, el DNA está fuertemente enrollado alrededor de **proteínas histonas** y organizado en complejos denominados **cromosomas** (sección F2). Visible bajo el microscopio de luz (sección A4) está el **nucleolo**, una subregión del núcleo que es el





**Figura A2-1.** Estructura de la célula eucariota: a) estructura de una célula animal típica; b) estructura de una célula vegetal típica.

sitio donde tiene lugar la síntesis del ácido ribonucleico ribosómico (rRNA).

### Retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico (ER) es una red de vesículas membranosas interconectadas. El **retículo endoplásmico rugoso (RER)** está poblado en su cara citosólica con **ribosomas**, el sitio de la **biosíntesis de las proteínas de la membrana y secretorias** (sección H4). Dentro de la luz del RER están las enzimas que intervienen en la **modificación postraducción** (glucosilación, proteólisis, etc.) de las proteínas de la membrana y secretorias (sección H5). El **retículo endoplásmico liso (SER)**, el cual carece de ribosomas, es el sitio de la **biosíntesis de fosfolípidos**, y es donde tienen lugar numerosas **reacciones de desintoxicación**.

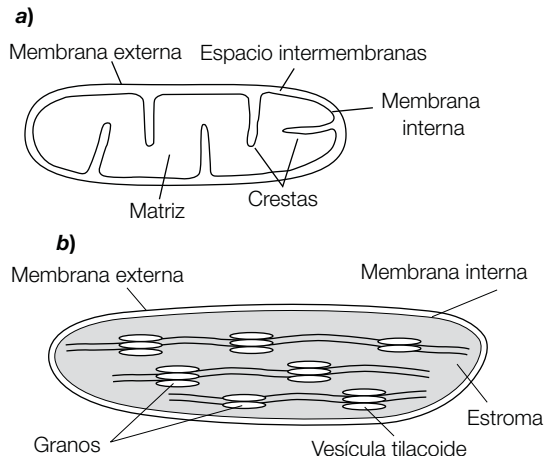
### Aparato de Golgi

El aparato de Golgi es un sistema de sacos aplanados rodeados de membrana. Las vesículas membranosas procedentes del RER, que contienen proteínas de la membrana y secretorias, se fusionan con la fase *cis* del

aparato de Golgi y liberan su contenido en éste. Durante el tránsito a través del aparato de Golgi, suceden **modificaciones postraducción** adicionales en estas proteínas y luego son clasificadas y empaquetadas en diferentes vesículas (sección H5). Tales vesículas emergen por la cara *trans* del aparato de Golgi (también llamada la red de Golgi) y son transportadas a través del citosol, para terminar por fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido al espacio extracelular (un proceso conocido como **exocitosis**; sección E4) o a otros organelos internos (p. ej., lisosomas) (para mayores detalles véase la sección H4).

### Mitocondrias

Una mitocondria tiene una membrana interna y una externa y entre ambas se encuentra el **espacio intermembranoso** (figura A2-2a). La membrana externa contiene **proteínas porinas**, las cuales la hacen permeable a moléculas de hasta 10 kDa. La membrana interna, que es considerablemente menos permeable, presenta grandes pliegues denominados **crestas**, las cuales protruyen en la **matriz central**. La membrana interna es el



**Figura A2-2.** Estructura de una a) mitocondria y un b) cloroplasto.

sitio donde ocurre la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones que participa en la producción de ATP (sección L2). La matriz central es el lugar de numerosas reacciones metabólicas, como la del ciclo del ácido cítrico (sección L1) y la degradación de los ácidos grasos (sección K2). También se encuentran dentro de la matriz el DNA mitocondrial, encargado de codificar algunas de las proteínas mitocondriales.

## Cloroplastos

Los cloroplastos, que son estructuras exclusivas de las células vegetales, también presentan **membranas interna y externa**. Además, hay un extenso sistema de membrana interno hecho de **vesículas tilacoides** (vesículas aplanadas interconectadas que forman discos) apiladas una contra la otra para formar **granos** (figura A2-2b). Dentro de las vesículas tilacoides está el pigmento verde **clorofila** (sección M4), junto a las enzimas que atrapan la energía luminosa y la convierten en energía química bajo la forma de ATP (sección L3). El **estroma**, que es el espacio que rodea a las vesículas tilacoides, es el sitio de fijación del dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) —el de la conversión del  $\text{CO}_2$  en compuestos orgánicos—. Los cloroplastos, igual que las mitocondrias, contienen DNA, el cual codifica algunas de las proteínas de los cloroplastos.

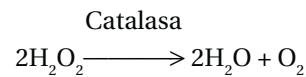
## Lisosomas

Los lisosomas, los cuales se encuentran sólo en las células animales, tienen una membrana simple que los rodea. El pH interno de estos organelos es **levemente ácido** (pH 4 a 5) y se mantiene debido a la acción de proteínas integrales de la membrana que bombean iones de hidrógeno en ellos (sección E3). Los lisosomas contienen un conjunto de hidrolasas que muestran actividad óptima en este pH ácido (y que en consecuencia se denominan **hidrolasas ácidas**), pero son inactivas en el pH neutral del citosol y del líquido extracelular. Estas enzimas participan en la degradación de macromoléculas

del hospedador y externas en sus subunidades monoméricas; las **proteasas** degradan proteínas, las **lipasas** degradan lípidos, las **fosfatasa**s eliminan grupos sulfato de los nucleótidos y fosfolípidos y las **nucleasas** degradan DNA y RNA. Los lisosomas intervienen en la degradación de macromoléculas extracelulares que han sido incluidas dentro de las células mediante **endocitosis** (sección E4), así como en la degradación y reciclamiento de organelos celulares envejecidos normales, un proceso que se denomina **autofagia**.

## Peroxisomas

Estos organismos tienen una membrana de revestimiento única y contienen enzimas que degradan los ácidos grasos y los aminoácidos. Un bioproducto de estas reacciones es el **peróxido de hidrógeno**, el cual es tóxico para las células. La presencia de grandes cantidades de la enzima **catalasa** en los peroxisomas convierte con rapidez el peróxido de hidrógeno tóxico en las sustancias inocuas  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ .



## Citosol

El citosol es aquella parte del **citoplasma** no incluida dentro de ninguno de los organelos subcelulares y es el principal sitio del metabolismo celular, en el que se demuestra la presencia de un gran número de diferentes enzimas y otras proteínas. Por ejemplo, en el citosol tienen lugar la glucólisis (sección J3), gluconeogénesis (sección J4), la vía de la pentosa fosfato (sección J5) y la síntesis de ácidos grasos (sección K3). El citosol no es una “sopa” homogénea, ya que contiene dentro de sí al **citoesqueleto**. También se encuentran dentro del citosol de muchas células los **cuerpos de inclusión** (gránulos de material que no están rodeados por una membrana), como los gránulos de glucógeno en el hígado y en las células musculares y las gotitas de triacilglicerol en las células grasas del tejido adiposo.

## Citoesqueleto

El citoesqueleto es una **estructura interna** importante para el mantenimiento y alteración de la forma celular, para permitir que células como los espermatozoides y los leucocitos se muevan de un sitio a otro, en vesículas del transporte intracelular y arrastrar los cromosomas durante la mitosis y también cuando la célula se divide en dos. Tres tipos de **filamentos** componen el citoesqueleto: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos, cada uno de ellos con diferentes propiedades mecánicas y dinámicas.

## Microfilamentos

Los **microfilamentos** (también conocidos como **filamentos de actina**), con un diámetro de 5 a 9 nm, cumplen

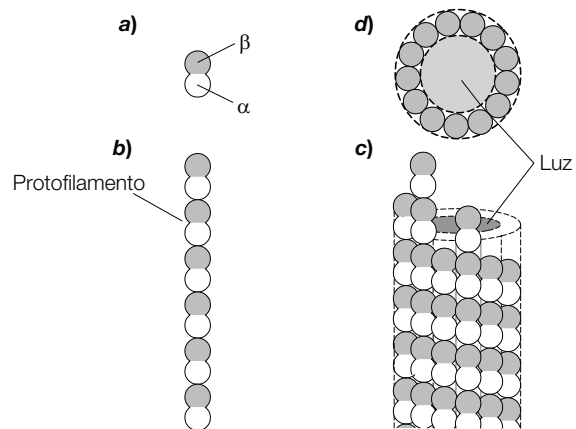
una función de soporte mecánico, lo cual determina la forma de la superficie celular y también participan en el movimiento de todas las células. Los microfilamentos son dos polímeros helicoidales de doble hebra de la proteína **actina**, los cuales parecen ser estructuras flexibles organizadas en una variedad de haces lineales y redes más extensas. A través de su interacción con la miosina, los microfilamentos forman ensambles contráctiles que participan en varios movimientos intracelulares como el flujo citoplásmico y en la formación de invaginaciones de la membrana (sección B5).

### Filamentos intermedios

Los **filamentos intermedios** (7 a 11 nm de diámetro) proveen fuerza mecánica y resistencia a la fuerza de cizallamiento. Están formados de **proteínas filamentosas intermedias** que constituyen una familia grande y heterogénea que forma fibras tipo cuerda. La piel de los animales más grandes contiene una extensa red de filamentos intermedios elaborados con la proteína **queratina**, que tiene una estructura enrollada helicoidal  $\alpha$  de dos hebras, mientras que la lámina nuclear, una red que está justo por debajo de la membrana nuclear interna, está formada de otro tipo de filamentos intermedios.

### Microtúbulos

El tercer tipo de filamentos del citoesqueleto, los **microtúbulos**, determina la posición de los organelos rodeados de membranas y dirigen su transporte intracelular. Por ejemplo, el **huso mitótico** que interviene en la separación de los cromosomas replicados durante la mitosis es un ensamble de microtúbulos. Los microtúbulos son estructuras cilíndricas huecas con un diámetro externo de 25 nm que están elaboradas con la proteína **tubulina** (figura A2-3). La pared rígida de un microtúbulo está hecha de una disposición helicoidal de subunidades alternantes de tubulina  $\alpha$  y  $\beta$ , cada una de 50 kDa de tamaño. Un corte transversal a través del microtúbulo revela que hay 13 subunidades de tubulina por vuelta del filamento. Los microtúbulos celulares están formados por la adición de moléculas de tubulina y a filamentos preexistentes o centros de nucleación. Un extremo del microtúbulo suele fijarse a un **centro organizador de microtúbulos** denominado **centrosoma**. Los fármacos **colchicina** y **vimblastina** inhiben la polimerización de los microtúbulos y por tanto bloquean procesos celulares como la división celular, que depende del funcionamiento de los microtúbulos. Otro componente, **taxol**, estabiliza la tubulina en los microtúbulos y promueve la polimerización. Algunos de estos compuestos, como la vimblastina y el taxol, se están utilizando como **fármacos anticancerosos** ya



**Figura A2-3.** Estructura de un microtúbulo: a) la tubulina consiste en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ; b) un protofilamento de tubulina consiste en muchas subunidades adyacentes; c) el microtúbulo se forma a partir de 13 protofilamentos alineados de manera paralela; d) corte transversal del microtúbulo hueco.

que bloquean la proliferación de las células de división rápida mediante la interferencia del huso mitótico.

### Pared de la célula vegetal

Rodeando la membrana plasmática de una célula vegetal está la pared celular, la cual proporciona fuerza y rigidez a la célula. Está construida de manera primaria por **celulosa**, un **polisacárido** similar a un bastón de unidades de glucosa a repetición con uniones 1-4 $\beta$  (sección J2). Tales moléculas de celulosa se ordenan juntas en haces de fibras mediante puentes de hidrógeno y las fibras a su vez son mantenidas juntas por otros polisacáridos que las entrecruzan. En la madera, otro compuesto, la **lignina**, imparte fuerza y rigidez adicional a la pared celular. La lignina es un complejo fenólico polimerizado insoluble en agua.

### Vacuola de la célula vegetal

Las células vegetales suelen contener una o más **vacuolas rodeadas por membranas**. Éstas se usan para almacenar nutrientes (p. ej., sucrosa), agua, iones y productos de desecho (en especial compuestos que contienen nitrógeno en exceso). Como los lisosomas de las células animales, las vacuolas tienen un **pH ácido** que mantienen bombas de hidrógeno de la membrana y contienen una diversidad de **enzimas degradativas**. La entrada de agua en la vacuola causa su expansión, lo cual crea presión hidrostática (**turgor**) dentro de la célula, que se balancea mediante la resistencia mecánica de la pared celular.

# A3 Crecimiento celular

## Notas clave

|   |   |   |
|---|---|---|
| <b>Cultivo celular: descripción</b>               | Las células se pueden hacer crecer en cultivos bajo condiciones apropiadas, lo que permite realizar estudios biológicos celulares y manipulación genética.  |   |
| <b>Cultivo y división de la célula procariota</b> | Las células procariotas pueden crecer en un medio simple que contenga sales inorgánicas y una fuente de energía. En el ciclo de la célula procariota la replicación del DNA sucede a medida que la célula crece, antes de la división en dos células hijas por fisión binaria.  |   |
| <b>Cultivo de células eucariotas</b>              | Las células animales y vegetales pueden crecer en cultivo pero, además de sales inorgánicas y glucosa, requieren varios aminoácidos, vitaminas y factores de crecimiento para sobrevivir. Los cultivos primarios se preparan de manera directa a partir de tejidos y tienen una expectativa de vida finita. Las líneas de células inmortales derivadas de células madre o células tumorales pueden proliferar de manera indefinida en cultivos. |   |
| <b>Ciclo de la célula eucariota</b>               | En células eucariotas, el ciclo celular consta de las fases M, G <sub>1</sub> , S y G <sub>2</sub> . En la fase M, la cual dura alrededor de una hora, ocurren la mitosis y la división celular, mientras que en la fase S el DNA cromosómico se replica. La mayor parte del ciclo celular (95%) se destina a la interfase (fases G <sub>1</sub> , S y G <sub>2</sub> ). Se dice que las células quiescentes están en la fase G <sub>0</sub> .  |   |
| <b>Temas relacionados</b>                         | (A1) Células procariotas<br>(A2) Células eucariotas<br>(F2) Genes y cromosomas  | (F3) Replicación del DNA en bacterias<br>(F4) Replicación del DNA en eucariotas |

## Cultivo celular: descripción

Tanto las células procariotas como las eucariotas pueden crecer y manipularse en **cultivo**. El cultivo celular proporciona un gran número de células idénticas que pueden utilizarse en una variedad de estudios biológicos y bioquímicos. Tales sistemas de cultivos celulares *in vitro* permiten el crecimiento de las células a ser estudiadas y las manipulaciones genéticas llevan a la comprensión de la estructura génica y la función que realizan.

## Cultivo y división de células procariotas

Las procariotas como la *E. coli* pueden crecer en soluciones con medios simples que contenga sales inorgánicas y una fuente de energía, por ejemplo, glucosa. Algunos procariotas pueden replicarse en alrededor de 20 minutos bajo condiciones ideales (p. ej., la presencia de una fuente de energía apropiada, crecimiento a la temperatura óptima), lo cual significa que una sola célula puede multiplicarse en muchos millones en unas pocas horas.

El **ciclo de la célula procariota** es relativamente simple ya que la replicación del DNA en el **cromosoma circular único** (sección A1) se produce de manera continua

conforme la célula crece. La célula entonces se divide por **fisión binaria**. En este proceso, se forman una nueva membrana celular y pared celular alrededor del medio de la célula, proceso que acaba por dividir la célula parental en dos células hijas. Cada una de las células hijas recibe una copia de DNA cromosómico.

## Cultivo de célula eucariota

Aunque las **levaduras** pueden crecer con facilidad en cultivos que usen medios mínimos como las células bacterianas, otras células eucariotas (**células animales y vegetales**) requieren medios de cultivo mucho más complejos que contengan, además de sales y glucosa, varios aminoácidos y vitaminas, que la célula no puede producir por sí misma. Los medios para el crecimiento de la célula animal también contienen suero, el cual proporciona los diversos factores de crecimiento proteínicos requeridos para la división celular.

Los cultivos de la célula animal se inician mediante la dispersión (p. ej., mediante homogeneización suave, sección A5) de una pieza de tejido en una suspensión de las células componentes. Las células aisladas crecen entonces en un **plato de cultivo** plástico bajo

condiciones apropiadas con un **medio de crecimiento definido**. Los cultivos preparados directamente a partir de los tejidos de un organismo se refieren como **primarios**. De manera habitual, tales cultivos primarios pueden cultivarse hasta duplicarlos 50 a 100 veces, después de lo cual el crecimiento se detiene y mueren. En contraste, las células derivadas de tumores y células madre embrionarias con frecuencia proliferan en cultivo de manera indefinida y se refieren como **líneas celulares** permanentes o inmortales. Bajo condiciones apropiadas, muchas células en cultivo conservan las propiedades diferenciadas adecuadas a su origen. Por ejemplo, los fibroblastos continúan secretando colágeno y las células nerviosas extienden axones. Las **células madre**, que con frecuencia se cultivan a partir de embriones tempranos, mantienen su capacidad para diferenciarse en todos los tipos celulares de un organismo adulto.

### Ciclo de la célula eucariota

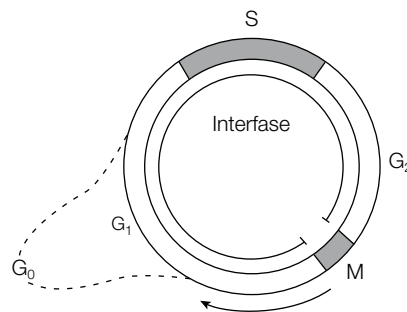
La división de las células eucariotas debe regularse con sumo cuidado tanto con crecimiento celular como con replicación del  $\text{DNA}$  y que ambos fenómenos reciban una cuidadosa coordinación que asegure la formación de células hijas que contengan el complemento completo de cromosomas intactos (es decir, el genoma completo, sección F2). La vida de una célula eucariota puede definirse como un **ciclo celular**, el cual consiste en cuatro procesos coordinados: crecimiento celular,

replicación del  $\text{DNA}$ , distribución de los cromosomas duplicados a las células hijas y división celular.

La **mitosis** (división nuclear), en la cual los cromosomas hijos se separan y ocurre la **división celular (citocinesis)** en la **fase M**, dura tan sólo alrededor de una hora (figura A3-1).

La parte restante del ciclo celular (alrededor de 95%) se conserva en **interfase** (figura A3-1), el periodo entre mitosis. Durante la interfase, los cromosomas se descondensan y distribuyen en los núcleos; a nivel molecular, es el momento en que ambas células crecen y se replica el  $\text{DNA}$ .

La mitosis es seguida por la **fase  $G_1$**  (figura A3-1), la cual corresponde al intervalo entre mitosis y a la iniciación de la replicación del  $\text{DNA}$  cuando la célula crece de manera continua. Luego la célula ingresa en la **fase S** (S por síntesis), durante la cual el  $\text{DNA}$  cromosómico se replica, y por último en la **fase  $G_2$** , cuando el crecimiento celular continúa y las proteínas se sintetizan en preparación para la mitosis. De manera típica, las células eucariotas en cultivo tienen un ciclo celular cuya duración es de 16 a 24 horas, pero éste puede ser mucho más extenso ( $> 100$  días) para algunas células de un organismo multicelular. La mayoría de las variaciones en la duración del ciclo celular suceden por diferencias en la extensión de la fase  $G_1$ . Algunas células *in vivo*, como las neuronas, detienen su división por completo y se dice que son quiescentes, encerradas en una **fase  $G_0$**  (figura A3-1).



**Figura A3-1.** Ciclo de la célula eucariota. La fase S tiene una duración típica de 6-8 horas, la  $G_2$  es una fase en la cual la célula se prepara para la mitosis y dura 2-6 horas, la mitosis (M) en sí misma es breve y toma sólo alrededor de 1 hora. La duración de  $G_1$  es muy variable y depende del tipo celular. Las células pueden ingresar en  $G_0$ , una fase quiescente, en lugar de continuar con el ciclo celular.

# A4 Imágenes de las células

## Notas clave

### Microscopio de luz

En el microscopio de luz, un rayo de luz se enfoca mediante lentes de vidrio que producen una imagen agrandada del espécimen. En el microscopio de campo claro, el espécimen se ilumina desde abajo, con el rayo de luz enfocado sobre el mismo por la lente condensadora. La lente objetivo enfoca después la luz incidente que pasa a través del espécimen sobre su plano focal, lo que crea una imagen magnificada. Antes de observarlo, el espécimen se fija con alcohol o formaldehído y luego se tiñe con una sustancia química como la hematoxilina o la eosina. El microscopio de contraste de fase y el más complejo microscopio de contraste de interferencia diferencial pueden utilizarse para ver células vivas.

### Microscopio de fluorescencia

En el microscopio de fluorescencia, los compuestos fluorescentes (los cuales absorben luz ante una longitud de onda excitante y luego la emiten a la longitud de onda de emisión) se usan para visualizar un componente particular de las células. En el microscopio confocal, un láser enfoca la luz de la longitud de onda excitante sobre el espécimen de manera que sólo una sección delgada del mismo se ilumina. El rayo láser se mueve a través de la muestra, lo que produce una serie de imágenes, que son reensambladas por una computadora para producir un cuadro tridimensional del espécimen. Los compuestos fluorescentes como la rodamina y la fluoresceína pueden acoplarse a anticuerpos que reconocen las proteínas de interés. La proteína fluorescente verde que las medusas producen de manera natural (GFP) puede emplearse para marcar otras proteínas y de esa manera visualizar la localización y movimiento de las proteínas en las células vivas. Las interacciones entre diferentes proteínas pueden vigilarse mediante transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) al marcar las dos proteínas de interés con diferentes fluorocromos. El movimiento lateral de una proteína marcada con fluorescencia puede monitorearse mediante recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP).

### Microscopia electrónica

En la microscopia electrónica, un rayo de electrones se enfoca mediante el auxilio de lentes electromagnéticas. El espécimen se monta dentro de un ambiente con vacío, de manera que los átomos que se encuentran en el aire no absorban los electrones. En la microscopia electrónica de transmisión, el rayo de electrones se pasa a través de una sección delgada del espécimen que ha sido teñido con metales pesados. Los metales densos dispersan los electrones incidentes y con ello producen una imagen del espécimen. En el microscopio electrónico de rastreo, la superficie de todo el espécimen es revestida con una capa de metal pesado y sólo después el espécimen es rastreado con un brazo electrónico que produce una imagen tridimensional de éste.

### Temas relacionados

(A2) Células eucariotas  
(B6) Anticuerpos

(C4) Inmunodetección  
(E2) Estructura de la membrana

## Microscopio de luz

En la microscopia de luz se usan **lentes de vidrio** para enfocar un rayo de luz sobre el **espécimen** en investigación. La luz que pasa a través del espécimen se enfoca mediante otra lente para producir una **imagen magnificada**.

Numerosos tipos diferentes de microscopios de luz se usan de manera rutinaria para estudiar distintos aspectos de la estructura celular. El más simple es el **microscopio de campo claro**, en el cual una lámpara que se halla en la base del microscopio ilumina el espécimen desde abajo (figura A4-1), con la luz enfocada en el plano del espécimen gracias a una **lente condensadora**. La luz incidente que atraviesa el espécimen es recogida por la **lente objetivo** y enfocada en su plano focal, lo que acaba por crear una imagen magnificada. Luego esta imagen es magnificada por el ocular, con una magnificación total que es la suma de las magnificaciones de cada lente. Con el fin de incrementar la resolución alcanzada por un microscopio compuesto, el espécimen es con frecuencia recubierto con **aceite de inmersión**, dentro del cual se coloca la lente objetivo. El límite de resolución del microscopio de luz usando luz visible es de alrededor de 0.2  $\mu\text{m}$ .

## Fijación y tinción de los especímenes

En el microscopio de campo claro, el espécimen a examinar suele fijarse en primer lugar con una solución que contiene alcohol o formaldehído. Estos compuestos desnaturalizan las proteínas y, en el caso del formaldehído, introducen enlaces covalentes cruzados entre grupos amino de moléculas adyacentes, los cuales estabilizan las interacciones entre proteínas y entre proteínas y ácidos nucleicos. El **espécimen fijado** puede entonces embeberse en parafina o una resina y cortarse en **secciones delgadas** (0.5 a 10  $\mu\text{m}$  de grosor) con la ayuda de un **micrótopo**. Cada sección se monta en un portaobjetos de vidrio y entonces se coloca en la plataforma móvil

del microscopio para el espécimen (figura A4-1). Los diferentes constituyentes subcelulares (núcleo, mitocondrias, citosol, etc.) absorben casi el mismo grado de luz visible, lo que los vuelve difícil de distinguir bajo la luz del microscopio sin la tinción previa del espécimen. Muchos **colorantes químicos** se unen a las moléculas biológicas; por ejemplo, la **hematoxilina** se une a los aminoácidos básicos Arg y Lys de las proteínas, y la **eosina** se une a las moléculas ácidas (como el **DNA** y las cadenas laterales de los aminoácidos Asp y Glu). Otra forma de visualizar estructuras específicas intracelulares es la **tinción citoquímica**, en la cual una enzima cataliza la producción de muchas moléculas de un producto de una reacción localizada y coloreada a partir de un precursor incoloro. Entonces, el producto coloreado puede verse en el microscopio de luz, donde la enzima está presente. Por ejemplo, los peroxisomas pueden visualizarse mediante el uso de una tinción citoquímica para la catalasa (sección A2).

## Microscopio de contraste de fase

Cuando la luz atraviesa una célula viva, la fase de la onda de luz se modifica de acuerdo con el **índice refractivo** de la célula: la luz que pasa a través de una parte de la célula relativamente gruesa o densa, como el núcleo, es retardada; en consecuencia, su **fase** es desplazada en relación con la luz que pasa a través de una región más delgada adyacente del citoplasma. Tanto el **microscopio de contraste de fase** como, de una manera más compleja, el **microscopio de contraste de interferencia diferencial** (o microscopia de interferencia de Nomarski) aprovechan los efectos de interferencia producidos cuando los dos grupos de ondas de luz se recombinan y por tanto crean una imagen de las estructuras celulares. Como estos tipos de microscopios no requieren que los especímenes estén fijos o teñidos, se usan para examinar la estructura de los organelos más grandes (núcleo, mitocondrias, etc.) en las células vivas. El **microscopio de contraste de interferencia diferencial mejorado con**

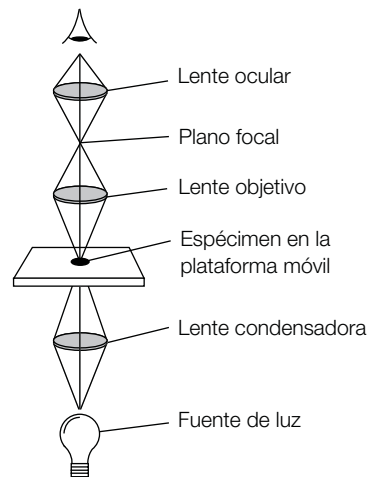


Figura A4-1. Vía óptica de un microscopio compuesto.

**vídeo** puede usarse para visualizar el movimiento de los organelos dentro de las células, por ejemplo junto con los microtúbulos (sección A2).

## Microscopia de fluorescencia

En la microscopia de fluorescencia, el microscopio de luz es adaptado para detectar la luz que emite un **componente fluorescente** que se usa para teñir en forma selectiva determinados componentes intracelulares. Se dice que una sustancia química es fluorescente si absorbe la luz en una longitud de onda (la **longitud de onda de excitación**) y a continuación emite luz a una longitud de onda más larga (**longitud de onda de emisión**). De manera habitual, en la microscopia fluorescente se usan dos compuestos que son la **rodamina** y el **rojo de Texas**, los cuales emiten luz roja y la **fluoresceína**, la cual emite luz verde. Primero, se agrega un anticuerpo contra el antígeno de interés (llamado el **anticuerpo primario**; sección B6) al espécimen. Un componente fluorescente se acopla por medios químicos a un **anticuerpo secundario** que reconoce al anticuerpo primario. A continuación, el anticuerpo secundario marcado con fluorescencia se añade a la sección tisular o a la célula permeabilizada, y de esa manera el espécimen se ilumina con luz a la longitud de onda excitante (figura A4-2). Entonces se visualizan las estructuras del espécimen al cual el anticuerpo está unido.

La **microscopia confocal** es un refinamiento de la microscopia de fluorescencia normal que produce imágenes más claras de toda la célula o de especímenes de mayor tamaño. En el microscopio de fluorescencia normal, la luz fluorescente emitida por el compuesto procede de moléculas que están por arriba y por debajo del **plano focal**, lo que enturbia la imagen y dificulta determinar el ordenamiento molecular tridimensional real. Con el microscopio confocal, sólo las moléculas del plano del foco fluorescen debido al uso de un **rayo láser** enfocado en la longitud de onda excitante. El rayo láser es movido a diferentes partes del espécimen, lo que permite la producción de una serie de imágenes

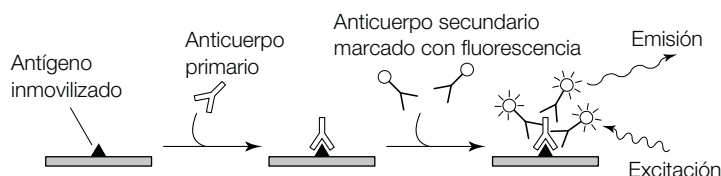
que se toman a diferentes profundidades a través de la muestra. A continuación, una computadora combina las imágenes para proporcionar la imagen tridimensional completa. El **microscopio de deconvolución** consigue el mismo efecto de imagen afilada del microscopio confocal pero a través de un proceso diferente.

## Proteína fluorescente verde

La visualización de proteínas en las células vivas ha sido revolucionada por el descubrimiento de una proteína fluorescente de manera natural encontrada en la **medusa *Aequorea victoria***. En esta proteína de 238 aminoácidos, llamada **proteína fluorescente verde (GFP)**, ciertas cadenas laterales de los aminoácidos se ciclizan de manera espontánea para formar un cromóforo que fluoresce con color verde. Con la ayuda de técnicas de **DNA recombinante** (sección I1), el **DNA** codificante de la GFP puede ser adherido a las secuencias de **DNA** que codifican otras proteínas y de esta forma introducido dentro de células vivas en cultivo o dentro de células específicas de un animal íntegro. Las células que contienen el gen introducido pasan a producir la **proteína marcada con la GFP**, la cual florecerá de color verde bajo el microscopio de fluorescencia. La localización y movimiento de la proteína marcada puede entonces estudiarse en células vivas en tiempo real. Se han diseñado múltiples variaciones de la GFP, las cuales emiten luz a diferentes longitudes de onda, por ejemplo proteína fluorescente azulosa (GFP) y la proteína fluorescente amarilla (YFP), lo que ofrece la oportunidad de visualizar varias proteínas en forma simultánea en la misma célula.

## Transferencia de fluorescencia por energía de resonancia (FRET)

Las **interacciones** entre una proteína y otra pueden monitorearse mediante la **transferencia de fluorescencia por energía de resonancia (FRET)**. Las dos proteínas de interés son marcadas con un **fluorocromo diferente** (marcadas con diferentes variantes de la GFP, véase antes), elegidos de manera que el espectro de emisión



**Figura A4-2.** Marcación de una proteína con un anticuerpo marcado con fluorescencia para el microscopio fluorescente. El anticuerpo primario reconoce el antígeno de interés y se une a él en el espécimen. Numerosas moléculas del anticuerpo secundario se unen al anticuerpo primario y proveen una amplificación de la señal. El anticuerpo secundario se acopla de manera covalente a un colorante fosforescente, que emite luz cuando se ilumina a su longitud de onda excitante.



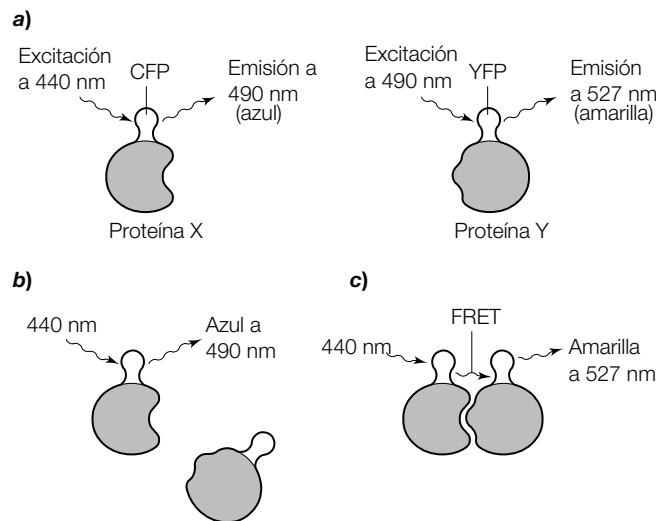
de un fluorocromo se superponga con el espectro de excitación del otro (figura A4-3a). Si las dos proteínas se encuentran en una **proximidad muy cercana** (tanto como 2 nm), la energía de la luz absorbida puede transferirse en forma directa desde un fluorocromo al otro (figura 3c). En consecuencia, cuando la muestra es iluminada bajo la longitud de onda de excitación del primer fluorocromo, la luz es emitida con la longitud de onda de emisión del segundo. Si las dos proteínas no se encuentran en proximidad cercana, no transfieren la fluorescencia (figura A4-3b).

### Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP)

El **movimiento lateral** de las proteínas en una membrana puede visualizarse a través del uso de la técnica de **recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo (FRAP)**. En esta técnica, una pequeña región de interés de las células que expresa una proteína marcada con GFP es expuesta a un pulso de luz muy intensa de un láser, que destruye (**blanquea**) las moléculas fluorescentes del área. La fluorescencia de esta región blanqueada es revisada de manera subsecuente como una función del tiempo, ya que otras proteínas marcadas con fluorescencia se mueven dentro de la región blanqueada de la membrana. La tasa de recuperación de la fluorescencia depende de la movilidad lateral de la proteína marcada con fluorescencia.

### Microscopia electrónica

En contraste con la microscopia de luz, donde lentes ópticas enfocan un rayo de luz, en el microscopio electrónico **lentes electromagnéticas** enfocan un rayo de **electrones**. Debido a que átomos del aire absorben los electrones, el espécimen debe montarse en un ambiente con **vacío** dentro de un tubo evacuado. La resolución del microscopio electrónico con materiales biológicos es a lo más de 0.10 nm. En la **microscopia electrónica de transmisión**, un rayo de electrones es dirigido a través del espécimen y las lentes electromagnéticas se usan para enfocar los **electrones transmitidos** para producir una imagen en la pantalla de visualización o en una película fotográfica (figura A4-4a). Como en la microscopia de luz estándar, se ven cortes delgados del espécimen. Sin embargo, para la microscopia electrónica de transmisión los cortes deben ser mucho más delgados (50 a 100 nm de grosor). Como los electrones pasan de manera uniforme a través del material biológico, los especímenes sin teñir proporcionan imágenes muy pobres. Por consiguiente, el espécimen debe ser teñido en forma rutinaria con el fin de dispersar algunos de los electrones incidentes, lo cuales no son enfocados por las lentes electromagnéticas y por tanto no forman imagen. **Metales pesados** como el oro y el osmio se usan con frecuencia para teñir los materiales biológicos. En particular, el **tetraóxido de osmio** tiñe de manera preferencial ciertos componentes celulares como las



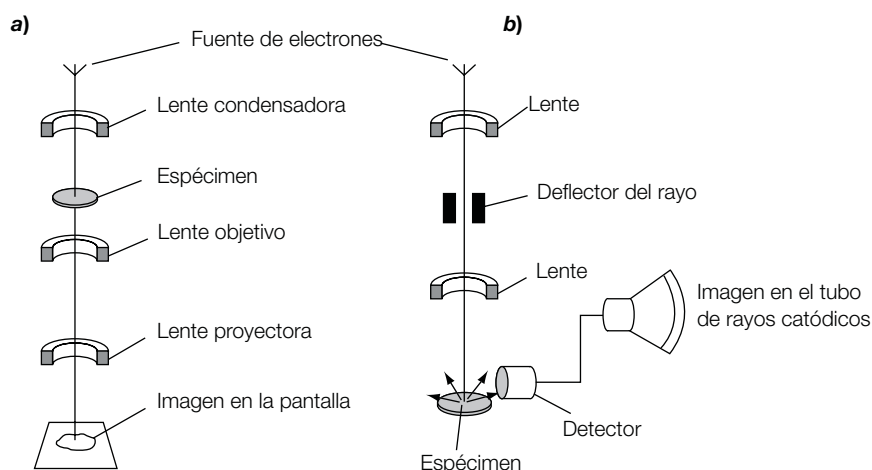
**Figura A4-3.** FRET. Para determinar si dos proteínas interactúan dentro de la célula, las proteínas primero se marcan con dos variantes diferentes de GFP. a) En este ejemplo, la proteína X se acopla a CFP, la cual se excita a 440 nm y emite luz azul a 490 nm, mientras que la proteína Y se acopla a YFP, la cual se excita a 490 nm y emite luz amarilla a 527 nm. b) Si la proteína X y Y no interactúan, sólo se produce fluorescencia a partir de CFP cuando la muestra se ilumina a 440 nm y fluoresce a 490 nm. c) Cuando las proteínas X y Y interactúan, sucede FRET. Al iluminar la muestra a 440 nm se excita CFP, cuya emisión a su vez excita a YFP, que emite luz amarilla a 527 nm.

membranas, las cuales aparecen negras en la imagen. El microscopio electrónico de transmisión cuenta con suficiente poder de resolución como para usarlo para obtener información acerca de las formas de las proteínas purificadas, virus y organelos subcelulares. Pueden obtenerse vistas tridimensionales de las estructuras con resoluciones de 2 a 10 nm con el uso de la técnica de **tomografía electrónica**, la cual genera imágenes tridimensionales mediante análisis por computadora de imágenes bidimensionales obtenidas en una gama de vistas diferentes. La **microscopía crioelectrónica**, en la cual la muestra se congela con rapidez a muy bajas temperaturas, se usa para determinar las estructuras tridimensionales de las proteínas (sección B2).

Los **anticuerpos** pueden ser marcados con partículas de oro electrónicamente densas de una forma similar a la que se marca con compuestos fluorescentes en la microscopía de fluorescencia y entonces unirse a proteínas específicas en secciones delgadas del espécimen. Cuando

se ven en el microscopio electrónico, las manchas oscuras y pequeñas debidas a las partículas de oro se ven en la imagen donde una molécula de anticuerpo se ha unido a su antígeno (sección C4) y de esa manera la técnica puede utilizarse para localizar proteínas específicas.

En la **microscopía electrónica de barrido**, un espécimen (íntegro) se fija y luego se reviste con una capa delgada de un **metal pesado** como el **platino**. Entonces un rayo electrónico **recorre** el espécimen y excita moléculas dentro de éste que liberan electrones secundarios. Tales electrones secundarios se enfocan sobre un detector y se muestra la imagen resultante (figura A4-4*b*). El microscopio electrónico de barrido produce una **imagen tridimensional** debido a que el número de electrones secundarios producidos por cualquier punto único del espécimen depende del ángulo del rayo electrónico en relación con la superficie del espécimen. La resolución del microscopio electrónico de barrido es sólo de alrededor de 10 nm.



**Figura A4-4.** Principales características de un a) microscopio electrónico de transmisión y un b) microscopio electrónico de barrido.

# A5 Fraccionamiento celular

## Notas clave

|   |   |
|---|---|
| <b>Aislamiento de las células y sus partes: descripción</b> | Los tejidos animales y vegetales contienen una mezcla de tipos celulares y la mayoría de las células contiene múltiples organelos subcelulares. Con el fin de estudiar células y organelos en aislamiento, es deseable tener una población homogénea de células.  |
| <b>Citometría de flujo</b>                                  | Las células individuales pueden identificarse mediante un citómetro de flujo. Los anticuerpos, acoplados a compuestos fluorescentes que se unen a moléculas en la superficie de determinados tipos de células, pueden usarse para separar células entre sí en un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS).   |
| <b>Fraccionamiento subcelular</b>                           | El fraccionamiento subcelular consiste en producir aberturas en una célula (p. ej., mediante homogeneización) y en la separación de los diversos organelos entre sí, de manera habitual, mediante centrifugación. La centrifugación diferencial separa los organelos subcelulares con base en su tamaño y densidad. Se usa una ultracentrífuga para generar fuerzas poderosas que separan los diversos organelos, los cuales sedimentan en el fondo del tubo de centrifugación. Con fuerzas menores, sedimentan el núcleo, las mitocondrias, cloroplastos y lisosomas, mientras que se necesitan fuerzas mayores para que sedimenten el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y la membrana plasmática. La centrifugación con un gradiente de densidad de equilibrio usa un gradiente de una solución densa (p. ej., solución de sucrosa) para separar organelos subcelulares con base en su densidad. |
| <b>Proteínas marcadoras</b>                                 | Una forma conveniente para determinar la pureza de una preparación de organelos es medir la actividad de una proteína marcadora o enzima en las diversas fracciones subcelulares. Una proteína marcadora es aquella que se encuentra sólo dentro de un compartimiento particular de la célula.  |
| <b>Temas relacionados</b>                                   | (A2) Células eucariotas<br>(A4) Imágenes celulares<br>(C2) Electroforesis en gel<br>(C4) Inmunodetección<br>(D1) Introducción a las enzimas   |

## Aislamiento de células y sus partes: descripción

La mayoría de los tejidos animales y vegetales contiene una mezcla de tipos celulares y casi todas las células contienen múltiples **organelos subcelulares** (sección A2). Aunque las técnicas microscópicas (sección A4) pueden usarse para visualizar organelos y grandes moléculas internas de las células, muchos estudios sobre la estructura celular y su función requieren muestras de tipos particulares células y de organelos o componentes internos de las mismas. La mayoría de los procedimientos bioquímicos requiere la obtención de grandes números de células y entonces se las rompe con recursos físicos para aislar sus componentes. Las **muestras tisulares** proveen con frecuencia grandes cantidades

de material, pero contienen una mezcla heterogénea de células. Se han desarrollado técnicas con las que pueden aislarse **poblaciones homogéneas de células**, hacerlas crecer en cultivos para amplificarlas y en pasos subsiguientes estudiar y fraccionar sus partes constitutivas.

## Citometría de flujo

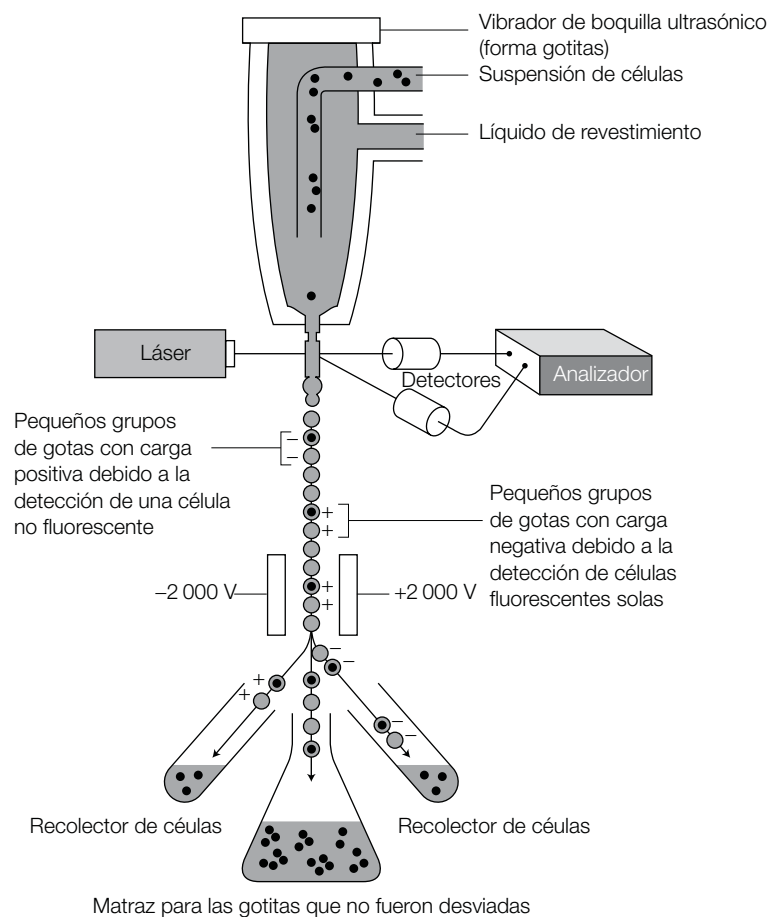
Pueden identificarse diferentes células a través de la medición de la luz o la fluorescencia que emiten, a medida que traspasan un rayo láser de un **citómetro de flujo**. En un **clasificador de células activado por fluorescencia** o FACS (figura A5-1), un instrumento basado en la citometría de flujo, las células pueden identificarse y separarse entre ellas. Las células de interés se marcan primero con un **anticuerpo**, el cual es espe-

cífico para una particular molécula de la superficie celular. El anticuerpo es acoplado a un colorante fluorescente (sección A4), de manera que cuando las células pasan un rayo láser en una fila y en una corriente estrecha, puede medirse la fluorescencia de cada célula. A continuación, una boquilla vibratoria forma pequeñas gotitas, cada una de las cuales contiene una sola célula, a la que se le da una carga positiva o negativa, lo que depende de si la célula que contiene es fluorescente. Un campo eléctrico fuerte separa las diferentes gotas cargadas en contenedores separados, de manera que cada contenedor termina por tener una **población homogénea de células** con respecto a la molécula de la superficie celular marcada con un anticuerpo fluores-

cente. Estas poblaciones homogéneas pueden entonces usarse para efectuar análisis bioquímicos o cultivos. El contenido de **DNA** y **RNA** de una célula también puede medirse mediante la citometría de flujo.

### Fraccionamiento subcelular

Con el propósito de estudiar macromoléculas y procesos metabólicos internos de las células, el fraccionamiento subcelular suele ser de ayuda para aislar un tipo de **organelo subcelular** (sección A2) del resto de los contenidos celulares. De manera inicial, la membrana plasmática (la pared celular, si está presente) debe romperse. Para hacerlo, el tejido o la muestra de las células



**Figura A5-1.** Clasificador de célula activado por fluorescencia. Un anticuerpo específico para una proteína particular de la superficie celular se liga a una molécula fluorescente y luego se añade a una mezcla de células. Cuando cada célula pasa a través del rayo láser se le monitorea la fluorescencia. A las gotas que contienen células solas se les asigna una carga positiva o negativa, según si la célula lleva unido el anticuerpo marcado con fluorescencia. Acto seguido, las gotas que contienen una sola célula son desviadas por un campo eléctrico en tubos de recolección de acuerdo con su carga. La concentración de células es tal que la mayoría de las gotas no contiene células y el flujo es desviado hacia un contenedor de desecho junto con cualquier cúmulo de células.

se suspenden en una solución de sucrosa isotónica (0.25 a 0.32 M) amortiguada a un pH apropiado y se hacen aberturas a las células por **homogeneización** en un homogeneizador o mezclador, por **sonicación** o someténdolas a altas presiones (**presión francesa** o **bomba de nitrógeno**). La homogeneización inicial y el fraccionamiento subcelular suelen efectuarse a 4 °C con el fin de minimizar la degradación enzimática de los constituyentes celulares. La muestra de células rotas es con frecuencia filtrada a través de muselina o de otra gasa fina para eliminar los cúmulos más grandes de material antes de continuar el procedimiento.

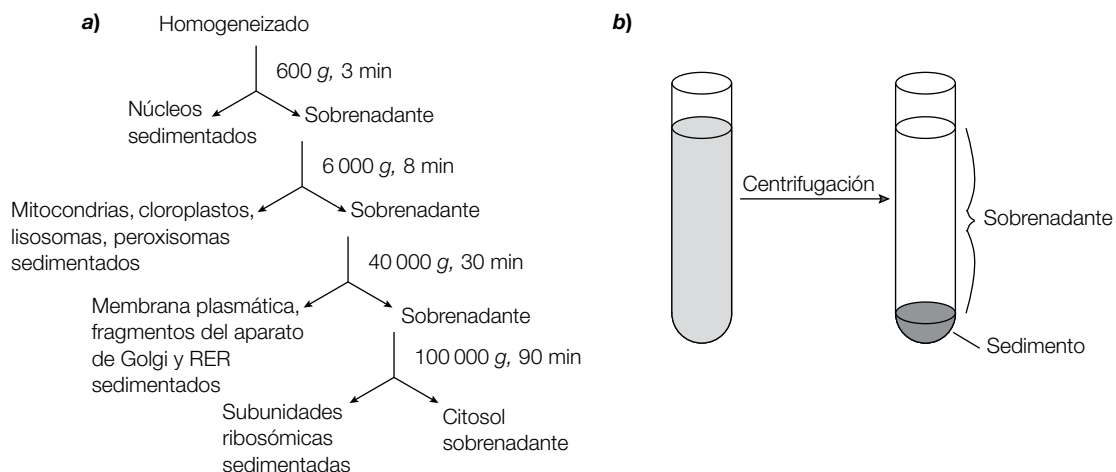
### Centrifugación diferencial

En la centrifugación diferencial, los diversos organelos subcelulares se separan uno de otro con base en su **tamaño** y **densidad**, por lo cual las estructuras más grandes y pesadas sedimentan con más rapidez. Se usa una **centrífuga** para generar fuerzas poderosas, hasta de 100 000 veces la fuerza de la gravedad (g). La muestra homogeneizada se coloca en un tubo de centrífuga apropiado, el cual se carga en el rotor de la centrífuga y se somete a centrifugación (figura A5-2a). En primer lugar se usan fuerzas g relativamente bajas durante breves periodos, pero luego se usan fuerzas g cada vez más altas por periodos más prolongados. Por ejemplo, la centrifugación a 600 g durante 3 minutos hace sedimentar el **núcleo** y los organelos más grandes (figura A5-2b). El sobrenadante de este paso se elimina hacia un tubo fresco y entonces se centrifuga a 6 000 g durante 8 minutos para hacer sedimentar las **mitocondrias**, **peroxisomas** y, si están presentes, **lisosomas** o **cloroplastos**. La centrifugación del siguiente sobrenadante a 40 000 g durante 30 minutos hace sedimentar la **membrana plasmática** y fragmentos del **retículo endoplásmico** y del **aparato**

**de Golgi**. Una centrifugación final a 100 000 g durante 90 minutos resultará en un **sedimento ribosómico** y un sobrenadante que en esencia es libre de materias particuladas y se considera que es la verdadera **fracción citosólica** soluble. Sin embargo, las fracciones aisladas por centrifugación diferencial no suelen encontrarse por completo libres de otros organelos subcelulares y de esa manera pueden necesitar una purificación adicional. Para separaciones a fuerzas g bajas, se usa una centrífuga preparadora, la cual tiene un rotor que gira en el aire a la presión ambiental. No obstante, se requiere una ultracentrífuga para separaciones a fuerzas g más altas, en la cual la cámara se mantiene en un alto vacío para reducir la fricción y el subsecuente calentamiento, que podría ocurrir entre el rotor que gira y el aire.

### Centrifugación con gradiente de densidad de equilibrio

La centrifugación con gradiente de densidad de equilibrio se usa con frecuencia para purificar adicionalmente los organelos después de su separación parcial por centrifugación diferencial. En este procedimiento, los organelos se separan con base en su **densidad**. La fracción de organelos impura se carga hasta llenar el tubo de la centrífuga que contiene un gradiente de una **solución densa** (p. ej., una solución de sucrosa; figura A5-3). La solución de sucrosa está más concentrada (densa) en la parte inferior del tubo y su concentración (y densidad) disminuye a medida que se asciende en el tubo. Durante la centrifugación (p. ej., a 160 000 g durante 3 h), los diferentes organelos se mueven hacia abajo del tubo hacia una **posición de equilibrio**, donde su densidad es igual a la de la sucrosa en esa posición. Las fuerzas de sedimentación tienden a mover los organelos un poco más hacia abajo del tubo pero, si hacen eso, los hacen ingresar en una región de densidad más alta que la



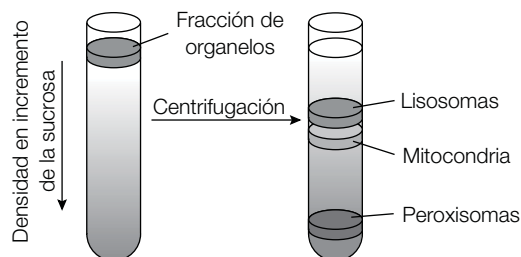
**Figura A5-2.** Fraccionamiento celular por centrifugación diferencial: a) esquema del fraccionamiento celular de una muestra de tejido; b) aspecto de una muestra en el tubo de la centrífuga antes y después de la centrifugación.

del organelo y de esa manera éstos flotan y ascienden hacia la posición previa. Las mitocondrias, lisosomas y peroxisomas difieren en densidad y por eso pueden ser efectivamente separados uno del otro mediante una centrifugación por gradiente de densidad (figura A5-3). De manera similar, el retículo endoplásmico rugoso, el aparato de Golgi y la membrana plasmática pueden separarse usando un gradiente de densidad más bajo. El **cloruro de cesio**, que es más denso, se usa para producir el gradiente de densidad para la separación de partículas más densas como el  $\text{DNA}$ ,  $\text{RNA}$  y proteínas mediante la centrifugación con gradiente de densidad de equilibrio.

### Proteínas marcadoras

Cuando la muestra celular ha sido fraccionada, la pureza de las preparaciones con los diferentes organelos necesita valorarse. Una forma en la cual puede hacerse esto es mediante la valoración de la **morfología**

en el microscopio electrónico (sección A4). Una alternativa disponible más accesible consiste en medir la actividad de (un ensayo para valorar) una **enzima** particular (sección D1), la cual es característica de un organelo y que por consiguiente no se encuentra en cualquier sitio de las células. Por ejemplo, la **catalasa** es una buena enzima marcadora de peroxisomas, la deshidrogenasa de succinato de la mitocondrias, la **catepsina C** o **fosfatasa ácida** de los lisosomas, y la **fosfatasa alcalina** de la membrana plasmática. Por tanto, la presencia de catalasa en una fracción de los lisosomas debería significar su contaminación con peroxisomas. Un buen indicador para comprobar la **pureza** o grado de contaminación de una preparación de organelos consiste en medir la actividad de tales enzimas en las diferentes fracciones aisladas. De manera alternativa, una proteína marcadora puede detectarse si se recurre al  $\text{SDS-PAGE}$  (sección C2) y el *Western blotting* con un anticuerpo específico (sección C4).



**Figura A5-3.** Separación de organelos mediante centrifugación con gradiente de densidad de equilibrio.

# B1 Estructura de los aminoácidos

## Notas clave

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| <b>Aminoácidos</b>                 | Todas las proteínas están formadas por el mismo grupo de 20 aminoácidos estándar. Un aminoácido típico cuenta con un grupo amino primario, un grupo carboxilo, un átomo de hidrógeno y una cadena lateral (grupo R) fija a un átomo de carbono $\alpha$ central ( $C_\alpha$ ).   |
| <b>Enantiómeros</b>                | Los aminoácidos con cuatro diferentes grupos dispuestos en tetraedro alrededor del átomo $C_\alpha$ pueden existir en una configuración D O L. Estos dos enantiómeros no son imágenes en espejo superpuestas y pueden distinguirse con base en sus diferentes planos de rotación de la luz polarizada. En las proteínas se encuentra sólo el enantiómero L.   |
| <b>Los 20 aminoácidos estándar</b> | Las diferentes cadenas laterales de los grupos R presentan distintas propiedades fisicoquímicas. Pueden ser polares, ácidas, básicas, aromáticas, voluminosas, con una conformación inflexible, capaces de formar enlaces de hidrógeno y enlaces cruzados, así como de presentar reactividad química. La glicina (Gly, G) tiene un átomo de hidrógeno como su grupo R. La alanina (Ala, A), valina (Val, V), leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I) y la metionina (Met, M) tienen cadenas laterales alifáticas de diferentes estructuras que son hidrófobas e inertes desde el punto de vista químico. Las cadenas laterales aromáticas de la fenilalanina (Phe, F), tirosina (Tyr, Y) y triptófano (Trp, W) también son de naturaleza hidrófoba. La prolina (Pro, P), un aminoácido de conformación rígida, tiene su cadena lateral alifática unida otra vez al grupo amino, por lo que en realidad es un iminoácido. La cadena lateral azufrada e hidrófoba de la cisteína (Cys, C) es muy reactiva y puede formar un enlace disulfuro con otro residuo cisteína. Los aminoácidos básicos arginina (Arg, R) y lisina (Lys, K) poseen cadenas laterales con carga positiva, en tanto que la cadena lateral de la histidina (His, H) puede presentar carga positiva o neutra en un pH neutral. Las cadenas laterales de los aminoácidos ácidos ácido aspártico (Asp, D) y ácido glutámico (Glu, E) muestran carga negativa en un pH neutral. La cadena lateral amida de la asparagina (Asn, N) y la glutamina (Gln, Q) y la cadena lateral hidroxilo de la serina (Ser, S) y la treonina (Thr, T) es polar y sin carga y puede formar enlaces de hidrógeno. |
| <b>Ácidos, bases y pH</b>          | El pH es una medida de la concentración de $H^+$ en una solución. Un ácido es un donador de protones; una base es un aceptor de protones y ambos juntos se denominan par acidobásico conjugado, por ejemplo el ácido acético ( $CH_3COOH$ ) y el acetato ( $CH_3COO^-$ ). El pK de un ácido es el pH al cual el ácido se disocia a la mitad. La ecuación de Henderson-Hasselbalch expresa la interrelación entre pH, pK y el cociente entre ácido y base.   |
| <b>Amortiguadores</b>              | Un par conjugado acidobásico puede fungir como un amortiguador, es decir, resistir los cambios del pH. En una curva de titulación de un ácido, el punto de inflexión indica el valor del pK. La capacidad de amortiguamiento del par acidobásico lo indica el $pK \pm 1$ unidad de pH. En los líquidos biológicos, los iones fosfato y carbonato actúan como amortiguadores. Aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos también tienen alguna capacidad de amortiguamiento.   |

**Ionización de los aminoácidos**

Los grupos amino  $\alpha$  y carboxilo  $\alpha$  de los aminoácidos actúan como grupos acidobásicos, ya que donan o aceptan un protón conforme a la variación del pH. A pH bajo, ambos grupos se hallan protonados, pero a medida que el pH se incrementa pierden un ion hidrógeno, primero el grupo carboxilo y después el amino. El pK de los 20 aminoácidos estándar es de 1.8–2.9 para el grupo carboxilo  $\alpha$  y de 8.8–10.8 para el grupo amino  $\alpha$ . Los aminoácidos con una cadena lateral ionizable tienen un grupo acidobásico adicional con un pK característico.

**Temas relacionados**

(B2) Estructura y función de las proteínas

(B3) Mioglobina y hemoglobina  
(B4) Colágena

**Aminoácidos**

Los aminoácidos son los ladrillos con los que se construyen las **proteínas** (sección B2). Las proteínas de todas las especies, desde las bacterias a los seres humanos, están elaboradas de los mismos **20 aminoácidos estándar**. Diecinueve de ellos son aminoácidos  $\alpha$  con un **grupo amino primario** ( $-\text{NH}_3^+$ ) y un **grupo de ácido carboxílico** (carboxilo;  $\text{COOH}$ ) fijo a un átomo de carbono central, que se denomina **átomo de carbono  $\alpha$**  ( $\text{C}_\alpha$ ) porque está adyacente al grupo carboxilo (figura B1-1a). También un átomo de hidrógeno está fijo al  $\text{C}_\alpha$  y una **cadena lateral variable** o grupo “R”. La única excepción a esta estructura general la representa  $\alpha$  prolina, que tiene un grupo amino secundario que la convierte en realidad en un **iminoácido  $\alpha$** . Los nombres de los aminoácidos suelen escribirse en forma abreviada, en ocasiones por medio de tres letras y en otras con una. Así, por ejemplo, la prolina se abrevia Pro o P (figura B1-2).

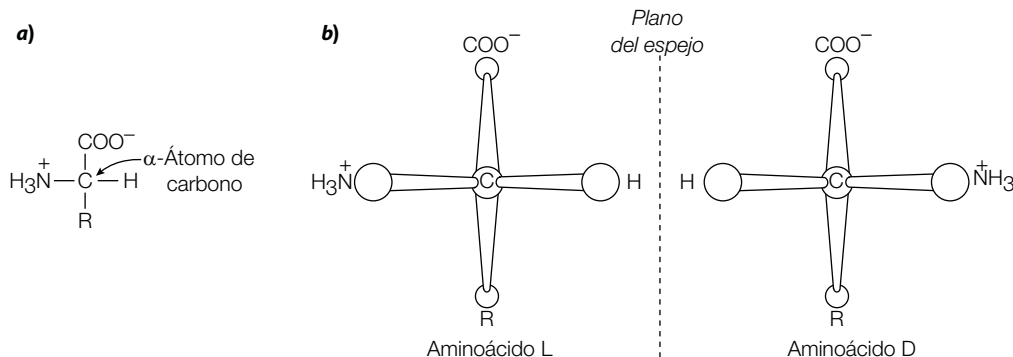
**Enantiómeros**

Todos los aminoácidos, excepto la glicina (Gly o G; figura B1-2), tienen cuatro diferentes grupos ordenados como un **tetraedro** alrededor del átomo  $\text{C}_\alpha$ , el cual se conoce entonces como un **centro asimétrico** o **centro quiral** y

tiene la propiedad de la **quiralidad** (del griego *cheir* = mano) (figura B1-1b). Las dos **imágenes en espejo que no se superponen** se denominan **enantiómeros**. Los enantiómeros son indistinguibles con la mayor parte de las técnicas físicas y químicas, pero pueden distinguirse con base en su diferente rotación óptica del plano de la luz polarizada. Las moléculas se clasifican con dextrorrotatorias (D; del griego *dextro* = derecho) o levorrotatorias (L; del griego *levo* = izquierdo) según si rotan el plano de la luz polarizada en el sentido de las agujas del reloj o al contrario, respectivamente. Los aminoácidos D y L también pueden distinguirse por enzimas que de manera habitual sólo reconocen uno u otro de los enantiómeros. En las proteínas sólo se encuentran **aminoácidos L**. Los **aminoácidos D** son excepcionales en la naturaleza y sólo se encuentran en paredes de las células bacterianas (sección A1) y en ciertos antibióticos.

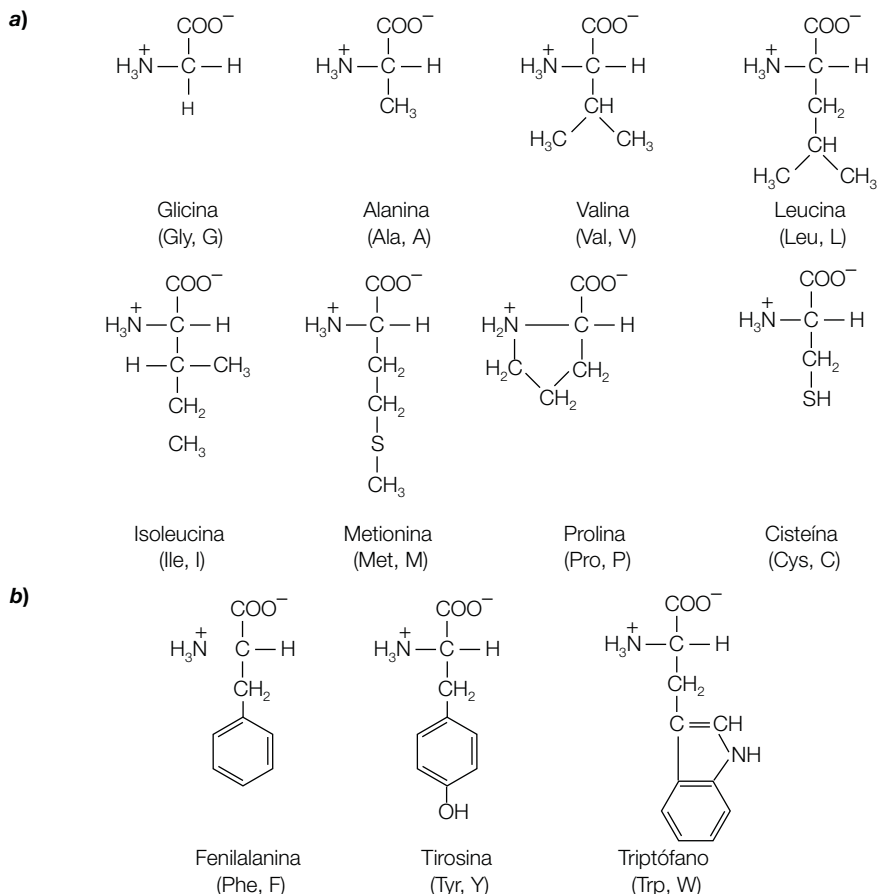
**Los 20 aminoácidos estándar**

Los 20 aminoácidos estándar difieren sólo en la estructura de la **cadena lateral** o grupo “R” (figuras B1-2 y B1-3). Pueden subdividirse en grupos más pequeños con base en la similitud de las propiedades de sus cadenas laterales. Presentan diferentes **propiedades fisicoquímicas**



**Figura B1-1.** a) Estructura básica de un aminoácido en que se muestran los cuatro diferentes grupos que rodean al átomo de carbono  $\alpha$  central; b) los dos enantiómeros de un aminoácido.





**Figura B1-2.** Los aminoácidos estándar: a) grupos hidrófobos alifáticos R; b) grupos hidrófobos aromáticos R. Los pesos moleculares de los aminoácidos se proporcionan en el Cuadro B1-1.

de acuerdo con la naturaleza de sus cadenas laterales. Algunos son ácidos y otros básicos. Algunos presentan pequeñas cadenas laterales mientras que las de otros son grandes y voluminosas. Algunos aminoácidos poseen cadenas laterales hidrófobas (repelen el agua) en tanto que otras son hidrófilas o polares (les atrae el agua). Algunas confieren inflexibilidad conformacional y otras pueden participar en enlaces de hidrógeno y enlaces covalentes. Algunas presentan reactividad química.

### Aminoácidos hidrófobos, alifáticos

La **glicina** (Gly, G) (figura B1-2a), el aminoácido más pequeño y con la estructura más simple, tiene un átomo de hidrógeno en la posición de la cadena lateral y por consiguiente no existe como par de estereoisómeros puesto que tiene dos grupos idénticos (átomos de hidrógeno) unidos al átomo C $\alpha$ . Las cadenas laterales alifáticas de la **alanina** (Ala, A), **valina** (Val, V), **leucina** (Leu, L), **isoleucina** (Ile, I) y **metionina** (Met, M) (figura 2a) carecen de reactividad química y son hidrófobas por naturaleza. La **prolina** (Pro, P) (figura B1-2a) también es hidrófoba, con su cadena lateral alifática unida otra vez al grupo amino, lo que la vuelve rígida desde el punto

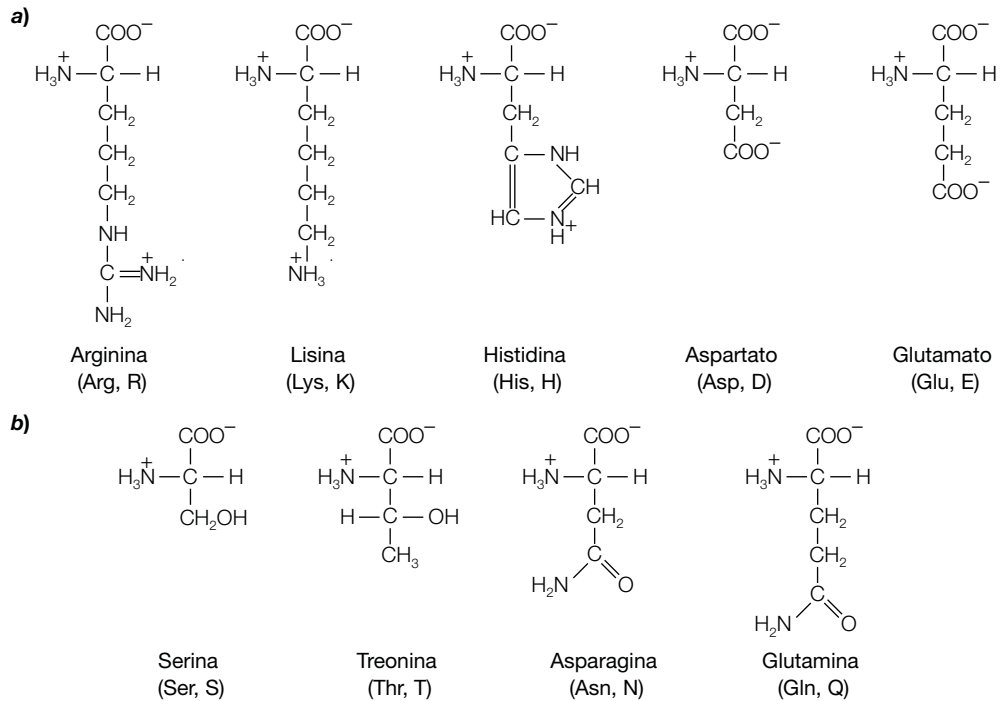
de vista conformacional. La cadena lateral azufrada de la **cisteína** (Cys, C) (figura B1-2a) también es hidrófoba pero es muy reactiva y proclive a reaccionar con otra cisteína para formar un enlace disulfuro (sección B2).

### Aminoácidos hidrófobos y aromáticos

La **fenilalanina** (Phe, F), **tirosina** (Tyr, Y) y **triptófano** (Trp, W) (figura B1-2b) son hidrófobos a raíz de sus anillos aromáticos.

### Aminoácidos polares, con carga

Los restantes aminoácidos son todos polares, con cadenas laterales hidrófilas, algunas de las cuales presentan carga en un pH neutral. Los grupos amino de las cadenas laterales de los aminoácidos básicos **arginina** (Arg, R) y **lisina** (Lys, K) (figura B1-3a) están protonados y por tanto tienen carga positiva en un pH neutral. La cadena lateral de la **histidina** (His, H) (figura B1-3a) puede tener carga positiva o no presentar carga en un pH neutral. En contraste, en un pH neutral, los grupos carboxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos **ácido aspártico** (aspartato; Asp, D) y **ácido glutámico**



**Figura B1-3.** Aminoácidos estándar: a) polar, grupos R con carga; b) polar, grupos R sin carga. Los pesos moleculares de los aminoácidos se proporcionan en el cuadro B1-1.

(glutamato; Glu, E) (figura B1-3a), que como su nombre lo dice son ácidos, están desprotonados y poseen carga negativa.

### Aminoácidos polares, sin carga

La cadena lateral de la **asparagina** (Asn, N) y la **glutamina** (Gln, Q) (figura B1-3b), los derivados amídicos de Asp y Glu, respectivamente, carece de carga pero puede participar en los enlaces de hidrógeno. La **serina** (Ser, S) y la **treonina** (Thr, T) (figura B1-3b) son aminoácidos polares debido a su grupo hidroxilo reactivo en la cadena lateral y también pueden participar en los enlaces de hidrógeno (como puede hacerlo el grupo hidroxilo del aminoácido aromático Tyr).

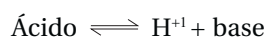
### Ácidos, bases y pH

El pH de una solución es una medida de su concentración de protones ( $H^+$ ) y pH se define como:

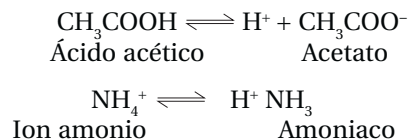
$$pH = \log_{10} \frac{1}{[H^+]} = -\log_{10} [H^+]$$

en la cual los corchetes denotan una **concentración molar**.

Un **ácido** puede definirse como un donador de protones y una **base**, como un receptor (aceptor) de protones.

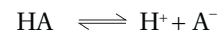


Por ejemplo:



La especie que se forma por la **ionización** de un ácido es su base conjugada. Al contrario, la protonación de una base produce su ácido conjugado. Así, por ejemplo, el ácido acético y el acetato representan un **par acidobásico conjugado**.

La ionización de un ácido débil se representa así:



La **constante de equilibrio** ( $K$ ) aparente de esta ionización se define como:

$$K = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad (\text{Ecuación 1})$$

El **pK** de un ácido se define como:

$$pK = -\log K = \log \frac{1}{K}$$

El pK de un ácido es el pH al cual se disocia a la mitad, es decir, cuando  $[A^-] = [HA]$ .

La **ecuación de Henderson-Hasselbalch** expresa la interrelación entre pH y el cociente entre ácido y base. Se deriva como sigue. El reordenamiento de la ecuación 1 da:

$$\frac{1}{[\text{H}^+]} = \frac{1}{K} \times \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Si se aplica el logaritmo a ambos lados de la ecuación se tiene:

$$\log \frac{1}{[\text{H}^+]} = \log \frac{1}{K} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

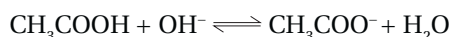
Si se sustituye el pH por el log de  $1/[\text{H}^+]$  y el pK por el log de  $1/K$  da:

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

que es la ecuación de Henderson-Hasselbalch. Esta ecuación indica que el pK de un ácido es numéricamente igual al pH de la solución cuando la concentración molar del ácido es igual a la de su base conjugada. El pH de una solución puede calcularse a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch si se conocen las concentraciones molares de  $\text{A}^-$  y HA y el pK de HA. De manera similar, el pK de un ácido puede calcularse si se conocen las concentraciones molares de  $\text{A}^-$  y HA y el pH de la solución.

## Amortiguadores

Un par conjugado acidobásico como el del ácido acético y el acetato puede resistir cambios en el pH de una solución, es decir, puede actuar como un **amortiguador**. Al añadir hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) a una solución de ácido acético sucede lo siguiente:



Una gráfica sobre la dependencia del pH de esta solución de la cantidad de  $\text{OH}^-$  añadida se llama **curva de titulación** (figura B1-4). Existe un punto de inflexión de la curva en el pH de 4.8, que es el pK del ácido acético. En la vecindad de tal pH, una cantidad relativamente grande de  $\text{OH}^-$  (o  $\text{H}^+$ ) produce un cambio escaso en el pH ya que el  $\text{OH}^-$  (o  $\text{H}^+$ ) agregado reacciona con el  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (o  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ), respectivamente. Los ácidos débiles son más eficaces para amortiguar cambios del pH dentro de una unidad de pH del pK (figura B1-4), lo que con frecuencia

se refiere como  $\text{pK} \pm 1$ , o la **capacidad de amortiguamiento**.

Los líquidos biológicos, como el citosol y líquidos extracelulares como la sangre, son amortiguados. Por ejemplo, en los individuos sanos, el pH de la sangre recibe cuidadosa atención para mantenerlo a un pH de 7.4. Los principales componentes amortiguadores de la mayor parte de los líquidos biológicos son el ion fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , pK de 6.82) y el ion carbonato ( $\text{HCO}_3^-$ , pK de 6.35) debido a que los mismos tienen valores de pK en ese espectro. Pese a ello, muchas moléculas biológicas, entre las cuales se reconocen los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, poseen numerosos grupos acidobásicos que son efectivos para amortiguar en el espectro del pH fisiológico (pH 6 a 8).

Cuando se trabaja con enzimas, proteínas y otras moléculas biológicas, es con frecuencia crucial amortiguar el pH de una solución con el fin de evitar la **desnaturalización** (pérdida de actividad) de los componentes de interés (sección D3). En los laboratorios se recurre a muchos amortiguadores para lograr este propósito. Uno de los más comunes es el tris(hidroximetil)aminoetano o **Tris**, que tiene un pK de 8.08.

## Ionización de los aminoácidos

Los 20 aminoácidos estándar tienen dos **grupos acidobásicos**: los grupos amino  $\alpha$  y carboxilo  $\alpha$  unidos al átomo  $\text{C}_\alpha$ . Los aminoácidos con una **cadena lateral ionizable** (Asp, Glu, Arg, Lys, His, Cys, Tyr) tienen un grupo acidobásico adicional. La **curva de titulación** de la Gly se muestra en la figura B1-5a. A un pH bajo (esto es, una concentración alta de iones hidrógeno), tanto el grupo amino como el grupo carboxilo están protonados por completo, de manera que el aminoácido se encuentra en la forma catiónica  $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COOH}$  (figura B1-5b). Como el aminoácido en solución se titula con cantidades crecientes de una base fuerte (p. ej., NaOH) pierde dos protones, primero el del carboxilo, que tiene el valor de pK más bajo (pK = 2.3), y luego el del grupo amino, que tiene el valor de pK más alto (pK = 9.78). El valor al

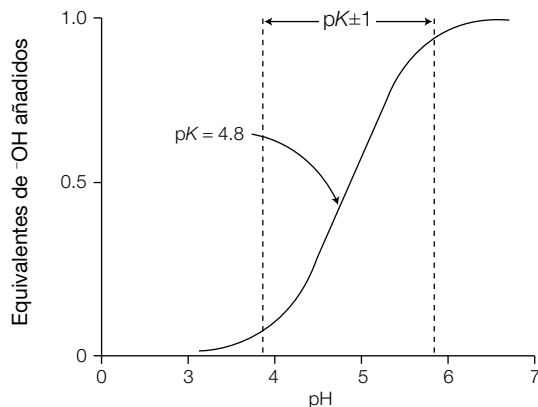
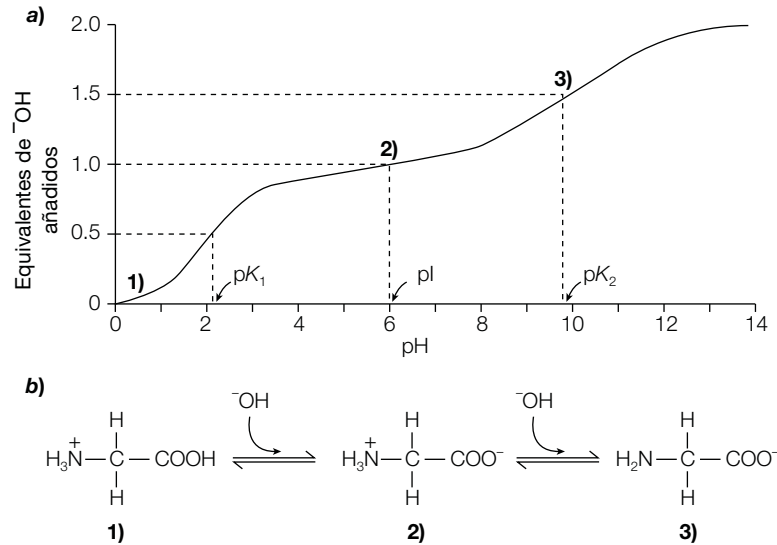


Figura B1-4. Curva de titulación del ácido acético.

cual la Gly carece de carga neta se denomina su **punto isoeléctrico**, o **pI**. Los grupos carboxilo  $\alpha$  de los 20 aminoácidos estándar tienen valores de  $pK$  en el espectro de 1.8 a 2.5, en tanto que sus grupos amino  $\alpha$  tienen valores de  $pK$  en el espectro de 8.7 a 10.7 (cuadro B1-1). Las cadenas laterales de los aminoácidos ácidos Asp y Glu tienen valores de  $pK$  de 3.9 y 4.1, respectivamente, en tanto que aquéllos de los aminoácidos básicos Arg y

Lys tienen valores de  $pK$  de 12.5 y 10.5, respectivamente. Sólo la cadena lateral de la His, con un valor de  $pK$  de 6.0, está ionizada dentro del espectro del pH fisiológico (pH de 6 a 8). Debería recordarse que cuando los aminoácidos están unidos en las proteínas, sólo los grupos de las cadenas laterales y los grupos terminales amino  $\alpha$  y carboxilo  $\alpha$  de la cadena polipeptídica están libres para ionizarse (sección B2).



**Figura B1-5.** Ionización de la glicina: a) curva de titulación de la glicina; b) disociación de la glicina. Los números en negritas entre paréntesis en a) corresponden a las estructuras de b).

**Cuadro B1-1. Valores de  $pK$  y pesos moleculares de los 20 aminoácidos estándar.**

| Aminoácido      | Peso molecular | $pK$ del $\alpha$ -COOH | $pK$ del $\alpha$ -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> | $pK$ de la cadena lateral |
|-----------------|----------------|-------------------------|---|---------------------------|
| Alanina         | 89.1           | 2.35                    | 9.87  |                           |
| Arginina        | 174.2          | 1.82                    | 8.99  | 12.48                     |
| Asparagina      | 132.1          | 2.14                    | 8.72  |                           |
| Ácido aspártico | 133.1          | 1.99                    | 9.90  | 3.90                      |
| Cisteína        | 121.2          | 1.92                    | 10.70   | 8.37                      |
| Ácido glutámico | 147.1          | 2.10                    | 9.47  | 4.07                      |
| Glutamina       | 146.2          | 2.17                    | 9.13  |                           |
| Glicina         | 75.1           | 2.35                    | 9.78  |                           |
| Histidina       | 155.2          | 1.80                    | 9.33  | 6.04                      |
| Isoleucina      | 131.2          | 2.32                    | 9.76  |                           |
| Leucina         | 131.2          | 2.33                    | 9.74  |                           |
| Lisina          | 146.2          | 2.16                    | 9.06  | 10.54                     |
| Metionina       | 149.2          | 2.13                    | 9.28  |                           |
| Fenilalanina    | 165.2          | 2.20                    | 9.31  |                           |
| Prolina         | 115.1          | 1.95                    | 10.64   |                           |
| Serina          | 105.1          | 2.19                    | 9.21  |                           |
| Treonina        | 119.1          | 2.09                    | 9.10  |                           |
| Triptófano      | 204.2          | 2.46                    | 9.41  |                           |
| Tirosina        | 181.2          | 2.20                    | 9.21  | 10.46                     |
| Valina          | 117.1          | 2.29                    | 9.74  |                           |

# B2 Estructura y función de las proteínas

## Notas clave

|   |  |
|---|--|
| <b>Proteínas: descripción</b>                         | Las proteínas desarrollan una gran variedad de funciones, entre ellas, el transporte y almacenamiento de otras moléculas, soporte mecánico, generación de movimiento, protección inmunitaria, catalizadoras, participan en la señalización celular y transmisión del impulso nervioso. Cada proteína cuenta con una secuencia de aminoácidos específica cuya determinación es genética.  |
| <b>Enlace peptídico</b>                               | Una proteína es una secuencia lineal de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. El enlace peptídico es una unión covalente entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilo de otro aminoácido. La conformación raquídea de un polipéptido es especificada por los ángulos de rotación del enlace $C_{\alpha}-N$ ( <i>phi</i> , $\Phi$ ) y el enlace $C_{\alpha}-C$ ( <i>psi</i> , $\Psi$ ) de cada uno de sus residuos de aminoácidos. Los valores que pueden tener $\Phi$ y $\Psi$ desde el punto de vista estérico se pueden consultar en la gráfica de Ramachandran.   |
| <b>Estructura primaria</b>                            | La secuencia lineal de los aminoácidos unidos por los enlaces peptídicos se llama estructura primaria de las proteínas. La posición de los enlaces disulfuro covalentes entre los residuos de cisteína también se incluye en la estructura primaria.   |
| <b>Estructura secundaria</b>                          | La estructura secundaria de una proteína se refiere al plegamiento regular de regiones de la cadena polipeptídica. Los dos tipos más comunes de estructuras secundarias son la hélice $\alpha$ y la hoja plegada $\beta$ . La hélice $\alpha$ es una disposición helicoidal parecida a un bastón, cilíndrica, de los aminoácidos en la cadena polipeptídica, que se mantiene por enlaces de hidrógeno paralelos al eje de la hélice. En la hoja plegada $\beta$ , los enlaces de hidrógeno se forman entre secciones adyacentes de polipéptidos que se disponen en la misma dirección (paralelos) o en direcciones opuestas (antiparalelos). |
| <b>Estructura terciaria</b>                           | La estructura terciaria de una proteína se refiere al ordenamiento tridimensional de todos los aminoácidos en la cadena polipeptídica. Esta conformación nativa y activa desde el punto de vista biológico se mantiene gracias a múltiples enlaces no covalentes.  |
| <b>Estructura cuaternaria</b>                         | Si una proteína está formada por más de una cadena polipeptídica, se dice que tiene estructura cuaternaria. Ésta se refiere a la disposición espacial de las subunidades polipeptídicas y a la naturaleza de las interacciones entre las mismas.   |
| <b>Estabilidad de la proteína</b>                     | Además de los enlaces peptídicos entre los residuos de los aminoácidos, la estructura tridimensional de una proteína se mantiene por una combinación de interacciones no covalentes (fuerzas electrostáticas, fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno, fuerzas hidrófobas) e interacciones covalentes (enlaces disulfuro).  |
| <b>Determinación de la estructura de una proteína</b> | La estructura tridimensional de una proteína puede determinarse mediante técnicas físicas complejas como la cristalografía de rayos X, la espectroscopia con resonancia magnética nuclear (NMR) y la microscopía crioelectrónica.  |
| <b>Plegamiento de las proteínas</b>                   | Las proteínas se pliegan en forma espontánea en su conformación nativa y la estructura primaria es la que dicta su estructura tridimensional. En primer lugar, son las fuerzas hidrófobas las que dirigen de manera primaria el plegamiento, que sigue un conjunto ordenado de vías. Proteínas accesorias, como las chaperonas moleculares, contribuyen a que las proteínas se plieguen correctamente en la célula. Enfermedades como la de Alzheimer se deben a que las proteínas se pliegan mal.   |

**Temas relacionados**(B1) Estructura de los aminoácidos  
(B3) Mioglobina y hemoglobina(B4) Colágena  
(B6) Anticuerpos**Proteínas: descripción**

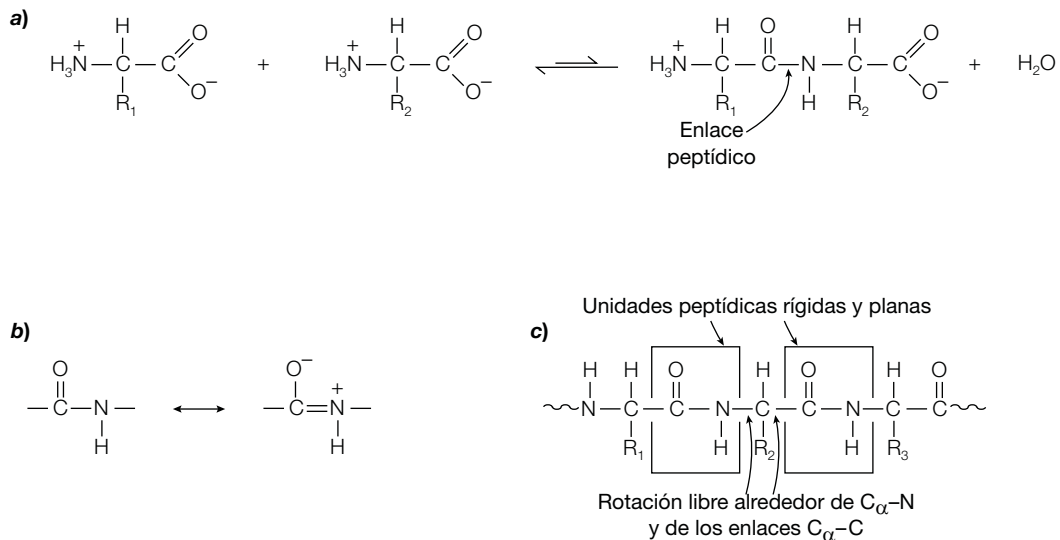
Las **proteínas** son las macromoléculas más versátiles de los organismos vivos, donde llevan a cabo una diversidad de funciones. Éstas **transportan** y **almacenan** otras moléculas (p. ej., la hemoglobina y la mioglobina; sección B3), proporcionan **soporte mecánico** (p. ej., la colágena; sección B4), **generan movimiento** (p. ej., la actina y la miosina; sección B5), proveen **protección inmunitaria** (p. ej., anticuerpos; sección B6), actúan como **catalizadores** (enzimas; secciones D1 a D5), intervienen en la **señalización celular** (sección E5), y **transmiten impulsos nerviosos** (sección E6). Cada proteína cuenta con una **secuencia de aminoácidos específica** que determinan los genes (sección H1). Casi todas las proteínas contienen entre 50 y 2 000 aminoácidos unidos por medio de **enlaces peptídicos**. Como el peso molecular promedio de un aminoácido es cercano a 110 (cuadro B1-1), los **pesos moleculares** de la mayoría de las proteínas se hallan entre 5 500 y 220 000. También es posible referirse a la masa de una proteína, la cual se expresa en unidades de **Dalton**, donde un Dalton (Da) es igual a una unidad de masa atómica. Por consiguiente, una proteína con un peso molecular de 25 000 tiene una masa de 25 000 Da o 25 kDa.

**Enlace peptídico**

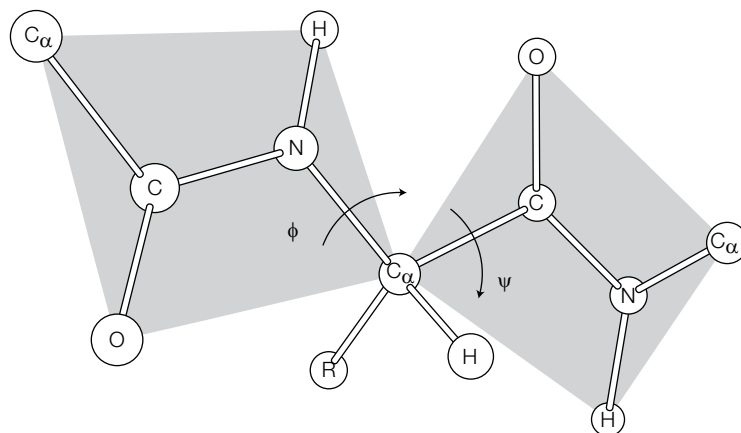
Las proteínas son secuencias lineales de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. El enlace peptídico es un

enlace químico covalente entre el grupo amino  $\alpha$  de un aminoácido y el grupo carboxilo  $\alpha$  de otro (figura B2-1a) (sección B1). Cuando dos aminoácidos están unidos por medio de un enlace peptídico para formar un dipéptido, todavía conservan un grupo amino libre en un extremo y un grupo carboxilo libre en el otro extremo, los cuales pueden unirse a aminoácidos adicionales. Por tanto, cadenas largas sin ramificaciones de aminoácidos pueden mantenerse unidas por enlaces peptídicos para formar oligopéptidos (hasta 25 residuos de aminoácidos) y polipéptidos (> 25 residuos de aminoácidos). Advuértase que el polipéptido todavía conserva un grupo amino  $\alpha$  libre en un extremo y un grupo carboxilo  $\alpha$  libre en el otro. Por convención, las cadenas peptídicas se escriben hacia abajo, con el grupo amino  $\alpha$  libre a la izquierda y el carboxilo  $\alpha$  libre a la derecha y un guión entre los aminoácidos para indicar los enlaces peptídicos. En consecuencia, el tripéptido  $^+H_3N$  serina-leucina-fenilalanina- $COO^-$  debe escribirse Ser-Leu-Phe (con el código de tres letras) o S-L-F (con el código de una letra).

El enlace entre el carbono y el nitrógeno exhibe un **carácter parcial de enlace doble** debido a la proximidad del doble enlace entre el carbono y el oxígeno del grupo carbonilo, lo que permite la existencia de las estructuras de resonancia de la figura B2-1b. A causa de ello, la longitud del enlace C-N es también más corta que la de los enlaces simples C-N habituales. La **unidad peptídica**, la cual está constituida por los átomos CO-NH, es



**Figura B2-1.** a) Formación de un enlace peptídico; b) estructuras de resonancia del enlace peptídico; c) unidades peptídicas de un polipéptido.

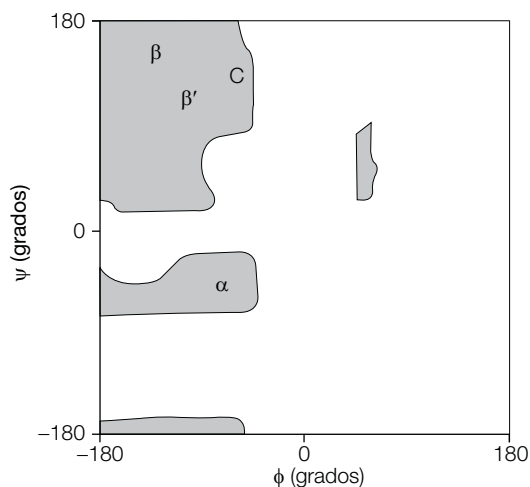


**Figura B2-2.** Un segmento de una cadena polipeptídica muestra los ángulos de torsión alrededor de los enlaces C<sub>α</sub>-N ( $\phi$ ) y C<sub>α</sub>-C ( $\psi$ ).

por tanto relativamente rígida y plana, no obstante lo cual puede tener lugar la rotación libre alrededor de los enlaces C<sub>α</sub>-N y C<sub>α</sub>-C (los enlaces que se hallan a cada lado del enlace peptídico), lo que permite que unidades peptídicas adyacentes se encuentren en ángulos diferentes (figura B2-1c). El hidrógeno del grupo amino está casi siempre en el lado opuesto (*trans*) del enlace doble del oxígeno del carbonilo y no en el mismo lado (*cis*).

La columna vertebral de una proteína es una secuencia unida de grupos peptídicos planos y rígidos. La conformación raquídea de un polipéptido depende de los **ángulos de rotación** o **ángulos de torsión** alrededor de los enlaces C<sub>α</sub>-N (*phi*,  $\phi$ ) y C<sub>α</sub>-C (*psi*,  $\Psi$ ) de cada uno de sus residuos de aminoácidos. Cuando la cadena polipeptídica está en su conformación plana, extendida

por completo (*toda-trans*), los ángulos  $\Phi$  y  $\Psi$  se definen como de 180° y se incrementan para una rotación a favor de las agujas del reloj cuando se ven desde C<sub>α</sub> (figura B2-2). El **espectro conformacional** de los ángulos de torsión,  $\Phi$  y  $\Psi$ , de la columna vertebral de un polipéptido está restringido por impedimentos estéricos. Desde el punto de vista estérico, el valor permitido de  $\Phi$  y  $\Psi$  puede determinarse si se calcula la distancia entre los átomos de un tripéptido a todos los valores de  $\Phi$  y  $\Psi$  para la unidad peptídica central. Estos valores se visualizan en un diagrama de contorno estérico, conocido por otro lado como mapa de conformación o **gráfica de Ramachandran** (figura B2-3). Si se observa la figura B2-3, puede verse que la mayor parte de las áreas de la gráfica de Ramachandran (en su mayoría combinaciones de  $\Phi$  y  $\Psi$ ) son inaccesibles desde la perspectiva



**Figura B2-3.** Gráfica de Ramachandran en la que se muestran los ángulos permitidos para la poli-L-alanina (regiones oscuras).  $\alpha$ , Valores  $\Phi$ - $\Psi$  que producen la mano derecha de la hélice  $\alpha$ ;  $\beta$ , la hoja plegada  $\beta$  antiparalela;  $\beta'$ , la hoja plegada  $\beta$  paralela; C, la hélice de colágena.

conformacional a una cadena polipeptídica. Sólo tres regiones pequeñas del mapa de conformación son físicamente accesibles a una cadena polipeptídica y dentro de tales regiones se encuentran los valores  $\Phi$  y  $\Psi$  que producen la lateralización a la derecha de la hélice  $\alpha$ , las hojas plegadas  $\beta$  paralelas y antiparalelas y la hélice de la colágena (véase más adelante y la sección B4).

La cadena polipeptídica se pliega para configurar la forma específica (**conformación**) de la proteína. Esta conformación es la **disposición tridimensional** de los átomos en la estructura y está determinada por la secuencia de los aminoácidos. La estructura de las proteínas tiene cuatro niveles: **primario, secundario, terciario** y a veces, pero no siempre, **cuaternario**.

### Estructura primaria

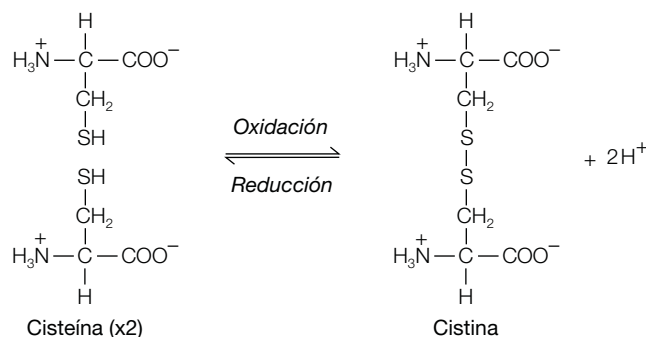
El nivel primario de la estructura de una proteína es la **secuencia lineal de aminoácidos** como quedan unidos por los enlaces peptídicos. Esta secuencia está determinada a su vez por la secuencia de bases de los nucleótidos en la codificación genética de la proteína (sección H1). También se incluye en la estructura primaria la localización de cualquier otro **enlace covalente**. De manera primaria, éstos son **enlaces disulfuro** entre residuos de cisteína que se hallan adyacentes en el espacio, pero no en la secuencia lineal de aminoácidos. Estos entrecruzamientos covalentes entre cadenas polipeptídicas separadas o entre partes diferentes de la misma cadena se forman por la oxidación de los grupos SH de los residuos de cisteína que se yuxtaponen en el espacio (figura B2-4). El disulfuro resultante se llama residuo de **cisteína**. Los enlaces disulfuro son frecuentes en las proteínas extracelulares, pero rara vez se encuentran en proteínas intracelulares. Algunas proteínas como la colágena presentan entrecruzamientos covalentes entre cadenas laterales de residuos de Lys (sección B4).

### Estructura secundaria

El nivel de estructura secundaria de una proteína es el plegamiento regular de regiones de la cadena polipep-

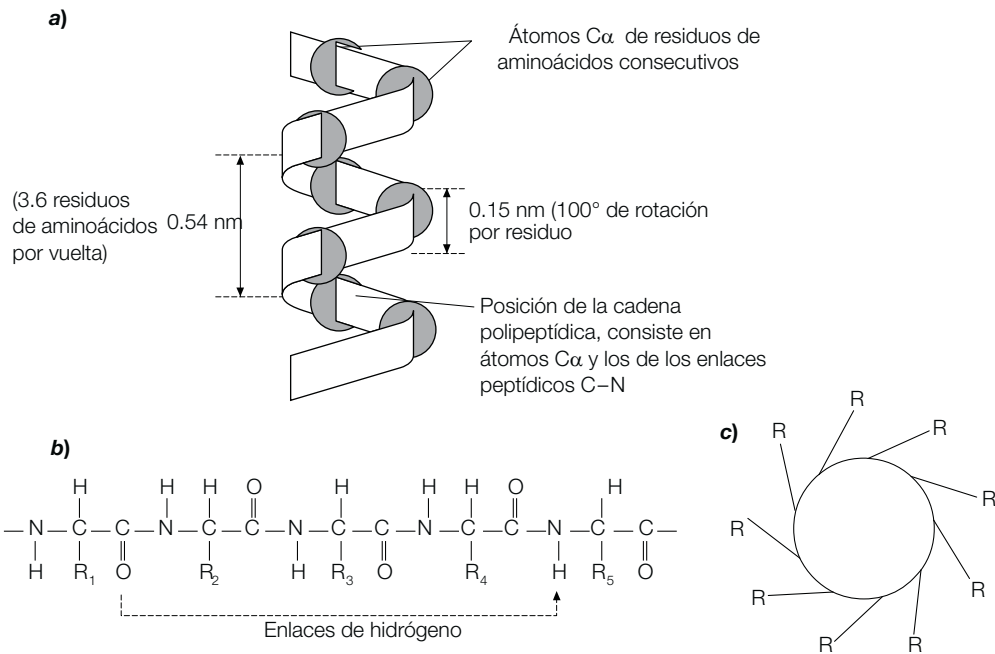
tídica. Los dos tipos más comunes de pliegues de las proteínas son la **hélice  $\alpha$**  y la **hoja plegada  $\beta$** . En la hélice  $\alpha$  similar a un bastón, los aminoácidos se disponen en una conformación helicoidal regular (figura B2-5a). El oxígeno del grupo carbonilo de cada enlace peptídico está unido al hidrógeno del grupo amino del cuarto aminoácido situado más allá del enlace (figura B2-5b), con el enlace de hidrógeno dispuesto casi en paralelo al eje de la hélice. En una hélice  $\alpha$  hay 3.6 aminoácidos por vuelta de la hélice y cubren una distancia de 0.54 nm, en tanto que cada residuo de aminoácido representa un avance de 0.15 nm a lo largo del eje de la hélice (figura B2-5a). Todos los aminoácidos de las cadenas laterales se localizan a lo largo de la parte externa de la hélice cilíndrica (figura B2-5c). Ciertos aminoácidos se hallan con más frecuencia en unas hélices  $\alpha$  que en otras. En esta situación se encuentra la Pro, que rara vez se reconoce en regiones helicoidales  $\alpha$  debido a que no puede formar el patrón de enlace de hidrógeno correcto a raíz de que carece de un átomo de hidrógeno en su átomo de nitrógeno. Por esta causa, la Pro se encuentra con más frecuencia al final de una hélice  $\alpha$ , donde altera la dirección de la cadena polipeptídica y hace concluir la hélice. Diferentes proteínas muestran cantidades distintas de cadenas polipeptídicas plegadas en hélices  $\alpha$ . Por ejemplo, la cadena polipeptídica única de la mioglobina presenta ocho hélices  $\alpha$  (sección B3).

En la **hoja plegada  $\beta$** , se forman enlaces de hidrógeno entre los enlaces peptídicos de diferentes cadenas polipeptídicas o de diferentes secciones de la misma cadena polipeptídica (figura B2-6a). El carácter plano de los enlaces peptídicos fuerza al polipéptido a ser plegado con las cadenas laterales de los aminoácidos haciendo protrusión hacia arriba y abajo de la hoja (figura B2-6b). En las hojas plegadas  $\beta$ , las cadenas polipeptídicas adyacentes pueden ser **paralelas** o **antiparalelas** según si corren en la misma dirección o en la dirección opuesta, respectivamente (figura B2-6c). La cadena polipeptídica que se halla dentro de una hoja plegada  $\beta$  está extendida por completo, de manera que existe una distancia de 0.35 nm desde un átomo de  $C_{\alpha}$  al siguiente. Las cadenas

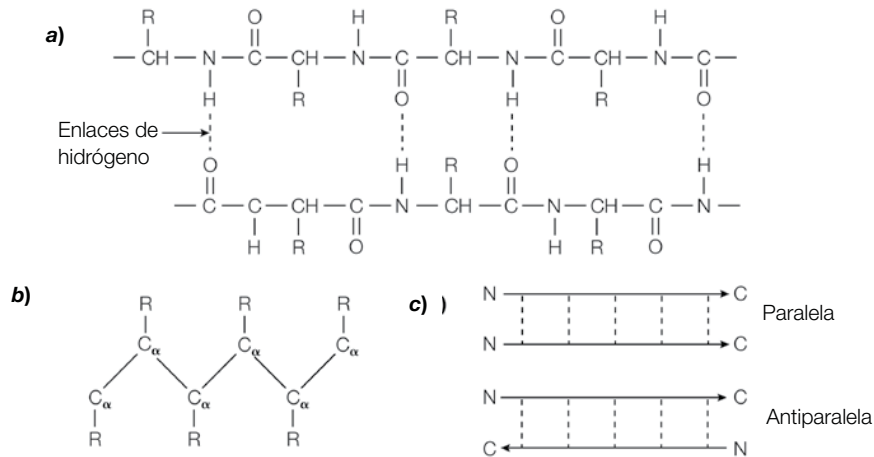


**Figura B2-4.** Formación de un enlace disulfuro entre dos residuos de cisteína, de lo que resulta la formación de un residuo de cistina.





**Figura B2-5.** Plegamiento de la cadena polipeptídica en una hélice  $\alpha$ : a) modelo de una hélice  $\alpha$  con sólo los átomos  $C_{\alpha}$  a lo largo de la columna vertebral que se muestra; b) en la hélice  $\alpha$ , el grupo CO del residuo  $n$  es hidrógeno ligado al grupo NH del residuo  $(n+4)$ ; c) vista de un corte transversal de una hélice  $\alpha$  en el que se muestran las posiciones de las cadenas laterales (grupos R) de los aminoácidos en el lado externo de la hélice.



**Figura B2-6.** Plegamiento de la cadena polipeptídica en una hoja plegada  $\beta$ : a) enlaces de hidrógeno entre dos secciones de una cadena polipeptídica donde forma una hoja plegada  $\beta$ ; b) vista lateral de una de las cadenas polipeptídicas en una hoja plegada  $\beta$  donde se muestran las cadenas laterales (grupos R) fijas a los átomos  $C_{\alpha}$  sobresaliendo por arriba y abajo de la hoja; c) debido a que la cadena polipeptídica tiene polaridad, pueden formarse hojas plegadas  $\beta$  paralelas o antiparalelas.

plegadas  $\beta$  presentan siempre un ligero encorvamiento y, si participan numerosos polipéptidos, la hoja puede cerrarse para formar un **tonel  $\beta$** . Múltiples hojas plegadas  $\beta$  proporcionan fuerza y rigidez en muchas estructuras proteínicas, como la fibroína de la seda, la cual

consiste casi por completo en pilas de hojas plegadas  $\beta$  antiparalelas.

Con el fin de plegarse de forma hermética dentro de la forma compacta de una proteína globular, con frecuen-

cia la cadena polipeptídica invierte su dirección, para lo cual hace una **vuelta  $\beta$**  (horquilla o vuelta invertida). En estas vueltas  $\beta$ , el oxígeno del grupo carbonilo de un aminoácido se une al hidrógeno del grupo amino del cuarto aminoácido (figura B2-7). Las vueltas  $\beta$  se encuentran con frecuencia donde se conectan los extremos de las hojas plegadas  $\beta$  antiparalelas. Se dice que las regiones de la cadena polipeptídica que no están en una estructura secundaria regular tienen una **conformación enrollada** o **en asa**. Cerca de la mitad de las cadenas polipeptídicas de una proteína globular típica se hallan en esta conformación.

### Estructura terciaria

El tercer nivel estructural que se encuentra en las proteínas, la estructura terciaria, alude a la disposición espacial de los aminoácidos que están lejos en la secuencia lineal así como a aquellos residuos que están adyacentes. Otra vez, es la secuencia de los aminoácidos la que especifica esta **estructura tridimensional** final (figuras B2-8 y B2-9). En proteínas globulares solubles en agua como

la mioglobina (sección B3), la principal fuerza directriz que subyace al plegamiento de la cadena polipeptídica es el requerimiento energético para sepultar los aminoácidos apolares en el interior hidrófobo, lejos del medio acuoso e hidrófilo circundante. La cadena polipeptídica se pliega de manera espontánea y la mayor parte de sus cadenas laterales hidrófobas resulta sepultada en el interior, en tanto que sus cadenas laterales polares, con carga, permanecen en su superficie. Cuando está plegada, la **conformación tridimensional**, la **activa desde la perspectiva biológica (nativa)**, de la proteína se mantiene no sólo por interacciones hidrófobas sino también por fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno y, si están presentes, enlaces disulfuro. Las fuerzas electrostáticas incluyen puentes salinos entre grupos con cargas opuestas y las múltiples interacciones débiles de van der Waals entre las cadenas laterales alifáticas estrechamente empaçadas del interior de las proteínas.

En muchas proteínas grandes, la cadena polipeptídica se pliega en dos o más regiones compactas y globulares llamadas **dominios**. La mayoría de los dominios

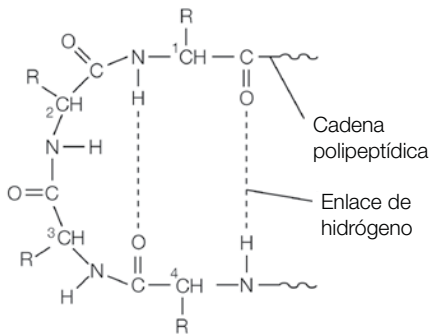


Figura B2-7. Plegamiento de una cadena polipeptídica en una vuelta  $\beta$ .

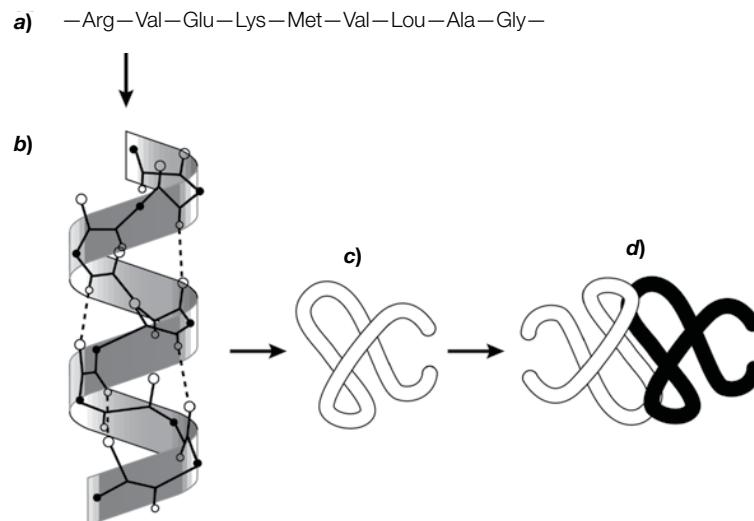
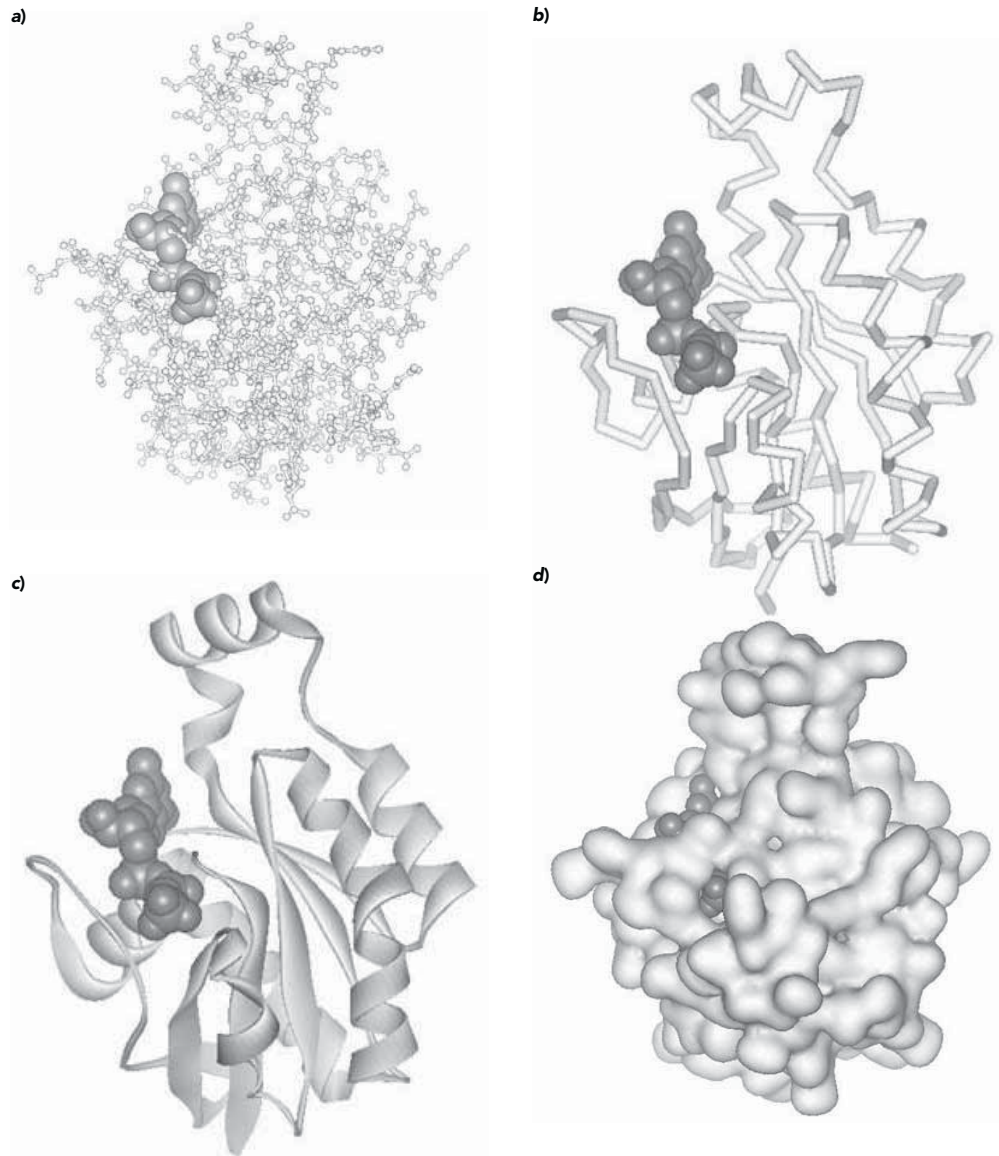


Figura B2-8. Los cuatro niveles de estructura de las proteínas: a) estructura primaria (secuencia de aminoácidos); b) estructura secundaria (hélice  $\alpha$ ); c) estructura terciaria; d) estructura cuaternaria.



**Figura B2-9.** Varias representaciones gráficas de la RND3/RHOE, una pequeña proteína que une GTP formando un complejo con este nucleótido (representación del trifosfato de guanosa desde diferentes perspectivas): a) la representación de barras y bolitas revela la localización de todos los átomos de la proteína; b) los indicios de la columna vertebral de  $C\alpha$  muestran cómo se pliega la cadena polipeptídica; c) la representación con cintas destaca cómo se organizan las hélices  $\alpha$  y las hebras  $\beta$  en la proteína; d) un modelo de la superficie accesible al agua revela los numerosos baches y grietas de la superficie de la proteína.

consta de 30 a 400 aminoácidos y en ellos la cadena polipeptídica se pliega en estructuras específicas, con regiones peptídicas que casi no se pliegan y que vinculan a los dominios sin interrupciones. En consecuencia, muchos dominios son unidades independientes, si se los ve desde una perspectiva estructural, que tienen las características de las proteínas globulares pequeñas. En tanto, diversas proteínas pueden tener dominios en común aunque sus estructuras terciarias completas sean diferentes. Entre los ejemplos de dominios en las

proteínas está el del **pliegue de la inmunoglobulina** que se encuentra en anticuerpos y otras proteínas del sistema inmunitario (sección B6) y la **hélice-giro-hélice**, **dedos de cinc** y los **dominios básicos** que se hallan en las proteínas que se unen con el DNA (sección G6).

### Estructura cuaternaria

Las proteínas que contienen más de una cadena polipeptídica, como la hemoglobina (sección B3), exhiben

un cuarto nivel estructural de las proteínas que se denomina **estructura cuaternaria** (figura B2-8). Este nivel estructural alude a la disposición espacial de las **subunidades** polipeptídicas y a la naturaleza de las interacciones entre ellas. Tales interacciones pueden ser enlaces covalentes (p. ej., enlaces disulfuro) o interacciones no covalentes (fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas).

### Estabilidad de las proteínas

Un conjunto de interacciones no covalentes (fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno, fuerzas hidrófobas) y de interacciones covalentes (enlaces disulfuro) mantiene la conformación tridimensional nativa de una proteína, además de los enlaces peptídicos entre los aminoácidos.

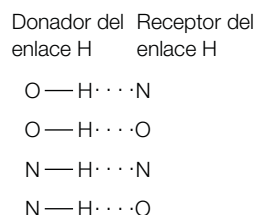
- **Fuerzas electrostáticas:** incluyen las interacciones entre dos grupos iónicos de carga opuesta, como el caso del grupo amonio de la Lys y el grupo carboxilo del Asp, con frecuencia referido como **par iónico** o **punto salino**. Además, las asociaciones no covalentes entre moléculas eléctricamente neutras, que en conjunto se conocen como **fuerzas de van der Waals**, originadas de interacciones electrostáticas entre dipolos permanentes o inducidos, como el del grupo carbonilo de los enlaces peptídicos.
- **Enlaces de hidrógeno:** son interacciones predominantemente electrostáticas entre un grupo donador débilmente ácido y un átomo aceptor que es portador de un par de electrones solitarios y que en consecuencia presenta una carga parcial negativa que atrae al átomo de hidrógeno. En los sistemas biológicos, el grupo donador es un átomo de oxígeno o nitrógeno que tiene un átomo de hidrógeno unido a él a través de un enlace covalente y el aceptor es el oxígeno o el nitrógeno (figura B2-10). De manera habitual, los enlaces de hidrógeno están en el espectro de 0.27 a 0.31 nm y son muy direccionales, es decir que el hidrógeno donador y los átomos aceptores son colineales. Los enlaces de hidrógenos son más fuertes que las fuerzas de van der Waals pero mucho más débiles que los enlaces covalentes. Los enlaces de hidrógeno no sólo desempeñan un rol importante en la estructura de las proteínas sino también en la

estructura de otras macromoléculas biológicas como la hélice doble del DNA (sección F1) y las bicapas lipídicas (sección E1). Por último, los enlaces de hidrógeno son críticos para las propiedades del agua y para su papel como solvente bioquímico.

- **Fuerzas hidrófobas: efecto hidrófobo** es el nombre que se les da a aquellas fuerzas que causan las moléculas apolares para minimizar su contacto con el agua. Lo anterior se ve con toda claridad con las moléculas anfipáticas como los lípidos y los detergentes que forman micelas en una solución acuosa (sección E1). Asimismo, las proteínas encuentran una conformación en la que sus cadenas laterales apolares están en gran medida fuera del alcance del solvente acuoso y en consecuencia las fuerzas hidrófobas son un determinante de gran importancia en la estructura, plegamiento y estabilidad de las proteínas. En éstas, los efectos de las fuerzas hidrófobas suelen designarse **enlazamiento hidrófobo**, con lo cual se pretende indicar la naturaleza específica del plegamiento de la proteína bajo la influencia del efecto hidrófobo.
- **Enlaces disulfuro:** estos enlaces covalentes se forman entre residuos de Cys que están muy cercanos en la conformación final de la proteína (figura B2-4) y funcionan como estabilizadores de la estructura tridimensional. En realidad, los enlaces disulfuro sólo se forman en el ambiente oxidante del retículo endoplásmico (sección A2) y por tanto se encuentran en primer lugar en las proteínas extracelulares y secretadas.

### Determinación de la estructura de las proteínas

Con frecuencia puede predecirse la presencia de hélices  $\alpha$  y hojas plegadas  $\beta$  en las proteínas a partir de la secuencia de aminoácidos primaria. En cambio, no es posible predecir la estructura tridimensional precisa de una proteína de sólo conocer su secuencia de aminoácidos, a menos que su secuencia sea muy similar a una proteína cuya estructura tridimensional ya se conoce. Se requieren métodos físicos muy complejos y análisis muy elaborados de los datos experimentales para determinar la conformación de una proteína. La estructura



**Figura B2-10.** Ejemplos de enlaces de hidrógeno (se muestran en líneas de punteadas).

tridimensional de una proteína puede determinarse a nivel atómico mediante técnicas como la cristalografía de rayos X, la espectroscopia con resonancia magnética nuclear (NMR) y la microscopía crioelectrónica.

En la **cristalografía de rayos X**, el primer requerimiento son los **crisales** de proteínas muy purificadas. En el cristal, millones de moléculas de proteínas están precisamente alineadas unas con otras en una disposición rígida característica de cada proteína. Entonces, los **haces de rayos X** se hacen pasar a través del cristal (figura B2-11). Las longitudes de onda de los rayos X son de 0.1 a 0.2 nm, lo suficientemente cortos para discriminar los átomos en el cristal de la proteína. Los átomos del cristal desvían los rayos X y al hacerlo producen un **patrón de difracción** de manchas discretas en la película fotográfica. Las intensidades de la difracción máxima (la oscuridad de las manchas de la película) se usan entonces matemáticamente para construir la imagen tridimensional del cristal de proteína.

La **espectroscopia con resonancia magnética nuclear (NMR)** puede utilizarse para determinar las estructuras tridimensionales de proteínas pequeñas (hasta de alrededor de 30 kDa) en **solución acuosa**. En esta técnica, una solución de proteína concentrada se coloca en un **campo magnético** y se miden los efectos de diferentes frecuencias de radio en el giro de diferentes átomos de la proteína. El comportamiento de cualquier átomo es influido por los átomos cercanos de los residuos adyacentes, pero donde los residuos más cercanos causan más perturbaciones que los alejados. Con base en la magnitud del efecto, puede calcularse la distancia entre los residuos y emplearse para generar la estructura tridimensional de la proteína.

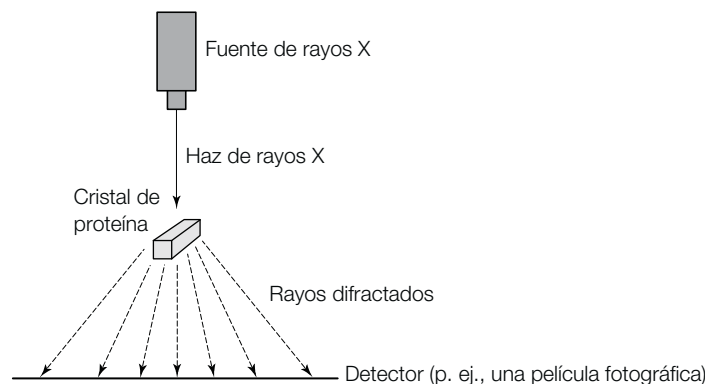
La microscopía crioelectrónica se usa con frecuencia para determinar la estructura tridimensional de las

proteínas, en particular de las proteínas con multi-subunidades, las cuales son difíciles de cristalizar. En esta técnica, la muestra de la proteína se **congela con rapidez** en helio líquido para preservar su estructura. A continuación, la proteína congelada e hidratada se examina en un microscopio crioelectrónico que usa una dosis baja de **electrones** para evitar cualquier daño inducido por la radiación en la estructura. Las imágenes resultantes se analizan por medio de programas de computadora complejos, que sirven para reconstruir la estructura tridimensional de la proteína.

## Plegamiento de las proteínas

Bajo condiciones fisiológicas apropiadas, las proteínas **se pliegan de modo espontáneo** en su conformación nativa. Como no se necesitan plantillas externas, queda implícito que la estructura primaria de la proteína determina su estructura tridimensional. A partir de experimentos con la proteína **RNA-asa A**, se ha observado que son en primer lugar los residuos internos de la proteína los que dirigen su plegamiento a la conformación nativa. Es menos probable que la alteración de los residuos superficiales por mutación afecte el plegamiento que los cambios en los residuos internos. Asimismo, ha sido observado que el plegamiento de la proteína es dirigido en primer lugar por las **fuerzas hidrófobas**. No ha sido posible plegar proteínas en su conformación nativa a través de un **conjunto de vías ordenadas** en lugar de recurrir a una exploración al azar de todas las conformaciones posibles hasta encontrar la correcta.

Aunque las proteínas pueden plegarse *in vitro* (en el laboratorio) sin la presencia de proteínas accesorias, este proceso puede tomar minutos a días. *In vivo* (en la célula), este proceso requiere sólo unos pocos minutos porque las células contienen **proteínas accesorias**, las



**Figura B2-11.** Cristalografía de rayos X. Cuando un haz estrecho de rayos X atraviesa un cristal, parte del mismo pasa siguiendo la misma dirección y otra parte es desviada (difractada) en diversas direcciones. La intensidad de las ondas difractadas se registra en una película fotográfica o en un detector electrónico de estado sólido. La estructura tridimensional de la proteína puede determinarse con los datos de la difracción.

cuales ayudan al polipéptido a plegarse en su conformación nativa. Hay tres clases principales de proteínas accesorias para el plegamiento de las proteínas:

- Las **isomerasas de proteindisulfuro** catalizan las reacciones de intercambio de disulfuros y por consiguiente facilitan la búsqueda de los enlaces disulfuro de una proteína hasta encontrar el par correcto.
- Las **cis-trans isomerasas de peptidilprolilo** catalizan por otro lado la lenta interconversión de los enlaces peptídicos X-Pro entre sus conformaciones *cis* y *trans* y de esta forma aceleran el plegamiento de los polipéptidos que contienen Pro. Una de las clases de *cis-trans* isomerasas de peptidilprolilo es inhibida por el **fármaco inmunosupresor** ciclosporina A.
- **Chaperonas moleculares**, las cuales incluyen proteínas como las **proteínas de choque por calor** 70 (hsc 70), las **chaperoninas** y las **lectinas calnexina**

y **calreticulina**. Éstas evitan el plegamiento inapropiado y la agregación de las proteínas, que por lado pueden ocurrir debido a que las regiones hidrófobas internas se exponen a otras similares.

Algunas enfermedades son consecuencia del **plegamiento erróneo** de las proteínas. Por ejemplo, en la neurodegenerativa y fatal **enfermedad de Alzheimer**, los pequeños pliegues erróneos del **péptido amiloide  $\beta$**  y los agregados en el cerebro matan las neuronas circundantes. Por su parte, en las **enfermedades infecciosas por priones**, como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CID) en los seres humanos y la encefalopatía espongiforme bovina (BSE o enfermedad de las vacas locas), la forma celular normal de la **proteína priónica**, la cual tiene sobre todo una estructura secundaria helicoidal  $\alpha$ , sufre una transición conformacional hacia la forma infecciosa de la proteína, que presenta una estructura predominante de hoja  $\beta$ .

## B3 Mioglobina y hemoglobina

### Notas clave

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| <b>Proteínas que unen oxígeno</b> | La hemoglobina y la mioglobina son las dos proteínas que unen oxígeno presentes en los organismos multicelulares grandes. La hemoglobina transporta oxígeno en la sangre y se localiza en los eritrocitos; por su parte, la mioglobina almacena el oxígeno en los músculos.   |
| <b>Mioglobina</b>                 | La mioglobina, cuya estructura tridimensional fue resuelta mediante la cristalografía de rayos X, es una proteína globular elaborada con una sola cadena polipeptídica de 153 residuos de aminoácidos, que están plegados en ocho hélices $\alpha$ . El grupo prostético hemo se localiza dentro de una hendidura hidrófoba de la cadena polipeptídica plegada.   |
| <b>Hemoglobina</b>                | La hemoglobina adulta (HbA) presenta estructura cuaternaria ya que está formada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas $\alpha$ y dos cadenas $\alpha$ ( $\alpha_1$ y $\alpha_2$ ), cada una de ellas con un grupo prostético hemo. Cada polipéptido de la hemoglobina presenta una estructura tridimensional casi idéntica a la de la cadena polipeptídica de la mioglobina.   |
| <b>Unión del oxígeno al hemo</b>  | El grupo prostético hemo consiste en un anillo de protoporfirina IX y un átomo de $\text{Fe}^{2+}$ central, el cual forma cuatro enlaces con el anillo de la porfirina. De manera adicional, en un lado del anillo de la porfirina, el $\text{Fe}^{2+}$ forma un enlace con la histidina proximal (His F8), un residuo de ocho aminoácidos a lo largo de la hélice F de la hemoglobina. El sexto enlace del $\text{Fe}^{2+}$ es con una molécula de $\text{O}_2$ . Cerca de donde se une el $\text{O}_2$ está la histidina distal (His E7), la encargada de evitar que el monóxido de carbono se una con más eficiencia.  |
| <b>Alosteria</b>                  | La hemoglobina es una proteína alostérica. La unión del $\text{O}_2$ es cooperativa; la unión del $\text{O}_2$ a una subunidad aumenta la facilidad de unión de moléculas de $\text{O}_2$ adicionales a las otras subunidades. La curva de disociación del oxígeno de la hemoglobina es sigmoidea, mientras que la de la mioglobina es hiperbólica. La mioglobina tiene una afinidad mayor por el oxígeno que la hemoglobina. La oxihemoglobina y la desoxihemoglobina tienen diferentes estructuras cuaternarias. A medida que el $\text{O}_2$ se une al $\text{Fe}^{2+}$ distorsiona el grupo hemo y mueve la histidina proximal. Esto a su vez mueve la hélice F y altera las interacciones entre las cuatro subunidades. El $\text{H}^+$ , el $\text{CO}_2$ y el 2,3-bisfosfoglicerato (BPG) son efectores alostéricos que promueven la liberación de $\text{O}_2$ de la hemoglobina. El BPG se une en la cavidad central situada entre las cuatro subunidades. |
| <b>Hemoglobina fetal</b>          | La hemoglobina F (HbF), la cual consiste en dos cadenas $\alpha$ y dos cadenas $\gamma$ ( $\alpha_2$ y $\gamma_2$ ), está presente en el feto. La HbF une BPG con menos firmeza que la HbA y por consiguiente presenta una afinidad más alta por el $\text{O}_2$ , que promueve la transferencia del $\text{O}_2$ desde la circulación materna a la fetal.  |
| <b>Hemoglobinopatías</b>          | Las hemoglobinopatías son enfermedades causadas por hemoglobinas anormales. La mejor caracterizada de éstas es la que reconoce un mecanismo de transmisión genética, la enfermedad hemolítica anemia de células falciformes. Es causada por la sustitución no conservadora de una Glu por una Val, lo que resulta en la aparición de un parche pegajoso hidrófobo en la superficie de la proteína. Esto permite que se formen largos agregados de fibras de moléculas de hemoglobina, los cuales distorsionan la forma de los glóbulos rojos. Los heterocigotos que portan sólo una copia del gen de la célula falciforme son más resistentes al paludismo que los homocigotos para el gen normal.  |

**Temas relacionados**

(B2) Estructura y función de las proteínas  
(D5) Regulación de la actividad enzimática

(M4) Hemos y clorofila

## Proteínas que unen oxígeno

La **hemoglobina** es una de las dos **proteínas que unen oxígeno** que se encuentran en los vertebrados. La función de la hemoglobina es transportar oxígeno en la sangre desde los pulmones hasta todos los tejidos restantes del cuerpo, con el propósito de aportarles a las células el  $O_2$  que necesitan para la fosforilación oxidativa de los productos alimenticios (sección L2). La hemoglobina se encuentra en la sangre dentro de los **eritrocitos** (glóbulos rojos). La función esencial de estas células, además de otras, es fungir como un saco para transportar hemoglobina, ya que los eritrocitos maduros carecen de cualquier organelo interno (núcleo, mitocondrias, etc.). La otra proteína que une  $O_2$  es la mioglobina, la que almacena el oxígeno en los tejidos del cuerpo donde lo mantiene listo para cuando las células lo necesiten. Las concentraciones más altas de mioglobina se hallan en los **músculos** esquelético y cardíaco, que requieren grandes cantidades de  $O_2$  debido a su gran necesidad de  $O_2$  durante la contracción (sección B5).

## Mioglobina

La mioglobina es una proteína relativamente pequeña con una masa de 17.8 kDa elaborada con 153 aminoácidos dispuestos en una cadena polipeptídica única. Fue la primera proteína en tener su **estructura tridimensional** determinada por **cristalografía de rayos X** (sección B2), logro llevado a cabo por John Kendrew en 1957. La mioglobina es una típica **proteína globular** que tiene una estructura compacta muy plegada, con la mayor parte de los residuos de aminoácidos hidrófobos ordenados en el interior y muchos de los residuos polares dispuestos en la superficie. La cristalografía de rayos X reveló que la cadena polipeptídica única de la mioglobina consiste por completo en una **estructura secundaria helicoidal  $\alpha$**  (sección B2). De hecho, hay ocho hélices  $\alpha$  en la mioglobina (designadas A-H) (figura B3-1a). Dentro de una hendidura hidrófoba formada por el plegamiento de la cadena polipeptídica está el **grupo prostético hemo** (figura B3-1a). Esta unidad no polipeptídica está unida en forma no covalente a la mioglobina y resulta esencial para la actividad biológica de la proteína (es decir, la unión de  $O_2$ ).

## Hemoglobina

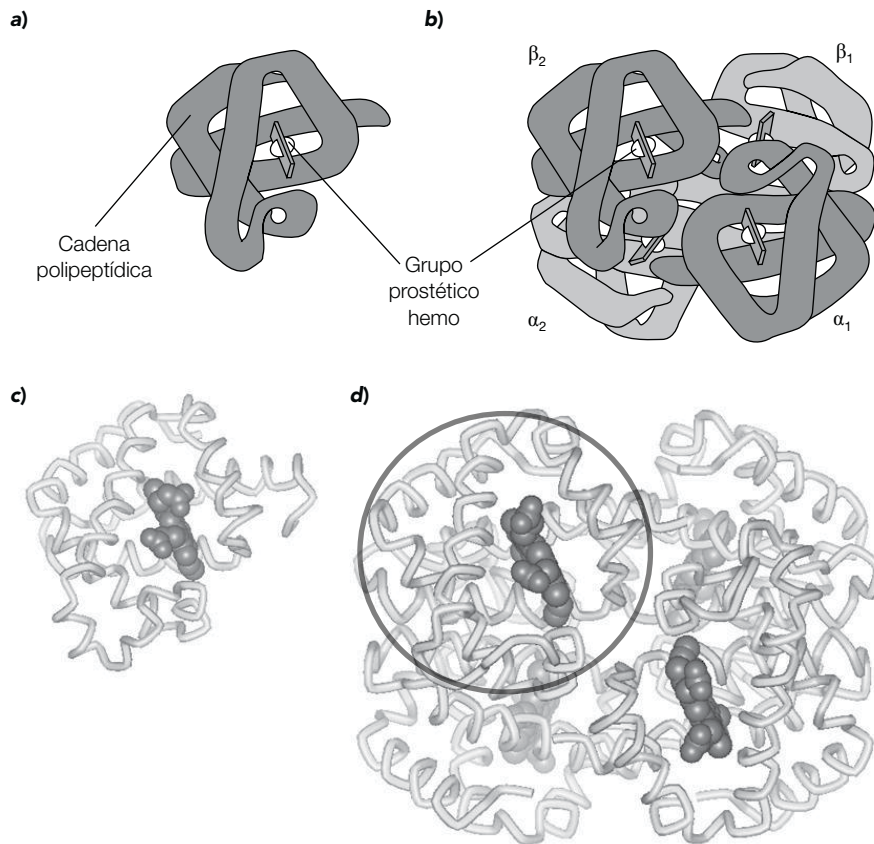
La estructura tridimensional de la hemoglobina fue resuelta por medio de la **cristalografía de rayos X** (sección B2), hecho que logró Max Perutz en 1959. Ésta

reveló que la hemoglobina está elaborada de cuatro cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales presenta una estructura tridimensional similar a la de la cadena polipeptídica única de la mioglobina (figura B3-1b), pese a que sus secuencias de aminoácidos difieren en 83% de los residuos. Lo anterior destaca un tema relativamente común de la estructura de las proteínas: que secuencias primarias muy diferentes pueden especificar estructuras tridimensionales muy similares. El tipo principal de hemoglobina que se encuentra en adultos (HbA) está elaborado con dos cadenas polipeptídicas diferentes: la **cadena  $\alpha$** , que consta de 141 residuos de aminoácidos, y la **cadena  $\beta$** , que consta de 146 residuos ( $\alpha_2\beta_2$ ; figura B3-1b). Cada cadena, como en la mioglobina, consta de ocho hélices  $\alpha$  y cada una contiene un grupo prostético hemo (figura B3-1b). Por consiguiente, la hemoglobina puede unir cuatro moléculas de  $O_2$ . Las cuatro cadenas polipeptídicas se hallan empacadas de manera muy estrecha una junto a la otra en una disposición tetraédrica para formar una molécula de forma casi esférica, cuya forma se mantiene por múltiples interacciones no covalentes (sección B2).

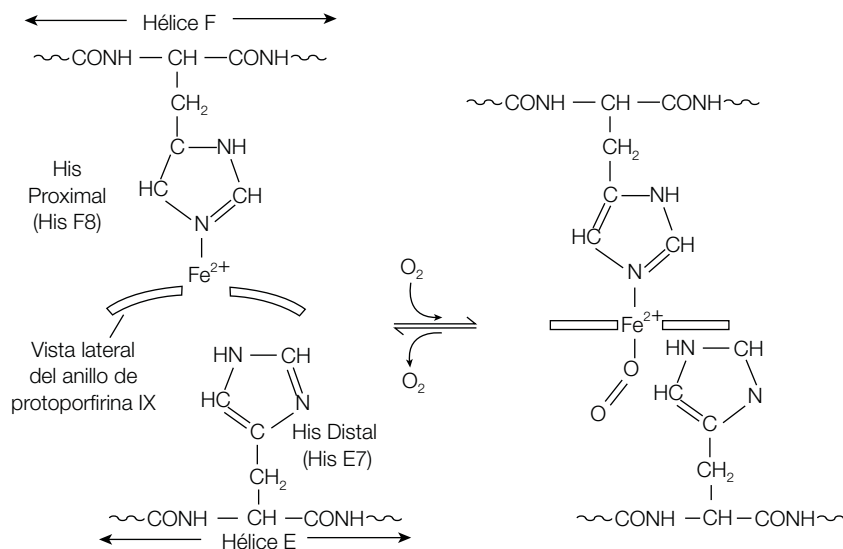
## Unión del oxígeno al hemo

El **grupo prostético hemo** de la mioglobina y la hemoglobina está hecho de un anillo de **protoporfirina IX** con un **átomo de hierro** en estado de oxidación ferroso ( $Fe^{2+}$ ) (sección M4; figura B3-2). Este  $Fe^{2+}$  se une con cuatro átomos de nitrógeno en el centro del anillo de protoporfirina y además forma dos uniones adicionales a cada lado del plano del anillo de protoporfirina. Una de éstas es con un residuo de histidina, el cual se halla ocho residuos más allá a lo largo de la hélice F de la hemoglobina, la **histidina proximal** (His F8) (figura B3-2). El sexto enlace es con uno de los átomos de oxígeno de la molécula de  $O_2$  (figura B3-2). Cerca de donde el  $O_2$  se une con el grupo hemo, se encuentra otro residuo de histidina, la **histidina distal** (His E7) (figura B3-2). Esto sirve para dos funciones de mucha importancia. Primero, evita que los grupos hemo de las moléculas de hemoglobina cercanas hagan contacto con otras y oxiden el hierro al estado  $Fe^{3+}$ , en el cual no pueden unir mucho  $O_2$ . Segundo, evita que el monóxido de carbono (co) se una con la configuración más favorable al  $Fe^{2+}$ , y disminuye de este modo la afinidad del hemo por el co. Este hecho es importante en virtud de que el co contrae uniones irreversibles con el hemo y así la proteína no puede unir mucho  $O_2$  más. En consecuencia, aunque el sitio de unión del oxígeno en la hemoglobina y





**Figura B3-1.** Estructura de la a) mioglobina y de la b) hemoglobina, en la que se muestran las cadenas polipeptídicas  $\alpha$  y  $\beta$ . Indicios de la columna vertebral de  $C\alpha$  en c) la mioglobina humana y d) la hemoglobina humana en la que se ven las hélices  $\alpha$  y el grupo prostético hemo en un modelo químico molecular y cómo se mapea el monómero de mioglobina en la estructura de la hemoglobina (círculo).



**Figura B3-2.** Unión del O<sub>2</sub> al hemo. El Fe<sup>2+</sup> del anillo de la protoporfirina está enlazado a la His F8 pero no a la His E7, que está muy cerca. A medida que el Fe<sup>2+</sup> une O<sub>2</sub>, la hélice F se mueve más cerca de la hélice E (véase el texto para mayores detalles).

la mioglobina es sólo una pequeña parte de la proteína total, la cadena polipeptídica modula la función del grupo prostético hemo.

## Alosteria

La hemoglobina es una **proteína alostérica** (consúltese la sección D5 para una descripción más completa de la alosteria). Esto significa que la unión del O<sub>2</sub> a una de las subunidades es afectada por sus interacciones con las otras subunidades. De hecho, la unión del O<sub>2</sub> a una subunidad de la hemoglobina induce cambios conformacionales (véase más adelante y la figura B3-2) que se retransmiten a las otras subunidades, lo que aumenta su capacidad de unir O<sub>2</sub> al incrementar su afinidad por esta molécula. Por ello, se dice que la unión del O<sub>2</sub> a la hemoglobina es **cooperativa**. En contraste, la unión del O<sub>2</sub> a la cadena polipeptídica única de la mioglobina es **no cooperativa**. Lo anterior se hace muy aparente en las **curvas de disociación del oxígeno** de las dos proteínas: la de la hemoglobina es **sigmoidea**, lo cual refleja que la unión es cooperativa, en tanto que la de la mioglobina es **hiperbólica** (figura B3-3). A partir de la curva de disociación de O<sub>2</sub> también puede verse que para cualquier presión de oxígeno específica el grado de saturación de la mioglobina es más alto que el de la hemoglobina. En otras palabras, la mioglobina presenta una afinidad más alta por el O<sub>2</sub> que la hemoglobina. Lo anterior significa que en la sangre de los capilares musculares, por ejemplo, la hemoglobina habrá de liberar su O<sub>2</sub> a la mioglobina para que lo almacene allí.

## Mecanismo del cambio alostérico

La cristalografía de rayos X reveló que la **oxihemoglobina**, la forma que tiene cuatro moléculas de O<sub>2</sub> unidas, difiere mucho en su **estructura cuaternaria** de la **desoxihemoglobina**, la forma sin O<sub>2</sub> unido. En ausencia de O<sub>2</sub> unido, el Fe<sup>2+</sup> yace ligeramente hacia un lado del anillo de porfirina, el cual es de por sí algo curvo (figura B3-2). A medida que la molécula de O<sub>2</sub> se une al grupo prostético hemo atrae al Fe<sup>2+</sup> hacia dentro del plano del anillo de porfirina (figura B3-2), al mismo tiempo que aplana dicho anillo. El movimiento del Fe<sup>2+</sup> determina

que la histidina proximal también se mueva. Ésta, a su vez, cambia su posición en la hélice F y en regiones de la cadena polipeptídica a cualquiera de los extremos de la hélice. Por consiguiente, el movimiento en el centro de la subunidad se transmite a las superficies, donde causa que las interacciones iónicas que mantienen las cuatro subunidades juntas se rompan y restablezcan en una posición diferente, que altera la estructura cuaternaria y conduce a la unión cooperativa del O<sub>2</sub> a la hemoglobina.

## Efecto Bohr

La concentración de **iones H<sup>+</sup>** y **CO<sub>2</sub>** en los tejidos circundantes afecta la unión del O<sub>2</sub> a la hemoglobina, o efecto Bohr. En tejidos con alta actividad metabólica como el músculo, la concentración de estas dos sustancias es relativamente alta. Esto causa un cambio en la curva de disociación de O<sub>2</sub> de la hemoglobina hacia la derecha, lo que promueve la liberación del O<sub>2</sub>. Lo anterior sucede debido a que hay sitios de unión de H<sup>+</sup>, en primer lugar el His146 en la cadena β, que tienen una afinidad más alta de unión del H<sup>+</sup> en la desoxihemoglobina que en la oxihemoglobina. Un aumento del CO<sub>2</sub> determina un incremento de H<sup>+</sup> debido a la acción de la enzima **anhidrasa carbónica**, encargada de catalizar la reacción:



De manera adicional, el CO<sub>2</sub> puede reaccionar con los grupos amino primarios de la cadena polipeptídica para formar un carbamato con carga negativa. Otra vez, este cambio de carga de positiva a negativa favorece la conformación de la desoxihemoglobina. En su regreso en la sangre hacia los pulmones, las concentraciones de H<sup>+</sup> y CO<sub>2</sub> son relativamente más bajas y la del O<sub>2</sub> más alta, de manera que el proceso se invierte y el O<sub>2</sub> se une a la hemoglobina. De este modo, puede verse que la hemoglobina no sólo transporta O<sub>2</sub> sino que también lo hace con el CO<sub>2</sub> en su regreso a los pulmones, donde es eliminado.

El **2,3-bisfosfoglicerato (BPG)** es una molécula de fosfato orgánico muy aniónica (figura B3-4) que está presente en los eritrocitos junto a la hemoglobina. Esta molécula

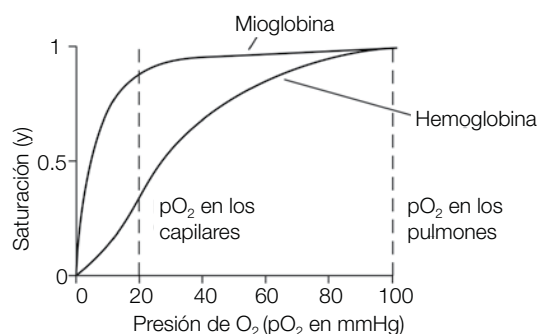


Figura B3-3. Curvas de disociación del oxígeno de la hemoglobina y la mioglobina.

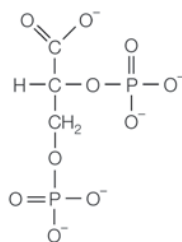


Figura B3-4. 2,3-bisfosfoglicerato.

promueve la liberación de  $O_2$  de la hemoglobina al reducir la afinidad de la proteína por este gas. El BPG se une en la pequeña cavidad del centro de las cuatro subunidades. En la oxihemoglobina, dicha cavidad es demasiado pequeña para alojar el BPG, en tanto que en la desoxihemoglobina es lo suficientemente grande para dar acomodo a una molécula de BPG. Cuando se une a la cavidad central de la desoxihemoglobina forma enlaces iónicos con las cadenas laterales de aminoácidos cargados positivamente de las subunidades  $\beta$ , lo que estabiliza la estructura cuaternaria. El  $H^+$ ,  $CO_2$  y BPG son todos **efectores alostéricos** (sección D5) ya que favorecen la conformación de la desoxihemoglobina y en consecuencia promueven la liberación de  $O_2$ . Como estas tres moléculas actúan en sitios diferentes, sus efectos se suman.

## Hemoglobina fetal

En el feto hay una clase diferente de hemoglobina, la **hemoglobina F** (HbF), la cual consta de dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\gamma$  ( $\alpha_2\gamma_2$ ), en contraste con la hemoglobina del adulto (HbA,  $\alpha_2\beta_2$ ). En condiciones fisiológicas, la HbF tiene una **afinidad más alta** por el  $O_2$  que la HbA, lo que optimiza la transferencia de oxígeno desde la circulación materna a la fetal a través de la placenta. La base molecular de esta diferencia en la afinidad por el  $O_2$  radica en que la HbF se une al BPG con menos fuerza que la HbA. Cerca del nacimiento, la síntesis de la cadena  $\gamma$  se detiene y comienza la de la cadena  $\beta$  (la cual está presente en la HbA).

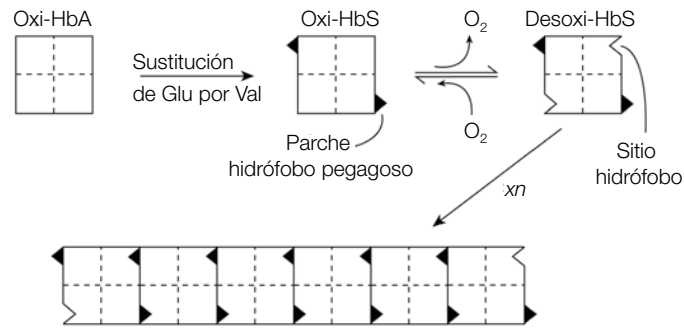
## Hemoglobinopatías

La comparación de las secuencias primarias de las cadenas de la hemoglobina en más de 60 especies diferentes revela que sólo nueve residuos de la cadena polipeptídica son **invariables** (es decir los mismos) en todas las especies. Estos nueve residuos incluyen a las **histidinas proximal y distal**, que son imprescindibles para el funcionamiento correcto de la proteína. Muchos de los restantes residuos son remplazados de una especie a otra por residuos con propiedades similares (p. ej., la Val hidrófoba es sustituida por la Ile hidrófoba, o la Ser polar es remplazada por la Asn polar), las llamadas

**sustituciones conservadoras**. En contraste, sólo unos pocos residuos han sido sustituidos entre especies por residuos muy diferentes (p. ej., una Leu hidrófoba por una Lys con carga positiva, o un Glu con carga negativa por una Arg con carga positiva), las llamadas **sustituciones no conservadoras**, ya que este tipo de cambio podría tener un efecto mayor en la estructura y función de la proteína.

Se han caracterizado varios cientos de **hemoglobinas anormales**, que han dado origen a las llamadas **hemoglobinopatías**. Es probable que la hemoglobinopatía mejor caracterizada sea la **anemia de células falciformes** (hemoglobina de células falciformes; HbS). Esta enfermedad se caracteriza porque los eritrocitos tienen una forma característica de hoz o de luna en cuarto creciente. La base molecular de esta enfermedad radica en el cambio de un Glu por una Val en la posición 6 de la cadena  $\beta$ , lo que resulta en la sustitución de un residuo polar por uno hidrófobo. Esta sustitución no conservadora de la Val por el Glu adjudica a la HbS un **parche hidrófobo pegajoso** en el lado externo de sus cadenas  $\beta$ . En la esquina entre las hélices E y F de la cadena  $\beta$  de la desoxi-HbS hay un sitio hidrófobo complementario del parche pegajoso (figura B3-5). Por consiguiente, el sitio complementario en una molécula de desoxi-HbS puede unirse al parche pegajoso de otra molécula de desoxi-HbS y dar origen a la formación de **largas fibras** de moléculas de hemoglobina que distorsionan el eritrocito. La microscopía electrónica (sección A4) ha revelado que las fibras tienen un diámetro de 21.5 nm y que consisten en una hélice de 14 hebras. Además de la interacción crítica entre los parches pegajosos, múltiples interacciones polares estabilizan la fibra. En la HbS, el sitio complementario está enmascarado, de manera que la formación de las fibras largas sólo acontece cuando se produce una concentración alta de la forma desoxigenada de la HbS.

La anemia de células falciformes es una enfermedad hemolítica de transmisión genética. Las células falciformes son más frágiles que los eritrocitos normales, se lisan con más facilidad y presentan una vida media más corta, lo que conduce a una anemia grave. Como la anemia de células falciformes es de transmisión genética, los **homocigotos** tiene dos copias del gen anormal y los



**Figura B3-5.** Bases moleculares de la agregación de las moléculas de desoxihemoglobina en la anemia de células falciformes.

**heterocigotos** una copia normal y una anormal. Por lo regular, los homocigotos tienen una esperanza de vida reducida como resultado de infecciones, insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca o trombosis, todas ellas debidas a que las células falciformes quedan atrapadas en los vasos sanguíneos pequeños, lo que condiciona daño tisular. En contraste, los heterocigotos no suelen padecer síntomas ya que sólo alrededor de 1% de sus eritrocitos es falciforme, comparado con cerca de 50%

de los heterocigotos. La frecuencia del gen falciforme es relativamente alta en ciertas partes de África y correlaciona con la incidencia de **paludismo**. La razón de esto es que los heterocigotos están protegidos contra la forma más letal del paludismo, mientras que los homocigotos normales son más vulnerables a esta enfermedad. Ahora puede determinarse la herencia de la hemoglobina anormal mediante técnicas con DNA recombinante (sección I1).

# B4 Colágena

## Notas clave

|   |   |
|---|---|
| <b>Función y diversidad</b>                       | Colágena es el nombre asignado a una familia con relaciones estructurales que forma fibras insolubles fuertes. Las colágenas consisten en tres cadenas polipeptídicas, cuya identidad y distribución varía entre los tipos de colágena. Los diferentes tipos de colágena se encuentran en distintas localizaciones del cuerpo.  |
| <b>Biosíntesis: descripción</b>                   | Los polipéptidos de la colágena son modificados después de su traducción por hidroxilación y glucosilación durante su transporte a través del retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi. Los tres polipéptidos forman la procolágena trihelicoidal, que se secreta fuera de la célula. La extensión peptídica es removida para dar lugar a la tropocolágena, la cual se agrega en una microfibrilla y se entrecruza de modo covalente para formar la fibra de colágena madura.   |
| <b>Composición y modificaciones postraducción</b> | Una tercera parte de los residuos de aminoácidos de la colágena son de Gly, mientras que una cuarta parte es de Pro. Los aminoácidos hidroxilados 4-hidroxiprolina (Hyp) y 5-hidroxilisina (Hyl) se forman después de la traducción por la acción de la hidroxilasa de prolina y la hidroxilasa de lisina. Estas enzimas que contienen $Fe^{2+}$ requieren ácido ascórbico (vitamina C) para su actividad. En el escorbuto, una enfermedad por deficiencia de vitamina C, la colágena no se forma de manera correcta debido a la incapacidad para hidroxilar a la Pro y la Lys. Los residuos Hyl suelen modificarse con carbohidratos luego de su traducción. |
| <b>Estructura</b>                                 | La colágena contiene una secuencia tripeptídica repetida de Gly-X-Y, donde X suele ser la Pro y Y suele ser la Hyp. Cada polipéptido de la colágena se pliega en una hélice de 3.3 residuos por vuelta. Las tres cadenas polipeptídicas se juntan para formar un cable helicoidal triple cuyas cadenas se mantienen juntas gracias a los puentes de hidrógeno que se forman entre las cadenas. Cada tres residuos, uno pasa a través del centro de la triple hélice, el cual está tan abarrotado que sólo la Gly es lo suficientemente pequeña para encajar.  |
| <b>Secreción y agregación</b>                     | Los péptidos de extensión en el N y C terminales de las cadenas polipeptídicas dirigen la formación del cable helicoidal triple y evitan la agregación prematura de las moléculas de procolágena dentro de la célula. Después de su secreción fuera de la célula, los péptidos de extensión son separados por peptidasas y las resultantes moléculas de tropocolágena se disponen juntas en un orden alternado.   |
| <b>Enlaces cruzados</b>                           | Los enlaces cruzados covalentes entre y dentro de las moléculas de tropocolágena confieren fuerza y rigidez a la fibra de colágena. Estos enlaces cruzados se forman entre la Lys y su derivado aldehído alisina. Ésta deriva de la acción de la oxidasa de lisilo sobre la Lys. Esta enzima contiene cobre y necesita fosfato de piridoxal para actuar.  |
| <b>Formación de hueso</b>                         | La hidroxiapatita (fosfato de calcio) se deposita en sitios de nucleación entre los extremos de las moléculas de tropocolágena, como el paso inicial en la formación del hueso.   |
| <b>Temas relacionados</b>                         | (B1) Estructura de los aminoácidos<br>(B2) Estructura y función de las proteínas<br>(H4) Direccionamiento de las proteínas  |

## Función y diversidad

La **colágena**, que está presente en todos los organismos multicelulares, no es una proteína sino una familia de proteínas con relación estructural. Es la proteína más abundante de los mamíferos y está presente en casi todos los órganos corporales, donde sirve para mantener a las células juntas en unidades discretas. Es asimismo el principal **elemento fibroso** de la piel, huesos, tendones, cartílagos, vasos sanguíneos y dientes. Las diferentes proteínas de colágena desempeñan muy diferentes funciones. La estructura dura en extremo de los huesos y los dientes contiene colágena

y un polímero de fosfato de calcio. En los tendones, la colágena forma fibras tipo cuerdas de alta fuerza tensil, mientras que en la piel forma fibras de tejido suelto que pueden expandirse en cualquier dirección. Los distintos tipos de colágena se caracterizan por **diferentes composiciones de polipéptidos** (cuadro B4-1). Cada colágena está compuesta por tres cadenas de polipéptidos, las cuales pueden ser idénticas (como en los tipos II y III) o pueden ser de dos clases diferentes (tipos I, IV y V). Una sola molécula de colágena de tipo I tiene una masa molecular de 285 kDa, un ancho de 1.5 nm y una longitud de 300 nm.

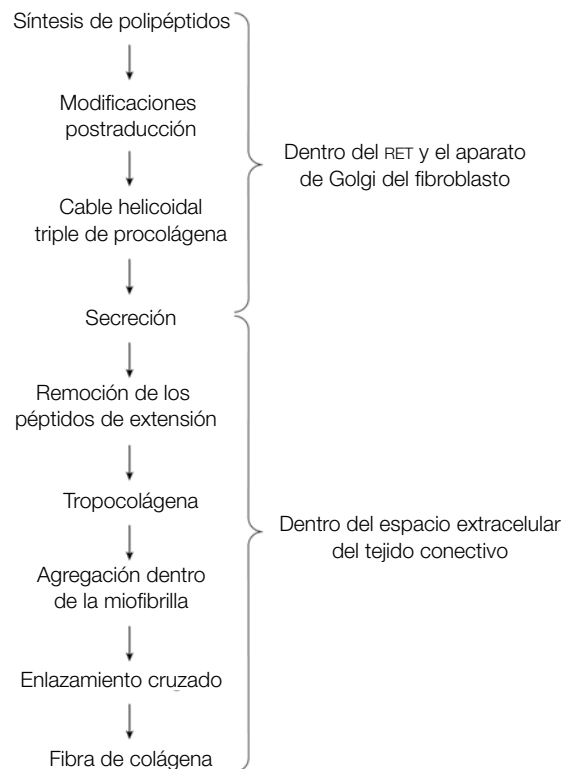
**Cuadro B4- 1. Tipos de colágena.**

| Tipo | Composición polipeptídica       | Distribución                                  |
|------|---------------------------------|---|
| I    | $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$   | Piel, hueso, tendón, córnea, vasos sanguíneos |
| II   | $[\alpha 1(II)]_3$              | Cartílago, disco intervertebral               |
| III  | $[\alpha 1(III)]_3$             | Piel fetal, vasos sanguíneos                  |
| IV   | $[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV)$ | Membrana basal                                |
| V    | $[\alpha 1(V)]_2 \alpha 2(V)$   | Placenta, piel                                |

## Biosíntesis: descripción

Como otras proteínas secretadas, los ribosomas sintetizan los polipéptidos de la colágena en el retículo endoplásmico rugoso (RER; sección H4). Luego, la cadena polipeptídica pasa a través del RER y el aparato de Golgi

antes de ser secretada. En ese transcurso sufre **modificaciones postraduccion**, como la hidroxilación y conjugación con carbohidratos a las que se somete a Pro y Lys (figura B4-1). Antes de su secreción, tres cadenas de polipéptidos se juntan para formar una estructura



**Figura B4-1.** Descripción de la biosíntesis de colágena.

helicoidal triple conocida como **procolágena**. En ese momento, la procolágena es secretada al espacio extracelular del tejido conectivo, donde peptidasas remueven cadenas de polipéptidos de extensión a nivel de los N y C terminales (**péptidos de extensión**) para formar **tropocolágena** (figura B4-1). Las moléculas de tropocolágena se agregan y forman numerosos **enlaces entrecruzados** para producir **fibras de colágena** madura (figura B4-1).

### Composición y modificaciones postraduccion

La composición de aminoácidos de la colágena es muy característica. Cerca de una tercera parte de sus residuos son de **Gly**, mientras que otra *cuarta parte* es de **Pro**, que son proporciones significativamente más altas que las que se encuentran en otras proteínas. Los aminoácidos hidroxilados **4-hidroxiprolina (Hyp)** y **5-hidroxilisina (Hyl)** (figura B4-2) se encuentran sólo en la colágena. Estos aminoácidos hidroxilados se forman por la acción de las enzimas **hidroxilasa de prolina** e **hidroxilasa de lisina**, respectivamente, sobre los aminoácidos parentales (figura B4-2). Estas enzimas cuentan con un ion  $\text{Fe}^{2+}$  en su sitio activo y requieren **ácido ascórbico (vitamina C)** para su actividad. El ácido ascórbico actúa como un antioxidante, lo que le permite mantener al ion  $\text{Fe}^{2+}$  en su estado reducido. La hidroxilasa de prolina y la hidroxilasa de lisina son dioxigenasas que usan una molécula de  $\text{O}_2$ . El cetoglutarato  $\alpha$ , un intermediario del ciclo del ácido cítrico (sección L1), es un sustrato obligatorio que se convierte en succinato durante la reacción (figura B4-2). Ambas enzimas hidroxilan sólo los residuos de Pro y Lys que forman parte de la cadena polipeptídica, y por tanto sólo cuando el residuo está en el lado N terminal de la Gly. La Hyp es importante para la

estabilización de la estructura de la colágena mediante la formación de enlaces de hidrógeno (véase más adelante). En caso de **deficiencia de vitamina C**, la Hyp (y la Hyl) no se sintetiza, lo que ocasiona el debilitamiento de las fibras de colágena. Esto conduce a lesiones de la piel, vasos sanguíneos frágiles y cicatrización deficiente de las heridas, que son las características del **escorbuto**.

La otra modificación postraduccion que le sucede a la colágena es la **glucosilación**. En este caso, los residuos de azúcar, que por lo general se limitan a la glucosa, galactosa y sus disacáridos, están fijos al grupo hidroxilo de los residuos Hyl de reciente formación, más que en los residuos de Asn o de Ser/Thr, como ocurre con la glucosilación más extendida ligada a N u O (sección H5). La cantidad de carbohidrato unido a la colágena varía de 0.4% a 12% del peso, de acuerdo con el tejido en el que se sintetice.

### Estructura

La **estructura primaria** de cada polipéptido de la colágena se caracteriza por una repetición de la secuencia **tripeptídica** de **Gly-X-Y**, donde X suele ser, pero no de manera exclusiva, Pro y Y es con frecuencia Hyp. Cada una de las tres cadenas polipeptídicas de la colágena tiene alrededor de 1 000 residuos de largo y las tres se pliegan en una **hélice** que sólo tiene 3.3 residuos por vuelta, en lugar de los 3.6 residuos por vuelta de la hélice (sección B2). Esta **estructura secundaria** es exclusiva de la colágena y con frecuencia se refiere como **hélice de la colágena**. Las tres cadenas polipeptídicas yacen paralelas y se enrollan una alrededor de la otra con una ligera inclinación a la derecha, retorcidas como una cuerda para formar un **cable helicoidal triple** (figura B4-3). Cada tercer residuo de cada polipéptido pasa a través

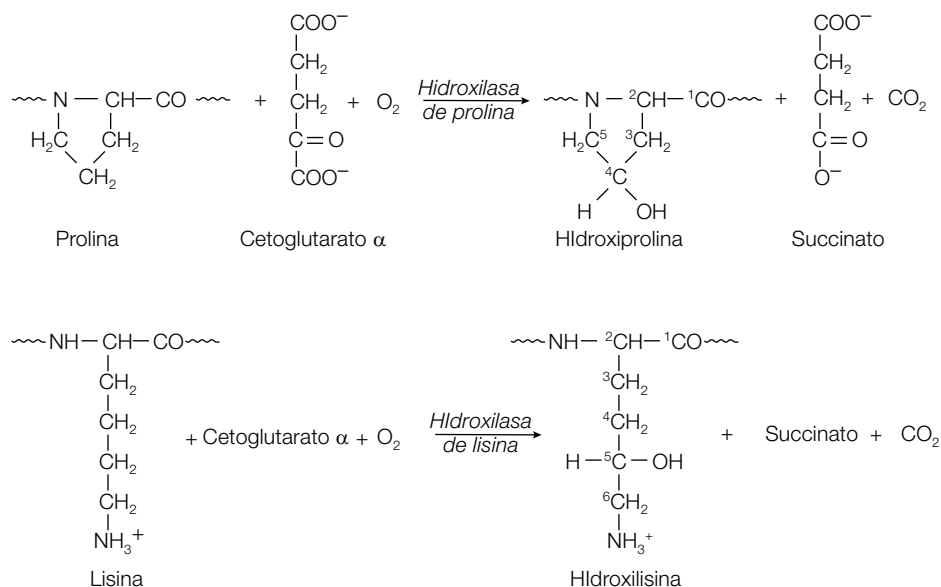


Figura B4-2. Formación de hidroxiprolina e hidroxilisina.

del centro de la hélice triple, el cual está tan atiborrado que sólo una cadena lateral pequeña como la Gly puede encajarse. Lo anterior explica la necesidad absoluta de Gly cada tres residuos. Los residuos de las posiciones X y Y se localizan en el lado externo del cable helicoidal triple, donde hay espacio para las cadenas laterales abultadas como la Pro y otros residuos. Las tres cadenas de polipéptidos se hallan alternadas, de modo que el residuo Gly de una cadena se alinea con el residuo X de la segunda cadena y con el residuo Y de la tercera cadena. La hélice triple se mantiene unida a raíz de una extensa red de **enlaces de hidrógeno** (sección B2), en particular entre el grupo amino primario de la Gly de una hélice y el grupo carboxilo de la Pro en la posición X de una de las otras hélices. Además, los grupos hidroxilo de los residuos Hyp participan en la estabilización de la estructura. La relativamente inflexible Pro y la Hyp, confieren también rigidez a la estructura de la colágena.

La importancia de que la Gly se encuentre cada tercer residuo se confirma cuando una **mutación** en la codificación del DNA de la colágena tipo I lleva a incorporar un aminoácido diferente en una sola posición de una cadena polipeptídica de 1000 residuos. Por ejemplo, si una mutación lleva a la incorporación de una Cys en lugar de una Gly, la hélice triple es interrumpida ya que la cadena lateral  $-\text{CH}_2\text{-SH}$  de la Cys es demasiado grande para encajar en el interior de la hélice triple. Lo anterior conduce a una estructura desplegada en forma parcial que es susceptible a hidroxilación y glucosilación excesiva y a que los fibroblastos no la secreten con eficiencia. Esto, a su vez, resulta en una estructura de colágena defectuosa que puede originar huesos frágiles y

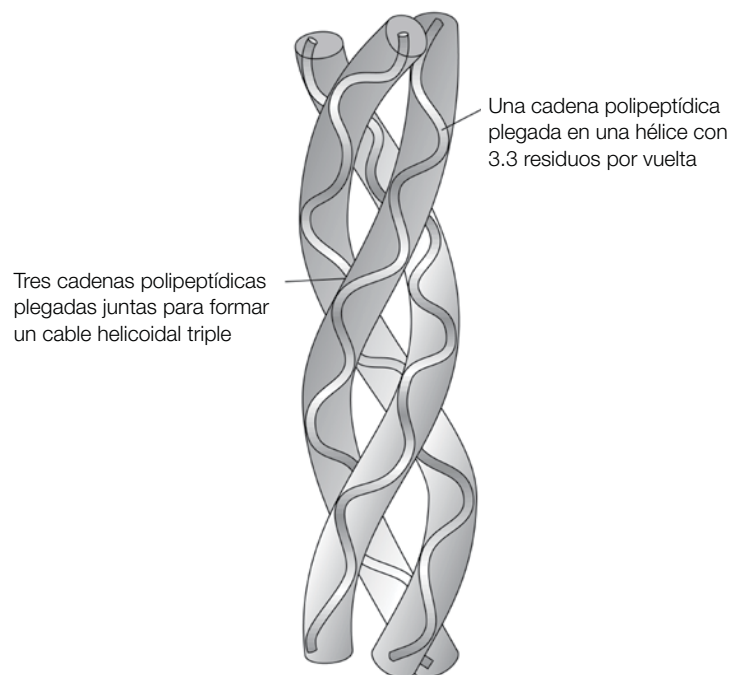
deformidades esqueléticas. Se conoce el espectro completo de tales mutaciones, que causan la producción de colágena defectuosa y resulta en una osteogénesis imperfecta (huesos frágiles).

### Secreción y agregación

Cuando los polipéptidos de colágena se sintetizan, tienen residuos de aminoácidos adicionales (100 a 300) en sus N y C terminales que no están en la fibra de colágena madura (figura B4-4). Estos **péptidos de extensión** contienen con frecuencia residuos de Cys que por lo general no existen en la cadena polipeptídica restante. Los péptidos de extensión contribuyen a alinear correctamente los tres polipéptidos ya que están juntos en la hélice triple, un proceso al que puede ayudar la formación de enlaces de disulfuro entre los péptidos de extensión y las vecinas cadenas de polipéptidos. Los péptidos de extensión también evitan la agregación prematura de las hélices triples de la procólágena dentro de la célula. Cuando se **secretan** fuera del fibroblasto, la acción de las **peptidasas** extracelulares elimina los péptidos de extensión (figura B4-4). Las moléculas de tropocolágena resultantes se **agregan** entonces juntas en una disposición alternada de cabeza a cola en la fibra de colágena (figura B4-4).

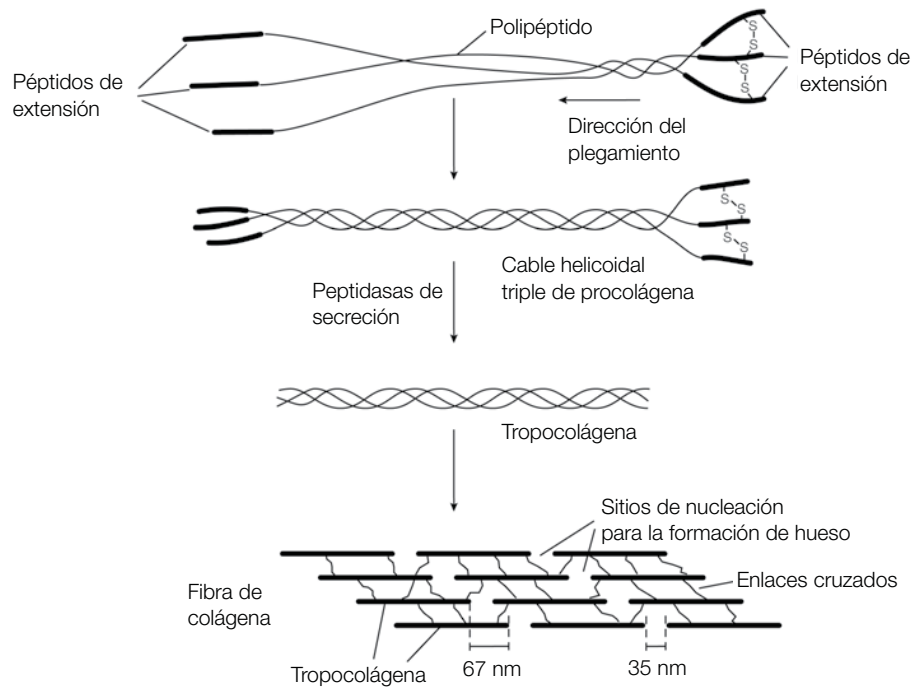
### Enlaces cruzados covalentes

Entre y dentro de las moléculas de tropocolágena, los enlaces cruzados covalentes imparten fuerza y rigidez a las fibras de colágena. Como casi no hay residuos de Cys en la colágena madura final, estos enlaces cruzados



**Figura B4-3.** Disposición de las tres cadenas de polipéptidos en la colágena.





**Figura B4-4.** Función de los péptidos de extensión en el plegamiento y secreción de la procologíaena. Cuando son secretados fuera de la célula, los péptidos de extensión son removidos y las moléculas de tropocolágena resultantes agregadas y entrecruzadas para formar una fibra.

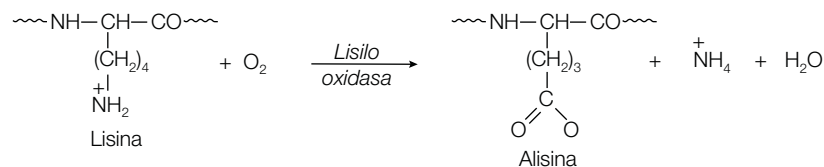
covalentes no son enlaces de disulfuro, como sucede por lo regular en las proteínas, sino que son enlaces cruzados singulares que se forman entre la **Lys** y su derivado aldehído **alisina**. Los residuos de alisina se forman por la acción de la monooxigenasa **lisiloxidasa** sobre la Lys (figura B4-5). Para su actividad, esta enzima que contiene **cobre** requiere la coenzima **fosfato de piridoxal**, que es un derivado de la vitamina B<sub>6</sub> (sección M2). A continuación, el grupo aldehído de la alisina reacciona de manera espontánea con el grupo amino de la cadena lateral de la Lys o con otro residuo de alisina de otra cadena polipeptídica para formar enlaces covalentes entre las cadenas.

La importancia de los enlaces cruzados en el funcionamiento normal de la colágena lo demuestra la enfermedad **latirismo**. Esta enfermedad se presenta en seres humanos y animales que ingieren semillas de chícharos dulces (*Lathyrus odoratus*), las cuales contienen la sustancia química **aminopropionitrilo β**. Este compuesto

inhibe en forma irreversible a la lisiloxidasa y así evita los enlaces cruzados de las moléculas de tropocolágena, de lo cual resultan anomalías serias de los huesos, articulaciones y grandes vasos sanguíneos debidas a la colágena frágil. Otra enfermedad por deficiencia de la colágena, el síndrome de Ehlers-Danlos tipo V, se debe a la deficiencia de lisiloxidasa y se manifiesta por articulaciones hiper móviles e hiperextensibilidad de la piel.

### Formación de hueso

La disposición alternada regular de los espacios entre los extremos de las moléculas de tropocolágena en una fibra de colágena (figura B4-4) corresponde a los **sitios de nucleación** para el depósito de una forma del **fosfato de calcio**, la **hidroxiapatita**, en la formación del hueso. Se añade más hidroxiapatita hasta que los sitios de nucleación crecen y se articulan con otros para formar la estructura ósea madura.



**Figura B4-5.** Conversión de la lisina en alisina por la lisiloxidasa.

# B5 Motores moleculares

## Notas clave

|  |   |
|--|---|
| <b>Motores moleculares</b>                   | Los motores moleculares o proteínas motoras se unen a los filamentos del citoesqueleto y usan energía derivada de la hidrólisis del ATP para moverse a lo largo de ellos. La región de la cabeza o dominio motor hidroliza el ATP y se une a los filamentos, en tanto que la región de la cola se une a la carga. Los tipos principales de proteínas motoras son las miosinas, las cinesinas y las dineínas.  |
| <b>Estructura del músculo</b>                | Cada célula de los músculos estriados de los vertebrados contiene dentro de su sarcoplasma muchas miofibrillas paralelas, las cuales están elaboradas de unidades de sarcómeros repetidos. Dentro de cada sarcómero, en forma alterna, están las bandas oscuras A y las bandas claras I, en medio de las cuales están la zona H y la línea Z, respectivamente. Una miofibrilla contiene dos tipos de filamentos: los gruesos, que son de miosina y los delgados, que son de actina, tropomiosina y troponina. Cuando el músculo se contrae, los filamentos gruesos y delgados se deslizan unos sobre otros y acortan la longitud del sarcómero. |
| <b>Miosina</b>                               | La proteína miosina consiste en dos cadenas de polipéptidos pesadas y en dos pares de cadenas livianas ordenadas como una región globular de cabeza doble fija a una espiral enrollada helicoidal de hebra doble. Las moléculas de miosina se ensamblan en filamentos, hidrolizan el ATP y unen actina.   |
| <b>Actina</b>                                | El constituyente principal de los filamentos delgados es la actina, que puede existir como un monómero globular de actina G o como un polímero fibroso de actina F. Los filamentos de actina están conectados a los filamentos gruesos mediante puentes cruzados formados por las cabezas S1 de la miosina.   |
| <b>Generación de la fuerza en el músculo</b> | La formación y disociación cíclicas de complejos entre los filamentos de actina y las cabezas S1 de la miosina lleva a la contracción del músculo. Al unirse a la actina, la miosina libera sus enlaces P <sub>i</sub> y ADP. Esto provoca un cambio conformacional en la proteína, que mueve el filamento de actina a lo largo del filamento grueso. En ese momento, el ATP se une a la miosina y desplaza a la actina. La hidrólisis del ATP hace regresar la cabeza S1 a su conformación original.   |
| <b>Troponina y tropomiosina</b>              | La tropomiosina yace a lo largo del filamento delgado y evita la asociación de la miosina con la actina en el estado de reposo. En respuesta a la estimulación nerviosa, desde el retículo sarcoplásmico, se liberan iones de Ca <sup>2+</sup> que se unen a la subunidad TnC de la troponina y causan un cambio de conformación en esta proteína. Mediante un mecanismo alostérico, este movimiento se transmite a través de las subunidades TnI y TnT de la troponina a la tropomiosina, lo que determina que esta última se mueva de su sitio y permita la asociación de la actina con la miosina.   |
| <b>Cinesinas</b>                             | Las cinesinas se mueven a lo largo de los microtúbulos y participan en el movimiento de las vesículas y organelos alrededor de la célula en la segregación de los cromosomas. Una molécula de cinesina tiene dos cabezas, ambas con actividad de ATP-asa, las cuales se unen de manera alternativa al microtúbulo y mueven de ese modo a la cinesina y su carga a lo largo de éste.   |

**Dineína**

Los cilios eucarióticos son protrusiones similares a cabellos en la superficie de las células que consisten de forma predominante en microtúbulos. En un cilio, las fibras de los microtúbulos se mantienen unidas en una disposición característica de 9 + 2 dentro del axonema. Las parejas de nueve microtúbulos más externos se ven como una figura en ocho, con un círculo más pequeño, la subfibra A y un círculo más grande, la subfibra B. La dineína es una proteína muy grande que forma puentes cruzados con las subfibras B y posee actividad de ATP-asa. Dos brazos de la dineína se proyectan desde la subfibra A, la cual, tras la hidrólisis del ATP, se mueve a lo largo de las subfibras B adyacentes. Debido a que nexina extensible se une entre las parejas, este movimiento deslizante se convierte en una flexión local del cilio.

**Temas relacionados**

(A2) Células eucariotas

**Motores moleculares**

Los **motores moleculares** o **proteínas motoras** se unen a un filamento del citoesqueleto y utilizan la energía derivada de ciclos repetidos de hidrólisis del ATP para moverse a lo largo de éste; por tanto, **convierten la energía química en movimiento**. Existen muchos tipos diferentes de proteínas motoras en las células eucariotas que difieren en el tipo de filamento al que se unen, la dirección en la cual se mueven a lo largo del filamento y la carga que transportan. Las proteínas motoras se asocian con los filamentos por medio de la **región de la cabeza** o **dominio motor**, que es el que se une e hidroliza el ATP, mientras que la **región de la cola** se une a la carga que se transporta. Hay tres tipos de proteínas motoras: las **miosinas**, que se unen a los filamentos de actina e intervienen en la contracción muscular; las **cinesinas**, que se unen a los microtúbulos y participan en el movimiento de vesículas y organelos alrededor de la célula y en la segregación de los cromosomas y las **dineínas**, que también se unen a los microtúbulos y proveen la energía para el movimiento de cilios y flagelos de las células eucariotas.

**Estructura del músculo**

El proceso generador de fuerza que mejor se entiende en los sistemas biológicos es el de la contracción del **músculo estriado de los vertebrados**, así llamado debido a que se ve estriado (rayado) con el microscopio de contraste de fase (sección A4). Este músculo se compone de numerosas células multinucleadas a las que rodea una membrana plasmática que se excita con estímulos eléctricos. Cada célula contiene dentro de su **sarcoplasma** (citósol) muchas **miofibrillas** paralelas, cada una de un diámetro aproximado de 1 nm. El sarcoplasma también es rico en ATP, fosfato de creatina (sección M3) y enzimas glucolíticas (sección J3). La unidad funcional de la miofibrilla es el **sarcómero**, el cual se repite cada 2.3  $\mu\text{m}$  a lo largo del eje de la fibrilla (figura B5-1a). Una **banda oscura A** y una **banda clara I** se alternan de manera regular a lo largo de la miofibrilla. La región central de la banda A,

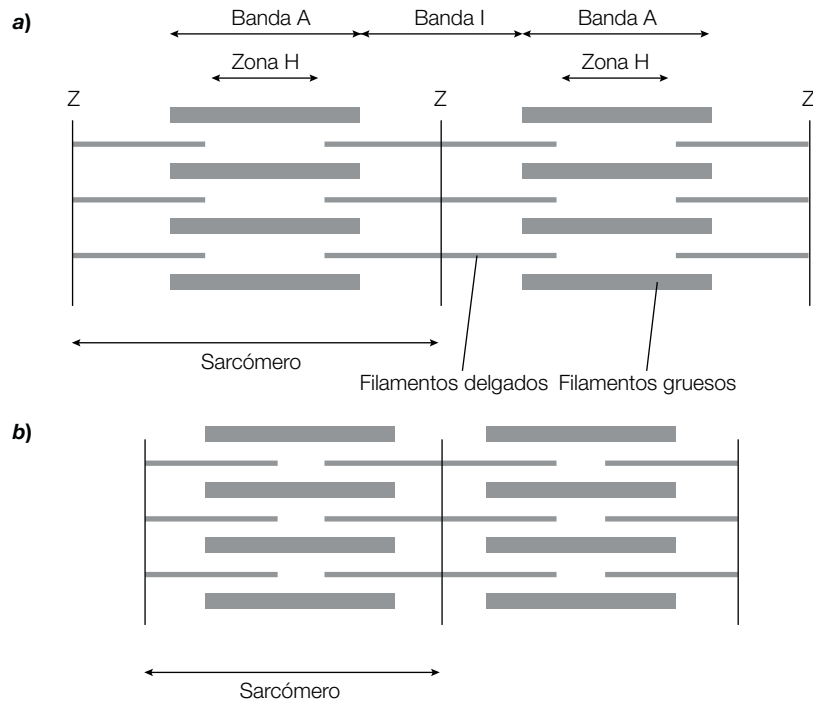
la **zona H**, es menos densa que el resto de la banda. En medio de la banda I está la **línea Z**, que es una zona muy densa y estrecha. Un corte transversal de una miofibrilla revela que hay dos tipos de filamentos que interactúan. Los **filamentos gruesos**, cuyo diámetro es cercano a 15 nm, se encuentran sólo en la banda A (figura B5-1a) y consisten de manera primaria en la proteína **miosina**, mientras que los **filamentos delgados**, cuyo diámetro se acerca a los 9 nm, contienen **actina**, **tropomiosina** y el **complejo troponina**.

Cuando el músculo se contrae, puede acortarse como una tercera parte de su longitud original. Información obtenida por cristalografía de rayos X (sección B2) y estudios microscópicos de luz y electrónicos (sección A4) llevan a la propuesta del **modelo de filamento deslizante** para explicar la contracción muscular. Se observó que los filamentos gruesos y delgados no cambian de longitud durante la contracción, pero en cambio se vio que la longitud del **sarcómero** disminuye a medida que los filamentos gruesos y delgados se deslizan y pasan uno sobre el otro (figura B5-1). Por consiguiente, conforme el músculo se contrae, los tamaños de la zona H y la banda I disminuyen. La fuerza de la contracción es generada por un proceso que mueve activamente un tipo de filamento más allá del filamento más cercano del otro tipo.

**Miosina**

La miosina es una proteína grande (520 kDa) consistente en seis cadenas de polipéptidos: dos cadenas pesadas (220 kDa cada una) y dos pares de cadenas livianas (20 kDa cada una). Esta gran proteína desempeña tres actividades biológicas:

1. Las moléculas de miosina se ensamblan de forma espontánea en **filamentos** en soluciones de potencia iónica y pH fisiológicos.
2. La miosina es una **ATP-asa** que hidroliza el ATP y produce  $\text{ADP}$  y  $\text{P}_i$ .
3. La miosina une la **forma polimerizada de la actina**.



**Figura B5-1.** Diagrama esquemático donde se muestra el aspecto del músculo estriado de los vertebrados como se lo ve con el microscopio de contraste de fase: a) relajado; b) contraído.

La miosina consiste en una región globular de doble cabeza unida a un largo bastón. El bastón es una espiral enrollada helicoidal  $\alpha$  de doble hebra formada por las dos cadenas pesadas, en tanto que las cabezas son también parte de cada cadena pesada con las cadenas livianas unidas (figura B5-2a). La **proteólisis** limitada de la miosina con la proteasa **tripsina** produce su diseción en dos fragmentos: **meromiosina ligera** (LMM) y **meromiosina pesada** (HMM) (figura B5-2b). Estudios funcionales de estos dos fragmentos revelan que la LMM puede todavía formar filamentos pero pierde su actividad de ATP-asa, mientras que la HMM es incapaz de formar filamentos pero conserva su actividad de ATP-asa y puede unirse a la actina. De manera adicional, la proteasa **papaína** (figura B5-2b) puede dividir la HMM en dos **subfragmentos globulares** idénticos (S1) y un **subfragmento en forma de bastón** (S2). El subfragmento S1, cuya estructura se determinó mediante cristalografía de rayos X, contiene un sitio ATP-asa, un sitio de unión de actina y dos sitios de unión de cadenas ligeras. La escisión proteolítica de la miosina tiene lugar en **regiones bisagra flexibles** de la proteína que separan el dominio globular S1 de los dominios tipo bastón S2 y LMM (figura B5-2c). Estas regiones bisagra juegan un papel crucial en la contracción del músculo.

## Actina

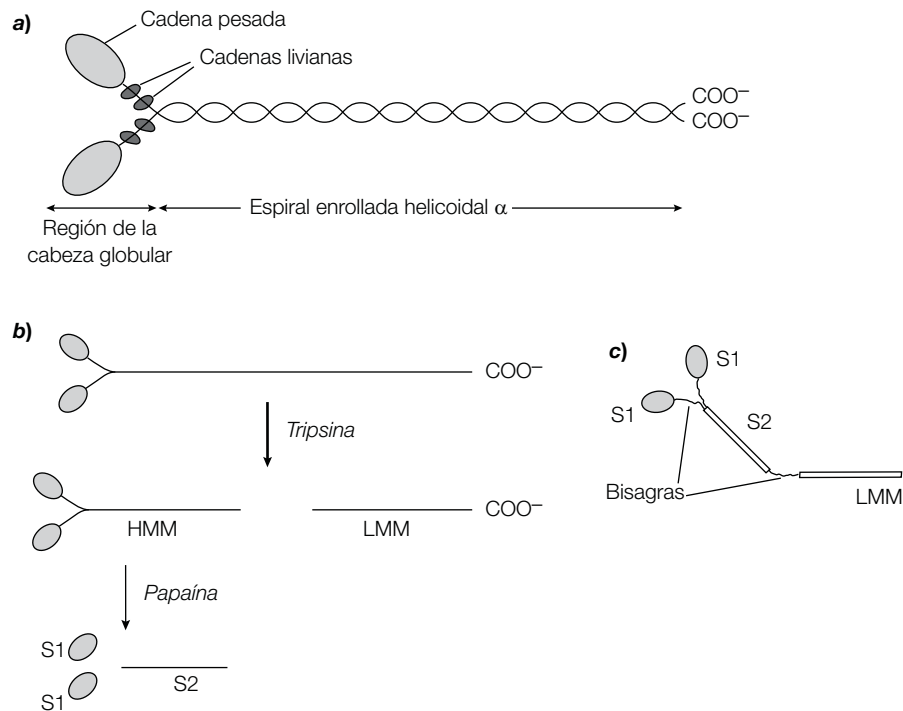
La actina, el constituyente principal de los filamentos delgados, existe en dos formas. En soluciones de baja

potencia iónica, existe como un monómero de 42 kDa denominado **actina G** debido a su forma globular. A medida que la potencia iónica de la solución aumenta hasta alcanzar la del nivel fisiológico, la actina G se polimeriza en una forma fibrosa, la **actina F**, que recuerda a los filamentos delgados que se encuentran en el músculo. Aunque la actina, como la miosina, es una **ATP-asa**, la hidrólisis del ATP no forma parte del ciclo de contracción-relajación del músculo sino en el del ensamble y desensamble del filamento de actina.

En los filamentos gruesos emergen **puentes cruzados** desde el eje del filamento en una disposición helicoidal regular hacia cualquier extremo, donde hay una región desnuda en el medio que carece de puentes cruzados (figura B5-3). En el músculo sin ATP, los puentes cruzados de la miosina interactúan con los filamentos de actina circundantes. La dirección absoluta de las moléculas de actina y miosina invierte la mitad entre las líneas Z. Por tanto, a medida que los dos filamentos delgados que se unen a los puentes cruzados en cualquier extremo de un filamento grueso se mueven uno hacia el otro deslizándose sobre el filamento grueso, la distancia entre las líneas Z se acorta y el músculo se contrae (figura B5-3).

## Generación de fuerza en el músculo

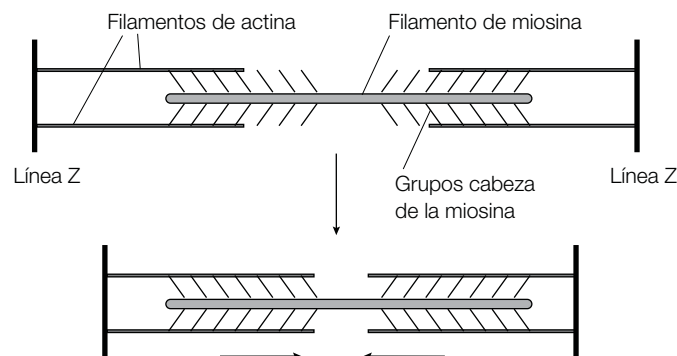
La formación y disociación cíclicas de puentes cruzados entre la actina y las cabezas S1 de la miosina hace contraer el músculo por los **cambios conformacionales** que



**Figura B5-2.** Estructura de la miosina donde se puede ver a) la asociación de las dos cadenas pesadas y los dos pares de cadenas ligeras; b) la fragmentación proteolítica de la miosina, y c) las regiones bisagra entre los dominios.

ocurren en la cabeza S1 de la miosina. En el músculo en reposo, las cabezas S1 son incapaces de interactuar con la actina en los filamentos delgados debido a la interferencia estérica de la proteína reguladora **tropomiosina** (figura B5-4a). La miosina tiene enlaces con el  $\text{ADP}$  y el  $\text{P}_i$ . Cuando el músculo recibe un estímulo, la tropomiosina se mueve hacia fuera y permite que las cabezas S1 se proyecten fuera del filamento grueso para fijarse en la actina en el filamento delgado (figura B5-4b). Cuando se produce la unión de la miosina- $\text{ADP-P}_i$  a la actina, primero se libera el  $\text{P}_i$  y después el  $\text{ADP}$ . Ni bien el  $\text{ADP}$  se libera, la cabeza S1 sufre un **cambio conformacional en**

**la región en bisagra** situada entre los dominios S1 y S2 que modifica su orientación relativa con la molécula de actina en el filamento delgado (figura B5-4c). Éste constituye el **golpe de poder** de la contracción muscular y resulta en el movimiento del filamento delgado en una distancia de alrededor de 10 nm en relación con el filamento grueso, hacia el centro del sarcómero. Entonces el  $\text{ATP}$  se une a la cabeza S1, lo que provoca la rápida liberación de la actina [es decir, la disociación de los ligamentos delgado y grueso (figura B5-4d)]. Luego el  $\text{ATP}$  sufre una hidrólisis parcial por la cabeza S1 libre que lo convierte en  $\text{ADP}$  y  $\text{P}_i$  y la cabeza S1 recupera su



**Figura B5-3.** Diagrama esquemático para mostrar la interacción de los filamentos gruesos de miosina y los filamentos delgados de actina durante la contracción del músculo esquelético.

conformación original lista para otra ronda de fijación (figura B5-4e), cambio conformacional y liberación.

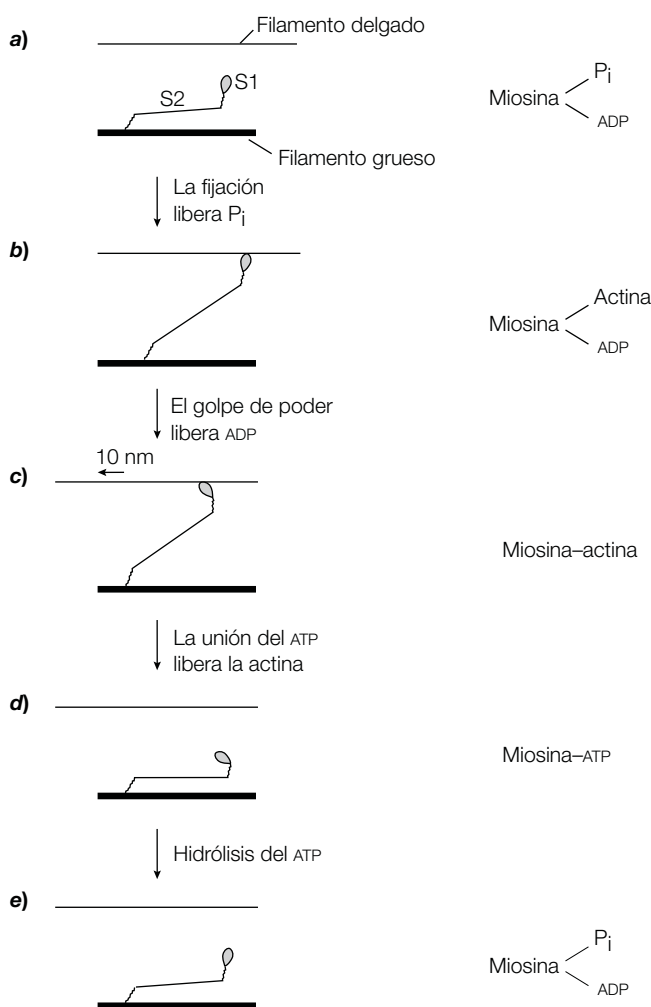
### Troponina y tropomiosina

La troponina y la tropomiosina median la regulación de la contracción muscular en respuesta al  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas dos proteínas están presentes en el filamento delgado, junto a la actina y constituyen alrededor de una tercera parte de la masa de éste. La **tropomiosina** es una proteína elongada de 70 kDa que forma un bastón helicoidal de dos hebras, el cual yace casi paralelo al eje mayor del filamento delgado. La **troponina** es un complejo de tres cadenas de polipéptidos: **TnC** (18 kDa), el cual se une al  $\text{Ca}^{2+}$ ; **TnI** (24 kDa), el que se une a la actina y **TnT** (37 kDa), el cual se une a la tropomiosina. Cuando un estímulo nervioso estimula el músculo, el **retículo sarcoplásmico** libera iones  $\text{Ca}^{2+}$  (una forma especializada de ER que se encuentra en las células musculares; sección A2) en el citoplasma, lo que eleva la concentración

citoplásmica del catión con respecto a la que muestra en reposo, que es menor de  $1 \mu\text{M}$  a casi  $10 \mu\text{M}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  se une a sitios del TnC, lo que provoca un **cambio conformacional** de este polipéptido que se transmite a través de los otros componentes del complejo de la troponina a la tropomiosina. A consecuencia de lo anterior, la tropomiosina se mueve hacia fuera, lo que permite que la cabeza S1 de la miosina interactúe con la actina e inicie un ciclo de contracción. Por consiguiente, el  $\text{Ca}^{2+}$  controla la contracción muscular por un **mecanismo alostérico** (sección D5) que implica a la troponina, la tropomiosina, la actina y la miosina.

### Cinesinas

Las **cinesinas** se mueven a lo largo de los **microtúbulos** formados por la proteína tubulina (sección A2) y están relacionadas con el movimiento de las vesículas y organelos alrededor de la célula y en la segregación de los cromosomas. Una molécula de cinesina tiene



**Figura B5-4.** Mecanismo de la generación de fuerza en el músculo a medida que el filamento grueso de miosina interactúa con el filamento delgado de actina.

**dos cabezas**, las cuales operan en tándem: una se une al microtúbulo y luego lo hace la otra. De este modo, la molécula de cinesina “camina” a lo largo del microtúbulo de una manera muy procesual. En contraste con la miosina, en que la unión con el ATP promueve la disociación de la actina, la adición de ATP incrementa con fuerza la afinidad de la cinesina por los microtúbulos. El ciclo comienza con ambas cabezas de una molécula de cinesina en la forma enlazada al ADP. Una de las cabezas se une al microtúbulo y libera su ADP, que es reemplazado por ATP. La unión del ATP provoca un **cambio conformacional** que bloquea la cabeza en el microtúbulo y atrae el enlazador de las dos cabezas hacia adelante y de esa manera lanza la segunda cabeza a lo largo del microtúbulo. La hidrólisis del ATP tiene lugar en la primera cabeza mientras la segunda cabeza interactúa con el microtúbulo. El intercambio de ATP por ADP en la segunda cabeza atrae la primera cabeza de la molécula de cinesina hacia adelante, lo que la hace mover a lo largo del microtúbulo en una forma escalonada. Luego el ciclo se repite para mover la molécula de cinesina y su carga enlazada a lo largo del microtúbulo.

### Dineína

Las proyecciones similares a cabellos, o **cilios**, de la superficie de ciertas células eucariotas, como las que revisten las vías respiratorias, consisten sobre todo en **microtúbulos** (sección A2). Los cilios intervienen en el movimiento de las corrientes de líquidos sobre la superficie de las células. Células libres como los protozoarios y los espermatozoides de varias especies pueden ser

impulsados por cilios o un flagelo (sección A1). En las células eucariotas, los cilios difieren de los flagelos sólo en que son mucho más largos. Todos los cilios y flagelos eucarióticos presentan el mismo diseño básico: un haz de fibras denominado **axonema** rodeado por una membrana que es continua con la membrana plasmática (figura B5-5). En un axonema, las fibras de microtúbulos están en una **disposición característica de 9 + 2**, con un grupo periférico de nueve pares de microtúbulos rodeando dos microtúbulos simples (figura B5-5). Cada una de las nueve parejas externas adquiere un aspecto parecido a un “8”, cuyo círculo más pequeño se llama **subfibra A** y el círculo mayor, **subfibra B**. La subfibra A se une a una vaina central por medio de rayos radiales, mientras las parejas de microtúbulos vecinas se mantienen juntas por enlaces de **nexina**. Dos brazos de **dineína** emergen de cada subfibra A, con todos los brazos de un cilio apuntando en la misma dirección (figura B5-5).

La dineína es una proteína muy grande (1000 a 2000 kDa) que consiste en una, dos o tres cabezas según cuál sea la fuente. Las cabezas de la dineína forman **puentes cruzados** con las subfibras B y poseen **actividad de ATP-asa**. La unión del ATP a la dineína determina que se disocie de la subfibra B. Durante la hidrólisis del ATP y su conversión en ADP y  $P_i$ , la dineína vuelve a unirse con la subfibra B con la consecuente liberación de  $P_i$  y ADP. Este ciclo de la ATP-asa produce el movimiento del cilio conforme las parejas externas del axonema se deslizan una sobre la otra. Los puentes cruzados de la dineína generan la fuerza entre las parejas adyacentes. Por consiguiente, los brazos de la dineína sobre la subfibra A de

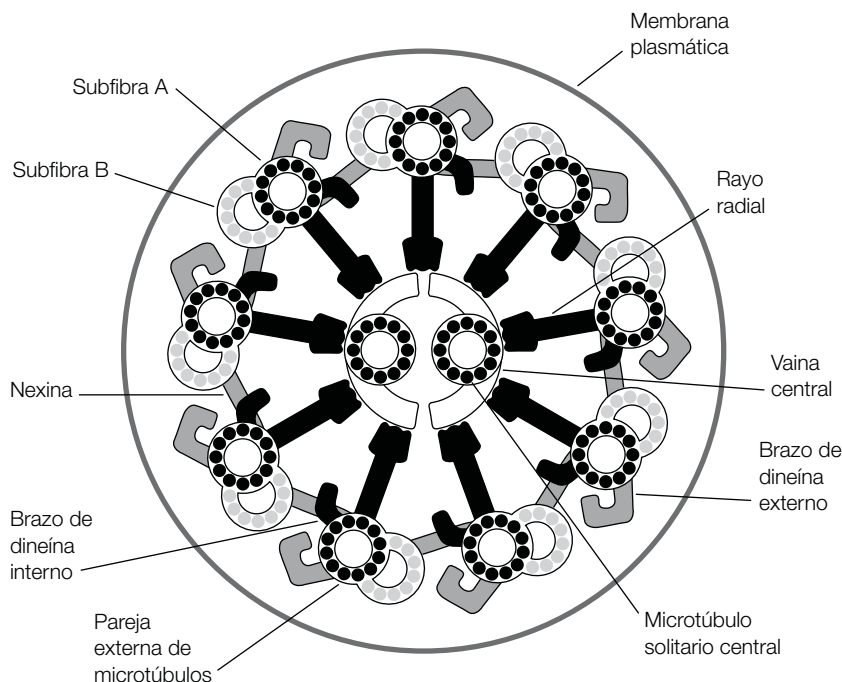


Figura B5-5. Diagrama de un corte transversal de un cilio.

una pareja recorren a lo largo la subfibra B de la pareja adyacente. A diferencia del músculo, donde los filamentos de actina y miosina se deslizan unos sobre otros, en un cilio, los rayos radiales resisten el movimiento deslizante, el cual es convertido en una flexión local. La muy extensible proteína **nexina** mantiene las parejas adyacentes juntas durante este proceso.

Un defecto o ausencia de cualquiera de las proteínas del axonema (p. ej., dineína, nexina) condiciona cilios

inmóviles, el llamado **síndrome de cilios inmóviles**. Los pacientes que sufren esta enfermedad tienen trastornos pulmonares crónicos debido a que los cilios de las vías respiratorias son incapaces de barrer las bacterias y otras partículas extrañas. De manera adicional, los varones con este defecto genético son infértiles ya que sus espermatozoides son incapaces de moverse debido a la inactividad de los flagelos.



# B6 Anticuerpos

## Notas clave

### Sistema inmunitario: descripción

El sistema inmunitario tiene dos funciones principales: reconocer los agentes patógenos invasores y desencadenar respuestas que los destruyan. El sistema inmunitario humoral recae en los linfocitos B, que producen anticuerpos que se unen a los antígenos extraños. El sistema inmunitario celular utiliza linfocitos T asesinos que reconocen y destruyen a las células invasoras de modo directo. La respuesta inmunitaria primaria se produce durante el contacto inicial con un antígeno extraño y resulta en la producción de inmunoglobulina M (IgM) y, a continuación, de inmunoglobulina G (IgG). Si se vuelve a encontrar el mismo antígeno, la memoria inmunológica conduce a respuestas inmunitarias secundarias que producen un incremento mucho más rápido y grande de la producción de IgG específica.

### Estructura del anticuerpo

Cada molécula de IgG consiste en cuatro cadenas de polipéptidos (dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas unidas por enlaces disulfuro) y tiene dos sitios de unión de antígenos (es decir que es divalente). Cada cadena ligera y cada cadena pesada consta de una región variable y una región constante. Cada cadena ligera se pliega en dos dominios, uno para la región variable y otro para la región constante. Cada cadena pesada de la IgG se pliega en cuatro dominios, uno para la región variable y tres para la región constante. La papaína digiere a la IgG y la convierte en dos fragmentos Fab (cada uno de los cuales tiene un sitio de unión de antígeno, lo que significa que es monovalente) y un fragmento Fc. La pepsina digiere a la IgG y libera un fragmento  $F(ab')_2$ , que cuenta con dos sitios de unión de antígeno.

### Cinco clases de inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas humanas existentes son las clases IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, las cuales contienen cadenas pesadas  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. La IgM es un pentámero que se une a los microorganismos invasores y activa el complemento para matar las células y fagocitarlas. La IgG es el principal anticuerpo que se encuentra en la sangre después de la estimulación antigénica y también encierra la capacidad de cruzar la placenta. La IgA actúa en particular en las secreciones corporales. La IgE provee inmunidad contra algunos parásitos, pero es asimismo la causa de los síntomas clínicos de las reacciones alérgicas. La función exacta de la IgD se desconoce.

### Anticuerpos policlonales

Una preparación de moléculas de anticuerpos que se originan de numerosas clonas de células diferentes se llama anticuerpo policlonal. Consiste en una mezcla de moléculas de anticuerpos que se unen a diferentes partes (epítomos) del antígeno con diferentes afinidades de unión.

### Anticuerpos monoconales

El anticuerpo monoclonal es el anticuerpo producido por una sola clona de células; todas las moléculas de anticuerpos son idénticas y se unen al mismo sitio antigénico con idénticas afinidades de unión.

### Síntesis de anticuerpos

No existe un gen de anticuerpos completo en las células de la línea germinal. Los genes de las cadenas livianas y pesadas se ensamblan por recombinación somática durante la maduración del linfocito B. Un linfocito B puede cambiar la clase de anticuerpo que expresa mientras mantiene la misma secuencia de genes que codifica para la región variable de la cadena pesada pero si la une a un nuevo segmento del gen C. La nueva cadena pesada tiene una región constante diferente, pero la misma especificidad de unión de antígeno de la cadena pesada previa.

**Temas relacionados**

(A4) Imágenes celulares  
(B2) Estructura y función de las proteínas

(C1) Purificación de las proteínas  
(C4) Inmunodetección

**Sistema inmunitario: descripción**

Hay dos funciones vitales del sistema inmunitario: reconocimiento de un agente patógeno invasor (bacteria, hongos, protozoarios y virus causantes de enfermedad) como diferente de los componentes normales del cuerpo (y en consecuencia tratado como extraño) y en consecuencia el desencadenamiento de mecanismos que lleven a la destrucción del invasor, como la activación del complemento (véase más adelante) y de células fagocitarias que engullan y digieran el microorganismo invasor (sección E4). Las células encargadas de la inmunidad de los vertebrados son los glóbulos blancos llamados linfocitos, los cuales se originan en células precursoras (madre) de la médula ósea. El sistema inmunitario tiene dos partes principales, las cuales interactúan para proporcionar protección total al animal:

- La **respuesta inmunitaria humoral** (*humor* es un término anticuado que significa fluido) depende de la producción de proteínas solubles llamadas anticuerpos (o inmunoglobulinas) por los **linfocitos B (células B)**, así llamados porque las células maduran en la médula ósea (del inglés *bone*, que significa hueso).
- La **respuesta inmunitaria celular** es mediada por los **linfocitos T (células T)**, así llamados porque su maduración a partir de las células madre tiene lugar en el timo. Los linfocitos T intactos son responsables del reconocimiento y muerte de los invasores extraños.

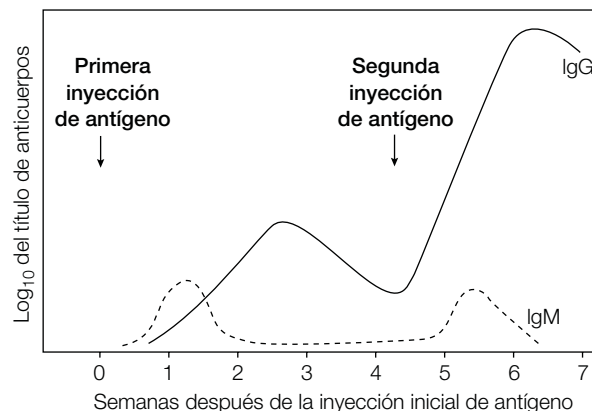
Tanto en la inmunidad celular como en la humoral, el reconocimiento de los invasores extraños depende del reconocimiento de macromoléculas extrañas (pro-

teínas, carbohidratos, ácidos nucleicos); estos componentes extraños se denominan **antígenos**.

**Respuestas inmunitarias primaria y secundaria**

La presencia de un antígeno extraño estimula la producción de un anticuerpo específico en la corriente sanguínea, el cual reconocerá y se unirá estrechamente al antígeno. Después de la inyección de un antígeno, las primeras moléculas de anticuerpos que se producen son de la clase de **inmunoglobulinas M** (moléculas IgM). Sin embargo, alrededor de diez días después de la inyección del antígeno, la cantidad de IgM en la corriente sanguínea declina (el **título** de anticuerpos) y se produce el aumento concurrente de otra clase de anticuerpos llamada **inmunoglobulina G** (IgG) (figura B6-1). A ésta se le llama **respuesta inmunitaria primaria**.

Una de las características más importantes del sistema inmunitario es que, cuando un animal tropieza con un agente patógeno en particular, el sistema le confiere protección contra futuras infecciones por el mismo. Esta memoria inmunitaria significa que, si el mismo agente patógeno o antígeno se encuentra por segunda vez, quizá incluso décadas después del primer encuentro, el sistema reacciona mucho más rápido y de manera más drástica y produce una gran cantidad de IgG específica para contrarrestar al antígeno. Ésta es la **respuesta inmunitaria secundaria** (figura B6-1), que es mediada por células T de memoria y células B de memoria longevas.



**Figura B6-1.** Respuestas inmunitarias primaria y secundaria a la inyección de un antígeno.

## Estructura del anticuerpo

### Cadenas ligera y pesada

Cada molécula de IgG tiene forma de Y y consiste en cuatro cadenas de polipéptidos unidas por enlaces disulfuro, de las cuales dos copias idénticas son **cadenas ligeras (L)** (25 kDa) y otras dos copias idénticas son **cadenas pesadas (H)** (50 kDa) (figura B6-2a). Los extremos terminales N de una cadena pesada y su cadena ligera vecina cooperan para formar un **sitio de unión de antígeno**, de manera que la molécula de IgG tiene dos sitios de unión de antígenos, es decir que es **divalente**. Debido a ello, una sola molécula de anticuerpo puede unir dos moléculas de antígeno y así forma enlaces cruzados y hace precipitar a los antígenos fuera de la solución.

### Regiones variable y constante

La comparación de las secuencias de aminoácidos de muchos polipéptidos de las inmunoglobulinas ha mostrado que cada cadena ligera tiene una **región variable** en su extremo N terminal y una **región invariable o constante** en su C terminal (figura B6-2b). De manera similar, cada cadena pesada tiene una región N terminal variable y una región C terminal constante. Como son las partes terminales N de las cadenas pesadas y ligeras las que forman el sitio de unión de antígenos, la variabilidad de las secuencias de aminoácidos de esas regiones explica cómo pueden formarse diferentes sitios con especificidades diferenciadas para la unión de antígenos. De hecho, la variabilidad de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas se localiza sobre todo en tres **regiones hipervariables** de cada cadena (figura B6-2b). En la estructura tridimensional de la molécula

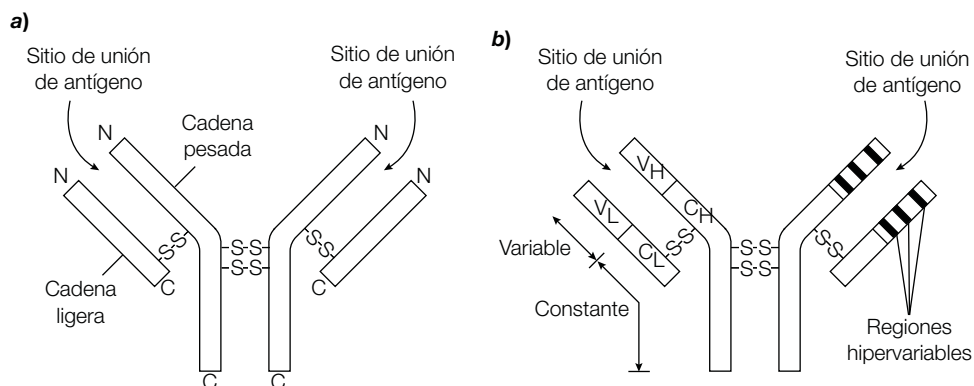
de inmunoglobulina, las partes hipervariables de las cadenas liviana y pesada se conectan en asas para formar el sitio de unión de antígenos. Las partes restantes de cada región variable conservan una secuencia razonablemente constante, por lo general no establecen contacto directo con el antígeno y se denominan **regiones marco**.

### Dominios de anticuerpos

Cada cadena ligera consiste en dos segmentos repetidos de alrededor de 110 aminoácidos que se pliegan en dos **dominios** tridimensionales compactos, de los cuales uno representa la región variable de la cadena ligera y el otro, la región constante. Cada cadena pesada también está elaborada de unidades repetidas de alrededor de 110 aminoácidos de largo. Como cada cadena pesada de la IgG tiene alrededor de 440 aminoácidos de longitud, forma cuatro dominios —un dominio para la región variable y tres dominios para la región constante—. La similitud de las secuencias de aminoácidos entre los diferentes dominios sugiere que se originaron por la duplicación de genes habida durante la evolución.

### Fragmentos Fab y Fc

La papaína, que es una proteasa, corta la molécula de IgG para liberar los dos brazos de la molécula en forma de Y, cada uno de los cuales posee un sitio de unión de antígeno que se llama **fragmento Fab** (del inglés *Fragment antigen binding*) (figura B6-3). Debido a que los fragmentos Fab sólo tienen un sitio de unión de antígeno (es decir que son **monovalentes**), no pueden entrecruzar antígenos. El tallo liberado de la molécula en forma de Y (que consiste en las dos partes C terminales idénticas de las dos cadenas H) se denomina **fragmento Fc**



**Figura B6-2.** Estructura de una molécula de anticuerpo: a) cada molécula de anticuerpo consiste en dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas —la molécula tiene dos sitios de unión de antígeno, cada uno de ellos formado por una cadena ligera y una cadena pesada—; b) las regiones N-terminal de las cadenas ligeras y pesadas son variables en sus secuencias de aminoácidos entre los anticuerpos (regiones variables; regiones v). Los términos genéricos de estas regiones en la cadena ligera son vl y cl y en la cadena pesada, vh y ch.

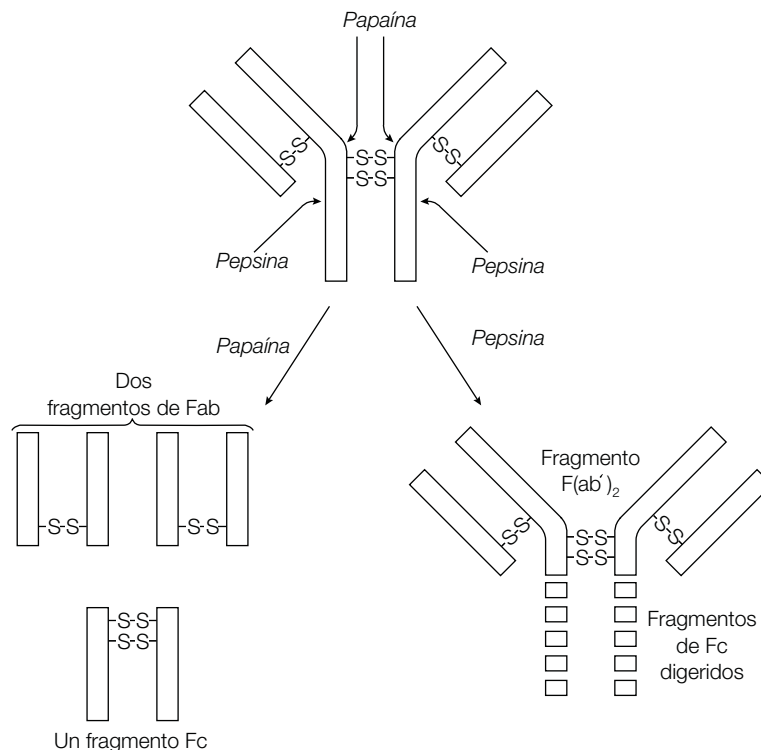
(así llamado porque cristaliza en seguida). Los fragmentos Fc son los portadores del sitio efector que produce la destrucción del antígeno, por ejemplo, al activar el sistema del complemento e inducir la fagocitosis de los agentes patógenos por otros glóbulos blancos. En contraste con la papaína, la pepsina (otra proteasa) corta la molécula de IgG para liberar los dos brazos de ésta que todavía se mantienen juntos y en consecuencia es un fragmento que posee dos sitios de unión de antígeno (es decir que es bivalente) y todavía puede formar enlaces cruzados con los antígenos. Este fragmento se llama  $F(ab')_2$  (figura B6-3).

### Cinco clases de inmunoglobulinas

Los seres humanos tienen cinco clases diferentes de moléculas de anticuerpos que difieren tanto en su estructura como en su función. Tales moléculas se denominan inmunoglobulina A (IgA), IgD, IgE, IgG e IgM y cada una tiene su propio tipo de cadena pesada:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Por consiguiente, las moléculas de IgA tienen dos cadenas pesadas  $\alpha$  idénticas, las moléculas de IgD tienen dos cadenas pesadas idénticas y así sucesivamente. La clase de anticuerpos humanos IgG se subdivide en cuatro subclases de IgG:  $IgG_1$ ,  $IgG_2$ ,  $IgG_3$  e  $IgG_4$ , cuyas cadenas pesadas son  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  y  $\gamma_4$ , respectivamente.

Las diferentes cadenas pesadas confieren distintas propiedades y funciones a cada una de las clases de inmunoglobulinas.

- La **IgM** tiene cadenas pesadas  $\mu$  y existe como un pentámero en combinación con otro polipéptido llamado cadena J, el cual se encarga de iniciar la polimerización para formar la estructura pentamérica. Con su gran número de sitios de unión de antígeno, cada molécula de IgM se une de manera muy estrecha a cualquier agente patógeno que tiene múltiples copias del mismo antígeno en su superficie. La unión induce a la región Fc a activar la vía del complemento, el cual acaba por causar la muerte del agente patógeno. La IgM también activa a los macrófagos para que fagociten a los agentes patógenos. No es de sorprender en virtud de sus funciones, que la IgM sea el primer anticuerpo producido cuando un animal responde a un nuevo antígeno (figura B6-1).
- La **IgG** es la principal inmunoglobulina en la corriente sanguínea al final de la respuesta inmunitaria primaria y en particular durante la respuesta inmunitaria secundaria (figura B6-1). Como la IgM, puede activar el complemento y desencadenar la respuesta de los macrófagos, pero es el único anticuerpo que puede atravesar la placenta y de ese modo proporcionar protección inmunitaria al feto. También se secreta en



**Figura B6-3.** La digestión de una molécula de anticuerpo por la papaína produjo dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc, en tanto que la digestión por la pepsina produjo un fragmento  $F(ab')_2$  bivalente.

la leche materna y es asimilada por el intestino del animal recién nacido para enviarla a la circulación sanguínea, con lo que provee protección continua después del nacimiento.

- La **IgA** es la principal clase de anticuerpos en secreciones como las lágrimas, saliva y en secreciones de los pulmones y el intestino. Representa la primera línea de defensa inmunitaria contra la infección en tales sitios.
- La **IgE** se produce en tejidos donde, después de enlazarse al antígeno, estimula a las células cebadas (mastocitos) para que liberen una serie de factores. A su vez, algunos de éstos activan glóbulos blancos (llamados eosinófilos) para que maten varios tipos de parásitos. No obstante, las células cebadas también pueden liberar aminas con actividad biológica, como la histamina, que causan dilatación e incrementan la permeabilidad de los vasos sanguíneos, que son los causantes de los síntomas que se observan en reacciones alérgicas como la fiebre del heno y el asma.
- La **IgD** se halla en la superficie de los linfocitos B maduros y en indicios en varios líquidos corporales, no obstante su función exacta se desconoce.

También existen dos formas de cadenas ligeras. Las moléculas de anticuerpos en cualquiera de las clases o subclases de anticuerpos pueden tener dos cadenas ligeras  $\kappa$  o dos cadenas ligeras  $\lambda$ . Contra lo que sucede con las diferentes cadenas pesadas antes descritas, no se conocen diferencias de función biológica entre las cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$ .

### Anticuerpos policlonales

Si un antígeno se inyecta en un animal, varias células productoras de anticuerpos unirán ese antígeno, aunque con diferentes grados de afinidad y de ese modo el anticuerpo que aparezca en la corriente sanguínea dará origen a numerosos clones de células, es decir que será un **anticuerpo policlonal**. En una preparación de anticuerpo policlonal, diferentes moléculas de anticuerpos se unirán a diferentes partes de un antígeno macromolecular, con diferentes afinidades de unión. La región de unión reconocida por cualquier molécula de anticuerpo se llama epítipo. La mayoría de los anticuerpos reconoce estructuras superficiales específicas de una proteína más que secuencias de aminoácidos determinadas (los epítopos se definen por la conformación del antígeno proteínico). Una preparación de anticuerpos policlonales se unirá a muchos epítopos del antígeno proteínico.

### Anticuerpos monoclonales

Si puede aislarse un clon simple de células productoras de anticuerpos, todos los anticuerpos que produzca dicho clon serán idénticos; asimismo, todas las

moléculas de anticuerpos en una preparación de **anticuerpo monoclonal** se unirán al mismo epítipo del antígeno.

El problema radica en que si se aísla una célula individual productora de anticuerpo y crece en cultivo, sus descendientes tienen una esperanza de vida acotada, que limita en gran medida su uso en las preparaciones de rutina de anticuerpos monoclonales. En 1975, Milstein y Köhler descubrieron de qué forma pueden producirse de manera indefinida y en grandes cantidades los anticuerpos monoclonales de casi cualquier especificidad deseada. Su método consistió en fusionar un linfocito B productor de anticuerpos de la especificidad deseada con una célula derivada de un tumor linfocítico canceroso, llamada célula de mieloma y que es inmortal. La fusión de células se llama **hibridoma**, que es inmortal y secreta el mismo anticuerpo específico original codificado por el linfocito B.

Los anticuerpos monoclonales que se producen por intermedio de esta tecnología son herramientas comunes de la investigación contemporánea debido a su muy alta especificidad. Por ejemplo, tales anticuerpos pueden usarse para localizar determinadas moléculas intracelulares (sección A4) o secuencias de aminoácidos particulares de las proteínas (sección C4). Si primero se unen a una matriz insoluble, también resultan de extrema utilidad para unirse y por tanto purificar una molécula particular contenida en extractos o fracciones celulares (sección C1). Asimismo, se ha incrementado su uso en la medicina, tanto como herramienta diagnóstica como terapéutica, por ejemplo para inactivar toxinas bacterianas y tratar ciertas formas de cáncer.

### Síntesis de anticuerpos

Se cree que el genoma humano contiene tan pocos como  $10^5$  genes y sin embargo un ser humano puede producir cuando menos  $10^{15}$  diferentes tipos de anticuerpos, en términos de especificidad de unión a un antígeno. Para dar cuenta de la mayor parte de esta diversidad de anticuerpos, los genes existen en secciones de codificación separadas y se ensamblan durante la maduración del linfocito B por un proceso denominado **recombinación somática**. Este proceso de ensamble tiene lugar en cada linfocito B. Mediante el ensamble de diferentes fragmentos de DNA, pueden crearse genes de inmunoglobulinas completamente nuevos y de este modo se cuenta con un reservorio potencial enorme de diversidad de anticuerpos.

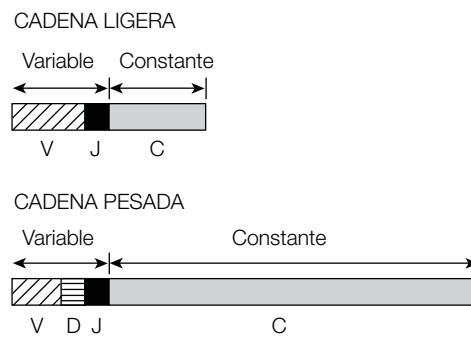
No existen genes de anticuerpos completos en las células de la línea germinal. Los genes para las cadenas ligeras y pesadas se ensamblan por recombinación somática durante la maduración de los linfocitos B. En la línea germinal, cada gen de cadena ligera existe como múltiples segmentos de los genes V y J corriente arriba de un solo segmento del gen C. Durante la diferenciación del

linfocito B, un segmento del gen V se une con un segmento del gen J (unión VJ) para ensamblar el gen completo de la cadena ligera, lo que suele ocurrir por delección del DNA participante. Las secuencias de los genes v y j codifican la región variable, mientras que el segmento del gen C codifica la región constante del polipéptido de la cadena ligera (figura B6-4).

Las cadenas pesadas son codificadas por múltiples segmentos de los genes v, j y D, los cuales yacen corriente arriba de una copia simple de segmentos del gen c para cada una de las regiones constantes de las cadenas  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  y  $\alpha$ . Durante la diferenciación del linfocito B, un segmento del gen D se une a un segmento J (unión DJ),

y después la unión DJ se une a un segmento del gen v (unión vDJ); la secuencia génica vDJ codifica la región variable del polipéptido de la cadena pesada (figura B6-4).

Un linfocito B puede cambiar la clase de anticuerpo que se está expresando al mover un nuevo segmento del gen c a la posición que ocupaba el segmento vDJrecombinado y para ello elimina el DNA que intervino. La nueva cadena pesada presenta una región constante diferente, pero conserva la misma región variable y de esta manera, cuando se produce el cambio de clase y el linfocito pasa a producir IgA en lugar de IgM, la especificidad del anticuerpo por el antígeno se mantiene.



**Figura B6-4.** La región variable de la cadena ligera es codificada por dos segmentos génicos separados, v y j. La región variable de la cadena pesada es codificada por tres segmentos génicos, v, D y J.

# C1 Purificación de proteínas

## Notas clave

### Principios de la purificación de proteínas

El fin de la purificación de proteínas es aislar una proteína particular del resto en el material inicial. Se usa una combinación de técnicas de fraccionamiento que explotan la solubilidad, tamaño, carga, hidrofobicidad y afinidad de unión específica de la proteína de interés. El material inicial que se usa es una fuente relativamente abundante de la proteína de interés que sea fácil de obtener. El uso de técnicas de DNA recombinante implica que pueden obtenerse grandes cantidades de proteínas que de manera habitual son escasas mediante la expresión de células bacterianas o eucariotas.

### Homogeneización y solubilización

La proteína debe obtenerse en solución antes de su purificación. La homogeneización y la lisis osmótica son dos procesos usados para destruir tejidos y células, que luego se someten a centrifugación diferencial para aislar la fracción subcelular en la que se localiza la proteína de interés. En el caso de las proteínas unidas a la membrana, la estructura membranosa debe solubilizarse con un detergente para que libere la proteína. Se deben tener precauciones para evitar que las proteínas se desnaturalicen o inactiven durante la purificación debido a factores físicos o biológicos. Entre éstos se incluyen el amortiguamiento del pH de las soluciones, efectuar los procedimientos a bajas temperaturas e incluir inhibidores de las proteasas para evitar proteólisis indeseables.

### Ensayo de proteínas

Con el propósito de vigilar el progreso de la purificación de una proteína, es necesario disponer de un ensayo para la misma. Según sea la proteína, el ensayo puede incluir la medición de su actividad enzimática o propiedades de unión de ligandos, o puede cuantificar la proteína presente por medio de anticuerpos contra la misma.

### Precipitación del sulfato de amonio

La solubilidad de las proteínas disminuye a medida que la concentración de sulfato de amonio en la solución aumenta. La concentración de sulfato de amonio a la cual una proteína determinada pierde su solubilidad y precipita suele ser bastante diferente de la de otras proteínas de la mezcla y útil para efectuar la separación.

### Cromatografía de filtración en gel

La cromatografía de filtración en gel separa proteínas con base en su tamaño y forma, para lo cual usa cuentas porosas encerradas en una columna. Las proteínas grandes o elongadas no pueden atravesar los poros de las cuentas y eluyen desde el fondo de la primera columna, en tanto que las proteínas más pequeñas atraviesan las cuentas, disponen de un volumen líquido mayor accesible a ellas y se mueven a través de la columna con mayor lentitud, por lo que eluyen más tarde.

### Cromatografía de intercambio de iones

En la cromatografía de intercambio de iones, las proteínas se separan con base en su carga neta. En la cromatografía de intercambio de aniones se usa una columna que contiene cuentas con carga positiva, mientras que en la cromatografía de intercambio de cationes se usan cuentas con carga negativa, a las cuales se unen proteínas con una carga positiva neta. A continuación, las proteínas unidas se eluyen al añadirles una solución de cloruro de sodio o al modificarles el pH del amortiguador.

**Cromatografía de afinidad**

La cromatografía de afinidad explota la unión específica de determinada molécula a una proteína, o su ligando (p. ej., un antígeno por su anticuerpo, también conocida como cromatografía por inmunoafinidad). Un soporte insoluble inmoviliza el ligando y queda encerrado en una columna. Al agregar una mezcla de proteínas, sólo la proteína de interés se une al ligando. Las restantes proteínas atraviesan la columna con libertad. La proteína unida se eluye entonces desde el ligando inmovilizado en una forma muy purificada.

**Temas relacionados**

(A2) Células eucariotas  
(A5) Fraccionamiento celular

(B1) Estructura de los aminoácidos  
(C2) Electroforesis en gel

**Principios de la purificación de proteínas**

El fin fundamental de la purificación de proteínas es aislar una proteína determinada de otras proteínas contaminantes, de manera que sea posible estudiar su estructura y otras propiedades. Cuando se identifica una **fente** celular apropiada de proteínas, las proteínas se liberan en una solución y luego se separan del material contaminante mediante el uso secuencial de una serie de diferentes **técnicas de fraccionamiento o separación**. Estas técnicas explotan una o más de las siguientes propiedades básicas de las proteínas: **solubilidad, tamaño, carga, hidrofobicidad** o sus **afinidades de unión específicas**. Entre estas técnicas de separación se reconocen las **técnicas cromatográficas** como las de **intercambio de iones, filtración en gel o cromatografía de afinidad, cromatografía por interacción hidrófoba**, en la cual la proteína se une a un material hidrófobo, o **técnicas electroforéticas** como la del **enfoque isoelectrico** (sección C2). Otros procedimientos electroforéticos, en especial la **electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con dodecilsulfato de sodio (SDS)** (sección C2), se usan para monitorear la extensión de la purificación y para determinar la masa molecular y composición en subunidades de la proteína purificada.

**Selección de una fuente de proteínas**

Antes de intentar purificar una proteína, lo primero es considerar la fuente del **material de inicio**. Las proteínas difieren en su distribución celular y tisular y por tanto, si se sabe que una proteína es abundante en determinado tejido (p. ej., el renal), tiene sentido comenzar la purificación a partir de tal tejido. Asimismo, algunas fuentes son más accesibles que otras y éste es otro aspecto que debe tenerse en cuenta. En el presente, con el uso de las técnicas de **DNA recombinante** (sección I1), incluso las proteínas escasas pueden expresarse (sintetizarse) en células bacterianas y eucariotas desarrolladas en cultivos (sección A3) y de manera subsecuente obtenerse cantidades relativamente grandes de una proteína.

**Homogeneización y solubilización**

Una vez que se identifica una fuente apropiada, el siguiente paso es solubilizar la proteína. En el caso de las proteínas de líquidos biológicos, por ejemplo el suero sanguíneo o el medio de cultivos celulares, no hay nada más que hacer, pero en el de numerosas proteínas, es necesario desintegrar tejidos y células (lisarlos). La **homogeneización** y subsecuente **centrifugación diferencial** de muestras biológicas se detallan en la sección A5. Además de los procedimientos que se describen allí, otra forma sencilla de desintegrar células que no tienen una pared celular rígida para liberar su contenido citosólico es la **lisis osmótica**. Cuando las células animales se colocan en una solución hipotónica (como el agua o una solución amortiguada sin sucrosa), el agua de la solución circundante se difunde hacia el más concentrado citosol, lo que provoca que la célula se hinche y explote. A continuación se recurre a la centrifugación diferencial para eliminar a los organelos subcelulares contaminantes (sección A5). Las proteínas que están unidas a la membrana requieren un paso solubilizador adicional. Después de su aislamiento por centrifugación diferencial, la membrana apropiada recibe tratamiento con un **detergente** como el Triton X-100 para romper la bicapa lipídica y liberar las proteínas integrales de la membrana en una solución (para mayores detalles, consúltese la sección E2).

**Estabilización de las proteínas**

A lo largo del proceso de purificación, deben seguirse determinados pasos para asegurar que la proteína de interés no se **inactiva** o **desnaturalice** por factores físicos o biológicos. El pH de las soluciones a usar necesita **amortiguarse** con sumo cuidado (sección B1) a un pH al cual la proteína sea estable, lo que por lo regular sucede alrededor de un pH de 7. Con frecuencia, la temperatura debe mantenerse por debajo de 25 °C (en general, cerca de 4 °C) para evitar su **desnaturalización térmica** y reducir al mínimo la actividad de las **proteasas**. Bajo homogeneización, las proteasas del material fuente, que de manera habitual se hallan en compartimientos subcelulares diferentes, son liberadas en la solución y se



ponen en contacto con la proteína de interés, a la que pueden degradar. Por ejemplo, las hidrolasas ácidas de los lisosomas (sección A2) podrían ser liberadas en la solución y degradar con rapidez a la proteína de interés. Por consiguiente y del mismo modo como los procedimientos se llevan a cabo a baja temperatura, es común incorporar **inhibidores de las proteasas** (sección D4) en los amortiguadores utilizados en las etapas iniciales de los procedimientos de aislamiento con el propósito de minimizar proteólisis indeseadas.

## Ensayos de proteínas

Se debe contar con medios adecuados de detección (**ensayos**) de la proteína para vigilar los sucesos de cada etapa del proceso de purificación. Los **ensayos** más sencillos son aquellos que se verifican con las enzimas que catalizan reacciones cuyos productos son fáciles de detectar (para mayores detalles sobre ensayos enzimáticos, véase la sección D1). Las proteínas que no son enzimas pueden ensayarse (probarse) a través de la observación de sus efectos biológicos. Por ejemplo, un receptor puede ensayarse midiendo su capacidad de unir su ligando específico. Las técnicas inmunológicas suelen emplearse para ensayar a la proteína de interés mediante anticuerpos específicos que la reconocen (p. ej., radioinmunoensayo, inmunoensayo ligado a enzimas [ELISA] o el análisis Western blot [sección C4]).

## Precipitación del sulfato de amonio

Un primer paso de separación empleado de manera habitual es el de la **precipitación del sulfato de amonio**. Esta técnica se basa en el hecho de que la **solubilidad** de la mayor parte de las proteínas está disminuida en altas concentraciones salinas. A medida que la concentración de sal se eleva, se alcanza un punto en el cual la proteína pierde su solubilidad y precipita. La concentración de sal que se requiere para este **efecto de desplazamiento salino** varía de proteína a proteína y por consiguiente es útil para usar en el fraccionamiento de una mezcla de proteínas. Por ejemplo, 0.8 M de sulfato de amonio

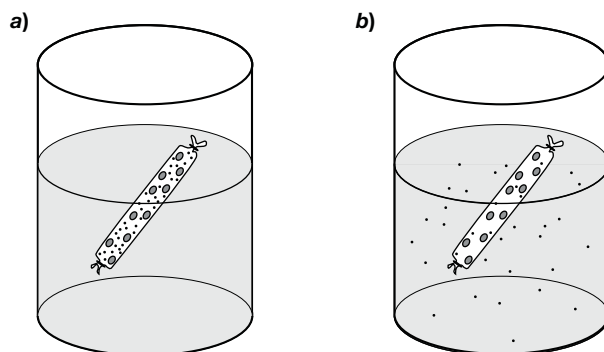
hacen precipitar la proteína coagulante fibrinógeno del suero sanguíneo, en tanto que 2.4 M de sulfato de amonio es la cantidad requerida para que la albúmina precipite. No obstante, muchas otras proteínas también precipitan a estas concentraciones de sulfato de amonio. En consecuencia, es una técnica de separación relativamente burda, aunque con frecuencia representa un paso de concentración conveniente. A veces, el desplazamiento se usa en las etapas finales de un procedimiento de purificación para **concentrar** una solución diluida de la proteína y hacer que ésta precipite y luego pueda ser redisuelta en un volumen de amortiguador más pequeño.

## Diálisis

Las proteínas de moléculas pequeñas pueden separarse por diálisis a través de una **membrana semipermeable** como el celofán (acetato de celulosa). Los **poros** de la membrana permiten el paso de moléculas de hasta alrededor de 10 kDa, al tiempo que las moléculas más grandes son retenidas en la bolsa de diálisis (figura C1-1). Como casi todas las proteínas tienen masas moleculares mayores de 10 kDa, esta técnica resulta inadecuada para el fraccionamiento de proteínas, pero se usa con frecuencia para eliminar moléculas pequeñas como las de sal y sulfato de amonio de una solución de proteínas. Debe subrayarse que, en equilibrio, la concentración de moléculas pequeñas dentro de la bolsa de diálisis es igual a la concentración de afuera (figura C1-1b) y por ello suele ser necesario efectuar numerosos cambios en la solución circundante para reducir lo suficiente la concentración de moléculas pequeñas en la solución de las proteínas.

## Cromatografía de filtración en gel

En la cromatografía de filtración en gel (**cromatografía de exclusión de tamaño** o **cromatografía de tamiz molecular**), las moléculas se separan con base en su **tamaño y forma**. La muestra de proteínas en un volumen pequeño se aplica en el extremo superior de una



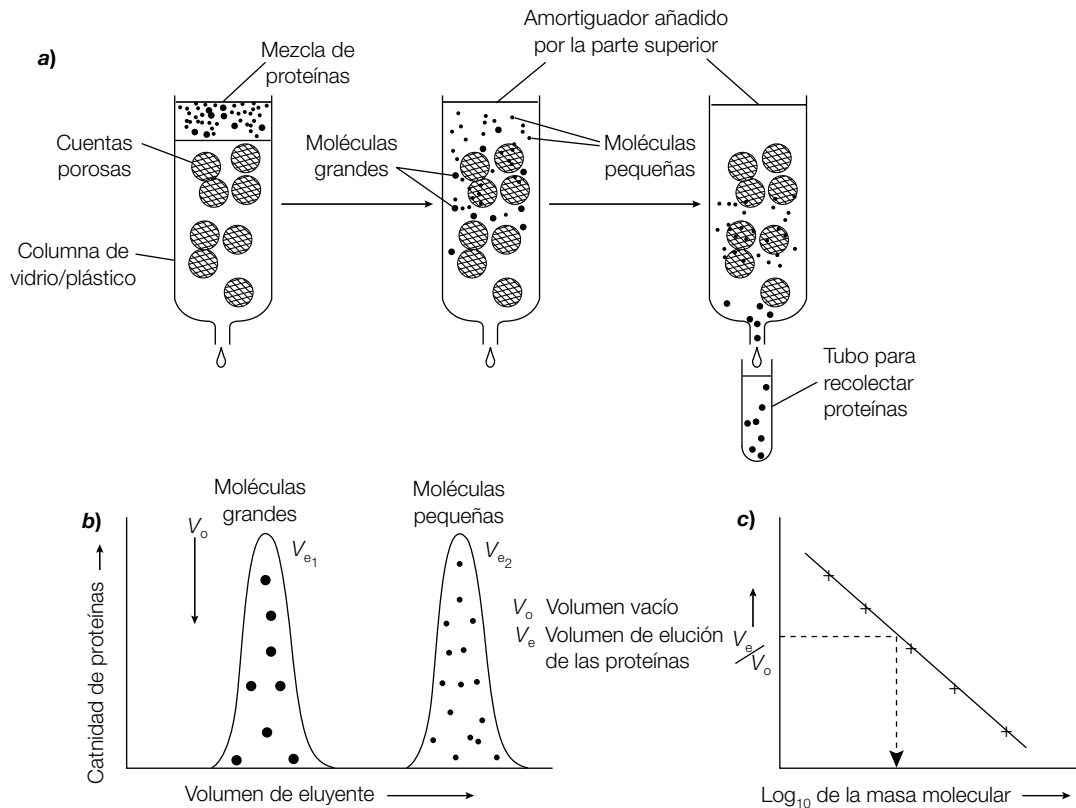
**Figura C1-1.** Separación de moléculas por diálisis, con base en el tamaño: a) punto inicial; b) en equilibrio.

columna de **cuentas porosas** (diámetro de 0.1 mm), que están hechas de un polímero insoluble pero muy hidratado como la poli(acrilamida) (Bio-Gel) o los carbohidratos dextrano (Sephadex) o agarosa (Sefarosa) (figura C1-2a). Las moléculas pequeñas pueden ingresar en los **poros** de las cuentas, mientras que las moléculas más grandes o elongadas no pueden hacerlo. Por consiguiente, las moléculas más pequeñas tienen un volumen de líquido mayor accesible a ellas, tanto el del líquido que rodea a las cuentas porosas como el que se halla en su interior. En contraste, las moléculas más grandes sólo disponen del líquido que rodea a las cuentas y por tanto se mueven a través de la columna con más rapidez, lo que las lleva a ser las primeras que emergen del fondo (**elución**) (figuras C1-2a y C1-2b). Las moléculas más pequeñas se mueven con mayor lentitud a través de la columna y eluyen más tarde. Están disponibles cuentas con diferentes tamaños de poros, lo que permite separar proteínas de distintos tamaños de manera efectiva. La cromatografía de filtración en gel se usa con frecuencia para eliminar la sal de una muestra proteínica (p. ej., para remover el sulfato de amonio después de la precipitación de éste), ya que la sal ingresa en las cuentas porosas y es eluida más tarde, en tanto que las proteínas no ingresan en las

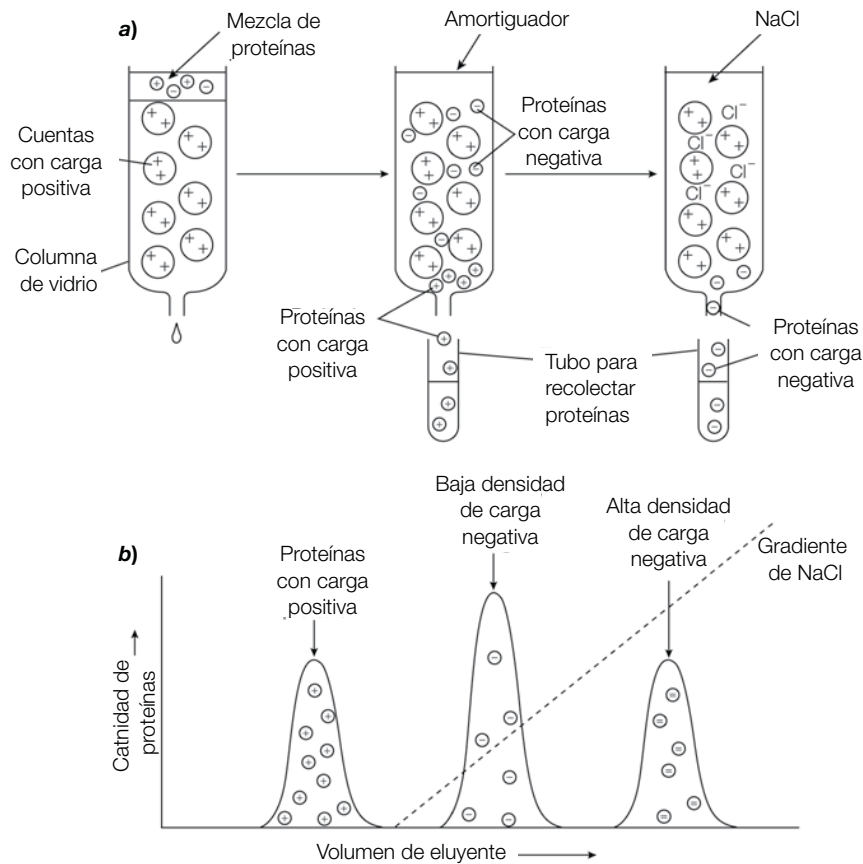
cuentas y se eluyen antes. La cromatografía de filtración en gel también puede utilizarse para estimar la **masa molecular** de una proteína. Existe una interrelación lineal entre el volumen de elución relativo de una proteína ( $V_e/V_0$  donde  $V_e$  es el volumen de elución de una proteína determinada y  $V_0$  es el volumen eliminado de la columna, que es el volumen del espacio del solvente que rodea las cuentas; figura C1-2b) y el logaritmo de su masa molecular. Por tanto, la columna puede determinar una curva estándar de  $V_e/V_0$  contra el  $\log_{10}$  de la masa molecular mediante el uso de proteínas de masa conocida. En consecuencia, el volumen de elución de cualquier muestra de proteínas permite estimar su masa molecular tomando como referencia su posición en la curva estándar (figura C1-2c).

### Cromatografía de intercambio de iones

En la cromatografía de intercambio de iones, las proteínas se separan con base en su **carga total (neta)**. Si una proteína tiene una carga neta negativa a pK 7, se une a una columna que contiene cuentas con carga positiva, mientras que una proteína sin carga o con carga positiva neta no se unirá (figura C1-3a). Las proteínas con carga



**Figura C1-2.** Cromatografía por filtración en gel: a) ilustración esquemática de la cromatografía por filtración en gel; b) diagrama de la elución en el que se indica la separación; c) gráfica del volumen de elución relativo contra el logaritmo de la masa molecular de proteínas conocidas, en el que se indica de qué forma la masa molecular de una proteína desconocida puede leerse cuando se conoce su volumen de elución relativo.



**Figura C1-3.** Cromatografía de un intercambio iónico: a) esquema de la cromatografía de intercambio iónico; b) el diagrama muestra la separación de una proteína con carga neta positiva que no se ha unido a las matrices con carga positiva y, así, pasa de forma directa a través de la columna, en tanto que otras dos proteínas con diferente carga negativa neta se unen a las matrices con carga positiva y son eluidas, lo que aumenta la concentración de NaCl en la columna. La proteína con menor densidad de carga negativa es eluida antes que aquella con carga negativa de mayor densidad.

negativa unidas a tal columna pueden entonces eluirse si la columna se lava con una solución de **cloruro de sodio** (de iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ ) de gradiente cada vez mayor (concentración en incremento) al pH apropiado. Los iones  $\text{Cl}^-$  compiten con la proteína por los grupos con carga positiva de la columna. Las proteínas que tienen una densidad o carga negativa menor eluyen primero, seguidas por las que tienen una densidad o una carga negativa mayor (figura C1-3b). Las columnas que contienen grupos dietilaminoetil (DEAE) con carga positiva (como el DEAE-celulosa o el DEAE-Sephadex) se usan para separar a las proteínas con carga negativa (proteínas aniónicas). Esta técnica se denomina cromatografía de intercambio aniónico. Las columnas que contienen grupos carboximetilo ( $\text{CM}$ ) con carga negativa (como el  $\text{CM}$ -celulosa o el  $\text{CM}$ -Sephadex) se usan para separar las proteínas con carga positiva (proteínas catiónicas). Esta técnica se denomina **cromatografía de intercambio catiónico**. Como una alternativa a la elución con un gradiente de NaCl, las proteínas pueden ser eluidas de

las columnas de intercambio aniónico al disminuir el pH del amortiguador y de las columnas de intercambio catiónico al incrementar el pH del amortiguador, porque de ese modo se altera el estado de ionización de las cadenas laterales de aminoácidos (sección B1) y por consiguiente la carga neta de la proteína.

### Cromatografía de afinidad

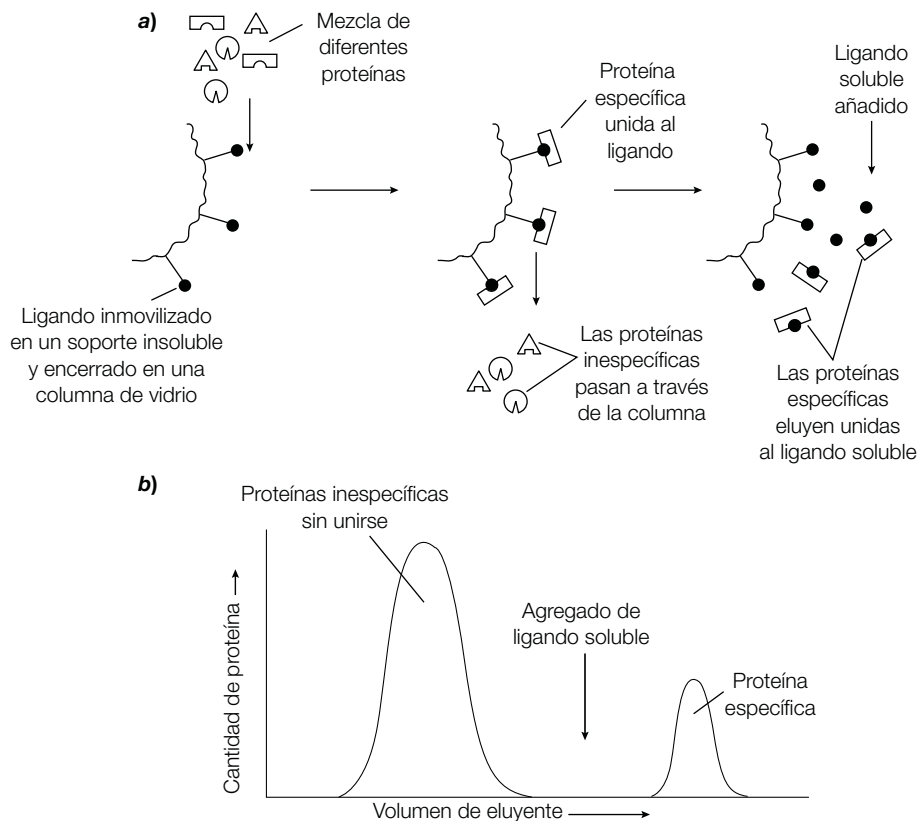
La cromatografía de afinidad explota la afinidad específica y alta de la unión no covalente de una proteína a otra molécula, el **ligando**. Primero, el ligando se fija en forma covalente a una matriz inerte y porosa (como la Sefarosa). Luego la mezcla de proteínas se hace pasar por una columna que contiene el **ligando inmovilizado**. La proteína de interés se une al ligando mientras las restantes proteínas pasan a través de la columna (figura C1-4). Después de un extenso lavado de la columna con amortiguador para arrastrar a las proteínas unidas inespecíficamente, la proteína de interés enlazada se libera

del ligando inmovilizado agregando ligando soluble, que compite con el ligando inmovilizado por la proteína, o alterando las propiedades del amortiguador (mediante cambio del pH o de la concentración de sal). Si se recurre a ligando soluble para eluir la proteína de la columna, con frecuencia es necesario usar una **diálisis** extensa para remover el pequeño ligando de la gran proteína. Debido a que esta técnica utiliza las propiedades de unión específicas y con frecuencia exclusivas de la proteína, suele ser posible separar la proteína de una mezcla de cientos de otras proteínas en un solo paso cromatográfico.

La **cromatografía de inmunoafinidad**, en la cual se usa un anticuerpo para purificar su antígeno, representa una de las formas más comunes de la cromatografía de afinidad. En la cromatografía de inmunoafinidad, un **anticuerpo** específico a un **antígeno** proteínico se acopla a cuentas de una matriz inerte, las cuales se encierran en una columna de vidrio o de plástico. Al añadir la solución impura de proteínas en el extremo superior de la columna, el antígeno proteínico se unirá al anticuerpo en la matriz al tiempo que los otros componentes fluyen a través de la columna. De este modo, el antígeno proteínico puede eluirse en un estado puro o casi puro con sólo cambiar el pH del amortiguador de manera

que se interrumpa la interacción antígeno-anticuerpo; de rutina, se logran más de 1 000 purificaciones con este paso solo. Si el antígeno proteínico se expone de manera habitual en la membrana plasmática de un tipo celular deseado, estas células pueden purificarse de una mezcla de células con sólo hacer pasar la mezcla a través de la columna. Sólo las células que porten el antígeno en su superficie se unirán y podrán eluirse en un paso posterior.

Otras combinaciones de empleo usual de un ligando inmovilizado y una proteína a purificar usadas por los sistemas cromatográficos de afinidad incluyen un **inhibidor** para purificar una **enzima** (sección D4), una **hormona** (p. ej., la insulina) para purificar a su receptor (sección E5) y una **lectina** (p. ej., la concanavalina A) para purificar una **glucoproteína** (secciones E2 y H5). Los avances en la tecnología del DNA recombinante (sección I1) implican que las proteínas se pueden diseñar con secuencias de aminoácidos específicas en el extremo del C terminal, el llamado **rabillo**. La proteína recombinante con el rabillo puede entonces expresarse en un sistema celular adecuado y la afinidad del rabillo por un anticuerpo inmovilizado u otra molécula explotarse para purificar la proteína.



**Figura C1-4.** Cromatografía de afinidad: a) diagrama esquemático de la cromatografía de afinidad; b) diagrama de la elución en el que se indica que las proteínas inespecíficas que no se unen al ligando inmovilizado pasan a través de la columna, en tanto que las proteínas específicas se unen al ligando inmovilizado y se eluyen de la columna sólo al añadir ligando soluble.

## C2 Electroforesis en gel

### Notas clave

#### Electroforesis

En la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), las proteínas se aplican contra un gel de poliacrilamida poroso y se separan en un campo eléctrico con base en su carga negativa neta y su tamaño. Las proteínas con mayor carga negativa y más pequeñas migran más a través del gel que las proteínas con menos carga negativa y de tamaño más grande.

#### SDS-PAGE

En el SDS-PAGE, la muestra de proteínas se trata con un agente reductor para romper los enlaces de disulfuro y luego con el agente detergente dodecilsulfato de sodio (SDS), el cual desnaturaliza las proteínas y las recubre por completo con una carga negativa. A continuación, la muestra se fracciona por electroforesis a través de un gel de poliacrilamida. Como todas las proteínas tienen una carga idéntica en relación con la masa, se separan con base en su masa. Las proteínas más pequeñas se mueven más rápido. El SDS-PAGE puede utilizarse para determinar el grado de pureza de una muestra de proteínas, estimar la masa molecular de una proteína y deducir el número de subunidades polipeptídicas de una proteína.

#### Enfoque isoeléctrico

En un enfoque isoeléctrico, las proteínas se separan por electroforesis en un gel que contiene polianfolitos, los cuales producen un gradiente de pH. Éstos separan con base en su contenido relativo de residuos con cargas positivas o negativas. Cada proteína migra a través del gel hasta que alcanza un punto en el que carece de una carga neta, que es su punto isoeléctrico (pI).

#### Electroforesis en gel bidimensional

En la electroforesis en gel bidimensional, las proteínas se someten en primer lugar al enfoque isoeléctrico y luego, en la segunda dirección, al SDS-PAGE para producir un patrón bidimensional de manchas separadas con base en la carga y en la masa.

Esta técnica puede emplearse para comparar el proteoma de células que estén bajo diferentes condiciones.

#### Visualización de las proteínas en geles

Las proteínas pueden visualizarse directamente en geles mediante su tinción con el colorante azul brillante de Coomassie o con una tinción de plata. Las proteínas marcadas con radiactividad pueden detectarse mediante la superposición de una película de rayos X al gel, donde se buscan las áreas más oscuras de la autorradiografía revelada que se corresponden con las proteínas radiomarcadas. Una proteína determinada de interés puede detectarse por inmunoblot (Western blot) si se sigue su transferencia desde el gel a la nitrocelulosa y se utiliza un anticuerpo que la reconozca de manera específica. Luego se detecta este anticuerpo primario con un anticuerpo secundario ligado a una enzima o radiomarcado.

#### Temas relacionados

(B1) Estructura de los aminoácidos  
(B2) Estructura y función de las proteínas  
(C1) Purificación de proteínas

(C3) Secuenciación de proteínas y síntesis de péptidos  
(C4) Inmunodetección

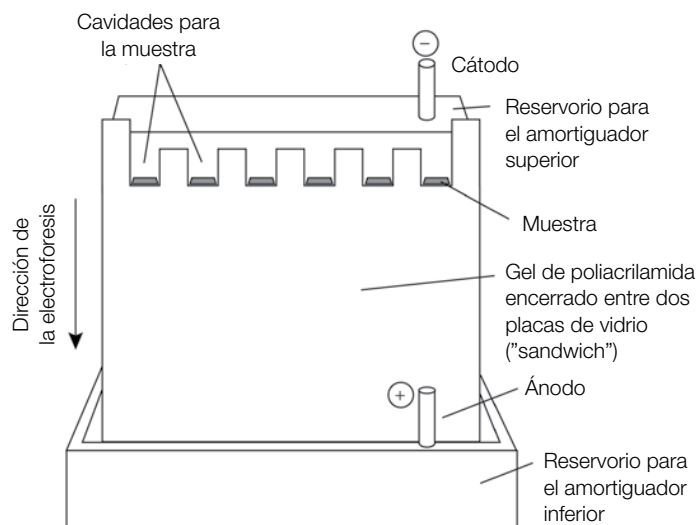
## Electroforesis

Cuando se colocan en un **campo eléctrico**, las moléculas con una carga neta, como las proteínas, se mueven hacia un electrodo o hacia el otro, un fenómeno conocido como **electroforesis**. Cuanto mayor sea la carga eléctrica, la molécula se moverá más rápido. En la **electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)**, la separación electroforética tiene lugar en un gel, el cual sirve de tamiz molecular. Las moléculas pequeñas se mueven con facilidad a través de los poros del gel, en tanto que las moléculas más grandes se retrasan. Los geles suelen elaborarse con **poliacrilamida**, una sustancia inerte desde el punto de vista químico que se forma con facilidad por la polimerización de la acrilamida. El tamaño de los poros del gel puede controlarse mediante la elección apropiada de las concentraciones de acrilamida y del reactivo de entrecruzamiento, la bisacrilamida de metileno. Cuanto más alta sea la concentración de acrilamida usada, más pequeños los tamaños de los poros en el gel final. Por lo regular, el gel se coloca entre dos placas de vidrio separadas por una distancia de 0.5 a 1.0 mm (figura C2-1). La muestra de proteína se agrega a las pequeñas cavidades de la parte superior del gel, las que se forman al colocar un molde de plástico en el gel antes de que fragüe (figura C2-1). Un colorante azul (azul de bromofenol) se mezcla con la muestra de proteínas para ayudar a cargarla sobre el gel. Debido a que el bromofenol es una molécula pequeña, también migra con celeridad a través del gel durante la electroforesis y de esa manera indica la progresión de la electroforesis.

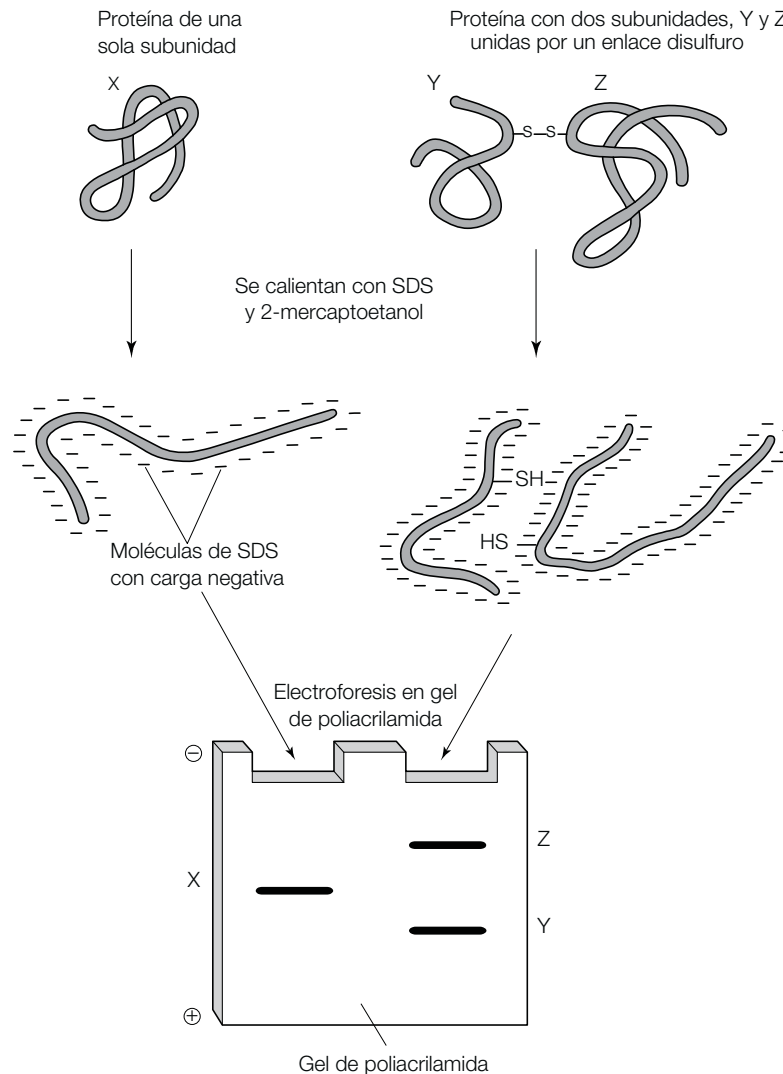
## SDS-PAGE

En el **dodecilsulfato de sodio (SDS)-PAGE**, las proteínas se **desnaturalizan** y recubren con una **carga negativa**

**completa** (debida a los enlaces de las moléculas de SDS) y en consecuencia la base para su separación es sólo su **masa**. En primer lugar, la mezcla de proteínas recibe un tratamiento con un agente reductor como el 2-mercaptoetanol o ditioneitol para romper los enlaces disulfuro (figura C2-2) (sección B2). Después se agrega el poderoso **detergente aniónico SDS**, el cual destruye casi todas las interacciones no covalentes de la proteína, al desplegar las cadenas polipeptídicas. Alrededor de una molécula de SDS se une, por medio de su cadena alquilo hidrófoba, a la columna vertebral polipeptídica por cada dos residuos de aminoácidos, lo que da a la proteína desnaturalizada una gran carga negativa neta que es proporcional a su masa. En ese momento se coloca la mezcla SDS/proteína a las cavidades para la muestra de la parte superior del **gel de poliacrilamida** (figura C2-1). El amortiguador, que es el mismo tanto en los reservorios superior e inferior y en el gel, tiene un pH aproximado de 9, de manera que las proteínas presentan una **carga negativa neta** y migran hacia el ánodo del reservorio inferior. Una corriente eléctrica (de alrededor de 300 V) se aplica a través del gel desde arriba hasta abajo durante 30 a 90 minutos con el propósito de mover las proteínas a lo largo del gel (figura C2-1). Después de efectuar la electroforesis, el gel se remueve del aparato y se visualizan las proteínas (figura C2-3a). Las proteínas pequeñas se mueven más lejos a través del gel, mientras que las grandes se mueven más lento a medida que son contenidas por los enlaces cruzados con el gel. Bajo estas condiciones, la movilidad de la mayoría de las cadenas polipeptídicas es linealmente proporcional al logaritmo de su masa. Por consiguiente, si las proteínas de masa molecular conocida sufren la electroforesis a lo largo de la muestra, la masa de las proteínas desconocidas puede determinarse porque existe una interrelación



**Figura C2-1.** PAGE. Las muestras de proteínas se cargan dentro de pequeñas cavidades formadas en la parte superior del gel. Se aplica un campo eléctrico a través del gel desde arriba hasta abajo y las proteínas descienden por el gel. Las proteínas más pequeñas son las que migran más.



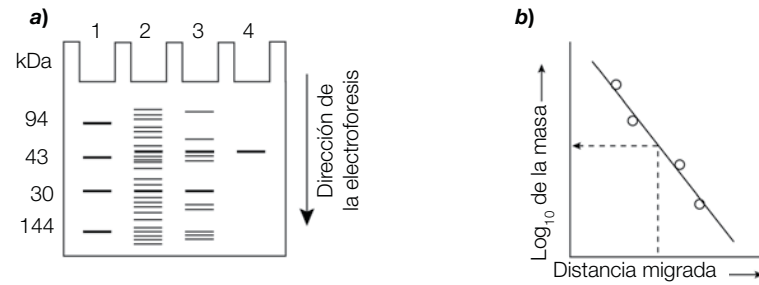
**Figura C2-2.** SDS-PAGE. La mezcla de proteínas se calienta en presencia de 2-mercaptoetanol, que rompe cualquier enlace disulfuro, y SDS. Las cadenas polipeptídicas desplegadas son recubiertas con moléculas de SDS con carga negativa, por lo cual migran hacia el ánodo del PAGE. Los polipéptidos más pequeños migran más a través del gel que los grandes.

lineal entre el  $\log_{10}$  de la masa molecular y la distancia migrada a través del gel (figura C2-3b). Las proteínas que difieren en masa por alrededor de 2% (p. ej., 40 y 41 kDa; una diferencia de casi 10 residuos de aminoácidos) pueden distinguirse bajo condiciones adecuadas. El SDS-PAGE es una técnica rápida, sensible y de amplio uso que puede emplearse para determinar el grado de pureza de una muestra de proteínas, para estimar la masa molecular de una proteína desconocida y para deducir el número de subunidades de una proteína.

### Enfoque isoelectrico

El enfoque isoelectrico separa proteínas por medios electroforéticos con base en su contenido relativo de

grupos con carga positiva o negativa. Cuando una proteína se halla en su **punto isoelectrico (pI)** (sección B1), su **carga neta es de cero** y en consecuencia no se moverá en un campo eléctrico. En el enfoque isoelectrico, se usa un gel de poliacrilamida que presenta poros grandes (de manera que no impide la migración de las proteínas) y contiene una mezcla de **polianfolitos** (pequeños polímeros con múltiples cargas, que tienen varios valores de pI). Si se aplica un campo eléctrico al gel, los polianfolitos migran y producen un **gradiente de pH**. Para separar las proteínas por medio del enfoque isoelectrico, se les somete a electroforesis a través del gel. Cada proteína migra a través del gel hasta que alcanza una posición a la cual el pH es igual a su pI (figura C2-4). Si una proteína difunde lejos de esta posición, su carga



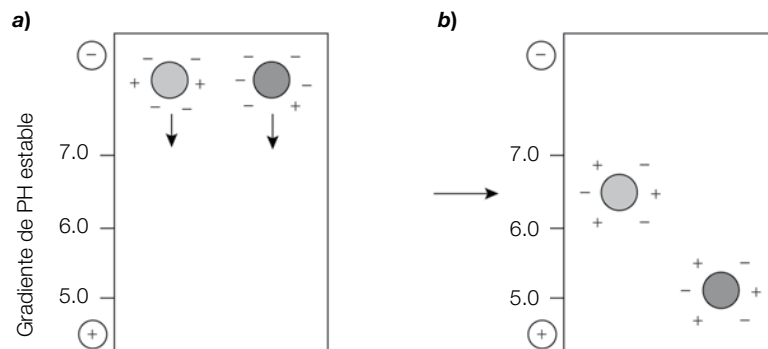
**Figura C2-3.** SDS-PAGE. a) Aspecto de las proteínas después de la electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida. Línea 1, proteínas (marcadores) de masa molecular conocida; línea 2, mezcla de proteínas sin purificar; línea 3, proteína parcialmente purificada; línea 4, proteína purificada hasta homogeneidad/pureza aparente. b) Determinación de la masa molecular de una proteína desconocida por comparación de su movilidad electroforética (distancia migrada) con la de aquellas proteínas (marcadores) de masa molecular conocida.

neta cambiará a medida que se mueva dentro de una región de diferente pH y las fuerzas electroforéticas resultantes la moverán de regreso a su posición isoeléctrica. De esta forma, cada proteína es enfocada en una banda estrecha (tan delgada como 0.01 de unidad de pH) alrededor de su pI.

### Electroforesis en gel bidimensional

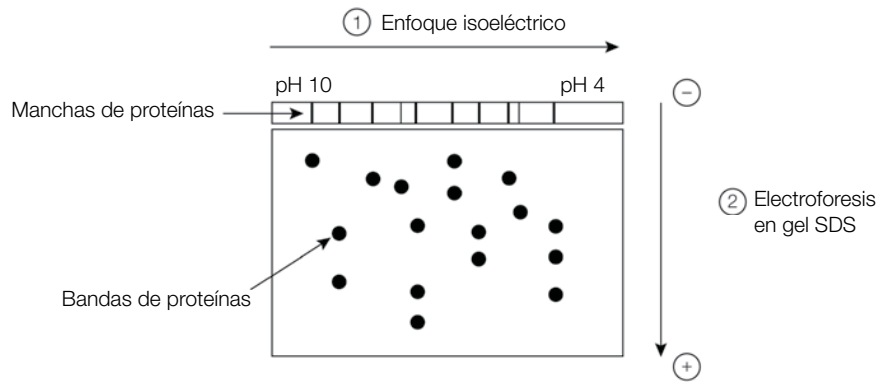
El enfoque isoeléctrico puede combinarse con el SDS-PAGE para obtener separaciones de muy alta resolución en un procedimiento que se denomina **electroforesis en gel bidimensional**. En primer lugar, la muestra de proteína se somete a un enfoque isoeléctrico en una tira estrecha de gel que contiene polianfolitos (figura C2-4). Esta tira de gel de enfoque isoeléctrico se coloca a continuación en la parte superior de un SDS-gel de poli-acrilamida y se somete a electroforesis para producir un patrón bidimensional de manchas, en el cual las proteínas han sido **separadas en la dirección horizontal con base en su pI, y en la dirección vertical con base**

**en su masa** (figura C2-5). El resultado global es que las proteínas se separan con base en su tamaño y su carga. Por consiguiente, dos proteínas que tienen un pI muy similar o idéntico y que producen una sola banda por enfoque isoeléctrico, si tienen diferentes masas producirán dos manchas por electroforesis en gel bidimensional (figura C2-5). De manera similar, las proteínas con masas moleculares similares o idénticas, las cuales producirían una sola banda por SDS-PAGE, también han de producir dos manchas si tienen diferente pI debido a la separación inicial por enfoque isoeléctrico. La **separación de alta resolución** de las proteínas de una mezcla compleja que pueda alcanzarse por electroforesis en gel bidimensional hace a esta técnica de extrema utilidad para comparar el **proteoma** (el complemento completo de proteínas de una célula u organismo) de células o tejidos bajo condiciones diferentes, como es el caso de las células diferenciadas contra las indiferenciadas, y se utiliza con frecuencia antes del análisis de manchas de proteínas individuales por **espectrometría de masa** (sección C3).



**Figura C2-4.** Enfoque isoeléctrico: a) antes de aplicar una corriente eléctrica; b) después de aplicar una corriente eléctrica, las proteínas migran a una posición en la cual su carga neta es cero (pI).





**Figura C2-5.** Electroforesis en gel bidimensional. Primero, la muestra de proteína se somete a un enfoque isoeléctrico en una dimensión y luego a SDS-PAGE en la segunda dimensión.

### Visualización de proteínas en geles

Como la mayoría de las proteínas en los geles no es visible a la observación directa para el ojo franco, se debió desarrollar un método para poder visualizarlas después de la electroforesis. La tinción de las proteínas de uso más corriente se hace con el colorante **azul brillante de Coomassie**. Después de la electroforesis, el gel que contiene las proteínas separadas se sumerge en una solución alcohólica ácida del colorante. Ésta **desnaturaliza** las proteínas, las  **fija**  en el gel de manera que no sea posible su lavado y permite que el colorante se les una. Después de lavar el exceso de colorante, las proteínas son visibles como discretas bandas azules (figura C2-3a). Puede visualizarse tan poco como 0.1 a 1.0  $\mu\text{g}$  de una proteína en el gel si se usa el colorante azul brillante de Coomassie. Una tinción de las proteínas más sensible consiste en remojar el gel en una solución de sales de **plata**. Sin embargo, esta técnica es más difícil de aplicar. Si la muestra de proteínas es **radiactiva**, las proteínas pueden visualizarse indirectamente si al gel se le superpone una hoja de **película de rayos X**. Con el tiempo (horas a semanas, de acuerdo con la radiactividad de las proteínas de la muestra), la radiación emitida oscurece la película. Después de revelar la película, la **autorradiografía** resultante muestra áreas oscurecidas correspondientes a las posiciones de las proteínas radiomarcadas.

Otra forma de visualizar la proteína de interés consiste en usar un **anticuerpo** contra dicha proteína en un **immunoblot** (Western blot) (consultese la sección C4, para mayores detalles). Para esta técnica, las proteínas tienen que transferirse del gel a una hoja de **nitrocelulosa** o una **membrana de nylon**. Esto se consigue al superponer el gel sobre la hoja de nitrocelulosa y **manchar** ésta con las proteínas al aplicar corriente eléctrica. Acto seguido, la nitrocelulosa tiene una imagen exacta del patrón de proteínas que presentaba el gel. El exceso de sitios de unión sobre la nitrocelulosa se bloquea con una solución inespecífica de proteínas como la leche en polvo, antes de colocar la nitrocelulosa en una solución que contenga el anticuerpo que habrá de reconocer a la proteína de interés (el **anticuerpo primario**). Después de remover el exceso de anticuerpo libre, el anticuerpo primario que se encuentra unido de manera específica a la proteína de interés se detecta con un **anticuerpo radiomarcado y fluorescente** o un **anticuerpo acoplado a una enzima**, que en ambos casos se denomina **anticuerpo secundario**. Como paso final, hay que detectar el anticuerpo secundario, lo que se consigue al colocar la nitrocelulosa contra una hoja de película de rayos X (si se utilizó un anticuerpo secundario radiomarcado), mediante un detector de fluorescencia, o al agregar a la nitrocelulosa una solución que contenga un sustrato al que la enzima que se acopló al anticuerpo secundario convierta en un producto coloreado e insoluble.

# C3 Secuenciación de proteínas y síntesis de péptidos

## Notas clave

### Análisis de la composición de aminoácidos

El número de cada tipo de aminoácido en una proteína puede determinarse por hidrólisis ácida y separación de los aminoácidos individuales por cromatografía de intercambio de iones. Los aminoácidos se detectan por una reacción colorimétrica con, por ejemplo, ninhidrina o fluorescamina.

### Degradación de Edman

El aminoácido N terminal de una proteína puede determinarse si la proteína se hace reaccionar con cloruro de dansilo o fluorodinitrobenzoceno antes de la hidrólisis ácida. La degradación de Edman puede determinar la secuencia de aminoácidos de una proteína y consiste en la remoción secuencial de un residuo por vez del extremo N terminal.

### Estrategia de secuenciación

Con el fin de secuenciar una proteína completa, la cadena polipeptídica debe romperse en fragmentos más pequeños mediante el uso de sustancias químicas (p. ej., bromuro de cianógeno) o enzimas (p. ej., tripsina). Los fragmentos más pequeños resultantes se secuencian entonces mediante la degradación de Edman. La secuencia completa se ensambla por medio del análisis de los fragmentos superpuestos generados por la escisión del polipéptido con diferentes reactivos.

### Espectrometría de masa

La espectrometría con tiempo de vuelo de la ionización por desorción con láser asistida con matriz (MALDI-TOF) se usa para determinar la masa precisa de los péptidos. Los péptidos se inmovilizan en una matriz orgánica y entonces se someten a un láser, el cual determina que sean eliminados bajo la forma de un gas ionizado. Los péptidos ionizados en el gas se aceleran en un campo eléctrico y se separan. La espectrometría de masa en tándem (MS-MS) utiliza dos espectrómetros de masa en tándem para fragmentar más los péptidos. El mapa peptídico resultante es diagnóstico de la proteína y se refiere como la huella digital de las proteínas.

### Proteómica

La proteómica es la rama de la ciencia que estudia el complemento completo de las proteínas, o proteoma, en una célula del organismo.

### Tecnología de DNA recombinante

La secuencia de una proteína puede determinarse si se recurre a la tecnología del DNA recombinante para identificar y secuenciar la parte del DNA que codifica la proteína. La secuencia de aminoácidos de la proteína puede deducirse a partir de su secuencia de DNA usando el código genético.

### Información derivada de la secuencia de las proteínas

La secuencia de aminoácidos de una proteína no sólo revela la estructura primaria de la proteína sino que también informa sobre las posibles familias o grupos de proteínas y sus interrelaciones evolutivas, las potenciales duplicaciones de genes y las posibles modificaciones postraduccion. De manera adicional, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos puede utilizarse para producir anticuerpos específicos.

### Síntesis de péptidos

En la síntesis de péptidos en fase sólida, los polipéptidos se sintetizan por medios químicos, que consisten en agregar aminoácidos libres a un péptido amarrado. Para prevenir reacciones indeseadas, el grupo amino  $\alpha$  y los grupos reactivos de las cadenas laterales de los aminoácidos libres se protegen (bloquean) con recursos químicos y luego se desprotegen (desbloquean) con los mismos recursos cuando el aminoácido se fija a la cadena polipeptídica en desarrollo.

**Temas relacionados**

(B1) Estructura de los aminoácidos  
(B2) Estructura y función de las  
proteínas

(C1) Purificación de proteínas  
(C2) Electroforesis en gel

## Análisis de la composición de aminoácidos

Puede determinarse el número de cada tipo de **aminoácido** en una muestra de proteínas mediante el análisis de la composición de aminoácidos. La muestra de la proteína purificada se hidroliza en sus aminoácidos constitutivos mediante calor en 6 M de HCl a 110 °C durante 24 horas, dentro de un tubo vacío y sellado. La mezcla resultante (el **hidrolizado**) de aminoácidos se somete a  **cromatografía de intercambio de iones** (sección C1) en una columna de poliestireno sulfatado donde se separan los **20 aminoácidos estándar** (sección B1). A continuación, los aminoácidos separados se detectan y cuantifican al hacerlos reaccionar con **ninhidrina**. Los aminoácidos  $\alpha$  producen un color azul, mientras que el iminoácido Pro genera un color amarillo. La cantidad de cada aminoácido en una muestra desconocida puede determinarse al comparar la absorbancia óptica con una cantidad conocida de cada uno de los aminoácidos en una muestra estándar. Con la ninhidrina, puede detectarse tan poco como 10 nmol de cada aminoácido. Un sistema de detección más sensible (detecta menos de 10 nmol de un aminoácido) usa **fluorescamina** para reaccionar con el grupo amino  $\alpha$  y formar un producto fluorescente. El análisis de la composición de aminoácidos indica el número de cada residuo de aminoácido en un péptido, pero no informa nada acerca de la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, la composición de aminoácidos del oligopéptido:

Val-Phe-Asp-Lys-Gly-Phe-Val-Glu-Arg

debería ser:

(Arg, Asp, Glu, Gly, Lys, Phe<sub>2</sub>, Val<sub>2</sub>)

donde los paréntesis y las comas entre cada aminoácido denotan que ésta es la composición de aminoácidos, no la secuencia.

### Degradación de Edman

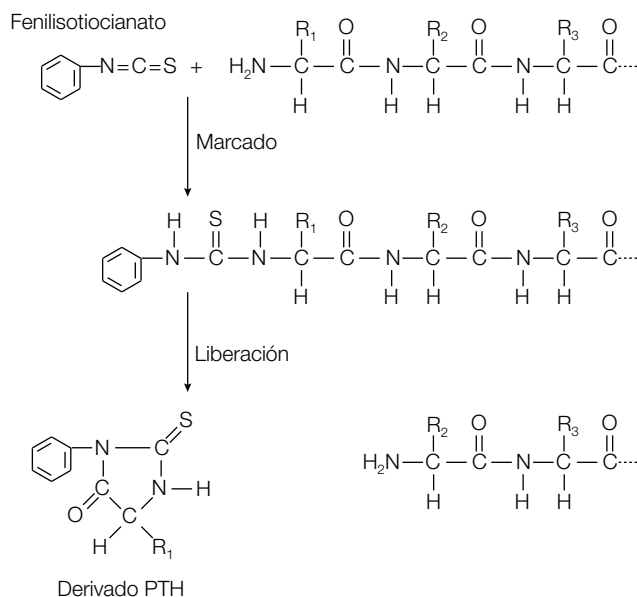
El residuo **amino terminal** (N terminal) de una proteína puede identificarse si se hace reaccionar la proteína con un compuesto que forme un enlace covalente estable con el grupo amino  $\alpha$  libre, antes de su hidrólisis con 6 M de NaCl. El aminoácido con el N terminal marcado puede identificarse al comparar sus propiedades cromatográficas con las de derivados de los aminoácidos estándar. Los reactivos usados de manera usual para el análisis del N terminal son el **fluorodinitrobenceno** y el **cloruro de dansilo**. Si esta técnica se aplicara al oligopéptido del ejemplo anterior, el residuo del N terminal

se identificaría como Val, pero la secuencia restante permanecería ignorada. La reacción adicional con cloruro de dansilo no revelaría el siguiente residuo de la secuencia ya que el péptido se degrada totalmente en el paso de la hidrólisis ácida.

Pehr Edman superó este problema cuando ideó un método para marcar el residuo del N terminal y luego lo escindió del resto del péptido sin afectar los enlaces peptídicos entre los otros aminoácidos. En la **degradación** llamada **de Edman** se remueve un residuo por vez de manera secuencial desde el extremo N terminal de un péptido o proteína y se identifica. El grupo amino N terminal sin carga de la proteína se hace reaccionar con fenilisotiocianato para formar un derivado feniltiocarbamoilo, el cual se libera del resto de la proteína como un **aminoácido de fenilhidantoína cíclico** (PTH), bajo condiciones ácidas leves (figura C3-1). Esta reacción de separación más suave deja a la parte restante del péptido intacta, disponible para otra ronda de marcación y liberación. El aminoácido PTH liberado se identifica por  **cromatografía líquida de alto desempeño** (HPLC). Esta técnica de secuenciación ha sido **automatizada** y refinada de manera que pueden secuenciarse más de 50 residuos desde el N terminal de una proteína a partir de picomoles de material.

### Estrategia de secuenciación

Una proteína “promedio” de 50 kDa debería contener alrededor de 500 aminoácidos. Por consiguiente, incluso con grandes cantidades de material muy purificado, sólo puede secuenciarse alrededor de una décima del N terminal de una proteína por la degradación de Edman. Con el propósito de secuenciar una proteína más grande, el primer paso es **escindir**la en **fragmentos más pequeños** de 20 a 100 residuos, los cuales luego se separan y secuencian. Una escisión específica puede alcanzarse por métodos **químicos** o **enzimáticos**. Por ejemplo, la sustancia química bromuro de cianógeno (CNBr) corta las cadenas de polipéptidos en el lado del C terminal de los residuos Met, mientras que las enzimas **tripsina** y **quimotripsina** escinden en el lado del C terminal de los residuos básicos (Arg, Lys) y aromáticos (Phe, Trp, Tyr), respectivamente. En el caso de la digestión por la tripsina, una proteína con seis Lys y cinco Arg produciría 12 péptidos trípticos, cada uno de los cuales terminaría en una Arg o Lys, además del péptido del C terminal. Los fragmentos peptídicos que se obtienen por separación específica química o enzimática se separan luego por  **cromatografía** (p. ej.,



**Figura C3-1.** Degradación de Edman. El aminoácido N terminal es marcado con fenilisotiocianato. Bajo hidrólisis ácida débil, este residuo es liberado como un derivado PTH y el péptido se acorta un residuo, listo para otra ronda de marcado y liberación.

cromatografía por intercambio de iones; sección C1) y a su vez la degradación de Edman determina la secuencia de cada uno.

Aunque ahora se conoce la secuencia de cada fragmento peptídico, no se sabe cuál es el orden de estos fragmentos en la cadena polipeptídica. La siguiente etapa es la de generar **fragmentos superpuestos** por escisión de otra muestra de la cadena polipeptídica original con una sustancia química o enzima diferentes (p. ej., quimotripsina), separar los fragmentos y luego secuenciarlos. Estos **péptidos quimotrípticos** se superponen con uno o más de los **péptidos trípticos**, lo que permite establecer el orden de los fragmentos (figura C3-2). De esta forma, es posible secuenciar la extensión completa de la cadena polipeptídica.

Para secuenciar los polipéptidos en una **proteína con múltiples subunidades**, primero deben disociarse las cadenas polipeptídicas, lo que se hace por destrucción de las **interacciones no covalentes con agentes desnaturizantes** como la **urea** o el **clorhidrato de guanidina**. También deben romperse los enlaces disulfuro de la proteína, lo que se logra por reducción con **2-mercaptoetanol** o **ditiotreitól**. Para evitar la recombinación de los residuos de cisteína, se añade **yodoacetato** para formar derivados estables de S-carboximetilo. Después, debe separarse cada cadena polipeptídica, por ejemplo, por cromatografía de intercambio de iones (sección C1), antes de secuenciarlas. En la actualidad, tan poco como cantidades de picomoles de proteínas pueden secuenciarse si para ello se recurre al SDS-PAGE,

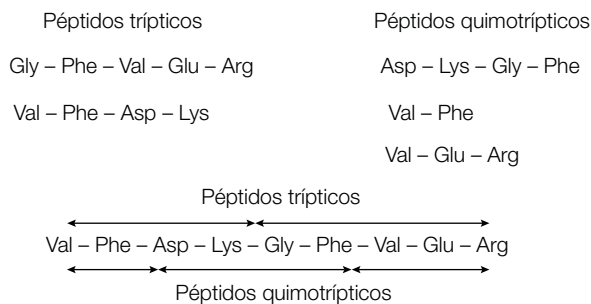
ya sea con un gel de poliacrilamida que contenga la proteína o haciendo su transferencia a nitrocelulosa (sección C2).

Para resumir los pasos clave en la secuenciación química de una proteína:

1. Purificar la proteína.
2. Reducir cualquier enlace disulfuro y bloquear su reoxidación con yodoacetato.
3. Escindir la proteína con bromuro de cianógeno o una proteasa (p. ej., tripsina).
4. Separar los fragmentos y secuenciarlos.
5. Repetir los pasos 3 y 4 usando un reactivo químico o proteasa diferentes con el fin de producir fragmentos superpuestos y luego revisar las superposiciones entre los dos conjuntos de secuencias con el propósito de construir la secuencia completa.

## Espectrometría de masa

La masa precisa de las proteínas y péptidos intactos derivados de ellas puede determinarse por **espectrometría de masa**. Ésta es una técnica muy sensible que requiere sólo pequeñas cantidades de material. El método de espectrometría de masa que se usa más se llama **espectrometría con tiempo de vuelo de la ionización por desorción con láser asistida con matriz** (MALDI-TOF). En este método, primero los péptidos se mezclan con un ácido orgánico y luego se secan en una laminilla



**Figura C3-2.** Uso de fragmentos superpuestos para determinar la secuencia de un péptido. Primero, la proteína se somete a la digestión de la tripsina y los péptidos que resultan se separan y secuencian. La proteína se hace digerir por separado con quimotripsina y, otra vez, los péptidos resultantes se separan y secuencian. Es posible determinar el orden de los fragmentos peptídicos en la proteína por comparación de las secuencias obtenidas.

de cerámica o metal. Luego, la muestra es sometida a un rayo **láser**, tras lo cual los péptidos abandonan la laminilla bajo la forma de un gas ionizado, en el cual cada molécula es portadora de una o más cargas positivas (figura C3-3a). Después, los péptidos ionizados se aceleran en un campo eléctrico y vuelan hacia un detector. El tiempo que les toma alcanzar el detector depende de su masa y su carga; los péptidos más grandes se mueven con mayor lentitud y los que están más cargados lo hacen con mayor celeridad. La masa precisa se determina a través del análisis de los péptidos que presentan una carga simple. Las masas del péptido resultante, o **huellas dactilares**, pueden utilizarse en la búsqueda de **bases de datos de secuencias proteínicas** para compararlas con las masas teóricas calculadas a partir de todos los péptidos divididos en teoría de todas las proteínas de un genoma secuenciado (figura C3-3b). De este modo, la identidad de la proteína original y su secuencia pueden determinarse con facilidad mediante una combinación de espectrometría de masa y de búsqueda de secuencias proteínicas en las bases de datos.

Puede usarse una variación de este método para determinar de manera directa las secuencias de cada péptido. Después de la digestión por la tripsina de la proteína purificada y de la determinación de sus masas por medio de la espectrometría de masa como se acaba de explicar, cada péptido se fragmenta aún más en sus enlaces peptídicos y las masas de los fragmentos resultantes se miden en un segundo espectrómetro de masa acoplado. Resulta así la denominada **espectrometría de masa en tándem (MS-MS)**. Las diferencias de masas entre los fragmentos pueden usarse para construir una secuencia de aminoácidos parcial la cual, a su vez, puede utilizarse para buscar secuencias de proteínas en las bases de datos o para proporcionar los medios para la clonación de genes.

La secuenciación de proteínas por espectrometría de masa presenta numerosas ventajas sobre la secuenciación química de Edman tradicional.

- Se requieren cantidades de material mucho menores.
- La secuencia del péptido puede obtenerse en sólo unos pocos minutos comparada con la hora que demanda tan sólo realizar un ciclo de la degradación de Edman.
- La espectrometría de masa puede utilizarse para secuenciar numerosos polipéptidos de una mezcla en lugar de necesitar la purificación completa de la mezcla antes de realizar el análisis.
- La espectrometría de masa puede usarse para determinar la secuencia de los péptidos que presentan los grupos **N terminales bloqueados** como el piroglutamato, un derivado del Glu en el que el grupo carboxilo de la cadena lateral forma un enlace amida con su grupo amino primario (una modificación eucariota postraducción común que obstaculiza la reacción de Edman) y para caracterizar otras **modificaciones postraducción** como la glucosilación y la fosforilación.

## Proteómica

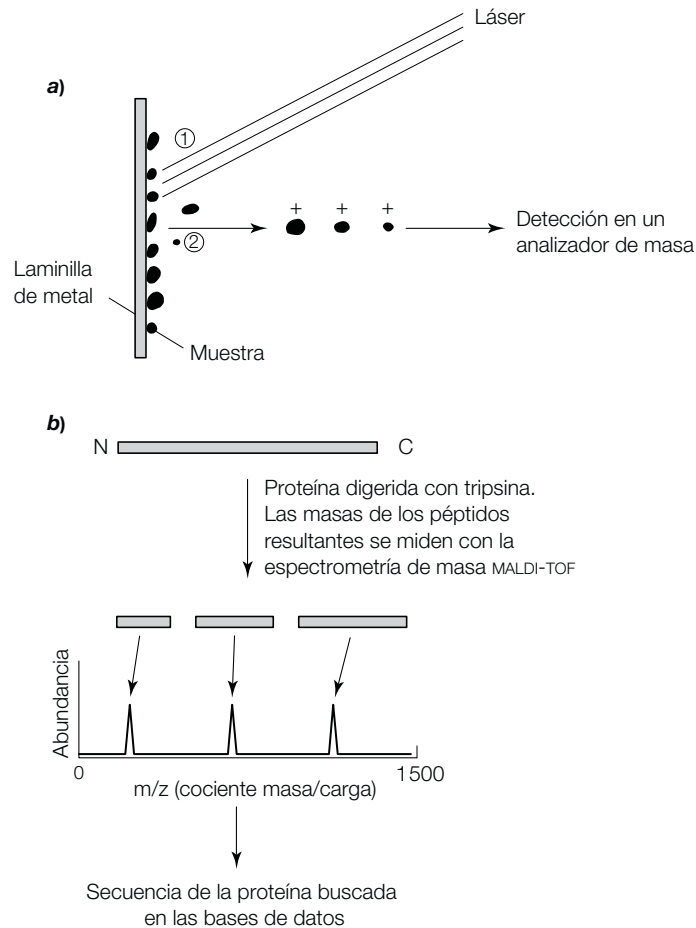
El **proteoma** es el complemento de proteínas completo de una célula u organismo. La **proteómica** representa un esfuerzo a gran escala para identificar y caracterizar todas las proteínas que codifica el genoma de un organismo, incluidas las modificaciones postraducción de éstas. Cada vez con mayor frecuencia, en el campo de la proteómica, las proteínas resueltas por electroforesis en gel bidimensional (sección C2) se someten a digestión por tripsina y las masas moleculares en extremo exactas de los péptidos producidas por la espectrometría de masa se utilizan como **“huellas dactilares”** para

identificar la proteína al compararla con las que figuran en las **bases de datos** de los tamaños peptídicos trípticos reales o predichos (figura C3-3).

### Tecnología de DNA recombinante

Aunque la degradación de Edman y la espectrometría de masa han servido para secuenciar numerosas proteínas, la determinación de las secuencias completas de las grandes proteínas por estos métodos es un proceso demandante y consumidor de tiempo. La **tecnología del DNA recombinante** (sección I1) ha permitido secuenciar

incluso proteínas muy grandes o proteínas que resultan muy difíciles de purificar para ser determinadas por la primera secuenciación del tramo de DNA que las codifica y por tanto usando el código genético para descifrar la secuencia de la proteína (sección H1). Incluso así, con frecuencia se requieren algunos datos de las secuencias de las proteínas para confirmar que la secuencia obtenida de la proteína es la correcta y para identificar cualquier modificación postraducción en la proteína. Por consiguiente, las técnicas de secuenciación del DNA y de las proteínas se usan juntas con mucha frecuencia para determinar la secuencia completa de una proteína.



**Figura C3-3.** Espectrometría de masa para determinar la secuencia de una proteína.

a) En un espectrómetro de masa MALDI-TOF, los pulsos de luz de un láser ionizan una mezcla de péptidos que se absorbe en una laminilla de metal ①. Un campo eléctrico acelera las moléculas de la muestra hacia el detector ②. El tiempo que tardan en llegar al detector es inversamente proporcional a la masa de la proteína. b) Uso de la espectrometría de masa para identificar proteínas. Se utiliza la tripsina para que digiera la proteína de interés y los fragmentos peptídicos resultantes se cargan en el espectrómetro de masa, donde se miden sus masas. A continuación se buscan las bases de datos de secuencias para identificar la proteína, cuyo perfil tríptico digerido se calcula y compara con los datos determinados de manera experimental.

### Información derivada de las secuencias de las proteínas

La secuencia de aminoácidos puede proveer información acerca de la **estructura primaria** de las proteínas y más.

1. La secuencia de interés puede compararse con otras secuencias conocidas para ver sus similitudes. Por ejemplo, las secuencias de la hemoglobina y la mioglobina indican que pertenecen al grupo o **familia de las proteínas globina** (sección B3).
2. La comparación de las secuencias de la misma proteína de diferentes especies puede proporcionar información acerca de sus **interrelaciones evolutivas**.
3. La presencia de segmentos de secuencia repetidos de la misma proteína en diferentes especies indicaría que la proteína pudo haberse originado por **duplicación de genes** (p. ej., en las moléculas de anticuerpos; sección B6).
4. Dentro de la secuencia de aminoácidos puede haber secuencias específicas que actúan como señales para el **procesamiento postraduccion** de la proteína (por el ejemplo, los procesos de glucosilación o proteolítico; sección H5).
5. Los datos de la secuencia de aminoácidos puede utilizarse para preparar anticuerpos específicos para la proteína de interés que pueden usarse para estudiar su estructura y función (sección C4).

6. Los datos de la secuencia de aminoácidos pueden emplearse para diseñar **sondas de DNA** que son específicas para la codificación genética de la proteína (secciones I3 e I4).

### Síntesis de péptidos

Los polipéptidos pueden **sintetizarse por medios químicos** al crear enlaces covalentes entre los aminoácidos y el extremo de una cadena polipeptídica en crecimiento. En la **síntesis de péptidos en fase sólida**, la cadena polipeptídica en crecimiento se fija de forma covalente desde su C terminal a un soporte insoluble como las cuentas de poliestireno. El siguiente aminoácido de la secuencia debe reaccionar con el grupo amino del péptido fijo, pero debe contar con un grupo amino libre que también puede reaccionar. Para resolver este problema, el aminoácido libre debe tener su grupo amino  $\alpha$  **químicamente protegido** (bloqueado) de manera que no reaccione con otras moléculas. Cuando el nuevo aminoácido se acopla, su grupo amino  $\alpha$ , ahora N terminal, se **libera** (desbloquea) para que sea posible el siguiente enlace peptídico. En consecuencia, cada ciclo de adición de un nuevo aminoácido requiere un **paso de acoplamiento** y un **paso de desacoplamiento**. De manera adicional, los grupos reactivos de las cadenas laterales deben bloquearse para evitar que se produzcan reacciones indeseables.

# C4 Inmunodetección

## Notas clave

### Métodos de inmunodetección

A raíz de la alta especificidad de un anticuerpo por su epítipo, un anticuerpo generado contra un antígeno proteínico particular puede emplearse para determinar la localización de tal antígeno en una célula (inmunocitoquímica) para detectar y cuantificar el antígeno en una mezcla compleja (ELISA) o para detectar proteínas después de un SDS-PAGE (*Western blotting*).

### Inmunocitoquímica

El anticuerpo contra el antígeno de interés se marca con fluorescencia para permitir la localización del antígeno en una célula a visualizar por inmunofluorescencia o microscopía inmunoelectrónica.

### ELISA

Puede emplearse un sándwich ELISA para detectar y cuantificar la cantidad de un antígeno proteínico específico en una muestra. El anticuerpo se une a un polímero de soporte inerte y luego se expone a la muestra. La proteína libre se lava y se añade un segundo anticuerpo que reacciona con el antígeno en un epítipo distinto. Este segundo anticuerpo se marca con un colorante fluorescente o lleva unida una enzima que convierte un sustrato incoloro en un producto con color. La cantidad unida del segundo anticuerpo y por tanto la cantidad del antígeno proteínico presente en la muestra original, se determina por cuantificación de la intensidad del color o de la fluorescencia que se produce. Puede emplearse una prueba de ELISA indirecta, en la cual el antígeno se une a un polímero inerte, para detectar la presencia en una muestra de un anticuerpo contra el antígeno.

### Inmuno (*Western blotting*)

Las muestras de proteínas se separan por SDS-PAGE y las proteínas resultantes se transfieren a una hoja de nitrocelulosa o nylon. Éstas se incuban con anticuerpo específico contra una proteína y el anticuerpo sobrante se lava. En el gel que une el anticuerpo, estas proteínas se detectan por autorradiografía (si el anticuerpo específico fue radiomarcado) o mediante un segundo anticuerpo marcado que se une al anticuerpo primario.

### Temas relacionados

((A4) Imágenes celulares (C2) Electroforesis en gel  
(C1) Purificación de proteínas (B6) Anticuerpos

## Métodos de inmunodetección

La disponibilidad de un **anticuerpo** (inmunoglobulina) contra un **antígeno** específico (sección B6) ofrece la oportunidad de utilizar dicho anticuerpo en un amplio espectro de métodos de detección inmunológica. El sitio del antígeno que un anticuerpo reconoce se denomina **determinante antigénico** o **epítipo**. Tanto los anticuerpos **monoclonales** como los **policlonales** (sección B6) pueden usarse para inmunodetección del antígeno deseado. La alta especificidad de un anticuerpo por su epítipo permite usarlo como un reactivo para determinar la localización del antígeno en una célula (**inmunocitoquímica**), para detectar y cuantificar un antígeno en una mezcla compleja (ELISA) y para detectar proteínas tras su separación por SDS-PAGE (*Western blotting*).

## Inmunocitoquímica

En la inmunocitoquímica, una **marca fluorescente** (p. ej., fluoresceína, la cual emite luz verde) se acopla a un anticuerpo, el que a continuación se añade a una célula fija. Entonces puede visualizarse la unión del anticuerpo a su antígeno al detectar su fluorescencia por **microscopía de luz inmunofluorescente** (para mayores detalles, consúltese la sección A4). Incluso puede alcanzarse un grado de resolución mayor si se recurre a anticuerpos a los que se hayan acoplado partículas electrónicas densas, como el oro coloidal, que luego pueden visualizarse con la ayuda de la microscopía electrónica (sección A4). En efecto, la **microscopía inmunoelectrónica** puede mapear la posición de los antígenos proteínicos dentro de las células y dentro de complejos de macromoléculas como los ribosomas.

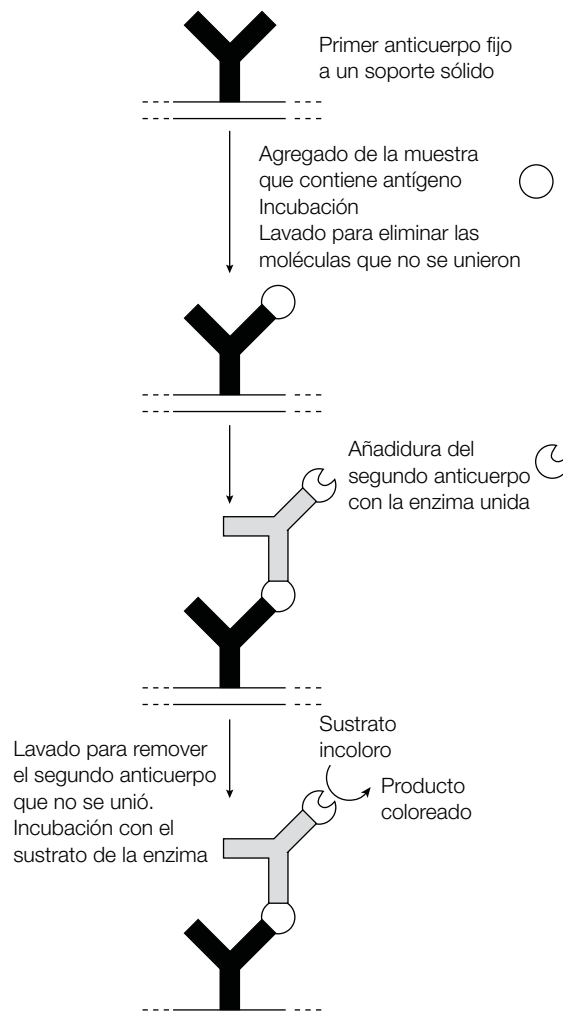


**ELISA**

Los anticuerpos específicos pueden usarse para detectar y cuantificar la cantidad de antígeno correspondiente en una muestra biológica. Existen varios tipos de ensayos inmunológicos. Una versión popular la representa el **inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)**, el cual puede detectar y cuantificar con facilidad menos de un nanogramo de una proteína antigénica específica. El sándwich **ELISA** permite la detección y cuantificación del antígeno. Este método emplea una bandeja de plástico que tiene cavidades moldeadas (**bandeja de microtitulación**) donde el anticuerpo ha sido acoplado al plástico que forma las cavidades (figura C4-1). Las muestras que contienen al antígeno a ensayar se agregan a las pequeñas cavidades. Si el antígeno está presente y el anticuerpo lo reconoce, se le une (figura C4-1). A continuación, las cavidades se lavan para eliminar las proteínas libres y luego se incuban con un segundo anticuerpo

que reconoce la proteína pero en un epítipo diferente al del primer anticuerpo (figura C4-1). El segundo anticuerpo se fija a un grupo fluorescente o una enzima que puede catalizar la conversión de un sustrato incoloro en uno coloreado. La intensidad del color o la fluorescencia producidas por cada muestra se mide para determinar la cantidad de antígeno presente en cada muestra. Existen numerosas máquinas disponibles para explorar las cavidades de la placa de microtitulación después de una **ELISA**, donde miden la absorbancia o fluorescencia y cuantifican la cantidad de antígeno unido en cada cavidad.

Un formato alternativo, la **ELISA indirecta**, puede emplearse para detectar la presencia de anticuerpo contra un antígeno particular en una muestra biológica. El antígeno por sí mismo está unido en las cavidades de la bandeja de microtitulación, a las cuales se añade la mezcla que contiene el anticuerpo que reconoce al antígeno.



**Figura C4-1.** Prueba **ELISA** realizada con un segundo anticuerpo, al que se le unió (conjugó) una enzima que convierte los sustratos incoloros en productos coloreados.

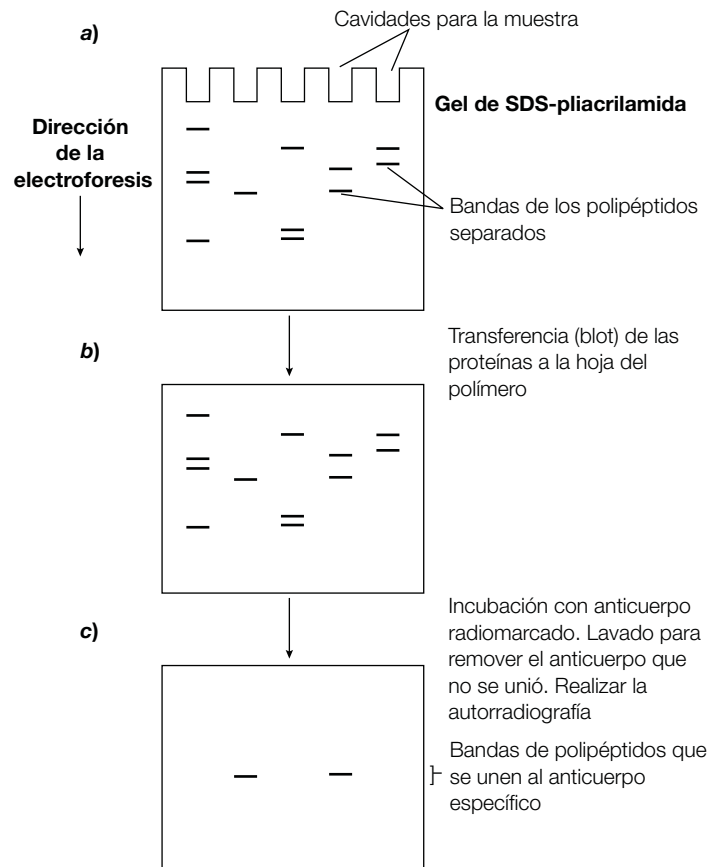
La presencia del anticuerpo de unión puede detectarse si se añade un anticuerpo fluorescente secundario que en este caso reconozca al primer anticuerpo (véase más adelante). Esta técnica es la base de la prueba para detectar la infección por el **virus de inmunodeficiencia humana** (VIH), en la que una proteína viral es inmovilizada y puede medirse la presencia de un anticuerpo contra ésta en una muestra de sangre.

### Inmuno (*Western*) blotting

Esta técnica puede utilizarse para la detección de una o más proteínas en una mezcla. La muestra se somete a electroforesis en un SDS-gel de poliácridamida (SDS-PAGE; sección C2) que separa las proteínas con base en su tamaño, de lo cual resulta una serie de bandas de proteínas debajo del gel (figura C4-2). Debido a que la matriz de gel no permite que proteínas grandes como los anticuerpos ingresen con facilidad, como paso previo las

proteínas de la muestra deben transferirse a un medio más accesible.

Este proceso se llama **blotting** (manchar). El gel se coloca cerca de una hoja de nitrocelulosa o nylon y luego se le aplica un campo eléctrico de modo que las proteínas migren desde el gel a la hoja, donde quedan unidas. La hoja de nitrocelulosa se incuba con una proteína como la albúmina sérica bovina para que se una a sitios de unión de proteínas inespecíficos, para de esa manera evitar uniones espurias de moléculas de anticuerpos en etapas subsecuentes. Se dice que este paso consiste en 'bloquear' sitios de unión inespecíficos. A continuación, la hoja de nitrocelulosa se hace reaccionar con anticuerpos marcados, los anticuerpos que no reaccionan se eliminan por lavado y las bandas proteínicas que se unieron al anticuerpo se vuelven visibles y pueden identificarse (figura C4-2). El método para visualizarlas depende del método que se utilizó para marcar el anticuerpo. Si la marcación consistió en



**Figura C4-2.** Inmuno (*Western*) blotting con un anticuerpo radiomarcado: a) electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida, de la que resultan polipéptidos separados en bandas discretas; b) membrana de nitrocelulosa o nylon, sobre la que se graficaron las bandas de las proteínas (es decir, un *Western blot*); c) autorradiografía después de incubar el *Western blot* con anticuerpo radiomarcado, de lavar el anticuerpo que no se unió y de colocar la membrana contra una película de rayos X.

la incorporación de una marca radiactiva (p. ej.,  $^{125}\text{I}$ ), se lleva a cabo una autorradiografía para detectar las bandas de proteínas radiactivas (figura C4-2). En forma alternativa, el anticuerpo puede detectarse incubando la hoja con un segundo anticuerpo que reconoce al primer anticuerpo (p. ej., si el primer anticuerpo se desarrolló en conejos, el segundo anticuerpo podría ser un

anticuerpo anticonejo de cabra). El segundo anticuerpo podría ser radiomarcado y su unión detectarse por autorradiografía o se le podría conjugar una enzima que origine un producto coloreado como en la prueba ELISA (figura C4-1). Se usa una técnica similar para manchar el DNA (*Southern blotting*; sección I3) o el RNA (*Northern blotting*; sección I3).

# D1 Introducción

## Notas clave

### Las enzimas como catalizadores

Las enzimas son catalizadores que cambian la velocidad de reacción sin que cambien ellas mismas. Presentan una especificidad muy alta y su actividad puede ser regulada. Virtualmente, todas las enzimas son proteínas, aunque se han identificado algunos RNA con actividad catalítica.

### Sitio activo

El sitio activo es la región de la enzima que se une al sustrato para formar un complejo enzima-sustrato y transformarlo en un producto. El sitio activo es una entidad tridimensional, que suele ser una hendidura o grieta en la superficie de la proteína, en el cual el sustrato se une por múltiples interacciones débiles. Se han propuesto dos modelos para explicar de qué forma las enzimas se unen a sus sustratos: el modelo de llave y cerradura y el modelo de ajuste inducido.

### Especificidad por el sustrato

La especificidad de una enzima por el sustrato la determinan las propiedades y ordenamiento espacial de los residuos de aminoácidos del sitio activo.

### Clasificación de las enzimas

Las enzimas se clasifican en seis grupos principales con base en el tipo de reacción que catalizan. Cada enzima tiene un número de clasificación exclusivo.

### Ensayos enzimáticos

Un ensayo enzimático mide la conversión de un sustrato en un producto, bajo condiciones de cofactores, pH y temperatura a las cuales las enzimas alcanzan su actividad óptima. Se usan concentraciones altas de sustratos, de manera que la velocidad de reacción inicial sea proporcional a la concentración de la enzima. Se mide ya sea la velocidad de aparición del producto o la velocidad de desaparición del sustrato y para ello suele recurrirse al cambio en la absorbancia que detecta un espectrofotómetro.

### Ensayos de enzimas ligadas

Si el sustrato o el producto de una reacción catalizada por una enzima son incapaces de absorber la luz a una determinada longitud de onda, puede ensayarse la enzima y para ello se la liga a otra reacción catalizada por una enzima que no incluye un cambio en la absorbancia. La segunda enzima debe estar en exceso, de manera que el paso limitante de la velocidad en el ensayo ligado es la acción de la primera enzima.

### Coenzimas y grupos prostéticos

Algunas enzimas requieren la presencia de cofactores, que son unidades no proteínicas pequeñas, para funcionar. Los cofactores pueden ser iones inorgánicos o moléculas orgánicas complejas llamadas coenzimas. Un cofactor que está unido en forma covalente a la enzima se denomina grupo prostético. Una holoenzima es la forma catalíticamente activa de la enzima con su cofactor, mientras que una apoenzima es la parte proteínica sola. Muchas coenzimas derivan de precursores de las vitaminas dietéticas y sus deficiencias propician ciertas enfermedades.

### Isozimas

Las isozimas son formas diferentes de una enzima que catalizan la misma reacción pero que exhiben diferentes propiedades físicas o cinéticas. Las isozimas de la deshidrogenasa de lactato (LDH) pueden separarse por medio de la electroforesis y usarse en el contexto clínico para diagnosticar un infarto del miocardio.

### Temas relacionados

(A4) Imágenes celulares  
(B2) Estructura y función de las proteínas  
(D2) Termodinámica

(D3) Cinética de las enzimas  
(D4) Inhibición enzimática  
(D5) Regulación de la actividad enzimática

## Las enzimas como catalizadores

Las enzimas son **catalizadores** que incrementan la velocidad de una reacción química sin que ellas mismas cambien en el proceso. En ausencia de una enzima, la reacción casi no puede acontecer, en tanto que en su presencia la velocidad puede incrementarse hasta  $10^{17}$  veces. Por lo regular, las reacciones catalizadas por enzimas tienen lugar bajo condiciones relativamente leves (temperaturas muy por debajo de  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a la presión atmosférica y pH neutral) si se las compara con las reacciones químicas correspondientes. Las enzimas presentan también una **especificidad muy alta** por los sustratos sobre los que actúan y los productos que forman. Además, la actividad enzimática puede **regularse**, y varía en respuesta a la concentración de sustratos u otras moléculas (sección D5). Casi todas las enzimas son **proteínas**, aunque se han identificado unas pocas **moléculas de RNA (ribozimas)** con actividad catalítica.

## Sitio activo

El **sitio activo** de una enzima es la región que **une el sustrato** y lo convierte en producto. Suele ser una parte relativamente pequeña de la molécula completa de la enzima y es una **entidad tridimensional** formada por residuos de aminoácidos que pueden yacer alejados de la cadena polipeptídica lineal (sección B2). Por lo general, el sitio activo es una hendidura o grieta de la superficie enzimática que forma un ambiente predominantemente apolar, que mejora la unión del sustrato. El sustrato se une al sitio activo por **múltiples fuerzas débiles** (interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrófobas; véase la sección B2) y en algunos casos por enlaces covalentes reversibles. Una vez que la molécula de sustrato está unida y se formó un **complejo enzima-sustrato**, los residuos con actividad catalítica del sitio activo de la enzima actúan sobre la molécula de sustrato para transformarla, primero, en el complejo del estado de transición (sección D2) y luego en el producto, el cual se libera a la solución. Acto seguido, la enzima está lista para volverse a unir a otra molécula de sustrato y comenzar su ciclo catalítico otra vez.

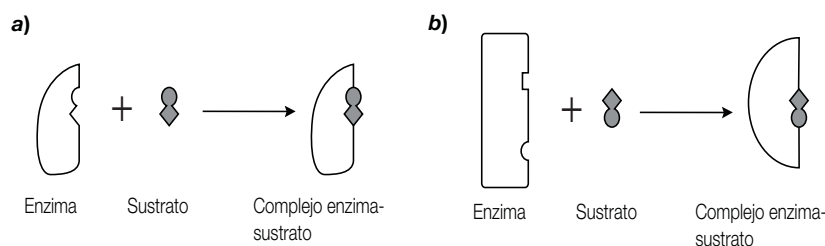
De manera original, se propusieron dos modelos para explicar de qué manera la enzima se une a su sustrato.

En el modelo de **cerradura y llave** propuesto por Emil Fischer en 1894, se pensaba que la forma del sustrato y del sitio activo de la enzima encajaban como una llave en su cerradura (figura D1-1a). Se consideraba que las dos formas eran rígidas y fijas y que se complementaban de forma perfecta una con la otra cuando se reunían en la alineación correcta (también referida como **complementariedad geométrica**). En el **modelo de ajuste inducido** propuesto por Daniel E. Koshland Jr. en 1958, la unión del sustrato **induce un cambio conformacional** en el sitio activo de la enzima (figura D1-1b). De manera adicional, la enzima puede distorsionar el sustrato y forzarlo a que adquiera una conformación similar a la del estado de transición (sección D2). Por ejemplo, la unión de **glucosa** a la **hexocinasa** induce un cambio conformacional en la estructura de la enzima en la que el sitio activo asume una forma que se complementa con la del sustrato (glucosa) sólo después de que éste se une a la enzima. Lo real es que diferentes enzimas muestran características de ambos modelos, con alguna complementariedad y algún cambio conformacional.

## Especificidad del sustrato

Las propiedades y el ordenamiento espacial de los residuos de los aminoácidos que forman el sitio activo de una enzima determinan qué moléculas pueden unirse y ser sustratos de la enzima. Por lo regular, son los cambios en relativamente unos pocos aminoácidos en el sitio activo los que determinan la **especificidad por el sustrato**. Lo anterior se ve con toda claridad en las tres enzimas digestivas **tripsina, quimotripsina y elastasa** (sección D5). Estas tres enzimas pertenecen a una familia de enzimas denominada **proteasas de serina** —“serina” porque tienen un residuo serina en el sitio activo que desempeña un papel crítico en la catálisis y ‘proteasas’ porque catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas—. Las tres enzimas dividen enlaces peptídicos en sustratos proteínicos en el lado del carboxilo de ciertos residuos de aminoácidos.

La tripsina divide en el lado del carboxilo de residuos de Lys o Arg con carga positiva, la quimotripsina divide en el lado del carboxilo de residuos de aminoácidos aromáticos e hidrófobos voluminosos y la elastasa divide en el lado del carboxilo de residuos de aminoácidos con



**Figura D1-1.** Unión de un sustrato a una enzima: a) modelo de llave y cerradura; b) modelo de ajuste inducido.

cadenas laterales pequeñas y sin carga. La naturaleza de los distintos grupos de aminoácidos en el sitio de unión del sustrato determina sus diferentes especificidades, sitios que son complementarios de los del sustrato sobre el que actúan. En consecuencia, la tripsina presenta un residuo Asp con carga negativa en su sitio de unión del sustrato que interactúa con la carga positiva de las cadenas laterales de la Lys y la Arg del sustrato (figura D1-2a). En su sitio de unión del sustrato, la quimotripsina tiene residuos de aminoácidos con cadenas laterales pequeñas como la Gly y la Ser que le dan acceso a la cadena lateral voluminosa del sustrato (figura D1-2b). En contraste, la elastasa tiene las cadenas laterales sin carga relativamente grandes de dos residuos de los aminoácidos Val que sobresalen en el sitio de unión del sustrato y que evitan el acceso de todas las cadenas laterales pequeñas de la Gly y la Ala (figura D1-2c).

### Clasificación de las enzimas

Muchas enzimas se nombran añadiendo el sufijo “-asa” al nombre de su sustrato. Por consiguiente, **ureasa** es el nombre de la enzima que cataliza la hidrólisis de la urea y la **fructosa-1,6-bisfosfatasa** hidroliza la fructosa-1,6-bisfosfato. Pese a ello, otras enzimas como la tripsina

y la quimotripsina tienen nombres que no denotan su sustrato. Algunas enzimas tienen varios nombres alternativos. Para racionalizar los nombres de las enzimas, se acordó un sistema internacional de **nomenclatura de enzimas**. Este sistema coloca a las enzimas en una de **seis clases principales** basadas en el tipo de reacción que catalizan (cuadro D1-1). De este modo, cada enzima se identifica de manera exclusiva con un número de clasificación de cuatro partes. Así, la tripsina tiene el número de la Comisión de Enzimas (EC) 3.4.21.4, en el que el primer número (3) significa que es una hidrolasa, el segundo número (4) denota que es una proteasa que hidroliza enlaces peptídicos, el tercer número (21), que es una proteasa de serina con un residuo de serina crítico en el sitio activo y el cuarto número (4) indica que fue la cuarta enzima asignada a esta clase. En comparación, la quimotripsina tiene el número EC 3.4.21.1, y la elastasa el 3.4.21.36.

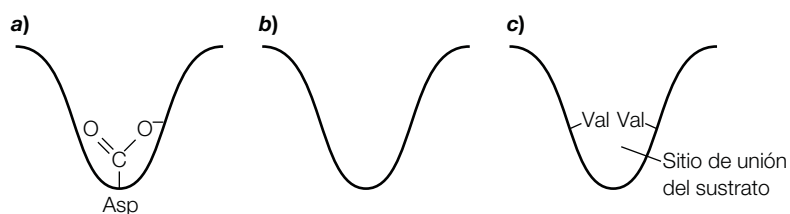
### Ensayos enzimáticos

La cantidad de proteína enzimática presente puede determinarse (**ensayarse**) en términos del efecto catalítico que produce, es decir, la conversión de sustrato en producto. Con el fin de **ensayar** (determinar la acti-

**Cuadro D1-1. Clasificación internacional de las enzimas**

| Clase | Nombre               | Tipo de reacción catalizada                                | Ejemplo  |
|-------|----------------------|--|--|
| 1     | Oxidorreductasas     | Transferencia de electrones                                | $A^- + B \rightarrow A + B^-$<br>Deshidrogenasa alcohólica |
| 2     | Transferasas         | Transferencia de grupos funcionales                        | $A-B + C \rightarrow A + B-C$<br>Hexocinasa                |
| 3     | Hidrolasas           | Reacciones de hidrólisis                                   | $A-B + H_2O \rightarrow A-H + B-OH$<br>Tripsina            |
| 4     | Liasas               | Adición o remoción de un grupo para formar un enlace doble | $A-B \rightarrow A=B + X-Y$<br>Descarboxilasa de piruvato  |
| 5     | Isomerasas           | Transferencia de grupos dentro de la misma molécula        | $A-B \rightarrow A-B$<br>Isomerasa de malato               |
| 6     | Ligasas (o sintasas) | Formación de enlaces acoplada a la hidrólisis de ATP       | $A + B \rightarrow A-B$<br>Carboxilasa de piruvato         |

ATP, trifosfato de adenosina.



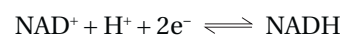
**Figura D1-2.** Representación esquemática de los sitios de unión de sustrato en las proteasas de serina: a) tripsina; b) quimotripsina; c) elastasa.



**holoenzima.** La parte proteínica sola de la enzima sin su cofactor se denomina **apoenzima**. Algunas coenzimas, como el  $\text{NAD}^+$ , están unidas y se liberan de la enzima durante su ciclo catalítico y en efecto funcionan como cosustratos. Muchas coenzimas derivan de **precursores de las vitaminas** (cuadro D1-2), los cuales suelen ser constituyentes esenciales de la dieta del organismo y en consecuencia dan origen a **enfermedades por deficiencia** cuando se produce un aporte inadecuado.

Las coenzimas **dinucleótido de adenina y nicotinamida** ( $\text{NAD}^+$ ) y **dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato** ( $\text{NADP}^+$ ) se basan en una estructura común que consiste en la base adenina, dos ribosas ligadas por grupos fosfato y un anillo de nicotinamida (figura D1-4).

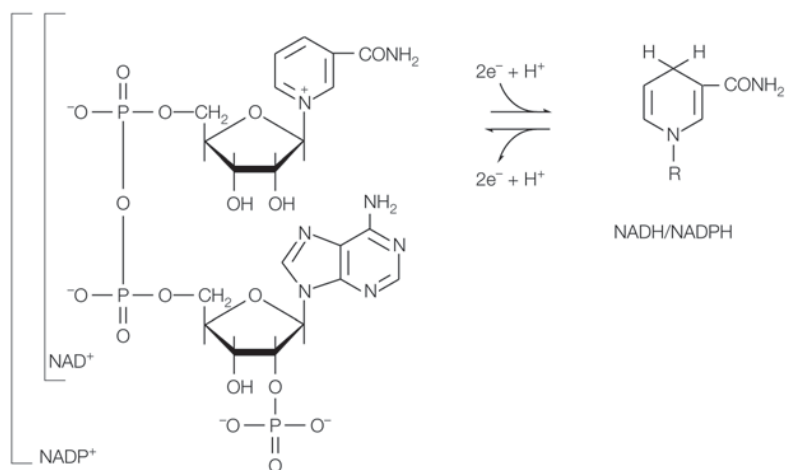
La  $\text{NADP}^+$  difiere de la  $\text{NAD}^+$  en que tiene un grupo fosfato adicional fijo a una de las ribosas (figura D1-4). Estas dos coenzimas comparten una función común ya que ambas actúan como transportadoras de electrones y participan en las **reacciones de oxidorreducción**. La  $\text{NAD}^+$  es de empleo más común en las reacciones **catabólicas** (degradativas), mientras que la  $\text{NADP}^+$  interviene más en las reacciones **anabólicas** (biosintéticas). La parte reactiva de ambas moléculas es el **anillo de nicotinamida**, el cual existe en un estado oxidado o reducido y debido a ello actúa como aceptor o donador de electrones en una reacción enzimática. La reacción también incluye la transferencia de protones, de acuerdo con la ecuación:



**Cuadro D1- 2. Algunas coenzimas comunes, sus vitaminas precursoras y las enfermedades que produce su deficiencia**

| Coenzima                         | Precursor                              | Enfermedad que provoca su deficiencia                                    |
|----------------------------------|--|--|
| Coenzima A                       | Ácido pantoténico                      | Hipertensión   |
| FAD, FMN                         | Riboflavina (vitamina B <sub>2</sub> ) | Dermatitis   |
| $\text{NAD}^+$ , $\text{NADP}^+$ | Niacina (ácido nicotínico)             | Pelagra (dermatitis, depresión, diarrea)                                 |
| Pirofosfato de tiamina           | Tiamina (vitamina B <sub>1</sub> )     | Beriberi (pérdida de peso, trastornos cardiacos, disfunción neurológica) |
| Tetrahidrofolato                 | Ácido fólico                           | Anemia, defectos del tubo neural en desarrollo                           |
| Desoxiadensilcobalamina          | Cobalamina (vitamina B <sub>12</sub> ) | Anemia perniciosa  |
| –                                | Vitamina C (ácido ascórbico)           | Escorbuto (encías tumefactas y sangrantes, hemorragias subdérmicas)      |
| Fosfato de piridoxal             | Piridoxina (vitamina B <sub>6</sub> )  | Depresión, confusión, convulsiones                                       |

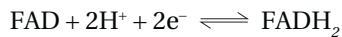
FAD, dinucleótido de adenina y flavina; FMN, mononucleótido de flavina;  $\text{NAD}^+$ , dinucleótido de adenina y nicotinamida;  $\text{NADP}^+$ , dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato.



**Figura D1-4.** Estructuras de las coenzimas  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ .



El **dinucleótido de adenina y flavina** (FAD) y el **mononucleótido de flavina** (FMN) son asimismo transportadores de electrones y presentan estructuras químicas relacionadas (figura D1-5). Ambas coenzimas constan de una **unidad de mononucleótido de flavina**, que es la que contiene el sitio activo. La FAD tiene un azúcar adicional y una base adenina, que completan su estructura. La FAD y la FMN reaccionan con dos protones, así como con dos electrones, en alternancia entre el estado reducido y el oxidado:



### Isozimas

Las isozimas (isoenzimas) son formas diferentes de una enzima que **catalizan la misma reacción**, pero que exhiben **diferentes propiedades físicas o cinéticas**, como el punto isoelectrico, el pH óptimo, la afinidad por el sustrato o el efecto de los inhibidores. Diferentes formas de isozimas de una determinada enzima derivan por lo general de genes distintos y suelen encontrarse en diferentes tejidos del cuerpo.

Un ejemplo de una enzima que presenta diferentes formas de isozimas es la **deshidrogenasa de lactato** (LDH), que cataliza la conversión reversible de lactato en piruvato en presencia de la coenzima NADPH (véase antes). La LDH es un tetrámero de dos tipos distintos de **subunidades**, llamadas H y M, las cuales exhiben

pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos. Las dos subunidades pueden combinarse al azar entre ellas y formar cinco isozimas que tienen las composiciones  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_3\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{M}_2$ ,  $\text{HM}_3$  y  $\text{M}_4$ . Las cinco isozimas se pueden resolver por medio de la electroforesis (sección C2). Las subunidades M predominan en el músculo esquelético y el hígado, en tanto que las subunidades H predominan en el corazón. Las subunidades  $\text{H}_4$  y  $\text{H}_3\text{M}$  son predominantes en el corazón y los glóbulos rojos,  $\text{H}_2\text{M}_2$  se encuentra sobre todo en el cerebro, mientras que  $\text{HM}_3$  y  $\text{M}_4$  son más frecuentes en el hígado y el músculo esquelético. Lo anterior deja ver que el patrón de isozimas es característico de un tejido en particular, un factor de una inmensa importancia diagnóstica para la medicina. El **infarto del miocardio**, la **hepatitis infecciosa** y las **enfermedades musculares** incluyen la muerte celular en el tejido afectado, con liberación del contenido celular a la sangre. Como la LDH es una proteína citosólica soluble, se libera con facilidad en las afecciones anteriores. En circunstancias normales, hay poca LDH en sangre. Por tanto, el patrón de isozimas LDH en la sangre es indicativo del tejido que las liberó y de esta manera puede utilizarse para diagnosticar una afección y para vigilar el progreso del tratamiento. Para el **diagnóstico clínico** del infarto del miocardio, además del patrón de isozimas LDH, se miden de rutina otras enzimas, como la **cinasa de creatina** y la **aminotransferasa de aspartato**, junto con un electrocardiograma (ECG).

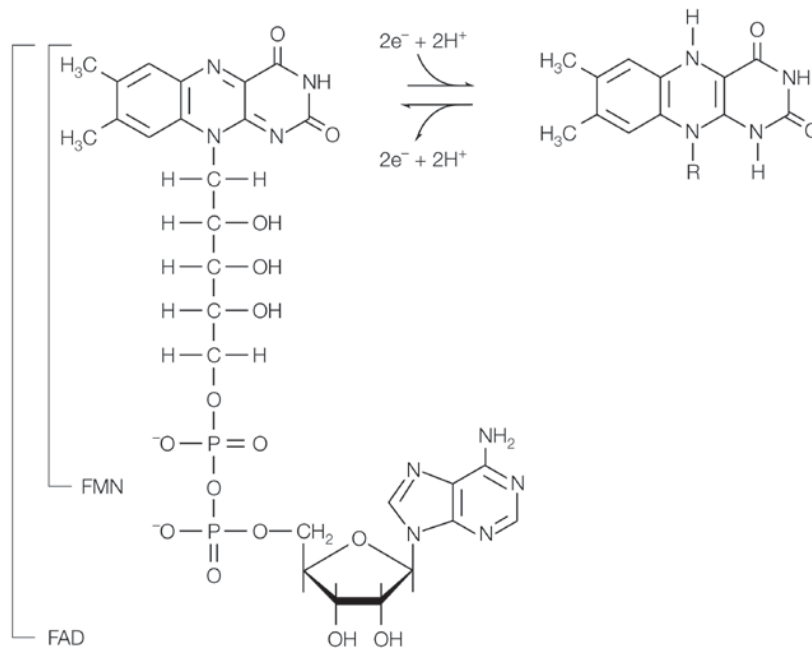


Figura D1-5. Estructuras de las coenzimas FAD y FMN.

# D2 Termodinámica

## Notas clave

### Termodinámica

El conocimiento de la termodinámica, que describe la interrelación entre las diversas formas de energía y de qué manera ésta afecta la materia, permite determinar si un proceso físico es posible. La primera y segunda leyes de la termodinámica están combinadas en la función de la termodinámica, la energía libre ( $G$ ). La unidad de energía es el Julio (J) o la caloría (cal).

### Energía de activación y estado de transición

Para que una reacción química tenga lugar, debe superarse la barrera de energía necesaria para transformar las moléculas del sustrato a su estado de transición. El estado de transición tiene la energía libre más alta de una reacción. La diferencia en energía libre entre el sustrato y el estado de transición se llama energía libre de activación de Gibbs ( $\Delta G^\ddagger$ ). Una enzima estabiliza el estado de transición y reduce la ( $\Delta G^\ddagger$ ) y de ese modo incrementa la velocidad a la que sucede la reacción.

### Cambio de energía libre

La diferencia en el nivel de energía entre los sustratos y los productos se denomina cambio en la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ). Una  $\Delta G$  negativa indica que la reacción es favorable desde la perspectiva termodinámica de la dirección más conveniente de la misma, mientras que una  $\Delta G$  positiva indica que la reacción es desfavorable desde la perspectiva termodinámica y requiere un aporte de energía para que evolucione en la dirección conveniente. Una reacción desfavorable desde el punto de vista energético obedece con frecuencia a que la misma se liga a una reacción favorable desde el punto de vista energético, como la de la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP).

### Equilibrios químicos

De manera habitual, una reacción química existe en estado de equilibrio dinámico. La constante de equilibrio ( $K$ ) define la relación de las concentraciones de sustrato y de producto en equilibrio. Las enzimas no modifican la posición de equilibrio, pero aceleran la consecución de la posición de equilibrio al acelerar las reacciones hacia delante y hacia atrás.

### Temas relacionados

(D1) Introducción a las enzimas

(D3) Cinética de las enzimas

(D4) Inhibición enzimática

(D5) Regulación de la actividad enzimática

## Termodinámica

El conocimiento de la termodinámica permite determinar si un proceso físico es posible y se requiere para comprender por qué las proteínas se pliegan en su conformación nativa, por qué algunas reacciones catalizadas por enzimas requieren un aporte de energía, cómo los músculos generan la fuerza mecánica, entre tantas más. La **termodinámica** (de las palabras griegas *therme*, calor y *dynamis*, poder) es la descripción de la interrelación entre las diferentes formas de energía y de qué forma la energía afecta la materia a nivel macroscópico. Como se aplica a la bioquímica, la termodinámica se interesa con frecuencia en describir las condiciones bajo las cuales los procesos se producen de manera espontánea (por sí mismos).

En la termodinámica, un **sistema** es la materia dentro de una región definida. La materia del resto del universo se

denomina el **entorno**. La **primera ley de la termodinámica**, una declaración matemática de la ley de conservación de la energía, establece que la energía total de un sistema y su entorno es una constante:

$$\Delta E = E_B - E_A = Q - W$$

en la cual  $E_A$  es la energía del sistema al comienzo del proceso y  $E_B$ , al final del proceso. Por su parte,  $Q$  es el calor absorbido por el sistema y  $W$  es el trabajo efectuado por el sistema. El cambio en la energía de un sistema depende sólo de los estados inicial y final y no de la forma en que se alcanza dicho estado. Los procesos en los cuales el sistema libera calor (es decir que tiene una  $Q$  negativa) se conocen como procesos **exotérmicos** y aquéllos en los que el sistema gana calor (es decir que tienen una  $Q$  positiva) se conocen como **endotérmicos**.

La **unidad de energía** del SI es el Julio (J), aunque la caloría (cal) todavía se usa con frecuencia (1 kcal = 4.184 kJ).

La primera ley de la termodinámica no puede usarse para predecir si una reacción puede suceder de manera espontánea ya que algunas reacciones espontáneas tienen una  $\Delta E$  positiva. Por tanto, se requiere una función de  $\Delta E$  diferente. Una de tales funciones es la **entropía** ( $S$ ), la cual es una medida del grado de imprevisibilidad o desorden de un sistema. La entropía de un sistema se incrementa ( $\Delta S$ ) es positiva cuando el sistema se desordena más. La **segunda ley de la termodinámica** establece que un proceso puede producirse de forma espontánea sólo si la suma de las entropías del sistema y de su entorno aumenta (o que el universo tiende al desorden máximo), esto es:

$$(\Delta S_{\text{sistema}} + \Delta S_{\text{entorno}}) > 0 \text{ para un proceso espontáneo.}$$

Sin embargo, usar la entropía como criterio para saber si un proceso bioquímico puede ocurrir en forma espontánea es difícil porque los cambios entrópicos de las reacciones químicas no son fáciles de medir y debe conocerse el cambio entrópico del sistema y de su entorno. Estas dificultades se resuelven al usar una función termodinámica diferente, la **energía libre** ( $G$ ), propuesta por Josiah Willard Gibbs, la cual combina la primera y la segunda leyes de la termodinámica:

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

en la cual  $\Delta G$  es la energía libre de un sistema que sufre una transformación a una presión ( $P$ ) y una temperatura ( $T$ ) constantes,  $\Delta H$  es el cambio en la **entalpía** (contenido de calor) del sistema, y  $\Delta S$  es el cambio en la entropía del sistema. El cambio de entalpía está dado por:

$$\Delta H = \Delta E + P\Delta V.$$

El cambio de volumen ( $\Delta V$ ) es escaso en casi todas las reacciones bioquímicas y por ello  $\Delta H$  es casi igual a  $\Delta E$ . Por consiguiente:

$$\Delta G = \Delta E - T\Delta S.$$

Así, la  $\Delta G$  de una reacción depende del cambio de energía interno y del cambio de la entropía del sistema. El

cambio de la energía libre  $\Delta G$  de una reacción es un criterio valioso para saber si esa reacción puede ocurrir de manera espontánea:

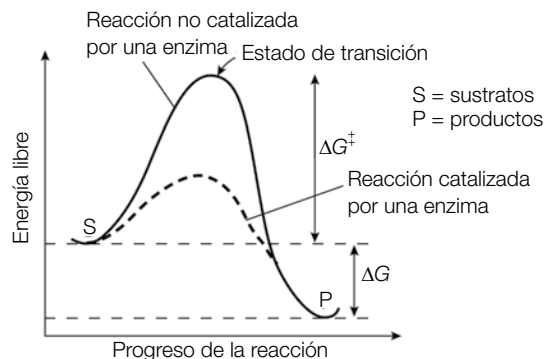
- Una reacción puede suceder de manera espontánea sólo si  $\Delta G$  es negativa
- Un sistema está en equilibrio si la  $\Delta G$  es cero
- Una reacción no se puede producir de manera espontánea si la  $\Delta G$  es positiva. Se necesita un aporte de energía para impulsar una reacción
- La  $\Delta G$  de una reacción es independiente de la vía de la transformación
- La  $\Delta G$  no proporciona información acerca de la velocidad de una reacción

### Energía de activación y estado de transición

Los cambios de energía que tienen lugar durante el curso de una reacción bioquímica particular se muestran en la figura D2-1. En todas las reacciones, existe una **barrera de energía** que debe superarse para que la reacción tenga lugar. Ésta es la energía necesaria para transformar las moléculas del sustrato y llevarlas al **estado de transición** —una forma química parcialmente inestable entre los sustratos y los productos—. El estado de transición ostenta la **energía libre más alta** de cualquier componente de la reacción. La **energía de activación libre de Gibbs** ( $\Delta G^\ddagger$ ) es igual a la diferencia en energía libre entre el estado de transición y el sustrato (figura D2-1). Una enzima trabaja mediante la **estabilización del estado de transición** de una reacción química y por reducción de la  $\Delta G^\ddagger$  (figura D2-1). La enzima no altera los niveles de energía de los sustratos o los productos. Por consiguiente, una enzima incrementa la velocidad a la cual sucede la reacción, pero carece de efecto en el cambio total de energía de la reacción.

### Cambio de energía libre

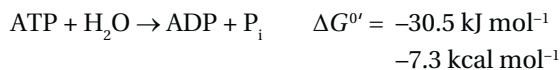
El cambio en la **energía libre de Gibbs** ( $\Delta G$ ) determina si una reacción será favorable o no desde el punto de



**Figura D2-1.** Los cambios energéticos tienen lugar durante el curso de una reacción bioquímica.

vista energético. La figura D2-1 muestra un ejemplo en el que el cambio en la energía total de la reacción la hace favorable desde el punto de vista energético (esto es, los productos están en un nivel de energía más bajo que los sustratos y la  $\Delta G$  es negativa). Es necesario destacar que la  $\Delta G$  no guarda relación con la  $\Delta G^\ddagger$ . La  $\Delta G$  de una reacción es independiente de la vía de la reacción y no suministra información sobre la velocidad de la reacción ya que ésta depende de  $\Delta G^\ddagger$ . Una  $\Delta G$  negativa indica que la reacción es favorable desde la perspectiva termodinámica y en que va en la dirección indicada (es decir, es probable que ocurra sin un aporte de energía), mientras que una  $G$  positiva indica que la reacción es desfavorable desde la perspectiva termodinámica y requiere un **aporte de energía** para proseguir en la dirección indicada. En los sistemas bioquímicos, este aporte de energía se logra con frecuencia al **acoplar** una reacción energéticamente desfavorable con otra más favorable desde el punto de vista energético (**reacciones acopladas**).

Suele resultar conveniente referirse a la  $\Delta G$  bajo un conjunto estándar de condiciones, definidas como cuando los sustratos y productos de una reacción están presentes a concentraciones de 1.0 M y la reacción tiene lugar a un pH constante de 7.0. Bajo estas condiciones, se encuentra un valor ligeramente favorable de  $\Delta G$  que se denomina  $\Delta G^\circ$ . Un ejemplo de una reacción favorable desde el punto de vista energético, que tiene una gran  $\Delta G^\circ$  negativa y se usa de manera habitual para dirigir reacciones menos favorables desde el punto de vista energético, es la hidrólisis del **trifosfato de adenosina** (ATP; figura D2-2) para formar difosfato de adenosina (ADP) y fosfato inorgánico libre ( $P_i$ ):

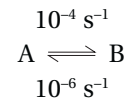


## Equilibrios químicos

De manera habitual, una reacción química existe en un estado de **equilibrio dinámico**, donde a pesar de que nuevas moléculas de sustrato y producto se están

transformando y formando de manera continua, el cociente entre sustrato y producto se conserva en un valor constante.

Considérese la reacción:



donde la velocidad de reacción hacia delante es de  $10^{-4}$  por segundo ( $\text{s}^{-1}$ ) y la velocidad de reacción hacia atrás es de  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ . En equilibrio, el cociente de las concentraciones del sustrato y el producto da un valor constante, conocido como **constante de equilibrio (K)**. La constante de equilibrio para una reacción determinada se define como:

$$K = \frac{[\text{productos}]_{\text{eq}}}{[\text{reactantes}]_{\text{eq}}} = \frac{[\text{B}]_{\text{eq}}}{[\text{A}]_{\text{eq}}}$$

donde los corchetes indican concentración. La constante de equilibrio también es dada por el cociente entre la velocidad de reacción hacia delante ( $k_f$ ) y la velocidad de reacción hacia atrás ( $k_b$ ):

$$K = \frac{k_f}{k_b} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100$$

Por consiguiente, para las reacciones en equilibrio de arriba, hay 100 veces más de producto B que de sustrato A, con prescindencia de que haya enzima presente o no. Lo anterior se debe a que las enzimas no alteran la posición de equilibrio de una reacción, porque aceleran las reacciones hacia delante y hacia atrás en la misma extensión. En otras palabras, **las enzimas aceleran la consecución de la posición de equilibrio**, pero no desvían su posición. En el caso de la reacción hipotética que se muestra arriba, en ausencia de la enzima añadida, la reacción puede tomar más de una hora para alcanzar la posición de equilibrio, mientras que en presencia de la enzima la posición de equilibrio puede lograrse en menos de un segundo.

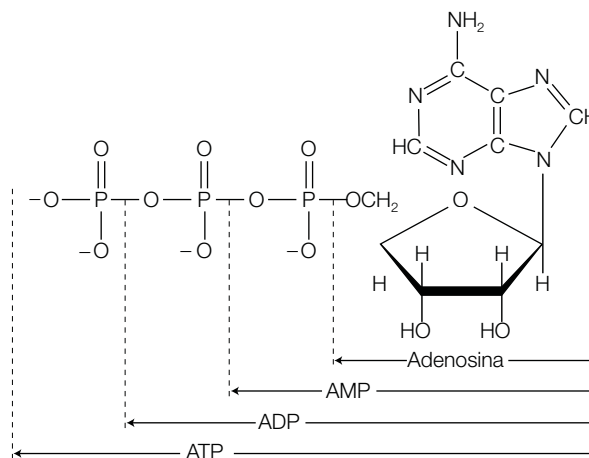


Figura D2-2. Estructura del ATP, ADP, AMP y la adenosina.

# D3 Cinética enzimática

## Notas clave

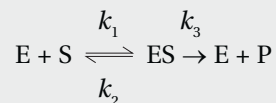
**Velocidad enzimática** De manera habitual, la actividad enzimática se expresa por la velocidad inicial ( $V_0$ ) de la reacción que está catalizando. Las unidades de  $V_0$  son  $\mu\text{mol min}^{-1}$ , las cuales también pueden representarse por la unidad (U) de la enzima, donde  $1 \mu\text{mol min}^{-1} = 1 \text{ U}$ . El término actividad (o actividad total) se refiere a las unidades totales de enzima en una muestra, en tanto que la actividad específica es el número de unidades por miligramo de proteína (unidades  $\text{mg}^{-1}$ ).

**Sustrato y concentración de la enzima** A concentraciones de sustrato ([S]) bajas, una duplicación de [S] conduce a duplicar  $V_0$ , mientras que a [S] más altas la enzima se satura y no se producen incrementos adicionales de  $V_0$ . Una gráfica de  $V_0$  contra [S] da una curva hiperbólica. Cuando [S] está saturada, una duplicación de la concentración de la enzima lleva a una duplicación de  $V_0$ .

**Temperatura** La temperatura afecta la velocidad de una reacción catalizada por una enzima al aumentar la energía térmica de las moléculas de sustrato. Esto incrementa la proporción de moléculas con energía suficiente para superar la barrera de activación y por consiguiente incrementa la velocidad de la reacción. Además, la energía térmica de las moléculas que componen la enzima aumenta, lo que conduce a una velocidad mayor de desnaturalización de la proteína enzimática debido a la rotura de las interacciones no covalentes que mantienen la estructura unida.

**pH** Cada enzima tiene un pH óptimo al cual la velocidad de la reacción que cataliza se encuentra al máximo. Pequeñas desviaciones del pH desde el óptimo llevan a una disminución de la velocidad de la reacción. Mayores desviaciones del pH conducen a la desnaturalización de la enzima debido a cambios en la ionización de los residuos de aminoácidos y a la rotura de las interacciones no covalentes.

**Modelo de Michaelis-Menten** El modelo de Michaelis-Menten usa el siguiente concepto de catálisis enzimática:



donde las constantes de velocidad  $k_1$ ,  $k_2$  y  $k_3$  describen las velocidades que corresponden a cada paso del proceso catalítico. A una [S] baja,  $V_0$  es directamente proporcional a [S], mientras que a una [S] alta la velocidad tiende a la velocidad máxima ( $V_{\text{máx}}$ ). La ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

describe estas observaciones y predice una curva hiperbólica de  $V_0$  contra [S]. La constante de Michaelis,  $K_m$ , es igual a la suma de las velocidades de rotura del complejo enzima-sustrato sobre su velocidad de formación y es una medida de la afinidad de una enzima por su sustrato.

**Gráfica de Lineweaver-Burk**  $V_{\text{máx}}$  y  $K_m$  pueden determinarse por medios experimentales si se mide  $V_0$  a diferentes concentraciones del sustrato y luego se grafica  $1/V_0$  contra  $1/[S]$  en una doble gráfica recíproca de Lineweaver-Burk. La intersección del eje y es igual a  $1/V_{\text{máx}}$ , la intersección del eje x es igual a  $-1/K_m$  y la inclinación de la línea es igual a  $K_m/V_{\text{máx}}$ .

**Temas relacionados**

(B2) Estructura y función de las proteínas  
(D1) Introducción a las enzimas  
(D2) Termodinámica

(D4) Inhibición enzimática  
(D5) Regulación de la actividad enzimática

**Velocidad enzimática**

La tasa de una reacción catalizada por una enzima se denomina con frecuencia su velocidad. Las velocidades de las enzimas se reportan de manera habitual como valores en tiempo cero (**velocidad inicial**, símbolo  $V_0$ ;  $\mu\text{mol min}^{-1}$ ), ya que la velocidad se acelera en el punto donde todavía no hay producto presente. Esto es así debido a que la concentración de sustrato es mayor antes de que cualquier sustrato se haya transformado en producto, porque las enzimas pueden ser sujeto de **inhibición por retroalimentación** por sus propios productos, porque con una reacción reversible los productos impulsarán la reacción hacia atrás, o ambas cosas. De manera experimental,  $V_0$  se mide antes de que alrededor de 10% del sustrato se haya convertido en el producto con el fin de minimizar tales factores de complicación. Una **gráfica de producto formado contra tiempo** típica de una reacción catalizada por una enzima muestra un periodo inicial de formación rápida del producto, la cual da la porción lineal de la gráfica (figura D3-1). Esto es seguido por una inclinación hacia abajo de la velocidad de la enzima a medida que el sustrato se usa o que la enzima pierde actividad o ambas. La  $V_0$  se obtiene al dibujar una línea recta a través de la parte lineal de la curva que comience en el punto temporal cero (figura D3-1). La inclinación de esta línea recta es igual a  $V_0$ .

**Unidades enzimáticas**

La actividad enzimática puede expresarse en varias formas. La más común es por la velocidad inicial ( $V_0$ ) de la reacción que está catalizando (es decir,  $\mu\text{mol}$  de sustrato transformado por minuto;  $\mu\text{mol min}^{-1}$ ). También hay una unidad estándar de actividad enzimática, la **unidad enzima (U)**. Una unidad enzima es la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto a 25 °C bajo condiciones óptimas para la enzima (es decir,  $1 \mu\text{mol min}^{-1} = 1 \text{ U}$ ). El término

**actividad** (o **actividad total**) se refiere a las unidades totales por miligramo de proteína (unidades  $\text{mg}^{-1}$ ). La **actividad específica** es una medida de la pureza de una enzima; durante la purificación de la enzima, su actividad específica se incrementa y se vuelve máxima y constante cuando la enzima es pura.

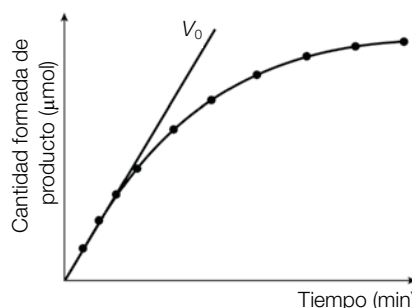
**Sustrato y concentración enzimática**

El patrón normal de dependencia de la velocidad de la enzima de la **concentración de sustrato** [S] es tal que, a concentraciones bajas de sustrato, la duplicación de [S] conduce a la duplicación de la velocidad inicial ( $V_0$ ). Sin embargo, a concentraciones más altas del sustrato la enzima se **satura** y los incrementos adicionales de [S] llevan a cambios escasos en la  $V_0$ . Lo anterior sucede debido a que, a concentraciones saturantes de sustrato, todas las moléculas de la enzima están efectivamente unidas al sustrato. Ahora, la velocidad global de la enzima depende de la velocidad a la cual el producto puede disociarse de la enzima y la adición adicional de sustrato no la modificará. La forma de la gráfica resultante cuando  $V_0$  se representa contra [S] se llama **curva hiperbólica** (figura D3-2).

En situaciones en las que concentración de sustrato es saturante (es decir, cuando todas las moléculas de enzima están unidas al sustrato), una duplicación de la **concentración de la enzima** conduce a duplicar la  $V_0$ . Esto produce una gráfica de línea recta, cuando  $V_0$  se representa contra la concentración de la enzima.

**Temperatura**

La **temperatura** afecta la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas de dos formas. Primero, un aumento de la temperatura incrementa la **energía térmica** de las moléculas del sustrato. Ello aumenta la proporción de moléculas del sustrato con energía suficiente



**Figura D3-1.** Interrelación entre la formación del producto y el tiempo para una reacción catalizada por una enzima.

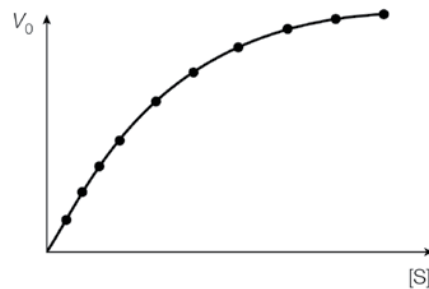


Figura D3-2. Interrelación entre  $[S]$  y  $V_0$ .

para superar la energía libre de Gibbs de activación ( $\Delta G^\ddagger$ ) (sección D2) y así incrementar la velocidad de la reacción. No obstante, un segundo elemento entra en juego a temperaturas más altas. El aumento de la energía térmica de las moléculas que forman la estructura proteínica de la enzima en sí mismo eleva las posibilidades de romper las múltiples interacciones débiles y no covalentes (enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, etc.), las cuales mantienen la estructura tridimensional de la enzima junta (sección B2). En última instancia, lo anterior lleva a la **desnaturalización** (desplegamiento) de la enzima, pero incluso pequeños cambios en la forma tridimensional de la enzima pueden alterar el sitio activo y conducir a una disminución de la actividad catalítica. El efecto total de un aumento en la temperatura en la velocidad de la reacción de la enzima es un balance entre estos dos efectos opuestos. Una gráfica de la temperatura trazada contra la  $V_0$  mostrará en consecuencia una curva, con una bien definida temperatura óptima (figura D3-3a). Para muchas enzimas de los mamíferos, ésta ronda los 37 °C, pero hay algunos organismos que tienen enzimas adaptadas que trabajan a temperaturas considerablemente más altas o más bajas. Por ejemplo, la **polimerasa Taq**, que se usa en la reacción en cadena de la polimerasa (sección I6), se encuentra en una bacteria que vive a altas temperaturas en aguas termales y por tanto está adaptada para trabajar de manera óptima a altas temperaturas.

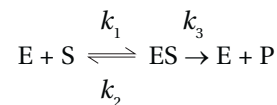
## pH

Cada enzima tiene su **pH óptimo** al cual la velocidad de la reacción que cataliza se encuentra al máximo.

Pequeñas desviaciones del pH desde el valor óptimo llevan a que la actividad disminuya debido a cambios en la ionización de los grupos del sitio activo de la enzima. Grandes desviaciones del pH conducen a la **desnaturalización** de la proteína de la enzima en sí misma debido a la interferencia con los numerosos enlaces débiles no covalentes que mantienen su estructura tridimensional. Una gráfica de  $V_0$  trazada contra el pH muestra por lo general una curva en forma de campana (figura D3-3b). Muchas enzimas tienen un pH óptimo de alrededor de 6.8, pero existe una gran diversidad en el pH óptimo de las enzimas debido a los diferentes ambientes a los que se adaptan para trabajar. Por ejemplo, la enzima digestiva **pepsina** está adaptada a trabajar en el pH ácido del estómago (alrededor de pH 2.0).

## Modelo de Michaelis-Menten

El **modelo de Michaelis-Menten** usa el siguiente concepto de catálisis enzimática:



La enzima (E) se combina con su sustrato (S) para formar el **complejo enzima-sustrato** (ES). El complejo ES puede disociarse para dar origen otra vez a E+S o puede proceder de forma química para formar E y el producto P. Las **constantes de velocidad**  $k_1$ ,  $k_2$  y  $k_3$  describen las velocidades inherentes a cada paso del proceso catalítico. Se asume que no existe velocidad significativa para que la reacción hacia atrás de enzima y producto (E+P)

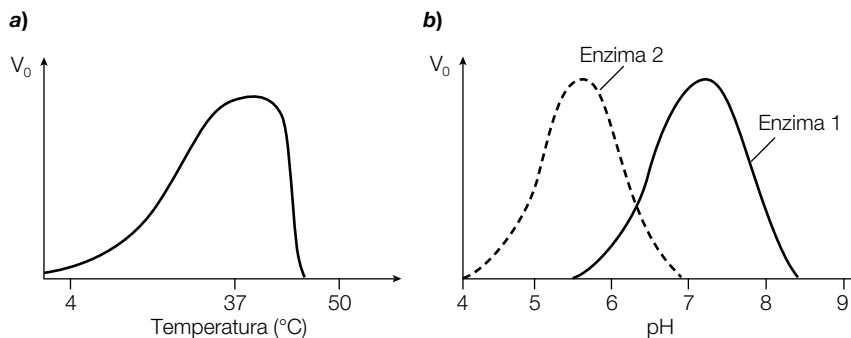


Figura D3-3. Efecto de la a) temperatura y b) el pH sobre la actividad enzimática.

los convierta en el complejo ES. El [ES] permanece aproximadamente constante hasta que se consume casi todo el sustrato, por lo que la tasa de síntesis de ES se equipara con su tasa de consumo durante la mayor parte del curso de la reacción, es decir que [ES] se mantiene en un **estado estable**. A partir de la observación de las propiedades de muchas enzimas se supo que la velocidad inicial ( $V_0$ ) a bajas concentraciones de sustrato es directamente proporcional a [S], en tanto que a concentraciones altas de sustrato la velocidad tiene a alcanzar su valor máximo, que es la velocidad que se vuelve independiente de [S] (figura D3-4a). Esta velocidad máxima se llama  $V_{\text{máx}}$  (unidades de  $\mu\text{mol min}^{-1}$ ). La **velocidad inicial** ( $V_0$ ) es la velocidad medida de manera experimental antes de que más de alrededor de 10% del sustrato se convierta en producto con el fin de minimizar factores que complican, como los efectos de las reacciones reversibles, la inhibición de la enzima por el producto y la inactivación progresiva de la enzima (véase antes).

Michaelis y Menten elaboraron una ecuación que describe estas observaciones, la **ecuación de Michaelis-Menten**:

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}} \cdot [\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

La ecuación describe una **curva hiperbólica** del tipo de la que se muestra para los datos experimentales en la figura D3-1. Mientras resolvían la ecuación, Michaelis y Menten definieron una nueva constante,  $K_m$ , la **constante de Michaelis** [unidad: Molar (es decir, por mol), M]:

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

La  $K_m$  es una medida de la **estabilidad del complejo ES**, que es igual a la suma de las velocidades de rotura del ES sobre su velocidad de formación. Para muchas enzimas,  $k_2$  es mucho mayor que  $k_3$ . Bajo esas circunstancias,  $K_m$  se convierte en una medida de la **afinidad** de una enzima por su sustrato ya que su valor depende de los valores relativos de  $k_1$  y  $k_2$  para la formación y disociación de ES, respectivamente. Una  $K_m$  alta significa unión

al sustrato débil ( $k_2$  predomina sobre  $k_1$ ), una  $K_m$  baja significa unión al sustrato fuerte ( $k_1$  predomina sobre  $k_2$ ). En la mayoría de las enzimas,  $K_m$  se ubica entre  $10^{-1}$  y  $10^{-7}$  M. La  $K_m$  puede determinarse de forma experimental por el hecho de que su valor equivale a la concentración del sustrato a la cual la velocidad es igual a la mitad de la  $V_{\text{máx}}$ .

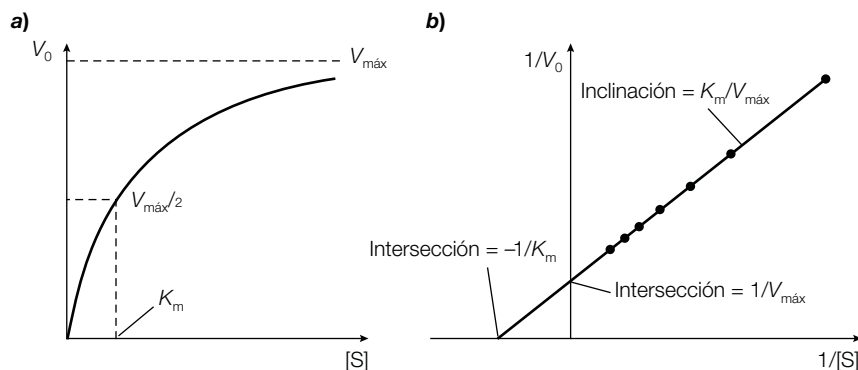
### Gráfica de Lineweaver-Burk

Debido a que la  $V_{\text{máx}}$  se alcanza a infinitas concentraciones de sustrato, es imposible estimarla (y en consecuencia la  $K_m$ ) si se parte de una gráfica hiperbólica, como se muestra en la figura D3-4a. Pese a ello, la  $V_{\text{máx}}$  y la  $K_m$  pueden determinarse de manera experimental si se mide la  $V_0$  a diferentes concentraciones del sustrato (figura D3-1). Por consiguiente, se hace una gráfica **recíproca doble** o gráfica de **Lineweaver-Burk** de  $1/V_0$  contra  $1/[\text{S}]$  (figura D3-4b). De manera alternativa, puede utilizarse un programa de computadora apropiado de ajuste de curvas con los datos de la figura D3-4a. La gráfica de Lineweaver-Burk es una derivación de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{\text{máx}}} + \frac{K_m}{V_{\text{máx}}} \cdot \frac{1}{[\text{S}]}$$

la cual da una línea recta, con la **intersección en el eje de la y igual a  $1/V_{\text{máx}}$** , y la **intersección en el eje de la x igual a  $-1/K_m$** . La inclinación de la línea es igual a  $K_m/V_{\text{máx}}$  (figura D3-4b). La gráfica de Lineweaver-Burk es también una forma útil de determinar de qué manera un inhibidor se une a una enzima (sección D4). La  $K_m$  y la  $V_{\text{máx}}$  también pueden determinarse por medio de una **gráfica de Eadie-Hofstee** de  $V_0/[\text{S}]$  contra  $V_0$ , donde la intersección en el eje de la x es igual a  $V_{\text{máx}}$  y la inclinación de la línea es igual a  $-1/K_m$ .

Aunque el modelo de Michaelis-Menten proporciona un muy buen modelo de los datos experimentales de muchas enzimas, unas pocas enzimas no satisfacen la cinética de Michaelis-Menten. Estas enzimas, como la transcarbamoilasa de aspartato, se llaman **enzimas alostéricas** (sección D5).



**Figura D3-4.** Interrelación entre [S] y  $V_0$ : a) gráfica directa; b) gráfica doble recíproca de Lineweaver-Burk.



# D4 Inhibición enzimática

|   |  |
|---|--|
| <b>Notas clave</b>                          |  |
| <b>Inhibición enzimática</b>                | Las moléculas inhibitoras pueden reducir la velocidad catalítica de una enzima. Existen muchos inhibidores, como los metabolitos normales del cuerpo, fármacos y toxinas externas. La inhibición enzimática puede ser de dos tipos principales: irreversible o reversible. La inhibición reversible se puede subdividir en competitiva y no competitiva.   |
| <b>Inhibición irreversible</b>              | Un inhibidor irreversible se une de forma estrecha, con frecuencia mediante enlaces covalentes, a los residuos de aminoácidos del sitio activo de la enzima, y al hacerlo inactiva de modo permanente a la enzima. Son ejemplos de inhibidores irreversibles el diisopropilfosfofluoridato (DIPF), la yodoacetamida, la aspirina y la penicilina.  |
| <b>Inhibición competitiva reversible</b>    | Un inhibidor competitivo le disputa el sitio activo de la enzima a las moléculas de sustrato. A concentraciones altas del sustrato, puede superarse el efecto de un inhibidor competitivo. En la gráfica de Lineweaver-Burk, se puede ver que un inhibidor competitivo incrementa la $K_m$ , pero deja la $V_{máx}$ sin cambio.  |
| <b>Inhibición no competitiva reversible</b> | Un inhibidor no competitivo se une a la enzima en un sitio diferente al sitio activo, y no obstante disminuye su velocidad catalítica porque modifica la conformación tridimensional de la enzima. El efecto de un inhibidor no competitivo no puede superarse ni con altas concentraciones del sustrato. En la gráfica de Lineweaver-Burk, se puede ver que un inhibidor no competitivo disminuye la $V_{máx}$ , pero deja la $K_m$ sin cambio. |
| <b>Temas relacionados</b>                   | (D1) Introducción a las enzimas<br>(D3) Cinética enzimática<br>(D5) Regulación de la actividad enzimática  |

## Inhibición enzimática

Existen muchos tipos de moléculas que son capaces de interferir con la actividad de una enzima. Cualquier molécula que actúe en forma directa sobre una enzima y disminuya la velocidad de su actividad catalítica se denomina **inhibidor**. Algunos inhibidores enzimáticos son metabolitos normales del cuerpo que inhiben una enzima particular como parte del control metabólico normal de una vía. Otros inhibidores pueden ser sustancias externas como los fármacos o las toxinas, de donde el efecto del inhibidor enzimático puede ser terapéutico o, en el otro extremo, letal. La inhibición enzimática puede ser de dos tipos principales: **irreversible** o **reversible**. La variedad reversible puede a su vez subdividirse en **inhibición competitiva** e **inhibición no competitiva**. La inhibición reversible puede superarse si se remueve al inhibidor de la enzima por diálisis, por ejemplo (sección C1), pero es imposible hacerlo en la inhibición irreversible, por definición.

## Inhibición irreversible

Los inhibidores que se unen de modo irreversible a una enzima forman con frecuencia un **enlace covalente**

con un residuo aminoácido reactivo situado en el sitio activo o cerca de éste, e inactivan en forma permanente la enzima. Los residuos de aminoácidos susceptibles incluyen a los residuos de la Ser y la Cys, los cuales tienen grupos reactivos  $-OH$  y  $-SH$ , respectivamente. El compuesto **diisopropilfosfofluoridato** (DIPF) y la **sarina**, un compuesto de estructura similar y componente como el anterior de los gases nerviosos, reaccionan con un residuo de Ser en el sitio activo de la enzima **acetilcolinesterasa** y la inhiben de manera irreversible y de esa manera impiden la transmisión de los impulsos nerviosos (figura D4-1a) (sección E6). La **yodoacetamida** modifica los residuos Cys y por consiguiente puede emplearse como herramienta diagnóstica para determinar si se requieren uno o más residuos de Cys para la actividad enzimática (figura D4-1b). La **aspirina** actúa al modificar de forma covalente a la enzima **sin-tasa de prostaglandina H2**, con lo cual reduce la síntesis de señales inflamatorias (sección K1). El **antibiótico penicilina** inhibe de manera irreversible a la **transpeptidasa de glucopéptido**, enzima que forma enlaces cruzados en la pared de la célula bacteriana, al fijarse por enlaces covalentes a un residuo de Ser del sitio activo de la enzima (sección A1). La penicilina accede al sitio

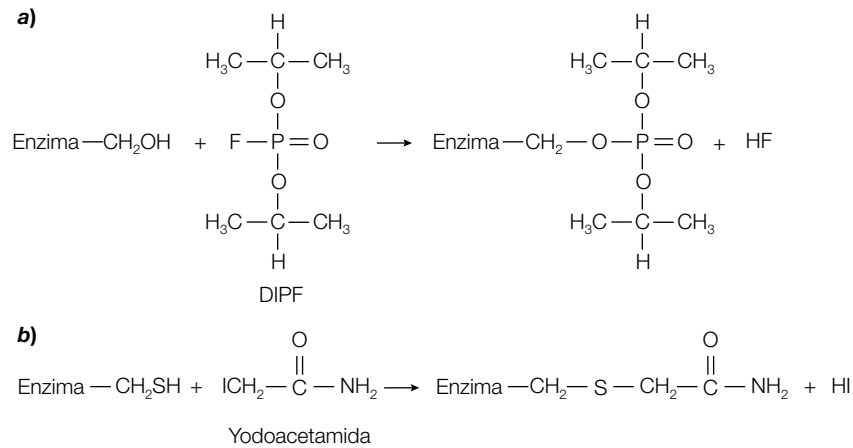


Figura D4-1. Estructura y mecanismo de acción de: a) DIPF; b) yodoacetamida.

activo de la enzima debido a que imita a una parte de la D-Ala-D-Ala del sustrato normal. En estas circunstancias, la transpeptidasa une a la penicilina en forma covalente a su residuo de Ser del sitio activo. Por tanto, la penicilina actúa como un **inhibidor suicida**.

### Inhibición competitiva reversible

De manera típica, un **inhibidor competitivo** presenta similitudes estructurales cercanas a las del sustrato normal de la enzima. En consecuencia, compite con las moléculas del sustrato para unirse al sitio activo (figura D4-2a). La enzima puede unirse a la molécula del sustrato o a la molécula del inhibidor, pero no a las dos al mismo tiempo (figura D4-2a). El inhibidor competitivo se une en forma **reversible al sitio activo**. A **concentraciones del sustrato altas**, la acción del inhibidor competitivo es superada debido a que la concentración lo suficientemente alta de sustrato elimina con éxito a la molécula del inhibidor del sitio activo. Por tanto, no hay cambio en la  $V_{\text{máx}}$  de la enzima, pero la aparente afinidad de la enzima por su sustrato decrece en presencia del inhibidor competitivo y por consiguiente la  $K_m$  se incrementa.

La **deshidrogenasa de succinato** representa un buen ejemplo de inhibición competitiva. El **succinato** es el sustrato de la enzima, pero el **malonato** lo inhibe por competencia y difiere del succinato por la presencia de un grupo metileno en lugar de dos (figura D4-3).

Muchos fármacos actúan porque su estructura se parece mucho a la del sustrato de la enzima objetivo, y por tanto actúan como inhibidores competitivos de la enzima. Por ejemplo, el **metotrexato**, un análogo estructural de la coenzima tetrahidrofolato (sección D1), a la cual requiere la enzima **reductasa de dihidrofolato** en la síntesis de purinas y pirimidinas, se usa en el tratamiento del cáncer. Los inhibidores de la **enzima convertidora de angiotensina**, como el captoprilo, se usan en el tratamiento de la hipertensión (presión arterial alta). Muchos de los fármacos usados para tratar el **virus de inmunodeficiencia humana (HIV)**, el causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), son inhibidores competitivos de la **transcriptasa inversa** (p. ej., AZT o cidovudina) o de la **proteasa del VIH** (p. ej., saquinavir, ritonavir).

La inhibición competitiva es el principio que se encuentra detrás del uso del etanol para tratar el **envenenamiento**

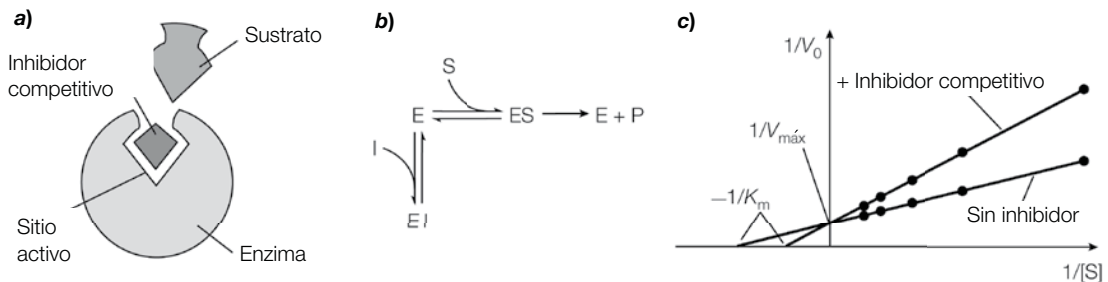


Figura D4-2. Características de la inhibición competitiva: a) un inhibidor competitivo compite con el sustrato por la unión al sitio activo de la enzima; b) la enzima puede unir al sustrato o al inhibidor competitivo pero no a los dos; c) gráfica de Lineweaver-Burk en la que se muestra el efecto de un inhibidor competitivo sobre la  $K_m$  y la  $V_{\text{máx}}$ .

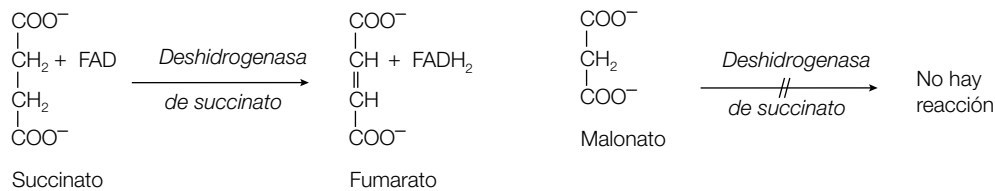


Figura D4-3. Inhibición de la deshidrogenasa de succinato por el malonato.

to con metanol. Aunque el metanol es en sí mismo sólo ligeramente tóxico, la enzima hepática **deshidrogenasa alcohólica** lo convierte en el producto altamente tóxico formaldehído, que incluso en pequeñas cantidades causa ceguera y la muerte. El etanol compite con el metanol por unirse al sitio activo de la deshidrogenasa alcohólica y de esa forma lentifica la conversión del metanol en formaldehído (el etanol se convierte en acetaldehído, un producto fácil de metabolizar). En consecuencia, una gran proporción de metanol es excretada del cuerpo en la orina sin que cause daño tras la administración de etanol. El mismo principio subyace al uso de etanol para tratar el **envenenamiento por anti-congelante** (etilenglicol).

La inhibición competitiva puede reconocerse si se recurre al uso de la gráfica de Lineweaver-Burk. La  $V_0$  se mide a diferentes concentraciones del sustrato en presencia de una concentración fija de un inhibidor. Un inhibidor competitivo incrementa la inclinación de la línea en la gráfica de Lineweaver-Burk y altera la intersección en el eje de la  $x$  (ya que la  $K_m$  **se incrementa**), pero conserva la intersección sobre el eje de la  $y$  sin modificar (ya que la  $V_{m\acute{a}x}$  permanece constante; figura D4-2c).

### Inhibición no competitiva reversible

Un **inhibidor no competitivo** se une en forma **reversible a un sitio diferente al sitio activo** (figura D4-4a) y causa un cambio en la forma tridimensional total de la enzima que lleva a reducir la actividad catalítica. Como el inhibidor se une a un sitio diferente al del sustrato, la enzima puede unir el inhibidor, el sustrato o ambos juntos (figura D4-4b). Los efectos de un inhibidor no competitivo no pueden superarse mediante el aumento de la concentración de sustrato, de manera que se produce una disminución de la  $V_{m\acute{a}x}$ . En la inhibición no competitiva, la afinidad de la enzima por el sustrato permanece sin cambios y por ello  $K_m$  se mantiene igual. Un ejemplo de inhibición no competitiva es la acción de la **pepstatina** sobre la enzima **renina**.

La inhibición no competitiva puede reconocerse en una gráfica de Lineweaver-Burk ya que incrementa la inclinación de la línea experimental y altera la intersección del eje de la  $y$  (ya que la  $V_{m\acute{a}x}$  **disminuye**), pero conserva la intersección en el eje de la  $x$  sin cambio (ya que la  $K_m$  **permanece constante**; figura D4-4c).

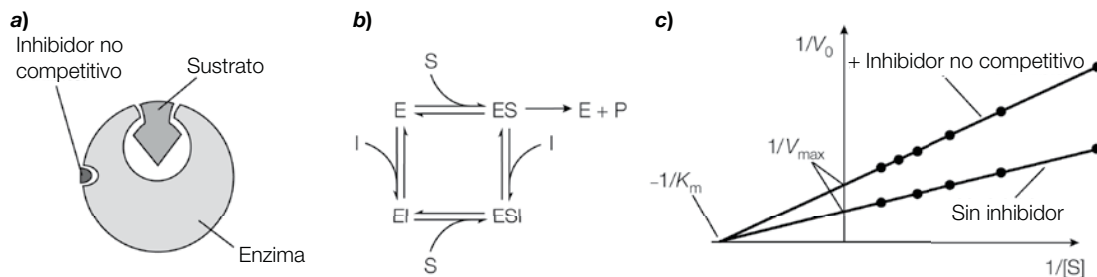


Figura D4-4. Características de la inhibición no competitiva: a) un inhibidor no competitivo se une a un sitio diferente al sitio activo; b) la enzima puede unir el sustrato, el inhibidor no competitivo o ambos; c) gráfica de Lineweaver-Burk en la que se muestra el efecto de un inhibidor no competitivo sobre la  $K_m$  y la  $V_{m\acute{a}x}$ .

# D5 Regulación de la actividad enzimática

## Notas clave

### Regulación por retroalimentación

Los activadores e inhibidores, conocidos en conjunto como moléculas efectoras, alteran la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas en los sistemas biológicos. En las vías metabólicas, el producto final suele inhibir por retroalimentación el paso anterior de la misma vía para evitar la acumulación de productos intermedios y el uso innecesario de metabolitos y energía. En las vías metabólicas con ramas, suele funcionar un proceso de inhibición por retroalimentación secuencial.

### Enzimas alostéricas

Una gráfica de  $V_0$  contra  $[S]$  para una enzima alostérica da una curva de forma sigmoidea. Por lo regular, las enzimas alostéricas son proteínas de múltiples subunidades con un sitio activo en cada subunidad, las cuales unen de forma cooperativa moléculas de sustrato, lo que implica que la unión de sustrato a un sitio activo provoca un cambio conformacional en la enzima, que modifica la afinidad de los restantes sitios activos por el sustrato. Se han propuesto dos modelos para explicar el comportamiento alostérico de las enzimas, el modelo concertado o simétrico y el modelo secuencial. Las moléculas efectoras (activadores o inhibidores) pueden controlar las enzimas alostéricas al unirse a sitios diferentes al sitio activo y alterar la velocidad de la actividad enzimática. La transcarbamoilasa de aspartato es una enzima alostérica que cataliza el paso forzoso en la biosíntesis de pirimidinas. La enzima consiste en seis subunidades reguladoras a las que se unen los efectores alostéricos trifosfato de citosina (CTP) y ATP. El producto final, CTP, de la vía de la transcarbamoilasa la inhibe por retroalimentación y actúa como un inhibidor alostérico. En contraste, el ATP, un intermediario inicial de la vía, actúa como un activador alostérico.

### Modificación covalente reversible

El establecimiento y destrucción de un enlace covalente entre la enzima y un pequeño grupo no proteínico altera la actividad de muchas enzimas. La más común de tales modificaciones es la adición y remoción de un grupo fosfato; la fosforilación y la desfosforilación, respectivamente. Las cinasas de proteína catalizan la fosforilación y con frecuencia recurren al ATP como el donador de fosfatos, en tanto que las fosfatasas de proteína se encargan de catalizar la desfosforilación. Un 30% de las proteínas humanas es fosforilado.

### Activación proteolítica

Algunas enzimas se sintetizan como grandes precursores inactivos llamados proenzimas o zimógenos. La hidrólisis irreversible de uno o más enlaces peptídicos los activa. Las proteasas pancreáticas tripsina, quimotripsina y elastasa derivan todas de zimógenos precursores (tripsinógeno, quimotripsinógeno y proelastasa, respectivamente) por activación proteolítica. La activación prematura de estos zimógenos provoca pancreatitis aguda. En la cascada de la coagulación sanguínea y en la apoptosis (muerte celular programada) también participa una serie de activaciones de zimógenos que produce una gran amplificación de la señal original.

### Regulación de la síntesis y destrucción de las enzimas

La cantidad de enzima presente representa un equilibrio entre las tasas de su síntesis y su degradación. El grado de inducción o represión de la codificación genética de la enzima y la tasa de degradación de su mRNA modifican la tasa de síntesis de la proteína enzimática. Cuando la proteína enzimática está sintetizada, la tasa de su destrucción (vida media) también puede modificarse como un medio de regular la actividad enzimática.

## Temas relacionados

(B3) Mioglobina y hemoglobina  
(D1) Introducción a las enzimas  
(D3) Cinética enzimática

(D4) Inhibición enzimática  
(J7) Control del metabolismo del glucógeno

## Regulación por retroalimentación

En los sistemas biológicos, la velocidad de muchas enzimas se altera por la presencia de otras moléculas como los activadores e inhibidores (conocidos en conjunto como los **efectores**). Un tema común en el control de las vías metabólicas es cuando una enzima resulta inhibida al principio de la vía metabólica por un producto final de la misma vía en la que participa. Esto se llama **inhibición por retroalimentación** y suele tener lugar en el **paso forzoso** de la vía (conversión de A en B en la figura D5-1a). El paso forzoso es el primer paso en producir un intermediario que es exclusivo para la vía en cuestión y por consiguiente, en general, obliga al metabolito a un metabolismo adicional a lo largo de la vía. El control de la enzima que lleva a cabo el paso forzoso de una vía metabólica conserva el aporte de energía metabólica del organismo y evita la acumulación de grandes cantidades indeseables de intermediarios metabólicos adicionales a lo largo de la vía. Una inhibición por retroalimentación de este tipo se ve, por ejemplo, en la vía de la biosíntesis de los aminoácidos (sección M2).

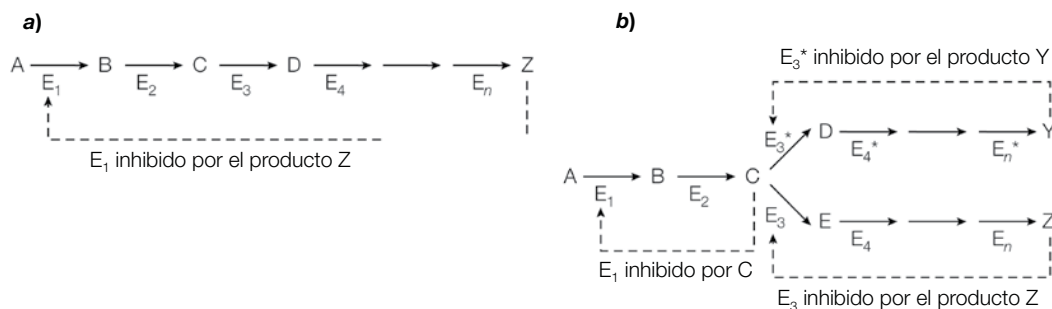
Como muchas vías metabólicas tienen **ramas**, la inhibición por retroalimentación debe permitir la síntesis de un producto de una vía ramificada para avanzar incluso cuando otro producto esté presente en exceso. Aquí, un proceso de inhibición por retroalimentación secuencial puede operar donde el producto final de una rama de una vía inhibirá a la primera enzima después del punto de ramificación (la conversión de C en D o de C en E, en la figura D5-1b). Cuando este punto de ramificación acumule intermediarios, éstos a su vez inhibirán el primer paso forzoso de la vía completa (conversión de A en B en la figura D5-1b). Como es poco probable que el producto final de una vía metabólica que incluye múltiples reacciones metabólicas se asemeje estructuralmente al compuesto inicial, el producto final se unirá a

la enzima en el punto de control en un sitio diferente al sitio activo. Tales enzimas son por lo regular **enzimas alostéricas**.

## Enzimas alostéricas

Una gráfica de  $V_0$  contra  $[S]$  de una **enzima alostérica** da una **curva sigmoidea** en lugar del trazado hiperbólico predicho por la ecuación de Michaelis-Menten (como se ve en la unión del  $O_2$  a la hemoglobina; sección B3, figura B3-3). La curva tiene una sección empinada en el medio del espectro de concentración de sustrato, lo que refleja el incremento rápido en la velocidad de la enzima que ocurre durante un rango estrecho de concentraciones del sustrato. Esto permite a las enzimas alostéricas ser particularmente sensibles a pequeños cambios en la concentración de sustrato en el rango fisiológico. En las enzimas alostéricas, la unión de una molécula de sustrato a un sitio activo afecta la unión de las moléculas de sustrato a otros sitios activos de la enzima; se dice que los distintos sitios activos se comportan de manera cooperativa en la unión y acción sobre las moléculas de sustrato (confróntese con la unión del  $O_2$  a las cuatro subunidades de la hemoglobina; sección B3). Las enzimas alostéricas suelen ser proteínas con varias subunidades (es decir, oligoméricas), con uno o más sitios activos en cada subunidad. La unión de un sustrato a un sitio activo **induce un cambio conformacional** en la proteína que se transmite a los otros sitios activos, a los que altera su afinidad por las moléculas del sustrato.

Se han propuesto dos modelos para explicar los efectos alostéricos que se observan en las proteínas. En el **modelo simétrico** o **concertado**, propuesto primero por Jacques Monod, Jeffries Wyman y Jean-Pierre Changeaux (a veces referido como el **modelo de Monod-Wyman-Changeaux (mwc)**), las subunidades de una enzima alostérica pueden existir en uno de sólo dos estados, T y R



**Figura D5-1.** Inhibición por retroalimentación a) e inhibición por retroalimentación secuencial b) en las vías metabólicas.

(figura D5-2a). Las subunidades del estado T se hallan en un estado tenso que es compacto y relativamente inactivo, mientras que las subunidades del estado R se encuentran en un estado relajado, expandido y activo con una afinidad más alta por el sustrato; no se permiten los estados intermedios. En ausencia de un sustrato unido, el equilibrio favorece el estado T. A medida que el sustrato se une a cada sitio activo del estado T, el equilibrio se desvía hacia el estado R. Todas las subunidades cambian de conformación de una manera concertada, lo cual implica que la conformación de cada subunidad es constreñida por su asociación con las otras subunidades; en otras palabras, hay formas oligoméricas de la enzima que contienen subunidades en estado R y T de manera simultánea y la simetría molecular de la proteína se conserva durante el cambio conformacional (figura D5-2a).

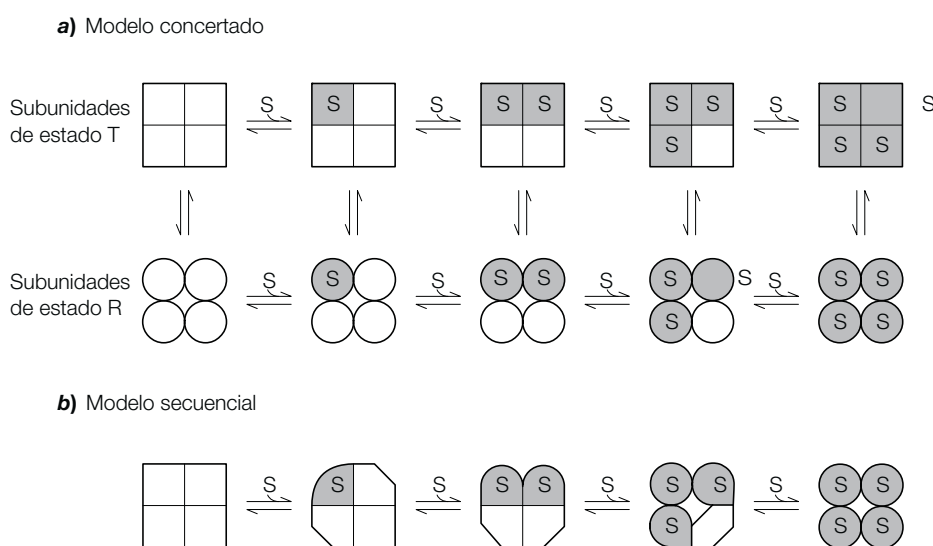
En el **modelo secuencial** alternativo, propuesto primero por Daniel Koshland, en una enzima oligomérica, los cambios secuenciales en la estructura tienen lugar a medida que se ocupan los sitios activos individuales (figura D5-2b). La unión de sustrato a un sitio influye en la afinidad por el sustrato de los sitios activos vecinos, sin que por fuerza induzca una transición que abarque a la enzima completa, de tal manera que la simetría molecular de la enzima completa no se conserva forzosamente (figura D5-2b). El modelo secuencial se basa en la hipótesis del ajuste inducido de la interacción enzima-sustrato, mientras que el modelo concertado asume de forma implícita el modelo de llave y cerradura de la unión del sustrato al sitio activo de la enzima (sección D1). En el modelo secuencial, la unión del sustrato induce un cambio conformacional en una subunidad

y las interacciones cooperativas surgen merced a la influencia que tales cambios conformacionales tienen en las subunidades vecinas. La fuerza de estas interacciones depende del grado de acoplamiento mecánico entre las subunidades. En el modelo secuencial, la afinidad de la unión entre enzima y sustrato varía con el número de moléculas de sustrato enlazadas, en tanto que en el modelo concertado esta afinidad depende sólo del estado cuaternario de la enzima. Los resultados de los estudios en varias proteínas alostéricas sugieren que la mayoría se comporta de acuerdo con una combinación de los modelos concertado y secuencial.

Las moléculas **efectoras** (activadores e inhibidores) pueden controlar a las enzimas alostéricas, a las cuales se unen en sitios diferentes al sitio activo (sea en la misma subunidad o en otra) y al hacerlo provocan un cambio conformacional de tal sitio, lo que termina por alterar la tasa de actividad de la enzima (confróntese con la unión del  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}^+$  y 2,3-bisfosfoglicerato a la hemoglobina; véase la sección B3). Un **activador alostérico** incrementa la tasa de actividad enzimática, en tanto que un **inhibidor alostérico** la reduce.

#### Transcarbamoilasa de aspartato

La **transcarbamoilasa de aspartato** (carbamoiltransferasa de aspartato; *atc-asa*), una enzima clave en la síntesis de pirimidina (sección F1), proporciona un buen ejemplo de regulación alostérica. La *ATC-asa* cataliza la formación de *N*-**carbamoilaspartato** a partir de aspartato y de carbamoilfosfato, que representa el paso forzoso en la biosíntesis de pirimidinas (figura D5-3). La unión de los sustratos aspartato y carbamoilfosfato es

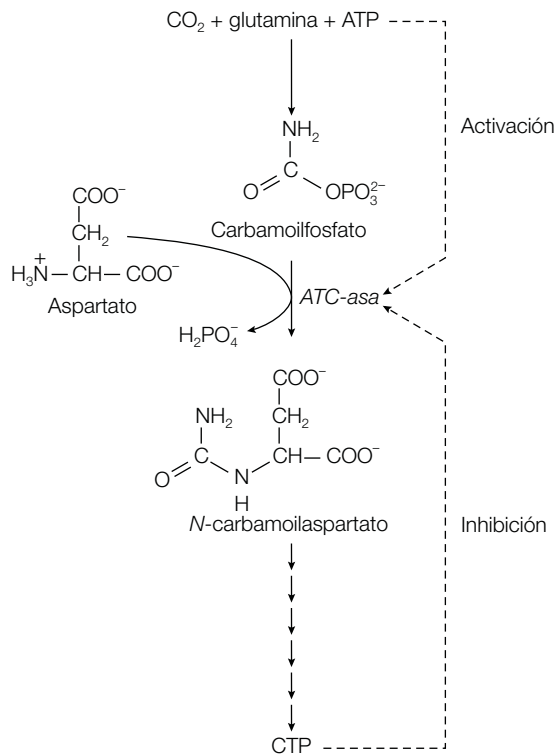


**Figura D5-2.** Modelos de alosterismo: a) el modelo concertado o de simetría; los cuadrados y los círculos representan los estados T y R, respectivamente; b) el modelo secuencial; la unión del sustrato induce los cambios conformacionales progresivos en las subunidades.

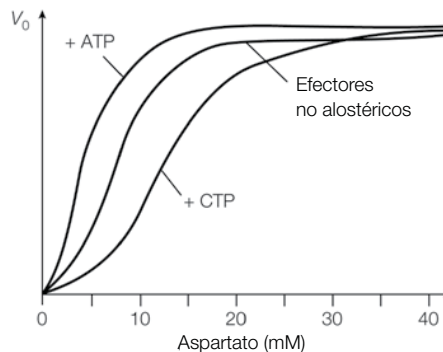
cooperativa, como lo muestra la curva sigmoidea de  $V_0$  contra la concentración de sustrato (figura D5-4).

La ATC-asa consiste en seis **subunidades catalíticas** y seis **subunidades reguladoras**. El producto final de la vía, el **trifosfato de citosina** (CTP; sección F1), inhibe a la enzima por **retroalimentación**, por lo que el CTP actúa como un **inhibidor alostérico** (figura D5-3). Esta molécula se une a las subunidades reguladoras y causa una disminución en la actividad catalítica de la ATC-asa al reducir la afinidad de las subunidades catalíticas por el sustrato. En contraste, el ATP, uno de los productos

intermedios iniciales de la vía, actúa como un **activador alostérico**, lo que hace al mejorar la afinidad de la ATC-asa por sus sustratos que la lleva a incrementar su actividad (figura D5-3). El ATP y el CTP compiten por el mismo sitio de unión en la subunidad reguladora. Altos niveles de ATP le indican a la célula que hay energía disponible para la replicación del DNA, por lo que la ATC-asa se activa, lo que resulta en la síntesis de los nucleótidos de pirimidina requeridos. Cuando la pirimidina abunda, los altos niveles de CTP inhiben a la ATC-asa, lo que evita la síntesis innecesaria de N-carbamoylaspartato y de los intermediarios subsecuentes de la vía.



**Figura D5-3.** La formación de *N*-carbamoylaspartato por la ATC-asa es el paso forzoso en la biosíntesis de pirimidina y en un punto de control clave.



**Figura D5-4.** Gráfica de velocidad inicial ( $V_0$ ) contra concentración de sustrato de la enzima alostérica transcarnamoilasa de aspartato.

## Modificación covalente reversible

La modificación covalente reversible consiste en la elaboración y degradación de un enlace covalente entre un grupo no proteínico y una molécula enzimática. Aunque un buen número de grupos no proteínicos puede unirse en forma reversible a enzimas que afectan su actividad, la modificación más común es la adición y remoción de un **grupo fosfato (fosforilación y desfosforilación, respectivamente)**. Las **quinasas de proteína** se encargan de catalizar la fosforilación y suelen usar ATP como donador de los grupos fosfato, mientras que las **fosfatasa de proteína** catalizan la desfosforilación (figura D5-5). La adición y remoción de un grupo fosfato provoca cambios en la **estructura terciaria** de la enzima que alteran su actividad catalítica. Una clase de cinasas de proteína transfiere el grupo fosfato de manera específica al grupo hidroxilo de los residuos de Ser o Thr de la enzima de interés (proteincinasas de serina/treonina, tipificadas por ser cinasas de proteína dependientes del 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico [cAMP]), mientras que una segunda clase transfiere el grupo fosfato al grupo hidroxilo del residuo de Tyr (quinasas de tirosina). Las fosfatasas de proteína catalizan la hidrólisis de los grupos fosfato de las proteínas para regenerar el grupo hidroxilo del aminoácido y liberar  $P_i$  (figura D5-5).

Una enzima fosforilada puede ser más o menos activa que su forma desfosforilada. La fosforilación/desfosforilación pueden usarse para una desviación rápida y reversible con el fin de activar o desactivar una vía metabólica según las necesidades de la célula. Por ejemplo, la **fosforilasa de glucógeno**, que participa en la degradación del glucógeno, es activa en su forma fosforilada y la **sintasa de glucógeno**, que interviene en la síntesis de glucógeno, es más activa en su forma desfosforilada (sección J7).

Otros tipos de modificaciones covalentes reversibles que se usan para regular la actividad de ciertas enzimas incluyen la **adenilación** (la transferencia de adenilato desde el ATP, como se ve en la sintetasa de glutamina) y la **ribosilación del ADP** (la transferencia de una parte de ribosilo al ADP desde el  $NAD^+$ , como se ve en la polimerasa de RNA).

## Activación proteolítica

Numerosas enzimas se sintetizan como grandes precursores inactivos llamados proenzimas o **cimógenos**. La

activación de los cimógenos implica la **hidrólisis irreversible** de uno o más **enlaces peptídicos**.

## Proteasas pancreáticas

Las enzimas digestivas **tripsina, quimotripsina y elastasa** (sección D1) se producen como cimógenos en el **páncreas**. Son transportadas al intestino delgado en su forma de cimógeno y allí se activan por la división de enlaces peptídicos específicos. De manera inicial, la tripsina se sintetiza bajo la forma del cimógeno **tripsinógeno**. El cimógeno es dividido (y en consecuencia activado) en el intestino por la enzima **enteropeptidasa**, la cual sólo se produce en el intestino. Una vez activada, la tripsina puede dividir y activar más moléculas de tripsinógeno así como otros cimógenos, como el **quimotripsinógeno** y la **proelastasa** (figura D5-6).

A medida que los cimógenos se sintetizan y secretan, el páncreas también sintetiza una pequeña (6 kDa) **proteína inhibidora de la tripsina (inhibidor pancreático de la tripsina)**. Esta proteína inhibidora se une en forma muy estrecha al sitio activo de la tripsina, lo que evita que el páncreas vaya a resultar destruido por la activación prematura de las moléculas de tripsina. Si este mecanismo de seguridad falla, por ejemplo, debido a un bloqueo del conducto pancreático, los cimógenos pueden activarse y digerir al páncreas, una afección conocida como **pancreatitis aguda**.

## Cascada de la coagulación sanguínea

Otro ejemplo de la existencia de cimógenos inactivos lo representan las enzimas que participan en la **cascada de la coagulación sanguínea**. En ésta, el proceso completo de coagulación de la sangre lo lleva a cabo una **serie de activaciones de cimógenos**.

## Apoptosis

Un grupo de proteasas denominado **caspasas** lleva a cabo la **apoptosis, o muerte celular programada**. En respuesta a señales proapoptóticas específicas, las procaspasas inactivas se activan a través de su proteólisis a su forma activa. A continuación, estas caspasas activas actúan sobre otras procaspasas así como sobre otras proteínas celulares para ocasionar la muerte celular.

La activación de cimógenos puede producir una **gran amplificación** de la señal inicial ya que una sola enzima

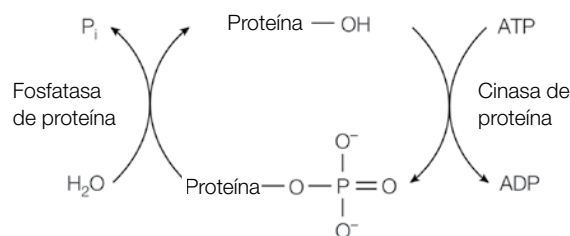


Figura D5-5. La fosforilación y desfosforilación reversibles de una enzima.



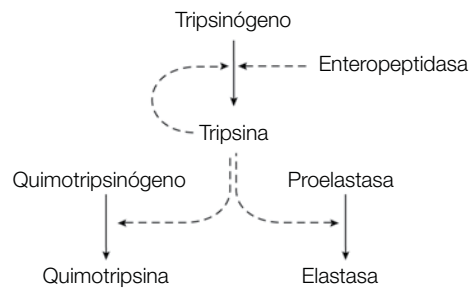
activada puede actuar sobre muchos cientos de moléculas de sustrato para que tenga lugar una activación adicional. Como la activación proteolítica no requiere ATP, la escisión del zimógeno es un mecanismo muy apropiado para la activación de proteínas fuera de las células. Sin embargo, a diferencia de la modificación covalente de una enzima (véase antes), la activación de un zimógeno no es reversible. Una vez activada, la enzima permanece activa.

### Regulación de la síntesis y destrucción de las enzimas

La cantidad de una enzima determinada presente en una célula o tejido cambia de acuerdo con sus tasas de **síntesis** y **degradación**.

Entre los factores que afectan la tasa de síntesis está el grado de **inducción o represión del gen** que codifica la enzima (secciones G3 y G4) y también la **tasa de degradación del mRNA** producido por ese gen. Muchas enzimas clave de los puntos de control de las vías metabólicas tienen mRNA de vida extremadamente corta y la tasa de síntesis de la enzima es en consecuencia controlada con facilidad por factores que afectan la tasa de transcripción genética.

La **vida media** refleja la tasa de destrucción de una enzima (la vida media es el tiempo que tarda en degradarse 50% de la proteína). La mayor parte de las enzimas importantes en la regulación metabólica presentan vidas medias cortas y se les denomina **enzimas lábiles**.



**Figura D5-6.** Papel central de la tripsina en la activación de los zimógenos pancreáticos.

# E1 Lípidos de la membrana

## Notas clave

### Membranas

Las membranas forman estructuras limitantes alrededor de la célula y alrededor de los diferentes compartimientos subcelulares. Actúan como barreras selectivamente permeables y participan en los procesos de señalización. Todas las membranas contienen cantidades variables de lípidos y proteínas y algunas contienen pequeñas cantidades de carbohidratos.

### Lípidos membranales

En las membranas, las tres clases principales de lípidos son los glicerofosfolípidos, los esfingolípidos y los esteroides. Los glicerofosfolípidos tienen una columna vertebral de glicerol que une a dos cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos y a un grupo-cabeza fosforilado; incluyen a la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. Los esfingolípidos se forman a partir de la esfingosina, a la cual está unida una cadena de ácido graso simple y un grupo-cabeza fosforilado (como en la esfingomielina) o uno o más residuos de azúcar (cerebrósidos y gangliósidos, los glucoesfingolípidos). El principal esteroide de la membrana plasmática animal es el colesterol, mientras que el estigmasterol y el sitosterol  $\beta$ , que guardan relación estructural con el anterior, se encuentran en plantas.

### Cadenas de ácidos grasos

Las cadenas de ácidos grasos de los glicerofosfolípidos y los esfingolípidos consisten en cadenas largas de átomos de carbono, las cuales usualmente no están ramificadas y tienen un número par de átomos de carbono (p. ej., palmitato C16, estearato C18). Las cadenas están completamente saturadas con átomos de hidrógeno o tienen uno o más enlaces insaturados que están en configuración *cis* (p. ej., oleato C18:1 con un doble enlace).

### Bicapa lipídica

Los lípidos membranales son anfipáticos, ya que contienen regiones hidrófilas e hidrófobas. En los glicerofosfolípidos y los esfingolípidos, las cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos son hidrófobas, mientras que los grupos-cabeza polares son hidrófilos. En solución acuosa, los lípidos anfipáticos se ordenan a sí mismos en hojas bimoleculares extensas (bicapas). La estructura de las bicapas se mantiene por múltiples interacciones no covalentes entre las cadenas de ácidos grasos vecinas y entre los grupos-cabeza polares de los lípidos. En las membranas biológicas, hay una distribución asimétrica de lípidos entre las monocapas interna y externa de la bicapa.

### Fluidez membranar

Los lípidos son relativamente libres para moverse dentro del plano de la bicapa por movimiento rotatorio o lateral, pero no les resulta fácil atravesar de un lado de la bicapa al otro (movimiento transversal). El incremento en la longitud de las cadenas de ácidos grasos o la disminución en el número de enlaces dobles insaturados en las cadenas de ácidos grasos lleva a una disminución en la fluidez de la membrana. En las membranas animales, el incremento en la cantidad de colesterol también disminuye la fluidez de la membrana.

### Temas relacionados

|                                 |                                  |
|---------------------------------|----------------------------------|
| (A1) Células procariontas       | ((E5) Transducción de señales    |
| (A2) Células eucariotas         | (E6) Función nerviosa            |
| (E2) Estructura de la membrana  | (K1) Estructura y función de los |
| (E3) Transporte de la membrana: | ácidos grasos                    |
| moléculas pequeñas              | (K5) Colesterol                  |

## Membranas

Las **membranas** forman los límites alrededor de las células (la membrana plasmática) y alrededor de los diferentes compartimientos subcelulares (p. ej., núcleo, mitocondrias, lisosomas, etc.) (secciones A1 y A2). Actúan como **barreras selectivamente permeables** y permiten que el ambiente interno de la célula u organelo se diferencie del lado externo (sección E3). Las membranas participan en los **procesos de señalización**; contienen receptores específicos para los estímulos externos e intervienen en la generación de señales químicas y eléctricas (secciones E5 y E6). Todas las membranas contienen dos componentes básicos: **lípidos** y **proteínas**. Algunas membranas también contienen **carbohidratos**. La composición de lípidos, proteínas y carbohidratos varía de una membrana a otra. Por ejemplo, la membrana mitocondrial interna tiene una cantidad mayor de proteína que de lípidos debido a la presencia de numerosos complejos proteicos que intervienen en la fosforilación oxidativa y en la transferencia de electrones (sección L2), mientras que la membrana de la vaina de mielina de las células nerviosas, la cual sirve para aislar a la célula eléctricamente, tiene una proporción mayor de lípidos (sección E6).

## Lípidos membranales

De manera original, los lípidos se clasificaron como sustancias biológicas insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos como el cloroformo y el metanol. De manera adicional, por tratarse de componentes estructurales de las membranas, los lípidos tienen varias funciones biológicas. Sirven como moléculas de combustible (sección K2), como almacenes de energía concentrada (p. ej., triacilglicerol, sección K4) y como moléculas de señalización (sección E5). Dentro de las membranas, hay tres tipos principales de lípidos: los **glicerofosfolípidos**, los **esfingolípidos** y los **esteroles**.

### Glicerofosfolípidos

Los glicerofosfolípidos están formados por tres componentes: un **grupo cabeza fosforilado**, una **columna vertebral de glicerol** de tres carbonos y dos **cadena hidrocarbonadas de ácidos grasos** (figura E1-1). El grupo cabeza fosforilado está unido al carbono 3 de la columna vertebral de glicerol, mientras que las dos cadenas de ácidos grasos están unidas a los otros dos átomos de carbono. El más simple de los glicerofosfolípidos es el fosfatidato (diacilglicerol 3-fosfato), el cual tiene sólo un grupo de ácido fosfórico esterificado al carbono 3 del glicerol. Aunque el fosfatidato como tal está presente en pequeñas cantidades en las membranas, los glicerofosfolípidos principales derivan del mismo. En esos otros lípidos el fosfato está esterificado de manera adicional al grupo hidroxilo de uno de numerosos alcoholes (colina, etanolamina, glicerol, inositol o serina). Los principales glicerofosfolípidos que se encuentran en las membranas

son la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol y fosfatidilserina (figura E1-1). El difosfatidilglicerol (o cardiolipina) (figura E1-1) se encuentra de manera predominante en la membrana mitocondrial interna.

### Esfingolípidos

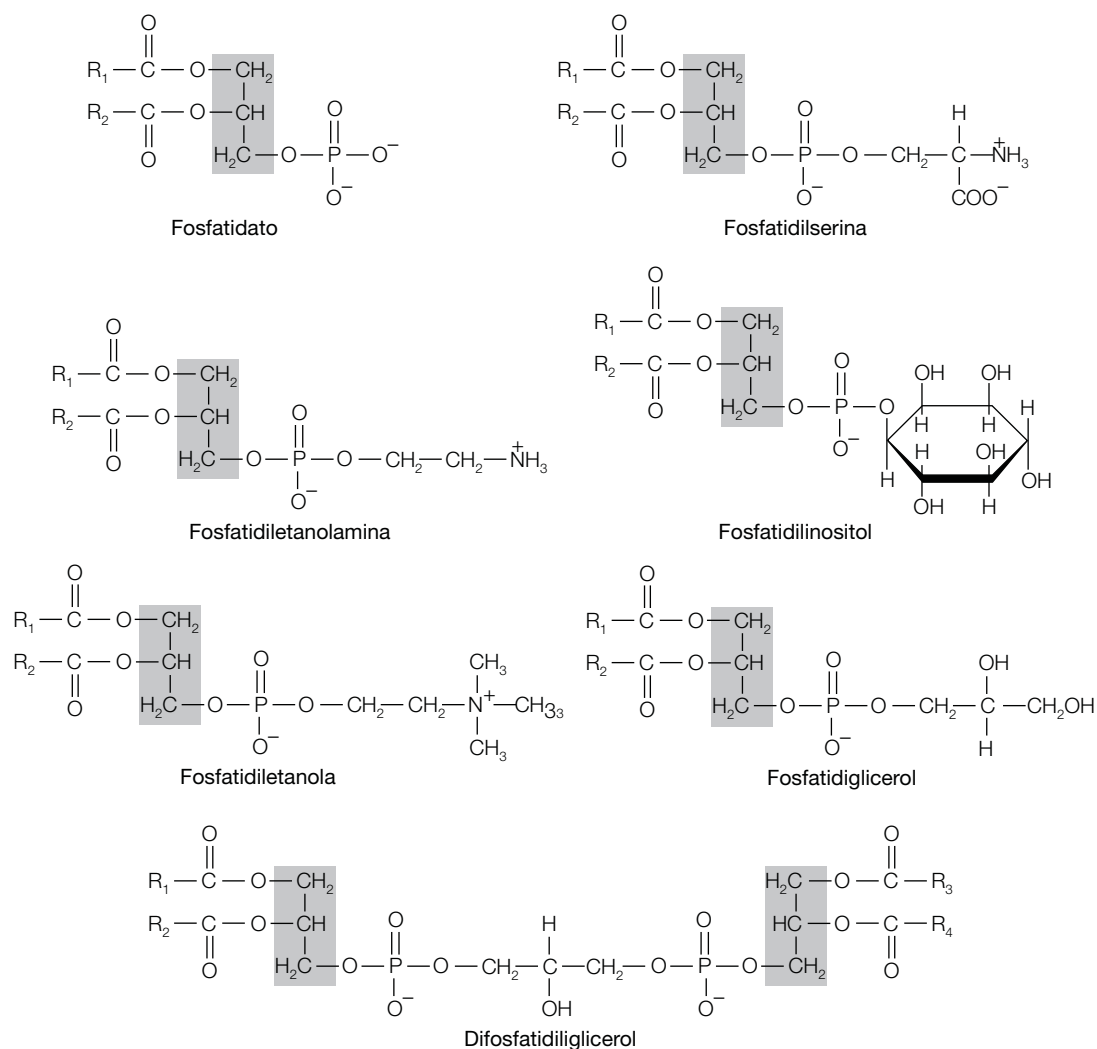
Las **esfingomielinas**, los esfingolípidos más comunes, tienen una **columna vertebral de esfingosina** (figura E1-2a) en lugar de la de glicerol de los glicerofosfolípidos. Como los glicerofosfolípidos, éstas tienen un grupo cabeza fosforilado (de colina o etanolamina) y dos cadenas hidrocarbonadas (figura E1-2a). Una de las cadenas hidrocarbonadas proviene de la molécula de esfingosina, la otra es un ácido graso como los que se encuentran en los glicerofosfolípidos, excepto que está unida mediante un enlace amida a los esfingolípidos. Las esfingomielinas están presentes en la membrana plasmática de la mayoría de las células y son particularmente abundantes en la vaina de mielina que rodea a las células nerviosas. Los **glucoesfingolípidos**, como los **cerebrósidos** y los **gangliósidos**, también se derivan de la esfingosina, pero en lugar de un grupo cabeza fosforilado tienen uno o más residuos de azúcar. Los galactocerebrósidos tienen un residuo de galactosa simple (figura E1-2a) y se encuentran predominantemente en las membranas de las células neuronales del cerebro. Los gangliósidos  $GM_1$ ,  $GM_2$  y  $GM_3$  tienen numerosos residuos de azúcar y cuando menos un residuo de ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico), además de que son un constituyente fundamental de la mayoría de las membranas plasmáticas de los mamíferos y en particular son abundantes en las células del encéfalo.

### Esteroles

El estero **colesterol** (figura E1-2b) es un constituyente principal de las membranas plasmáticas animales pero está ausente en los procariontes. El sistema de anillos fusionados del colesterol implica que es más rígido que otros lípidos de la membrana. Así como es un importante componente de las membranas, el colesterol es un precursor metabólico de las hormonas esteroideas (sección K5). Las plantas contienen poco colesterol, pero tienen en su lugar varios esteroides diferentes, sobre todo **estigmasterol** y **βsitosterol**, los cuales difieren del colesterol sólo en sus cadenas laterales alifáticas.

## Cadenas de ácidos grasos

Las dos cadenas de ácidos grasos de los glicerofosfolípidos y la cadena de ácidos grasos simple de los esfingolípidos consisten en una larga cadena de átomos de carbono. De manera habitual, esas cadenas tienen un número par de átomos de carbono (p. ej., palmitato, C16; estearato, C18) y carecen de ramificaciones. Las cadenas están completamente saturadas con átomos de hidrógeno o son insaturadas y tienen uno o más enlaces



**Figura E1-1.** Estructuras de los glicerofosfolípidos de la membrana.  $R_1$  y  $R_2$  representan cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos. La columna vertebral de glicerol está sombreada.

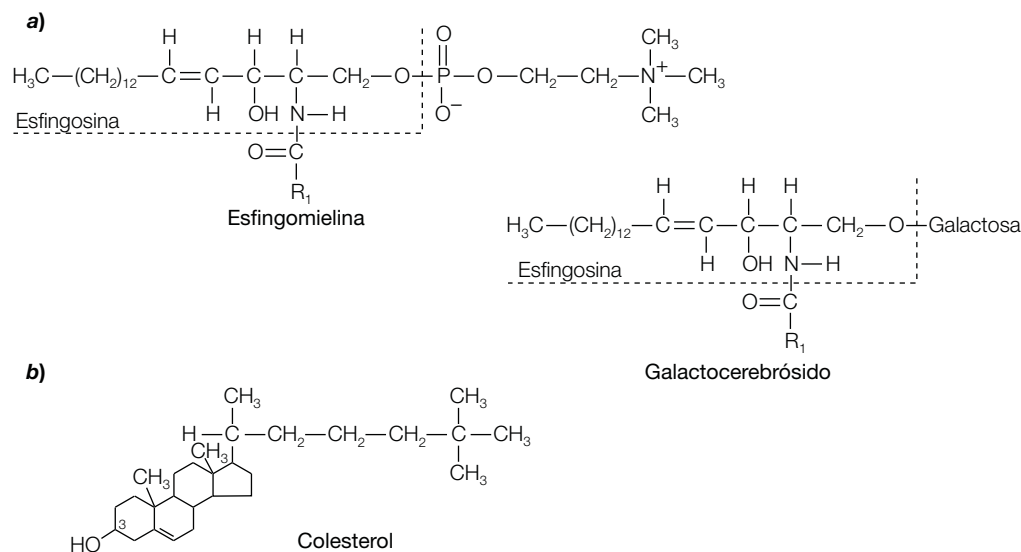
dobles, que están por lo general en la configuración *cis* (p. ej., oleato C18:1, el cual tiene dieciocho átomos de carbono y un doble enlace; ácido araquidónico C20:4, el cual tiene veinte átomos de carbono y cuatro enlaces dobles (para mayores detalles véase la sección K1). Las dos cadenas de ácidos grasos de un glicerofosfolípido no suelen ser idénticas (p. ej., 1-estearoil-2-oleoil-3-fosfatidilcolina [figura E1-3]). En los esfingolípidos, la cadena hidrocarbonada sin ramas de la esfingosina también consiste en 18 átomos de carbono, pero tiene un doble enlace en la configuración *trans* (figura E1-2a).

### Bicapa lipídica

Las moléculas **anfipáticas** (o anfífilas) contienen regiones **hidrófilas** (amantes del agua) e **hidrófobas** (que rechazan el agua). Los lípidos de la membrana son moléculas anfipáticas que están hechas de cadenas de ácidos

grasos hidrófobos y de un grupo-cabeza polar hidrófilo. En los glicerofosfolípidos, las dos cadenas hidrocarbonadas son hidrófobas, mientras que la columna vertebral de glicerol y el grupo-cabeza fosforilado son hidrófilos. En los esfingolípidos, la cadena de ácido graso y la cadena hidrocarbonada de la esfingosina son hidrófobas, mientras que el grupo cabeza fosforilado o el azúcar son hidrófilos. En el caso del colesterol, la molécula completa, exceptuando al grupo hidroxilo en el carbono 3, es de naturaleza hidrófoba.

En solución acuosa, las moléculas anfipáticas se orientan a sí mismas para evitar que sus regiones hidrófobas hagan contacto con las moléculas de agua. En el caso de los lípidos que contienen sólo una cadena hidrocarbonada (como el palmitato de sodio, un constituyente del jabón), las moléculas forman una estructura micelar esférica (cuyo diámetro usual es  $> 20$  nm), en la cual las

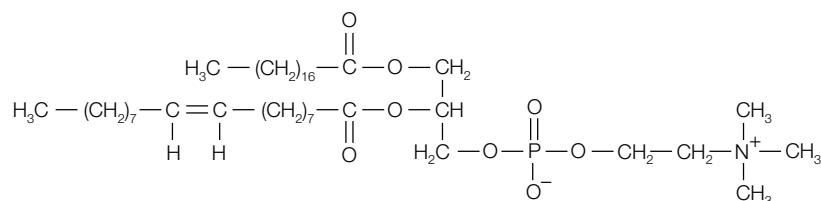


**Figura E1-2.** Estructuras de a) los esfingolípidos esfingomielina y galactocerebrósido; b) colesterol.  $R_1$  representa la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos.

cadena hidrófoba de los ácidos grasos están ocultas dentro de la micela y sus grupos-cabeza hidrófilos interactúan con las moléculas de agua circundantes (figura E1-4a). Debido a que las dos cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos son demasiado voluminosas para caber en el interior de la **micela**, la estructura que resulta favorecida por la mayoría de los fosfolípidos en solución acuosa es una hoja bimolecular bidimensional o **bicapa de lípidos** (figura E1-4b). Tales bicapas de lípidos, en las cuales las moléculas de fosfolípidos se orientan con sus cadenas hidrófobas en el interior de la estructura y sus grupos-cabeza hidrófilos se exponen en las dos superficies, pueden ser estructuras relativamente grandes de hasta alrededor de 1 mm<sup>2</sup> de área, pero son sólo dos moléculas gruesas (6 a 10 nm). Las dos capas de lípidos en la bicapa se denominan como la **monocapa interna** y la **monocapa externa**. En las membranas biológicas, las especies de lípidos individuales se **distribuyen de manera asimétrica** entre las dos

monocapas. Por ejemplo, en la membrana plasmática de los eritrocitos, la esfingomielina y la fosfatidilcolina se localizan de preferencia en la capa externa, mientras que la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina están sobre todo en la capa interna.

Las bicapas de lípidos se autoensamblan de forma espontánea en solución acuosa. La fuerza directriz principal detrás de esto es el efecto hidrófobo, por el que las cadenas de ácidos grasos hidrófobas sean excluidas por las moléculas de agua. Una vez formada, la estructura de bicapa se mantiene por múltiples interacciones no covalentes que incluyen las interacciones hidrófobas y las fuerzas de van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas, las interacciones por cargas eléctricas y puentes de hidrógeno entre los grupos-cabeza polares y entre los grupos-cabeza y las moléculas de agua circundantes (véase la sección B2 para una descripción más completa de estas interacciones no covalentes).



**Figura E1-3.** Estructura de la 1-estearoil-2-oleoil-3-fosfatidilcolina en la que se muestran las cadenas hidrocarbonadas del estearoil saturado (C18:0) y el oleoil monoinsaturado (C18:1). Los átomos de hidrógeno que rodean el enlace C=C están en la configuración *cis*.

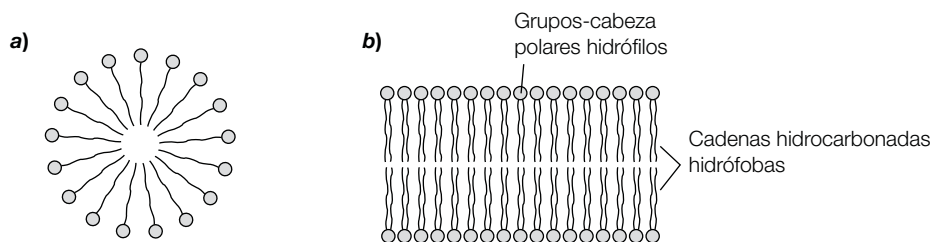


Figura E1-4. Estructura de a) una micela y b) una bicapa lipídica.

### Fluidez de la membrana

Debido a que no hay enlaces covalentes entre los lípidos que forman la bicapa, la membrana no es una estructura estática sino **fluida**. Por lo general, los lípidos son libres de moverse dentro del plano de la monocapa interna o externa o de la bicapa ya sea por **movimientos rotatorios o colaterales** (figura E1-5). Sin embargo, las moléculas de lípido no pueden cambiarse con facilidad de una monocapa de la bicapa a la otra, el llamado **movimiento transversal**, debido a la energía desfavorable que interviene en el movimiento de un grupo cabeza hidrófilo a través del interior hidrófobo de la bicapa.

La fluidez de la bicapa puede alterarse de numerosas formas. Tras el calentamiento por arriba de una **temperatura de transición** característica, la bicapa lipídica cambiará de una consistencia similar al gel a una consistencia de tipo más líquido. Esta temperatura de transición depende de la longitud de las cadenas de áci-

dos grasos y de su grado de insaturación. Si la longitud de las cadenas de ácidos grasos se incrementa, la fluidez de la bicapa disminuye debido a la mayor propensión de interacciones no covalentes entre las cadenas hidrocarbonadas. En contraste, si el grado de insaturación en las cadenas de ácidos grasos se incrementa, la fluidez de la bicapa también lo hace. Esto se debe a que los dobles enlaces con una configuración *cis* doblan la cadena hidrocarbonada y rompen el empaquetamiento fuertemente ordenado de las cadenas de ácidos grasos y por tanto reducen el número de interacciones entre los lípidos vecinos. Un importante regulador de la fluidez de la membrana en los sistemas de los mamíferos es el **colesterol**. A temperatura fisiológica (37 °C), incrementar la cantidad de colesterol en la bicapa llevará a una disminución en la fluidez de la membrana ya que los sistemas de anillos esteroideos rígidos interfieren con el movimiento lateral de las cadenas de ácidos grasos.

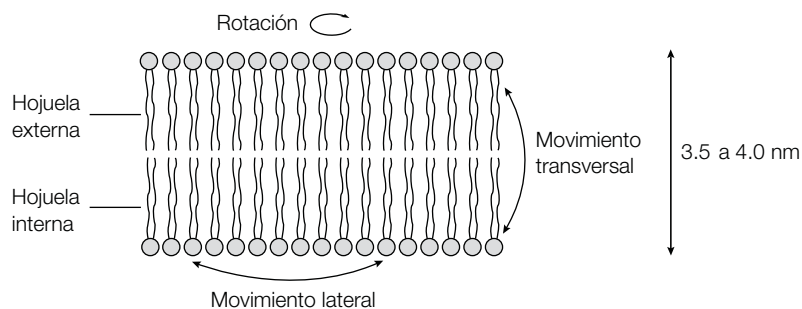


Figura E1-5. Movimiento de los lípidos en las membranas.

## E2 Estructura de la membrana

### Notas clave

#### Proteínas integrales de la membrana

Las proteínas integrales de la membrana se insertan en la región hidrófoba de la bicapa lipídica. La mayoría de las proteínas integrales de la membrana tienen una (p. ej., la glicoforina) o más (p. ej., la bacteriorodopsina) regiones de la cadena polipeptídica que atraviesan la bicapa lipídica. Estas regiones transmembranales contienen sobre todo aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas que forman una hélice  $\alpha$  e interactúan de manera no covalente con los lípidos circundantes. Unas pocas proteínas transmembranales atraviesan la membrana con una estructura formada por hebras  $\beta$ . Algunas proteínas integrales de la membrana no atraviesan la membrana, pero están asociadas a ella mediante un enlace covalente a un lípido de la membrana. Las proteínas integrales de la membrana se distribuyen de manera asimétrica a través de la bicapa y están en general libres para moverse en el plano de la bicapa, pero no para atravesar de un lado al otro de la membrana.

#### Proteínas periféricas de la membrana

Ninguna parte de una proteína periférica de la membrana interactúa con el interior hidrófobo de la bicapa. En su lugar, las proteínas periféricas de la membrana están asociadas a la superficie de ésta por enlaces iónicos no covalentes y puentes de hidrógeno y pueden removerse por lavado de la membrana con una solución de fuerza iónica alta o de pH extremo. El citoesqueleto que cubre la superficie citosólica de la membrana plasmática está formado por varias proteínas periféricas y es importante en el mantenimiento y alteración de la forma de las células.

#### Modelo de mosaico fluido de la estructura de la membrana

El modelo de mosaico fluido describe la estructura de las membranas biológicas, en el cual las membranas se consideran como soluciones bidimensionales de lípidos y proteínas globulares orientados. Muchas proteínas son libres de moverse lateralmente en el plano de la bicapa y este movimiento puede rastrearse usando la técnica de recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP).

#### Dominios lipídicos

Dentro de las membranas biológicas, lípidos y proteínas se pueden agrupar juntos en dominios discretos. Las balsas de lípidos son dominios de la membrana plasmática que están enriquecidos con colesterol, esfingomiélin y glucosfingolípidos, así como con proteínas modificadas por lípidos.

#### Purificación y reconstitución de las proteínas de la membrana

El primer paso en la purificación de las proteínas integrales de la membrana es la perturbación de la estructura de la membrana mediante su solubilización con un detergente (p. ej., Triton X-100). Una vez solubilizada, la región hidrófoba de la proteína es recubierta con una capa de moléculas anfipáticas del detergente, lo que permite que la proteína permanezca en solución acuosa y sea purificada, como sucede en una proteína globular soluble. Una vez purificadas, las proteínas integrales de la membrana pueden reconstituirse dentro de vesículas artificiales de lípidos (liposomas) con el fin de estudiar su función.

#### Carbohidratos de la membrana

Los residuos de azúcar se encuentran sólo en el lado extracelular de las membranas biológicas, fijos a los lípidos para formar glucolípidos o a las proteínas para formar glucoproteínas. Los carbohidratos forman una cubierta protectora sobre la superficie externa de la célula y están comprometidos en el reconocimiento intercelular.

#### Temas relacionados

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
| (A2) Células eucariotas                  | (C1) Purificación de las proteínas |
| (A4) Imágenes celulares                  | (E1) Lípidos de la membrana        |
| (B2) Estructura y función de la proteína | (E5) Transducción de señales       |
|  | (H5) Glucosilación de proteínas    |

## Proteínas integrales de la membrana

Las proteínas de membrana se clasifican en **periféricas** (extrínsecas) o **integrales** (intrínsecas) dependiendo de su grado de asociación a la membrana. Las proteínas integrales de la membrana están estrechamente unidas a la misma a través de interacciones con el centro hidrófobo de la bicapa (véase la figura E2-4) y pueden extraerse de ella sólo mediante el uso de agentes que destruyan la estructura de la membrana, como los **solventes orgánicos** (p. ej., cloroformo) o los **detergentes** (véase más adelante). La mayor parte de las proteínas integrales de la membrana tiene una o más regiones de la cadena polipeptídica que atraviesan la bicapa lipídica e interactúan de forma no covalente con las cadenas hidrófobas de ácidos grasos. No obstante, algunas proteínas están fijadas en la membrana por una unión covalente a una cadena de un ácido graso o a una cadena hidrocarbonada (véase más adelante). Como los lípidos, las proteínas integrales de la membrana son **anfipáticas**, tienen regiones hidrófobas e hidrófilas y se **distribuyen de manera asimétrica** a través de la bicapa (sección E1).

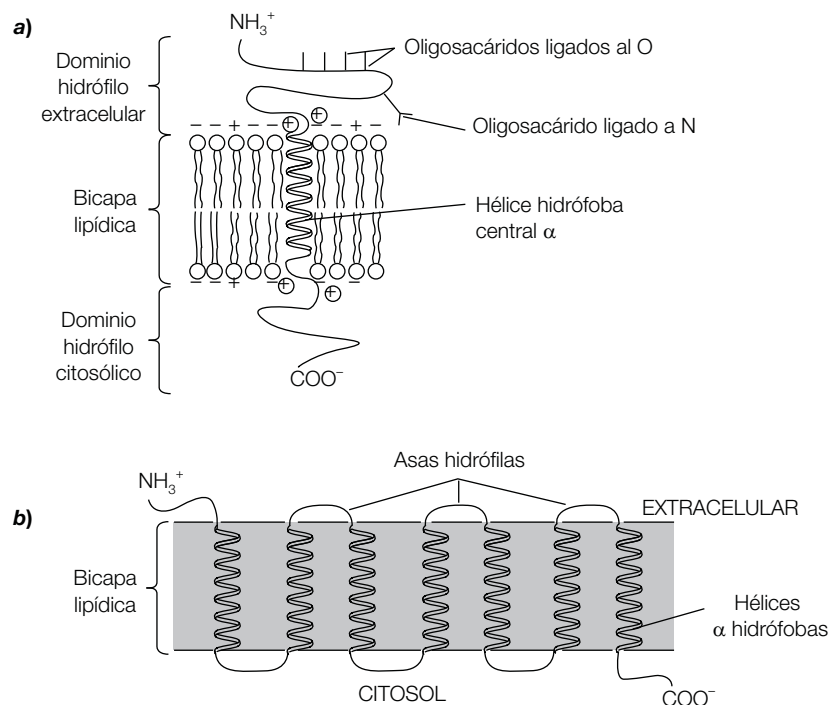
### Glicoforina, una proteína transmembranal

Debido a que los **eritrocitos** (glóbulos rojos) no contienen ningún organelo intracelular (en esencia, son un saco membranoso para transportar hemoglobina; sección B3), su membrana plasmática es un sistema modelo conveniente para realizar estudios de la estructura de

la membrana ya que puede aislarse con facilidad de otras membranas y componentes intracelulares. Una de las principales proteínas de la membrana plasmática de los eritrocitos es la **glicoforina A**, una proteína de 131 aminoácidos que fue la primera proteína integral de la membrana en secuenciarse (sección C3). Ésta reveló que la cadena polipeptídica de la glicoforina consta de tres dominios:

1. Una región N terminal en el lado extracelular de la membrana rica en residuos polares y cargados que contienen todos los **sitios de glucosilación** ligados a N y O (sección H5).
2. Una región central rica en residuos apolares que está oculta en el centro hidrófobo de la bicapa.
3. Una región C terminal rica en residuos polares y cargados que está expuesta en el lado citosólico de la membrana (figura E2-1a).

Como en la mayoría de las proteínas transmembranales, la región hidrófoba que atraviesa la membrana consiste sobre todo en residuos de aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas que están plegadas en una **configuración de hélice  $\alpha$**  (sección B2). Ya que cada residuo de aminoácidos agrega 0.15 nm a la longitud de una hélice  $\alpha$ , una hélice de 25 residuos debería tener una longitud de 3.75 nm, sólo lo suficiente para atravesar el centro hidrófobo de la bicapa. Las cadenas laterales hidrófobas de los residuos de la hélice protruyen hacia fuera



**Figura E2-1.** Proteínas integrales de la membrana: a) región donde la proteína atraviesa por única vez la membrana (p. ej., glicoforina); b) múltiples regiones donde la proteína atraviesa la membrana (p. ej., la bacteriorrodopsina).



desde el eje de la hélice para interactuar mediante interacciones hidrófobas con las cadenas de ácidos grasos. En cualquier lado de esta hélice  $\alpha$  hidrófoba hay grupos de aminoácidos con cadenas laterales cargadas que interactúan de manera no covalente con las cargas opuestas de los principales grupos polares de los lípidos de la membrana.

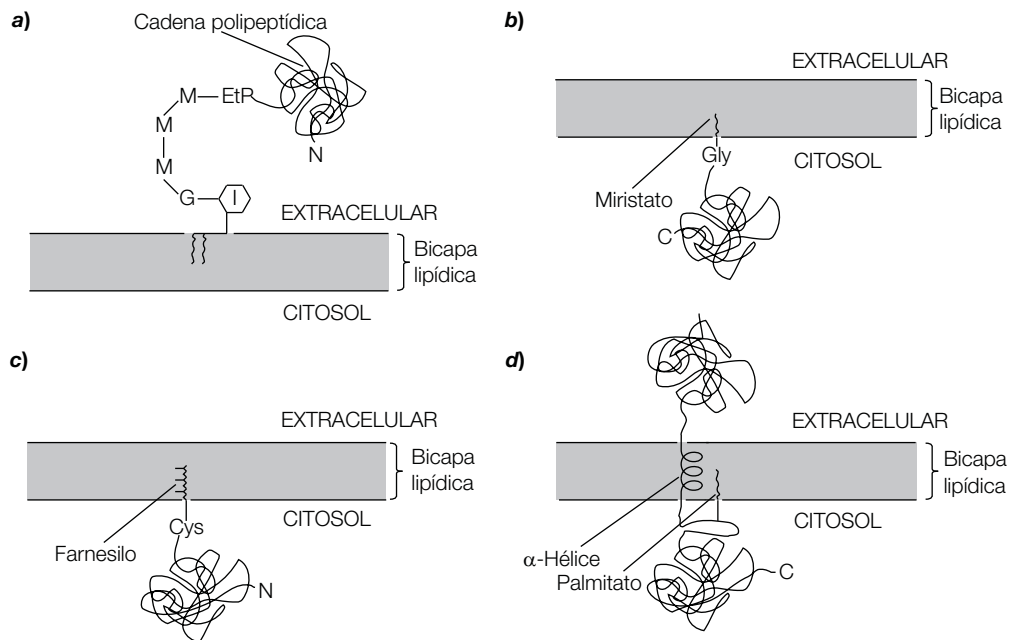
**Proteínas que atraviesan la membrana muchas veces**

Algunas proteínas transmembranales tienen **hélices  $\alpha$  que atraviesan la membrana muchas veces**. La **bacteriorodopsina**, una proteína encontrada en una bacteria fotosintética, capta energía de la luz y la usa para bombear protones a través de la membrana bacteriana. Como numerosas proteínas integrales, como las de los **receptores acoplados a la proteína G** (sección E5), la cadena polipeptídica de las asas de la bacteriorodopsina cruzan de regreso y de salida la bicapa lipídica siete veces (figura E2-1). Cada una de las **siete hélices  $\alpha$  transmembranales** está unida a la siguiente por una breve región hidrófila de la cadena polipeptídica que está expuesta sobre el lado extracelular o el citosólico de la membrana. Otras proteínas que atraviesan la membrana por múltiples trechos tienen de dos hasta 14 hélices transmembranales. Por ejemplo, la **proteína de la banda 3 del intercambiador aniónico** de la membrana plasmática del eritrocito que transporta cloro y bicarbonato a través de las asas de la membrana, cruza la bicapa lipídica de regreso y de salida hasta 14 veces.

Unas pocas proteínas transmembranales, por ejemplo la **proteína porina** de la membrana externa de la bacteria *E. coli*, no contienen hélices  $\alpha$  y en su lugar atraviesa la membrana con una estructura formada de **hebras  $\beta$** . Cada hebra  $\beta$  está unida al hidrógeno de la hebra vecina en una disposición antiparalela que forma una hoja  $\beta$  simple (sección B2). La hoja  $\beta$  se enrolla para formar un cilindro hueco que funciona como un canal a través de la bicapa.

**Proteínas ancladas a lípidos**

Un número significativo de proteínas integrales de la membrana en los eucariotas carece de regiones transmembranales, pero están ancladas a una u otra monocapa de la bicapa a través de uniones covalentes entre la proteína y una cadena lipídica hidrocarbonada. Varias proteínas, incluida la **proteína priónica** (el agente causal de la enfermedad de las vacas locas), están fijadas de manera estable a la superficie celular a través de un enlace covalente de su aminoácido del C terminal al grupo cabeza de un fosfatidilinositol mediante un puente de etanolamina-fosfato-trimanosa, las llamadas proteínas **ancladas al glucosilfosfatidilinositol (GPI)** (figura E2-2a). Esta estructura compleja está construida por la adición secuencial de residuos individuales de azúcar y fosfato de etanolamina al fosfatidilinositol. Un péptido con señal hidrófoba en el C terminal es eliminado de la proteína en la luz del RER y la GPI preformada fija se añade al nuevamente expuesto aminoácido del C terminal (véase la sección H4 para mayores detalles).



**Figura E2-2.** Proteínas modificadas por lípidos: a) una proteína fija al glucosilfosfatidilinositol (I, inositol; G, glucosamina; M, manosa; EtP, fosfato de etanolamina); b) una proteína miristoilada; c) una proteína prenilada; d) una proteína palmitoilada.

Otras proteínas se anclan de manera transitoria a la cara citosólica de la membrana mediante ligaduras amida o por medio de una molécula de miristato (C14:0) a un residuo Gly N terminal (proteínas **miristoiladas**; figura E2-2*b*), o mediante un enlace tioéter de un **farnesilo** de 15 carbonos o de un hidrocarburo poliinsaturado **geranilgeranilo** de 20 carbonos a un residuo Cys C terminal (proteínas **preniladas**; figura E2-2*c*). El farnesilo y el geranilgeranilo son sintetizados a partir de pirofosfato de isopentenilo, el precursor del colesterol (sección K5). Algunas proteínas también son modificadas en los residuos Cys con palmitato fijo de manera covalente (C16:0) (proteínas **palmitoiladas**). Éstas incluyen algunas con polipéptidos que atraviesan la membrana (figura E2-2*d*), algunas proteínas preniladas y algunas proteínas miristoiladas. Muchas de las proteínas que intervienen en la señalización celular, como las proteínas G y la familia de proteínas Ras, son modificadas por los lípidos (sección E5).

### Proteínas periféricas de la membrana

Las **proteínas periféricas de la membrana** están unidas menos estrechamente a la bicapa lipídica que las proteínas integrales y pueden removerse con facilidad mediante lavado de las membranas con una solución de **alta fuerza iónica** (p. ej., NaCl 1 M) o de **pH extremo**. Estos procedimientos dejan a la bicapa lipídica intacta, pero destruyen las interacciones iónicas y los puentes de hidrógeno que mantienen a las proteínas periféricas en la superficie de la membrana. Ninguna parte de una proteína periférica de la membrana interactúa con el centro hidrófobo de la bicapa. Las proteínas periféricas de la membrana pueden encontrarse en la superficie externa o interna de la bicapa y pueden relacionarse con la membrana a través de interacciones no covalentes con el grupo lipídico principal, con otras proteínas de la membrana o con ambos (véase la figura E2-4). Una vez removidas de la membrana, las proteínas periféricas se comportan como proteínas globulares solubles en agua y pueden ser purificadas como tales (sección C1).

### Citoesqueleto

La superficie citosólica de la membrana plasmática eritrocítica está cubierta por una red de proteínas periféricas de la membrana que constituyen el **citoesqueleto** (figura E2-3) (sección A2). El componente principal de tal citoesqueleto es la **espectrina**, la cual se pliega en una **espiral enrollada helicoidal  $\alpha$**  de triple hebra para formar cadenas largas. Las cadenas de espectrina se fijan a la membrana plasmática a través de interacciones con dos proteínas periféricas, la **anquirina** y la **proteína de banda 4.1**. La anquirina forma un enlace cruzado entre la espectrina y el dominio citosólico del intercambiador de aniones integral, la proteína de banda 3, mientras que la banda 4.1 promueve la unión de los **filamentos de actina** (sección A2) a las cadenas de espectrina que la ligan con el dominio citosólico de la glicoforina. El citoesqueleto otorga a la membrana plasmática del eritrocito mayor fuerza y flexibilidad y es importante en el mantenimiento y alteración de la forma de la célula. En otras células de los mamíferos, el citoesqueleto tiene una función similar pero consiste en otras numerosas proteínas que se entrecruzan a través del citoplasma (sección A2).

### Modelo de mosaico fluido de la estructura de la membrana

En 1972, S. Jonathan Singer y Garth Nicholson propusieron el **modelo del mosaico fluido** para la estructura completa de las membranas biológicas, en la cual las membranas pueden verse como soluciones bidimensionales de lípidos y proteínas globulares orientados (figura E2-4). Las proteínas integrales de la membrana pueden considerarse como ‘icebergs’ que flotan en un mar lipídico bidimensional. Ellos propusieron que la organización en bicapa de los lípidos podría actuar como un solvente para las proteínas integrales de la membrana anfipáticas y como una **barrera de permeabilidad**. También propusieron que algunos lípidos pueden interactuar con ciertas proteínas de la membrana,

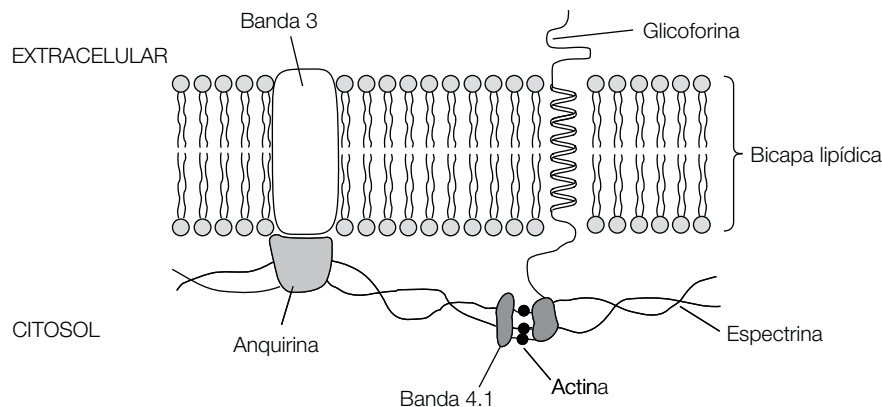


Figura E2-3. Citoesqueleto del eritrocito.

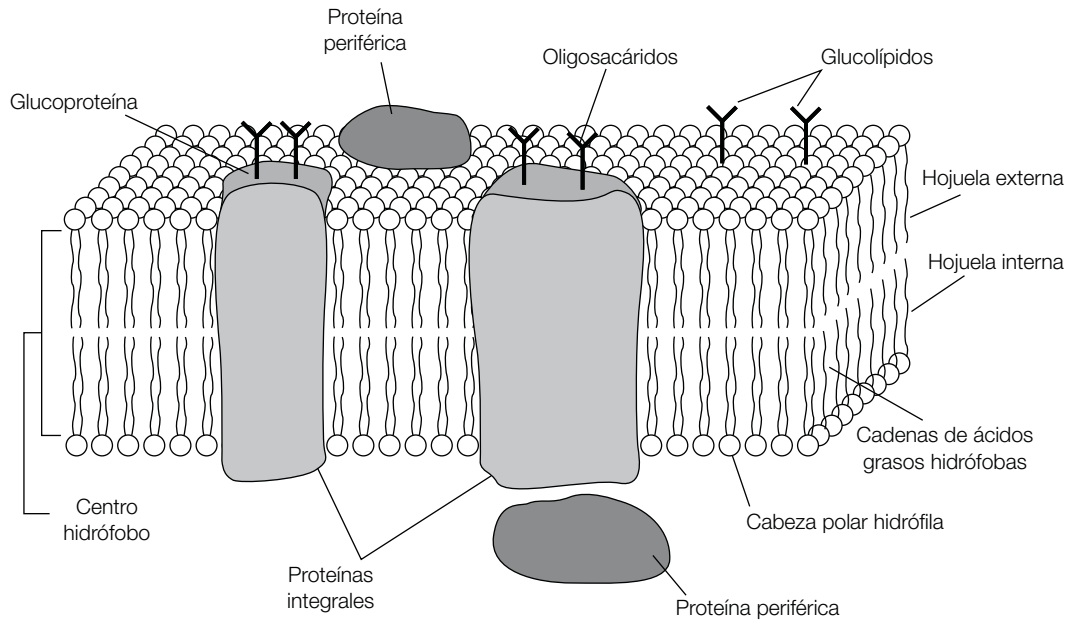


Figura E2-4. Modelo de mosaico líquido de la estructura membranosa.

que dichas interacciones podrían ser esenciales para el funcionamiento normal de la proteína y que las proteínas de la membrana podían ser libres de difundirse en dirección lateral en el plano de la bicapa, a menos que estuvieran restringidas de alguna forma, pero que no serían capaces de atravesar de un lado al otro de la bicapa. Ahora este modelo cuenta con el soporte de una amplia variedad de observaciones experimentales.

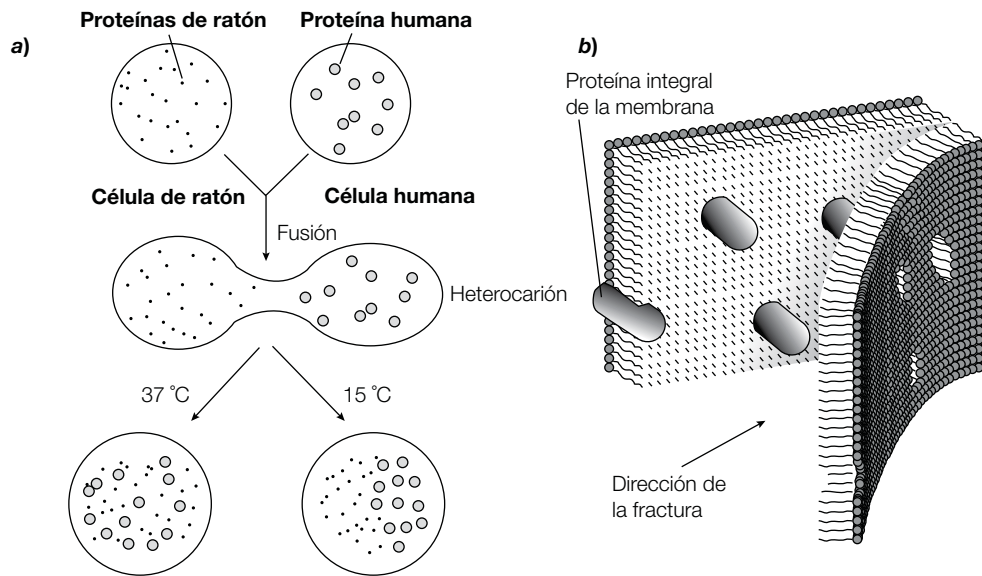
#### Movimiento y distribución de la proteína integral de la membrana

Muchas proteínas son libres de **moverse hacia los lados** en el plano de la bicapa. Un experimento usado para mostrar esto incluyó la fusión de células de ratón cultivadas con células humanas cultivadas bajo condiciones apropiadas para formar una célula híbrida conocida como **heterocarión** (figura E2-5a). Las células de ratón fueron marcadas con anticuerpos específicos contra proteínas de ratón a las cuales se fijó el colorante fluorescente verde **fluoresceína** de manera covalente, mientras que las células humanas fueron marcadas con el colorante fluorescente rojo **rodamina** (sección A4). Tras la fusión celular, al observarlas con el **microscopio de fluorescencia** (sección A4), las proteínas de ratón y humana fueron segregadas en las dos mitades del heterocarión (figura E2-5a). Después de 40 minutos a 37 °C, sin embargo, las proteínas de ratón y humanas estaban completamente entremezcladas. La reducción de la temperatura por abajo de 15 °C inhibió este proceso, lo que indicó que las proteínas son libres para difundirse lateralmente en la membrana y que este movimiento se lentifica a medida que la temperatura se reduce. Debe hacerse notar, sin embargo, que algunas proteínas integrales de la membrana no son libres de moverse lateralmente en

la membrana debido a que interactúan con el citoesqueleto del interior de las células (véase más adelante).

El movimiento lateral de las proteínas en una membrana también puede visualizarse por microscopía de fluorescencia (sección A4) a través del uso de la técnica de **recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento** (FRAP). Primero, la proteína de la membrana se marca de manera específica con un compuesto fluorescente (sección A4) y luego, mientras se visualiza la superficie celular a través de un microscopio de fluorescencia, las moléculas fluorescentes de una pequeña región son destruidas (blanqueadas) mediante un pulso intenso de luz de un láser. La fluorescencia de esta región blanqueada se inspecciona en función del tiempo en una etapa posterior en función del tiempo, a medida que otras proteínas marcadas con fluorescencia se mueven hacia dentro de la región blanqueada de la membrana. La tasa de recuperación de la fluorescencia depende de la movilidad lateral de las proteínas marcadas con fluorescencia.

La distribución de las proteínas en las membranas puede revelarse por microscopía electrónica mediante la **técnica de criofractura** (figura E2-5b). En esta técnica, un espécimen de membrana se congela con rapidez a la temperatura del nitrógeno líquido (−196 °C) y luego se fractura mediante un impacto fuerte. La bicapa se divide con frecuencia en las dos monocapas, lo que revela el interior. La superficie expuesta se recubre entonces con una película de carbono y se sombrea con platino con el fin de que sea visualizada en el microscopio electrónico (sección A4). La superficie fracturada de la membrana ha revelado la presencia de numerosas protuberancias distribuidas al azar que corresponden a las proteínas integrales transmembranales.



**Figura E2-5.** a) Movimiento y b) distribución (como se muestra por microscopia electrónica de criofractura) de las proteínas integrales de la membrana.

## Dominios lipídicos

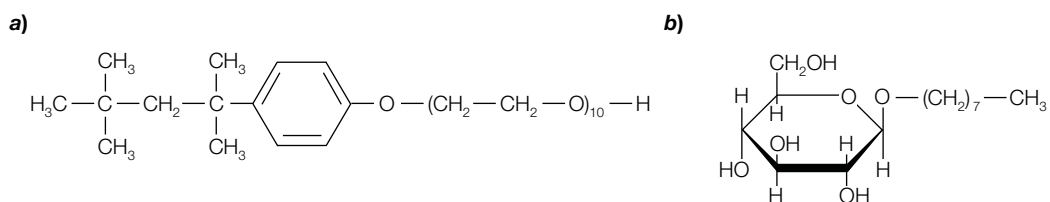
Las membranas biológicas no son sólo una mezcla homogénea de lípidos y proteínas. Dentro de ellas hay **dominios** acotados en los cuales ciertos lípidos y proteínas se agrupan juntos para formar unidades estructurales y funcionales. Por ejemplo, el agrupamiento conjunto de **colesterol**, **esfingomielina** y **glucoesfingolípidos** en la cara externa de la bicapa, más otros lípidos de la cara opuesta interior, da origen a las **balsas lipídicas**. Varias proteínas modificadas por lípidos, como las proteínas de la monocapa externa ancladas al GPI y las proteínas miristoiladas y palmitoiladas de la monocapa interna, se asocian con balsas de lípidos mismas que han sido implicadas en varios procesos celulares como la **señalización celular** (sección E5) y el transporte de proteínas y lípidos desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática.

## Purificación y reconstitución de las proteínas membranales

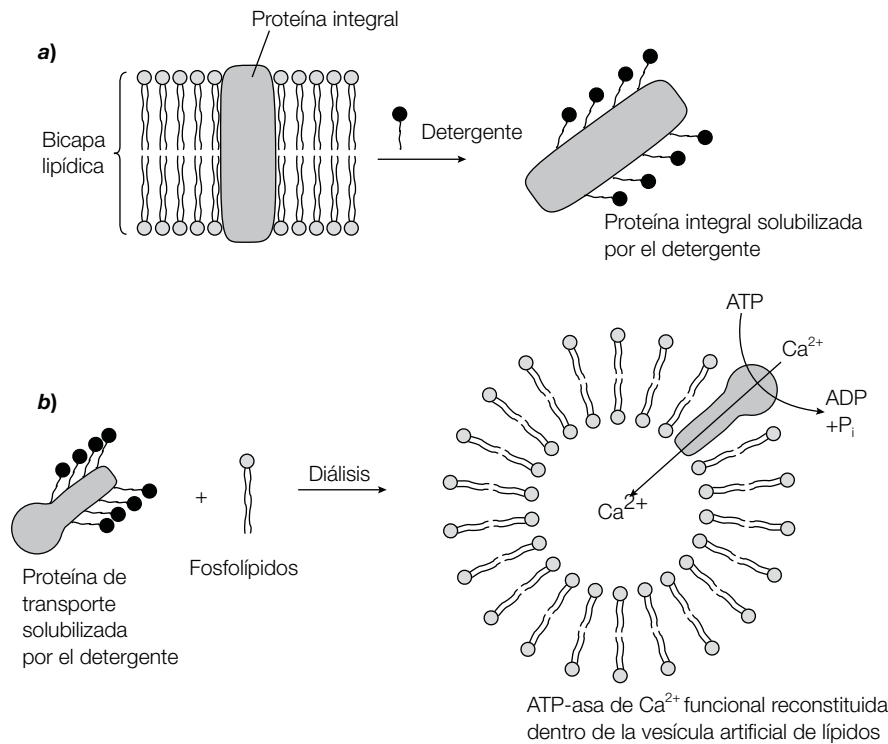
El primer paso en la **purificación** de una proteína integral de la membrana es destruir sus interacciones con otras proteínas y lípidos de la membrana. Lo anterior

suele conseguirse al añadir un **detergente**, que solubiliza la membrana. Con el fin de solubilizar la membrana pero sin desnaturalizar las proteínas, se usan detergentes suaves como el Triton X-100 o el octilglucósido (figura E2-6), en lugar de detergentes más fuertes como el SDS. Como las moléculas del detergente son en sí mismas anfipáticas, se intercalan con facilidad dentro de la bicapa lipídica y rompen las interacciones hidrófobas.

Una vez que se solubiliza, la región hidrófoba de la proteína integral es revestida por una capa de moléculas del detergente, las cuales le permiten a la proteína permanecer en solución (figura E2-7a). La proteína solubilizada está entonces en condiciones de ser purificada como una proteína globular soluble en agua (sección C1), en tanto el detergente se mantenga en el amortiguador para evitar la agregación y la pérdida de la proteína. Una vez purificada, una proteína integral de membrana puede reincorporarse (reconstituirse) dentro de vesículas artificiales de lípidos (**liposomas**) con el propósito de estudiar su función (figura E2-7b). Si se añaden fosfolípidos a la proteína en la solución con detergente y el detergente se dializa hacia afuera, se forman de manera espontánea vesículas de fosfolípidos que contienen a la proteína. A partir de éstas, puede estudiarse la función de



**Figura E2-6.** Estructuras del a) Triton X-100 y b) del octilglucósido.



**Figura E2-7.** a) Solubilización con detergente y b) reconstitución de una proteína integral de membrana dentro de vesículas artificiales de lípidos.

la proteína. Por ejemplo, si se reconstituye la **ATP-asa de  $\text{Ca}^{2+}$**  dentro de las vesículas lipídicas, su función (esto es, el transporte de calcio durante la hidrólisis del ATP) puede estudiarse si se mide el calcio del interior de la vesícula al agregar calcio y ATP por fuera de ella (figura E2-7b).

### Carbohidratos de la membrana

La superficie extracelular de la membrana plasmática está cubierta con frecuencia con una capa protectora de **carbohidratos**. Los residuos de azúcar de tal revestimiento de carbohidratos pueden encontrarse unidos a ciertos lípidos como los glucoesfingolípidos (sección E1) o a las cadenas polipeptídicas de las proteínas periféricas

o integrales de la membrana. Estos **glucolípidos** y **glucoproteínas** son abundantes en la membrana plasmática de las células eucariotas, pero están prácticamente ausentes de la mayoría de las membranas intracelulares, en particular de la membrana mitocondrial interna y de las láminas del cloroplasto. En las glucoproteínas, los residuos de azúcar pueden fijarse a la cadena polipeptídica a través del grupo hidroxilo de la cadena lateral de residuos de Ser o Thr como **oligosacáridos unidos al oxígeno**, o a través de un grupo amida de la cadena lateral del Asn como **oligosacáridos ligados al nitrógeno** (sección H5). El carbohidrato de la cara extracelular de la membrana no sólo desempeña un **papel protector** sino que también interviene en el **reconocimiento intercelular** y en el mantenimiento de la asimetría de la membrana.

## E3 Transporte de membrana: moléculas pequeñas

### Notas clave

#### Permeabilidad de la membrana

La membrana plasmática es una barrera selectivamente permeable. Algunas moléculas pequeñas, lipófilas pueden pasar directamente a través de la bicapa sin ayuda (transporte no-mediado), mientras que las moléculas hidrófilas/cargadas requieren la presencia de proteínas de transporte integrales de la membrana (transporte mediado).

#### Transporte pasivo

El movimiento de las moléculas a través de una membrana por transporte pasivo no requiere ningún aporte de energía metabólica. Las moléculas se mueven desde una concentración alta a una concentración más baja.

#### Difusión simple

El transporte pasivo por difusión simple (es decir, de agua, gases, urea, hormonas esteroideas) no requiere la presencia de proteínas integrales de la membrana y la velocidad del movimiento es directamente proporcional al gradiente de concentración de las moléculas a través de la membrana.

#### Difusión facilitada

El transporte pasivo por difusión facilitada requiere la presencia de proteínas integrales de la membrana específicas (canales, transportadores) para facilitar el movimiento de la molécula (p. ej., glucosa, otros azúcares, aminoácidos) a través de la membrana. La proteína transportadora (p. ej., el transportador de glucosa del eritrocito) es una molécula específica para una molécula particular. En algunas células, el agua pasa a través de proteínas con canales llamadas acuaporinas.

#### Transporte activo

El transporte activo de una molécula contra su gradiente de concentración a través de una membrana requiere el aporte de energía metabólica.

#### Transporte activo impulsado por el ATP (transporte activo primario)

En el caso del transporte activo impulsado por el ATP, la energía requerida para el transporte de la molécula o ion ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{H}^+$ ) a través de la membrana se deriva de la hidrólisis acoplada del ATP (p. ej., ATP-asa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , un ejemplo de una ATP-asa de tipo P). Los glucósidos cardíacos digitalina y ouabaína, los cuales se usan ampliamente en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, inhiben a la ATP-asa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

#### Transporte activo impulsado por iones (transporte activo secundario)

En el transporte activo impulsado por iones, el movimiento de la molécula a transportar a través de la membrana se acopla al movimiento de un ion (p. ej.,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ ) a favor del gradiente de concentración. Si la molécula a transportar y el ion se mueven en la misma dirección a través de la membrana, el proceso se llama simporte (p. ej., el transportador de  $\text{Na}^+/\text{glucosa}$ ); si la molécula y el ion se mueven en direcciones opuestas, se llama antiporte (p. ej., el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ).

#### Transporte de glucosa dentro de las células epiteliales intestinales

El transporte de glucosa a través de las células del revestimiento del epitelio polarizados del intestino incluye su transporte a través de la membrana apical por el simportador de  $\text{Na}^+/\text{glucosa}$ ; la energía para el movimiento de la glucosa procede del movimiento del sodio a favor de su gradiente de concentración. La concentración de los iones  $\text{Na}^+$  en el interior de la célula se mantiene a un nivel bajo por la acción de la ATP-asa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de la membrana basolateral. Entonces, la glucosa abandona la célula a través de la membrana basolateral por difusión facilitada con la mediación del transportador de glucosa. El movimiento del  $\text{Na}^+$  y la glucosa a través de la célula establece una diferencia de presión osmótica que causa su seguimiento por parte del agua por difusión simple, lo cual constituye la base de la terapia de rehidratación oral.

## Temas relacionados

(E1) Lípidos de la membrana  
(E2) Estructura de la membrana

(E6) Función nerviosa

**Permeabilidad de la membrana**

Una capa pura de fosfolípidos, con sus grupos hidrófobos internos (sección E1), es **permeable** al agua, gases ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $N_2$ ), pequeñas moléculas polares sin carga (p. ej., urea, etanol) y grandes moléculas lipófilas (p. ej., hormonas esteroideas). Sin embargo, es **impermeable** a las grandes moléculas polares sin carga (p. ej., glucosa), iones ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ) y a moléculas polares con carga (p. ej., aminoácidos, ATP, glucosa 6-fosfato). El primer grupo de moléculas puede cruzar una membrana biológica sin ayuda y sin aporte de energía (**transporte sin mediación**), mientras que el último grupo requiere la presencia de **proteínas de transporte integrales de la membrana** y, en algunos casos, un **aporte de energía** para viajar a través de la barrera de otro modo impermeable de la membrana (**transporte mediado**). Por tanto, la membrana plasmática y las membranas de los organelos internos son **barreras selectivamente permeables**, que mantienen un ambiente interno diferente.

**Transporte pasivo**

El transporte pasivo de moléculas a través de la membrana no requiere un aporte de energía metabólica. La velocidad de transporte (difusión) es proporcional al gradiente de concentración de la molécula a través de la membrana. Hay dos tipos de transporte pasivo: **difusión simple** y **difusión facilitada**.

**Difusión simple**

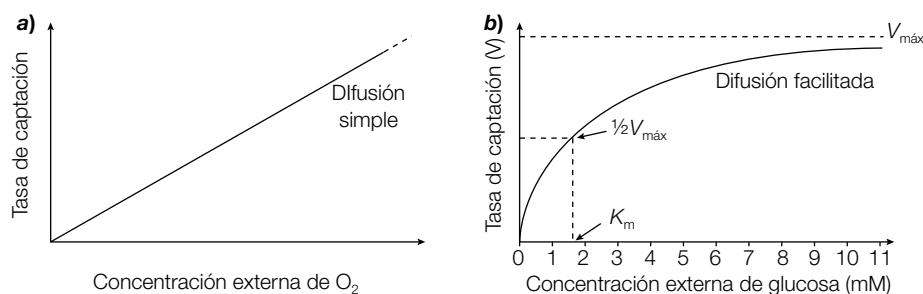
Sólo las moléculas pequeñas sin carga o hidrófobas ( $H_2O$ ,  $O_2$ ,  $CO_2$ , otros gases, urea y etanol) o las moléculas lipófilas más grandes (p. ej., hormonas esteroideas, las cuales derivan del colesterol; sección K5) cruzan la bicapa lipídica por difusión simple, sin intervención de proteínas de membrana, de manera que no hay especificidad. La molécula en solución acuosa en un lado de la membrana se disuelve dentro de la bicapa lipídica, la cruza y

luego se disuelve dentro de la solución acuosa del lado opuesto. La velocidad de difusión es directamente proporcional al gradiente de concentración de la molécula a través de la membrana y el proceso no es saturable (figura E3-1a).

**Difusión facilitada**

A diferencia de la difusión simple, la difusión facilitada (o mediada por transportador) de una molécula a través de una membrana biológica depende de las **proteínas específicas integrales de las membranas** (sección E2), que se denominan indistintamente **canales**, **acarreadores**, **permeasas** y **transportadores**. La molécula a transportar se une a la proteína integral en un lado de la membrana; la proteína entonces sufre un **cambio conformacional**, transporta la molécula a través de la membrana y luego la libera en el otro lado. Las moléculas así transportadas a través de las membranas pueden ser hidrófilas como la glucosa, otros azúcares y aminoácidos. Las proteínas transportadoras son **específicas** para una molécula o un grupo particular de moléculas con similitudes estructurales. Las proteínas de transporte pueden saturarse, muestran la cinética de unión tipo Michaelis-Menten ( $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ ) (figura E3-1b) y son influenciadas por la temperatura, el pH y moléculas inhibitoras de una forma similar a lo que le sucede a las enzimas (secciones D1 y D3).

Un ejemplo de difusión facilitada es la captación de la **glucosa** en los eritrocitos por el transportador de glucosa. El **transportador de glucosa de eritrocitos** o **uniportador (GLUT1)** es una proteína integral de la membrana de 45 kDa de masa que está orientada de manera asimétrica en la membrana plasmática. Esta proteína uniportadora tiene una estructura que atraviesa la membrana con 12 hélices  $\alpha$  (sección E2), la cual forma un poro central a través del cual pasa la molécula de glucosa tras los **cambios conformacionales** de la proteína (figura E3-2). Todos los pasos en el transporte de



**Figura E3-1.** Cinéticas de la difusión a) simple y b) facilitada.

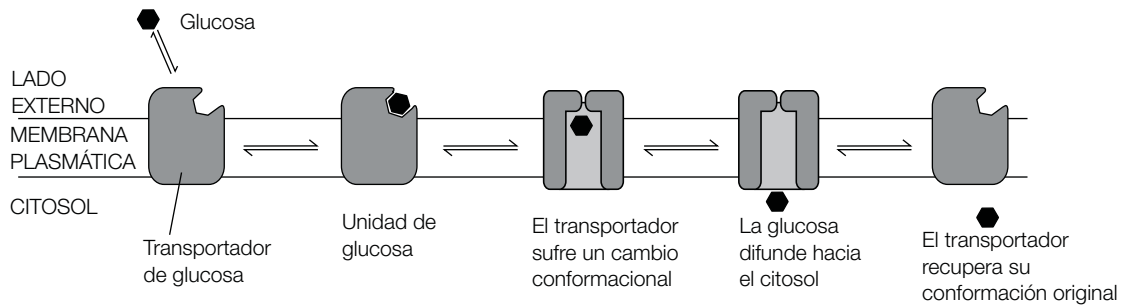


Figura E3-2. Difusión facilitada de la glucosa en los eritrocitos.

la glucosa hacia dentro de la célula son completamente reversibles y la dirección del movimiento de la glucosa depende de las concentraciones relativas de la glucosa a ambos lados de la membrana. Con el fin de mantener el gradiente de concentración a través de la membrana, la hexocinasa fosforila con rapidez a la glucosa dentro de la célula para convertirla en glucosa 6-fosfato (sección J3), la cual no es un sustrato demasiado grande para el transportador de glucosa. El transportador de la glucosa de eritrocitos es altamente específico para la D-glucosa ( $K_m = 1.5 \text{ mM}$ ), mientras que el L-isómero no biológico es transportado a una velocidad apenas medible. La D-manosa y la D-galactosa, las cuales difieren de la D-glucosa en la configuración en el átomo de carbono 1 (sección J1), son transportadas a velocidades intermedias. En consecuencia, el transportador tiene una afinidad más alta por la glucosa que por los otros azúcares.

Aunque el agua atraviesa con facilidad las membranas debido a su pequeño tamaño, su alta concentración y la falta de una carga eléctrica formal, muchas células, como los eritrocitos y las del riñón, contienen proteínas con canales para el agua, las **acuaporinas**, que aceleran el flujo osmótico del agua. Cada proteína acuaporina es un tetrámero de subunidades idénticas de 28 kDa, con seis hélices  $\alpha$  transmembranales en cada subunidad. Las moléculas de agua se mueven a través del poro central de cada subunidad. Las acuaporinas permiten que las células muevan grandes cantidades de agua con rapidez a través de su membrana plasmática.

## Transporte activo

El transporte activo, en el cual una molécula es transportada desde una concentración baja a una alta, requiere

el **aporte de energía metabólica**. Ésta puede derivarse desde el acoplamiento directo a la **hidrólisis del ATP** o mediante el acoplamiento al **movimiento de un ion** a favor de su gradiente de concentración.

## Transporte activo impulsado por el ATP (transporte activo primario)

En este caso, la energía requerida para el transporte de la molécula a través de la membrana deriva de la **hidrólisis acoplada del ATP**. Se han identificado numerosas familias de transportadores dependientes del ATP, como las **ATP-asas de tipo P** y los **transportadores ABC**. Un ejemplo de un buen estudio de ATP-asa de tipo P es el de la **ATP-asa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$**  que interviene en el movimiento de los iones de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  a través de la membrana plasmática de los eucariotas. Todas las células mantienen una concentración interna alta de  $\text{K}^+$  y una concentración interna baja de  $\text{Na}^+$ . El **gradiente de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$**  resultante a través de la membrana plasmática es importante para el transporte activo de ciertas moléculas y el mantenimiento del potencial eléctrico de la membrana (sección E6). El **regulador de la conductancia transmembranal en la fibrosis quística (CFTR)** es un ejemplo de un transportador ABC. Esta proteína, que es defectuosa en individuos con la fibrosis quística hereditaria, transporta  $\text{Cl}^-$  fuera de la célula. El movimiento a través de la membrana de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{H}^+$ , así como de varias otras moléculas, se acopla directamente a la hidrólisis del ATP.

## Estructura y acción de la ATP-asa de $\text{Na}^+/\text{K}^+$

La ATP-asa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  es una proteína integral de la membrana que consiste en una subunidad  $\alpha$  de 110 kDa que contiene los sitios de unión de iones y una subunidad  $\beta$

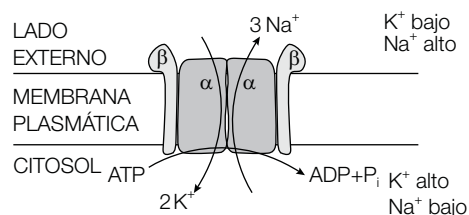


Figura E3-3. ATP-asa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .



de 55 kDa de función desconocida, que forma un heterotetrámero ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub> (figura E3-3). Después de la hidrólisis de una molécula de ATP a ADP y P<sub>i</sub> (el P<sub>i</sub> se une de manera transitoria a un residuo aspartilo en la proteína), la proteína sufre un cambio conformacional y se bombean tres iones Na<sup>+</sup> fuera de la célula a través de la membrana plasmática y dos iones K<sup>+</sup> en la dirección opuesta, hacia dentro de la célula. Ambos iones se mueven en contra de sus gradientes de concentración a través de la membrana; por consiguiente, requieren de un aporte de energía. No se produce transporte a menos que el ATP se hidrolice y éste no se hidroliza si no hay Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> para transportar (es decir, se trata de un **sistema acoplado**). Los **glucósidos cardíacos** o los **esteroides cardiotónicos**, **digitalina** (encontrado en extractos de hojas de digital púrpura) y **ouabafina**, inhiben a la ATP-asa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. La resultante disminución del gradiente de sodio inhibe al intercambiador de Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> (véase más adelante), lo que resulta en un incremento del calcio intracelular, el cual mejora la contractilidad del músculo cardíaco. Estos fármacos se usan en forma amplia en el tratamiento de la **insuficiencia cardíaca congestiva**.

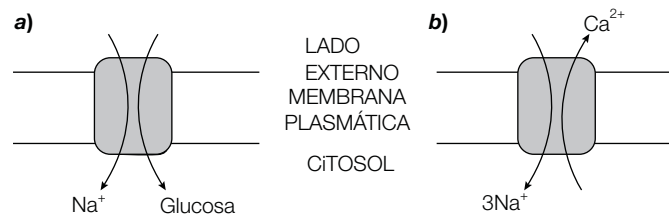
### Transporte activo impulsado por iones (transporte activo secundario)

En este caso, el movimiento de la molécula a transportar a través de la membrana se acopla al **movimiento de un ion**, en general Na<sup>+</sup> o H<sup>+</sup>. La energía para el movimiento de la molécula en contra de su gradiente de concentración a través de la membrana procede del movimiento del ion a favor de su gradiente de concentración (electroquímico). Si la molécula y el ion se mueven en la misma dirección, se denomina **simporte** y la proteína participante en el proceso se denomina un **simportador** (p. ej., el transportador de Na<sup>+</sup>/glucosa; figura E3-4a); si la molécula y el ion se mueven en direcciones opuestas, se denomina **antiporte** y la proteína participante en el proceso se llama **antiportador** (p. ej., el intercambiador de Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>; figura E3-4b).

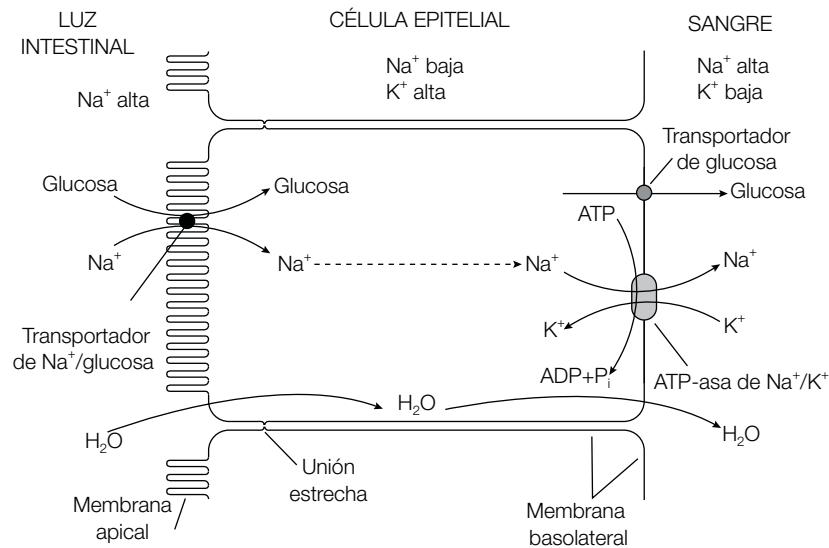
### Transporte de glucosa en las células epiteliales intestinales

Las células que revisten la luz del intestino están **polarizadas**, lo que significa que tienen dos lados o dominios diferentes que tienen asimismo composiciones distintas en lípidos y proteínas. La membrana **apical** o **el borde en cepillo** que mira hacia la luz está altamente plegado en microvellosidades que incrementan el área de superficie disponible para la absorción de nutrientes. El resto de la membrana plasmática, la superficie **basolateral**, está en contacto con las células vecinas y con los capilares sanguíneos (figura E3-5). El movimiento entre las células epiteliales adyacentes se evita mediante la formación de **uniones estrechas** alrededor de las células cerca del dominio apical. En consecuencia, cualquier molécula de nutriente que se encuentra en la luz del intestino tiene que pasar a través del citosol de la célula epitelial para que pueda ingresar a la sangre.

La glucosa (o los otros azúcares y aminoácidos) se transporta a través de la membrana apical desde una concentración relativamente baja en la luz del intestino a una concentración relativamente alta en el citosol de la célula epitelial por medio de un **simportador de Na<sup>+</sup>/glucosa** (figura E3-5). Esto es una forma de **transporte activo impulsado por un ion (secundario)**; la energía para el movimiento de la glucosa en contra de su gradiente de concentración procede del movimiento del sodio a favor de su gradiente de concentración. El flujo sanguíneo a través de los capilares en el lado basolateral de la célula epitelial mantiene un gradiente de concentración de la glucosa a través de esta membrana, lo que permite que la glucosa se mueva fuera de la célula por **difusión facilitada** a través de un **transportador de glucosa (un uniportador)**, el cual es similar al transportador de la glucosa de eritrocitos (véase antes). La relativamente baja concentración del Na<sup>+</sup> dentro de las células epiteliales se mantiene gracias a una **ATP-asa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>** (véase antes) en la membrana basolateral, un ejemplo de **transporte activo impulsado por ATP (primario)** (figura E3-5).



**Figura E3-4.** Mecanismos de cotransporte impulsados por iones. a) Proceso de simporte que incluye un simportador (p. ej., el transportador de Na<sup>+</sup>/glucosa); b) proceso de antiporte que incluye un antiportador (p. ej., el intercambiador de Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>).



**Figura E3-5.** Transporte de glucosa, Na<sup>+</sup> y agua a través de las células del epitelio intestinal.

### Terapia de rehidratación oral

En la **terapia de rehidratación oral (ORT)**, se administra una solución de glucosa y sal (NaCl) al paciente para remediar su deshidratación. Éste es un importante tratamiento que además es simple, no caro, pero de suma importancia, el cual ha salvado la vida de muchos lactantes en los países en desarrollo, quienes por otra parte hubieran muerto bajo los efectos de la deshidratación, por lo regular asociada a diarrea. La glucosa mejora la captación del Na<sup>+</sup> a través del simportador de Na<sup>+</sup>/

glucosa, el cual a su vez mejora el movimiento del agua por ósmosis a través de las células del epitelio intestinal hacia la sangre. Tomar sólo agua es ineficaz ya que el intestino grueso usualmente secreta en vez de absorber agua y iones Na<sup>+</sup>, los cuales después son reabsorbidos. Sin embargo, en sujetos con diarrea, el líquido secretado dentro del intestino pasa a través del intestino grueso tan rápido que se reabsorbe muy poco Na<sup>+</sup>, lo que conduce a niveles muy bajos de este catión en el cuerpo.

# E4 Transporte de membrana: macromoléculas

## Notas clave

### Exocitosis

La exocitosis es el movimiento de macromoléculas (proteínas, hormonas, neurotransmisores) fuera de la célula, a través de la membrana plasmática, hacia el espacio extracelular. Todas las células secretan proteínas en forma continua mediante vías secretorias constitutivas, aunque muchas células (p. ej., las del páncreas y las células nerviosas) también secretan proteínas a través de una vía secretoria regulada en respuesta a ciertos estímulos. Las proteínas destinadas a secretarse se sintetizan en los ribosomas unidos a la membrana del RER y luego son transportadas en vesículas unidas a la membrana hasta el aparato de Golgi, donde son distribuidas y empacadas en vesículas secretorias. Las vesículas recubiertas transportan material por toda la célula, siendo los revestimientos de proteínas como clatrina, COPI o COPII. Las proteínas SNARE median la fusión de las vesículas con sus membranas blanco.

### Endocitosis

La endocitosis es la captación de macromoléculas desde el espacio extracelular hacia la célula a través de la membrana plasmática, mediante la formación de una vesícula intracelular que se pellizca y se proyecta desde la membrana plasmática.

### Fagocitosis

La fagocitosis es la captación de partículas grandes (p. ej., bacterias y desechos celulares). Las partículas se unen a la superficie de las células fagocíticas y la membrana plasmática, que entonces las ingiere mediante la formación de una gran vesícula endocítica, el fagosoma. La mayoría de los protozoarios utiliza la fagocitosis como una forma de alimentación, mientras que en los organismos multicelulares sólo unas pocas células especializadas (p. ej., macrófagos y neutrófilos) pueden realizar fagocitosis.

### Endocitosis mediada por receptores

La endocitosis mediada por receptores, una forma de pinocitosis, es la captación selectiva de macromoléculas extracelulares a través de su unión a receptores específicos de la superficie celular. Luego, el complejo receptor-macromolécula se acumula en pequeñas cavidades revestidas de clatrina, que son endocitadas mediante una vesícula revestida por clatrina. Los polipéptidos de clatrina forman una estructura de tres patas conocida como trisquelelión, el cual se ensambla dentro de un marco convexo similar a un cesto que causa que la membrana se imagine en ese punto, y que acabe por pellizcarla para formar una vesícula (endosoma). Estas vesículas revestidas de clatrina migran dentro de la célula, donde la clatrina del revestimiento se pierde para formar endosomas iniciales. A medida que los endosomas maduran y acaban por fusionarse con los lisosomas, su contenido se acidifica y los receptores de la superficie celular son reciclados hacia la membrana plasmática. El colesterol, en la forma de lipoproteínas de baja densidad, es captado dentro de las células de los mamíferos por endocitosis mediada por receptor.

### Temas relacionados

|                                |                                    |
|--------------------------------|------------------------------------|
| (E2) Estructura de la membrana | (H4) Direccionamiento de proteínas |
| (E5) Transducción de señales   | (K6) Lipoproteínas                 |
| (E6) Función nerviosa          |                                    |

## Exocitosis

Con frecuencia, una célula necesita secretar moléculas más grandes que las que pueden acomodarse en los sistemas de transporte que se estudiaron en la sección E3.

**Exocitosis** se refiere al movimiento de macromoléculas como las proteínas, hormonas, neurotransmisores, etc., a través de la membrana plasmática, hacia el espacio extracelular. Las **vesículas unidas a las membranas** que contienen la molécula a secretarse se fusionan con la membrana plasmática para liberar su contenido en el espacio extracelular. En la **vía secretoria constitutiva** (figura E4-1), las vesículas destinadas a la membrana plasmática abandonan el aparato de Golgi en un flujo constante. Las proteínas y lípidos de la membrana de estas vesículas proveen nuevo material para la membrana plasmática, mientras que las proteínas solubles, neurotransmisores, etc., dentro de las vesículas se secretan hacia el espacio extracelular. Todas las células tienen esta vía constitutiva secretora.

Las proteínas destinadas a secretarse por la célula se traducen en ribosomas fijos al RER (sección H4). Las vesículas que contienen estas proteínas geman desde el RER, migran a través del citosol y se fusionan con la membrana del **aparato de Golgi** (figura E4-1). Otras vesículas geman y mueven las proteínas a través de los diferentes compartimientos del aparato de Golgi, donde se efectúan varias modificaciones postraduccionales en las proteínas, como la glucosilación O-ligada (sección H5). Las proteínas se empaquetan dentro de vesículas discretas que geman de la **red trans-Golgi** y entonces son dirigidas a las partes apropiadas de la célula (sección H4). Por ejemplo, las vesículas que contienen proteínas

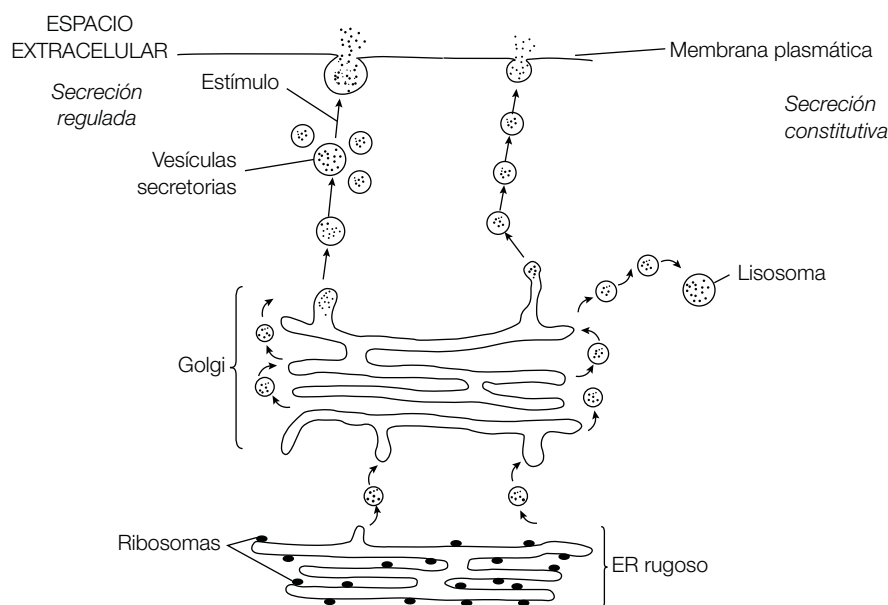
de secreción son dirigidas hacia la membrana plasmática, y aquellas que contienen proteínas lisosómicas se dirigen hacia los lisosomas.

Pese a todo lo anterior, en ciertas células existe una vía secretoria adicional, la **vía secretoria regulada** (figura E4-1). Esta vía se encuentra en particular en células que se especializan en secretar rápidamente productos en respuesta a la demanda de un estímulo particular. Por ejemplo, la hormona insulina y las enzimas digestivas son secretadas por el páncreas, en tanto que los neurotransmisores son secretados por las neuronas (sección E6). En tales células secretorias, las sustancias secretadas se almacenan de forma inicial en **vesículas secretorias**, las cuales se forman por brotes emitidos por la red trans-Golgi.

## Vesículas revestidas y proteínas de revestimiento

Las vesículas que transportan materiales alrededor de la célula se conocen como **vesículas revestidas** debido a que tienen proteínas específicas que cubren su superficie externa (citosólica). Estas **proteínas de revestimiento** actúan como andamios flexibles y promueven la formación de vesículas. Los tres tipos conocidos de vesículas revestidas se caracterizan por sus revestimientos proteínicos:

1. La **clatrina** forma un marco poliédrico alrededor de las vesículas que transportan material desde el aparato de Golgi hacia la membrana plasmática, así como desde la membrana plasmática hacia dentro de la célula (véase más adelante).



**Figura E4-1.** Exocitosis de proteínas por las vías secretorias constitutiva y regulada.

2. La *COPI* reviste vesículas que participan en el transporte hacia delante (**anterógrado**) y hacia atrás (**retrogrado**) entre compartimientos sucesivos del aparato de Golgi.
3. La *COPII* reviste vesículas que se mueven desde el RER hacia el aparato de Golgi.

### Fusión de vesículas mediada por proteínas

Cuando arriban a sus membranas de destino, las vesículas se fusionan con ellas y liberan sus contenidos en el lado opuesto de la membrana blanco (figura E4-1). Este proceso de fusión es mediado por proteínas integrales de la membrana o ligadas a lípidos conocidas como *SNARE*. La **R-SNARE** o **V-SNARE** (la cual contiene residuos conservados de Arg e incluye a la **sintaxina**) suele asociarse con la membrana de la vesícula, mientras que la **Q-SNARE** o **t-SNARE** (la cual contiene residuos de Gln conservados e incluye a la **sinaptobrevina** y a la **SNAP-25**), se asocian con sus membranas blanco. Diferentes *SNARE* SON escindidas protedíticamente por las **toxinas tetánica y botulínica**, que son las causantes de las fatales enfermedades infecciosas tétanos y botulismo, respectivamente.

### Endocitosis

La endocitosis es la captación de macromoléculas extracelulares a través de la membrana plasmática hacia el interior de la célula. Una pequeña porción de la membrana plasmática encierra progresivamente el material que se capta, la cual primero se invagina y luego se desprende para formar una vesícula intracelular que contiene a la molécula ingerida.

### Fagocitosis

La fagocitosis es la endocitosis de grandes partículas como las bacterias, desechos celulares o incluso células intactas a través de grandes vesículas endocíticas denominadas **fagosomas**. Para que sea posible ingerirla, primero la partícula debe unirse a la superficie del fagocito, por lo general a través de receptores especializados de la superficie celular. Una vez que se une a la superficie celular, el fagocito es estimulado para que comience a ingerir la partícula con su membrana plasmática, encerrándola dentro del fagosoma (figura E4-2). Después, el fagosoma se fusiona con un lisosoma (sección A2) y la partícula ingerida es degradada. El material utilizable será transportado por el citosol, mientras que las sustancias indigeribles permanecerán en los lisosomas, donde forman cuerpos residuales. En los protozoarios, la fagocitosis es una forma de alimentación, donde el material ingerido es destruido en los lisosomas y utilizado como alimento. En los organismos multicelulares, sólo unas pocas células especializadas son capaces de realizar fagocitosis. Los **macrófagos** y los **neutrófilos** (glóbulos blancos) usan la fagocitosis para proteger al organismo contra la infección por ingestión de microorganismos invasores. Los macrófagos también intervienen en la eliminación de las células muertas y dañadas y de los desechos celulares.

### Endocitosis mediada por receptores

La endocitosis mediada por receptores, una forma de **pinocitosis** (ingesta líquida de la célula), es la captación selectiva de macromoléculas desde el líquido extracelular, la cual requiere receptores de superficie específicos

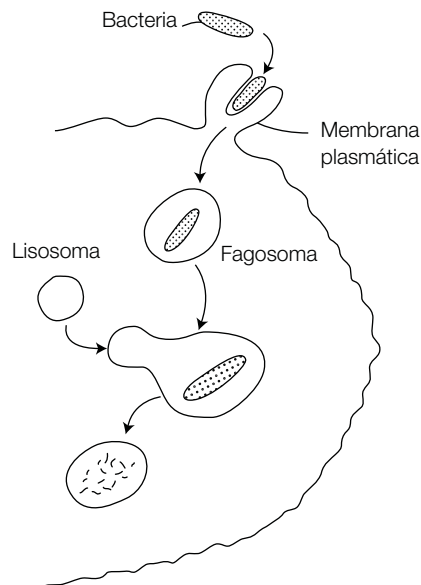


Figura E4-2. Fagocitosis.

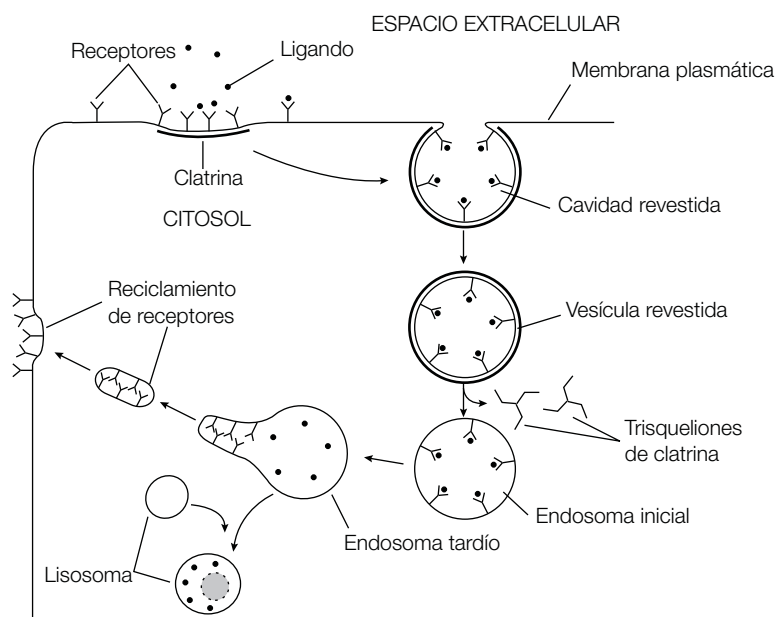
de la célula y por lo regular incluye cavidades y vesículas revestidas de clatrina. Este proceso, que tiene lugar en la mayoría de las células animales, incluye la unión específica de macromoléculas a un **receptor de la superficie celular** (en general, una proteína integral de membrana; Secciones E2 y E5). Cuando se une al receptor, el complejo receptor-macromoléculas se acumula dentro una **cavidad revestida de clatrina**. Con la colaboración de la proteína de unión de GTP asociada a la membrana, la **dinamina**, estas cavidades brotan desde la membrana para formar pequeñas **vesículas revestidas de clatrina** que contienen a los receptores y sus macromoléculas unidas (ligandos) (figura E4-3).

La endocitosis mediada por receptores proporciona una forma de concentrar de manera selectiva macromoléculas particulares que están a bajas concentraciones en el líquido extracelular y de ese modo incrementa la eficiencia de su captación sin tener que incorporar grandes cantidades de líquido extracelular. Uno de los procesos endocíticos mediados por receptores mejor estudiados y comprendidos es la captación de **colesterol** en la forma de **partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL)** por el **receptor de LDL** (sección K6) de las células de los mamíferos.

Muchos **virus** y otras **toxinas** ingresan a las células animales mediante endocitosis mediada por receptores. Aunque las células no tienen receptores de la superficie celular que reconozcan a la partícula viral de manera deliberada, los virus evolucionaron hasta expresar una proteína de superficie que imita al ligando correcto que reconoce el receptor Fc y que por tanto les permite a los virus unirse y ser internalizados.

### Cavidades y vesículas revestidas de clatrina

La microscopía electrónica (sección A4) ha revelado que las pozas revestidas de clatrina son invaginaciones de la membrana plasmática que están recubiertas en su superficie citosólica con un material densamente empacado elaborado predominantemente con la proteína **clatrina** (figura E4-3). Esta proteína, que ha sido altamente conservada a través de la evolución, consiste en tres cadenas polipeptídicas grandes y tres pequeñas que se juntan para formar una estructura de tres patas llamada **trisquelión**. Los trisqueliones de clatrina se ensamblan formando un revestimiento a manera de marco convexo similar a un cesto de hexágonos y pentágonos para formar cavidades así revestidas. Se piensa que el ensamblaje del revestimiento de clatrina impulsa a la membrana a invaginarse en ese punto. A medida que se añaden más trisqueliones de clatrina a la estructura, forman una caja completa que pellizca una región de la membrana y forma una vesícula revestida de clatrina. En la endocitosis, esas vesículas migran hacia el interior de la célula y esparcen su revestimiento de clatrina para formar **endosomas iniciales**, los cuales a su vez maduran y se convierten en **endosomas tardíos** (figura E4-3). El pH del interior de los endosomas disminuye debido a bombas de protones situadas en su membrana, mismas que acidifican la luz de la vesícula. Este cambio en el pH promueve con frecuencia la disociación de la molécula (el ligando) del receptor, lo que permite que los receptores sean reciclados hacia la membrana plasmática. Luego, los endosomas se fusionan con los lisosomas, donde el contenido es degradado y las partes componentes, como aminoácidos y azúcares, pueden ser tomadas por el citosol para ser usadas por la célula.



**Figura E4-3.** Endocitosis mediada por receptor que incluye cavidades y vesículas revestidas de clatrina.

# E5 Transducción de señales

## Notas clave

### Señalización de las células

En los organismos multicelulares, las células se comunican unas con otras a través de moléculas u hormonas de señalización extracelular. La hormona es secretada por la célula señalizante y se une a un receptor en la célula blanco, con lo cual se inicia una respuesta en esta célula. En la señalización endocrina, la hormona actúa en un sitio distante del sitio del cual es producida, en la señalización paracrina la hormona actúa sobre células cercanas y en la señalización autocrina la hormona actúa en la misma célula que la secretó.

### Moléculas de señalización con receptores intracelulares

Algunas hormonas lipófilas (p. ej., las hormonas esteroideas) se difunden a través de la membrana plasmática e interactúan con receptores intracelulares de la familia del receptor nuclear en el citosol o en el núcleo. El gas óxido nítrico (NO) es una molécula de señalización que atraviesa la membrana plasmática y estimula a la enzima intracelular guanililciclasa para que produzca monofosfato cíclico de guanosina (cGMP).

### Moléculas de señalización con receptores en la superficie celular

Otras hormonas lipófilas (p. ej., las prostaglandinas) e hidrófilas (p. ej., las hormonas peptídicas insulina y glucagon y las aminas biogénicas adrenalina e histamina) se unen a receptores de la superficie celular. Estas son proteínas integrales de la membrana que se localizan en la membrana plasmática y que unen la hormona (ligando) con alta afinidad y especificidad. En la unión del ligando, el receptor puede someterse a un cambio conformacional o dimerizarse y transmitir la información a la célula (transducción de la señal).

### Receptores ligados a enzimas

Los receptores ligados a enzimas (p. ej., el receptor de insulina) tienen actividad intrínseca enzimática. La unión del ligando causa autofosforilación de los residuos de tirosina en el dominio citoplásmico de los receptores de las cinasas de tirosina. Estas tirosinas modificadas son entonces reconocidas por otras proteínas del citosol. Otros receptores tienen actividad de cinasa de serina/treonina, mientras que algunos carecen de la actividad intrínseca de cinasa y se asocian con las cinasas de tirosina citoplásmicas (p. ej., las cinasas de la familia Src). Muchos receptores ligados a enzimas interactúan a través de pequeños dominios de unión (p. ej. SH2) con proteínas de andamiaje dentro de las células, las cuales organizan grupos de proteínas en complejos de señalización.

### Receptores ligados a canales iónicos

El cambio en la conformación de los receptores ligados a canales iónicos permite a los iones fluir a través de la membrana y en esa medida alterar el potencial de membrana.

### Receptores acoplados a la proteína G

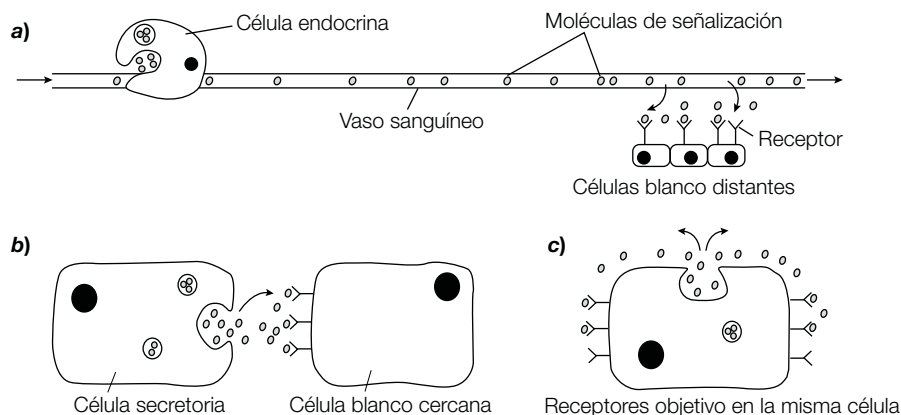
Los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) contienen siete hélices alfa transmembranales y activan a las proteínas triméricas G [unión-trifosfato de guanosina (GTP)], que a su vez llevan a la producción de un segundo mensajero intracelular. Las proteínas triméricas G contienen tres subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Diferentes GPCR interactúan con diferentes proteínas triméricas G que conducen a diferentes acontecimientos de señalización intracelular. Hay dos clases principales de proteínas que encienden a la GTP-asa: la subunidad G  $\alpha$  de las proteínas triméricas G y las proteínas monoméricas G (p. ej., Ras). Se encuentran ancladas a la superficie citosólica de la membrana plasmática por un lípido unido en forma covalente y hacen un ciclo a través de una forma inactiva enlazada al GDP y una forma activa enlazada al GTP.

|                             |  |  |
|-----------------------------|--|--|
| <b>Segundos mensajeros</b>  | Las moléculas de señalización intracelular (segundos mensajeros) se producen en respuesta a la activación de varios receptores de la superficie celular. La adenilciclasa y la guanilciclasa producen los segundos mensajeros $cAMP$ y $cGMP$ , respectivamente. La activación de la fosfolipasa C conduce a la producción de los segundos mensajeros 1,4,5-trisfosfato de inositol ( $IP_3$ ) y 1,2-diacilglicerol, los cuales a su vez causan la liberación de $Ca^{2+}$ de los almacenes intracelulares y activan a la cinasa C de proteínas, respectivamente.      |  |
| <b>Iones calcio</b>         | Muchas señales extracelulares inducen un incremento en el nivel de los iones calcio en el citosol. Cuando se activan los canales de calcio, como los canales de calcio dependientes de voltaje en la membrana plasmática, los canales de calcio con compuertas de $IP_3$ y los receptores de la rianodina en el ER y en el retículo sarcoplásmico, los iones calcio fluyen hacia el citosol. El aumento del calcio citosólico resulta en la alteración de eventos celulares a través de proteínas que unen calcio, como la troponina C en el músculo y la calmodulina. |  |
| <b>Proteólisis regulada</b> | Algunos receptores de la superficie celular sufren proteólisis intramembranosa regulada por la unión del ligando, liberando el dominio citoplásmico, el cual se transloca hacia el núcleo.   |  |
| <b>Temas relacionados</b>   | (E2) Estructura de la membrana<br>(E6) Función del nervio  | (J7) Control del metabolismo del glucógeno |

## Señalización de las células

En los organismos multicelulares, hay necesidad por parte de las células de **comunicarse** unas con otras con el fin de **coordinar** su crecimiento y metabolismo. La principal forma por la cual las células se comunican con las otras es por medio de las **moléculas de señalización extracelular** llamadas **hormonas**. Las **células de señalización** sintetizan y secretan estas moléculas, que producen una respuesta específica en las **células blanco** (o destino) que tienen **receptores específicos** para la molécula de señalización. Diferentes células pueden responder de modo distinto a la misma molécula de señalización según el tipo de receptor y la reacción intracelular iniciada (véase más adelante). La señalización celular puede clasificarse en tres tipos diferentes basados en la distancia a la cual actúa la molécula de señalización. En

la **señalización endocrina**, la molécula de señalización (p. ej., insulina) actúa sobre células blanco distantes del sitio de su síntesis en células de un órgano endocrino (p. ej., el páncreas; figura E5-1a). Las células endocrinas secretan la molécula de señalización a la corriente sanguínea (si es un animal) o a la savia (si es una planta), la cual transporta la sustancia a las células blanco, que se hallan en otro sitio del organismo. En la **señalización paracrina**, la molécula de señalización sólo afecta células blanco cercanas a la célula desde la cual la molécula es secretada (figura E5-1b). La comunicación desde una célula nerviosa a otra mediante neurotransmisores químicos es un ejemplo de señalización paracrina (sección E6). El tercer tipo de señalización celular es la **señalización autocrina**, donde una célula responde a la molécula que ha sido producida por ella misma (figura E5-1c).



**Figura E5-1.** Señalización celular: a) endocrina; b) paracrina; c) autocrina.



## Moléculas de señalización con receptores intracelulares

Pequeñas hormonas lipófilas (solubles en lípidos) difunden a través de la membrana plasmática y luego interactúan con **receptores intracelulares** en el citosol o el núcleo. Todos los receptores guardan relaciones estructurales y son parte de la **superfamilia de receptores nucleares**. El complejo hormona-receptor resultante se une con frecuencia a regiones del DNA y afecta la transcripción de ciertos genes (sección G6). Entre las pequeñas hormonas lipófilas con receptores intracelulares están las **hormonas esteroideas**, las cuales se sintetizan a partir del colesterol (sección K5) (p. ej., las hormonas sexuales femeninas estrógeno y progesterona), la **tiroxina**, la cual es producida por las células tiroideas y es el principal compuesto yodado de los animales, el **ácido retinoico**, que deriva de la vitamina A y la **vitamina D**, la cual se sintetiza en la piel en respuesta a la luz solar (sección K5).

Un ejemplo importante y destacable de una pequeña molécula de señalización que atraviesa con facilidad la membrana plasmática de la célula objetivo es el gas **óxido nítrico** (NO). Éste se usa en los animales y en las plantas. El NO es sintetizado por desaminación de la arginina, catalizada por la enzima **sintasa de NO** (sección M3). El NO difunde con rapidez fuera de la célula que lo produce e ingresa en las células cercanas. Este gas sólo actúa en forma local ya que tiene una vida media corta, de alrededor de 5 a 10 segundos. En muchas células blanco, el NO se une al sitio activo de la **guanililciclase** y la estimula para que produzca el pequeño mediador intracelular **cGMP** (véase más adelante). La **nitroglicerina**, la cual se usa para tratar a pacientes con **angina de pecho** (dolor que resulta de un flujo sanguíneo inadecuado hacia el músculo cardíaco), es convertida en NO, el cual relaja los vasos sanguíneos y por tanto reduce la carga de trabajo del corazón. El **monóxido de carbono** (CO) es otro gas que se usa como una molécula de señalización, lo que hace al estimular la guanililciclase.

## Moléculas de señalización con receptores en la superficie celular

Las moléculas hidrófilas (solubles en agua) (las cuales no pueden difundirse a través del interior de la bicapa lipídica hidrófoba) se unen a receptores de la superficie celular. Éstos incluyen a las **hormonas peptídicas**, como la **insulina** y el **glucagon** y a pequeñas moléculas cargadas, con frecuencia **aminas biogénicas**, como la **adrenalina** (**adrenalina**) y la **histamina**, que se derivan de aminoácidos y funcionan como hormonas y neurotransmisores (sección E6). Algunas hormonas lipófilas (solubles en lípidos) también se unen a receptores de la superficie celular. Entre éstas se incluyen las **prostaglandinas**, una familia de compuestos con similitudes estructurales que se encuentran en los vertebrados y en los invertebrados. Las prostaglandinas se sintetizan a

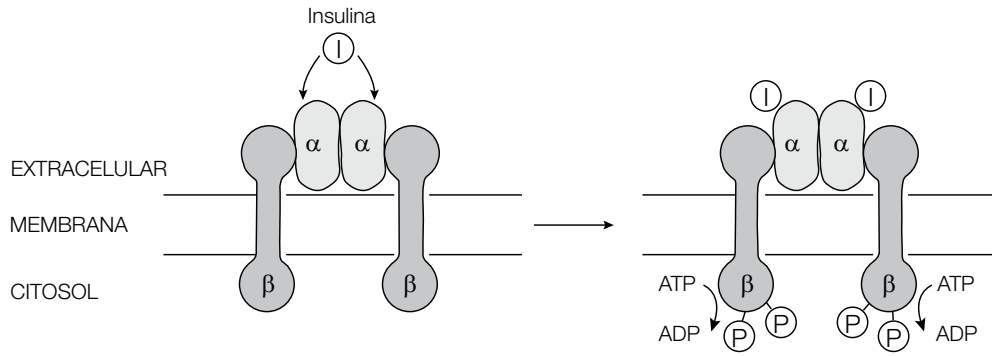
partir del **ácido araquidónico** (un ácido graso de 20 carbonos con cuatro dobles enlaces insaturados) (sección K1) y actúan como moléculas de señalización paracrina. La **aspirina** y otros **agentes antiinflamatorios** inhiben la síntesis de las prostaglandinas (sección K1).

Los receptores de la superficie celular son **proteínas integrales de la membrana** situados en la membrana plasmática (sección E2) que unen la molécula de señalización (**ligando**) con alta afinidad. El ligando se une a un sitio específico del receptor de una forma similar a como un sustrato se une a una enzima (sección D1). La unión del ligando al receptor puede causar un **cambio conformacional** en éste o promover la **dimerización** de dos receptores, que desencadenan una secuencia de reacciones (con frecuencia referida como **transducción de la señal**), en la célula blanco, lo cual conduce a un cambio en la función celular. La distribución de los receptores varía entre las diferentes células y hay con frecuencia más de un tipo de receptor para un ligando en especial, lo que permite que diferentes células blanco respondan de manera distinta a la misma molécula de señalización. Los receptores de la superficie celular pueden clasificarse en tres clases principales según cómo transfieren la información desde el ligando al interior de la célula: receptores ligados a enzimas, receptores ligados a canales iónicos y receptores acoplados a la proteína G.

## Receptores ligados a enzimas

Numerosos receptores tienen **actividad enzimática** intrínseca o estrechamente asociada. Tras la unión del ligando a su cara extracelular, tales receptores sufren un cambio conformacional y ponen en marcha una **actividad enzimática**. En el caso del **receptor de la insulina**, el cual es un complejo de dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  que se mantienen juntas por enlaces disulfuro, la hormona polipeptídica insulina (el ligando o señal) se une a la cara extracelular de las subunidades  $\alpha$  (figura E5-2). Acto seguido, el receptor sufre un cambio conformacional que lo lleva a la **autofosforilación** del dominio citosólico de la subunidad  $\beta$ . De manera específica, se fosforilan los grupos hidroxilo de las cadenas laterales de ciertos residuos de **tirosina**, donde el ATP funge como el donador de fosfato. El receptor fosforilado es reconocido por otras proteínas del citosol, que a su vez modulan diversos eventos celulares, lo que permite a la célula responder a la hormona de manera apropiada (sección J7). En adición, la subunidad  $\beta$  puede fosforilar de manera directa otras proteínas objetivo dentro de la célula.

El receptor de insulina es un ejemplo de un **receptor de cinasa de tirosina**, mientras que el **factor  $\beta$  de crecimiento transformador** (TGF- $\beta$ ) pertenece a una familia de receptores que tienen **actividad de cinasa de serina/treonina** en su dominio citosólico. Otros receptores con actividad enzimática estrechamente asociada incluyen



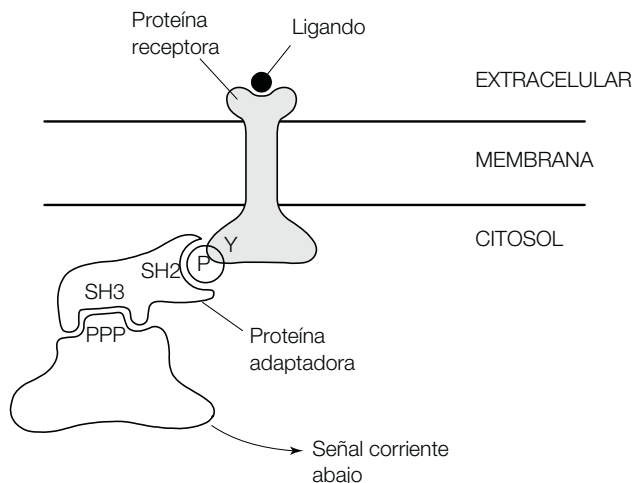
**Figura E5-2.** Transducción de la señal a través de un receptor ligado a una enzima como el receptor de insulina.

a varios receptores de citocinas que unen interferones, hormona del crecimiento, algunas interleucinas y otras citocinas. En el caso de muchos receptores ligados a enzimas, la unión del ligando induce la **oligomerización** (formación de dímeros o de oligómeros más grandes), y es este rearrreglo de los dominios citosólicos el que permite a los dominios vecinos de cinasa de las cadenas del receptor la fosforilación cruzada entre ellos en el proceso de **autofosforilación**.

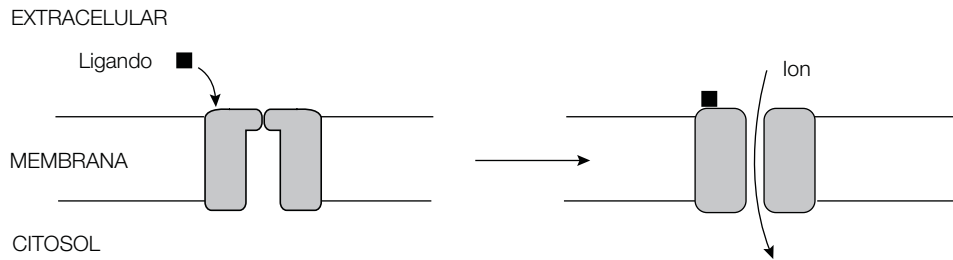
Algunos receptores ligados a enzimas, así como otros receptores, interactúan con **proteínas de andamiaje** dentro de la célula, los cuales organizan grupos de proteínas en **complejos de señalización** (figura E5-3).

Las proteínas del interior de estos complejos de señalización se ensamblan a través de las interacciones de

una variedad de dominios de unión pequeños y conservados, como los **dominios con homología 2 Src (SH2)** y los **dominios de unión de fosfotirosina (PTB)**, que se unen a residuos de tirosina fosforilados, los **dominios con homología 3 Src (SH3)**, que se unen a secuencias de aminoácidos cortas ricas en prolina y los **dominios de homología con la pleckstrina (PH)**, que se unen a los grupos-cabeza de los fosfolípidos de inositol que han sido fosforilados de manera adicional por la **cinasa-3 de fosfatidilinositol (PI 3-cinasa)**. Algunas proteínas de andamiaje contienen múltiples **dominios PDZ**, cada uno de los cuales se une a un motivo específico en un receptor o proteína de señalización. La unión de estas proteínas al receptor activado puede ayudar a liberar la señal hacia delante o puede disminuir el proceso de señalización, lo que implica una retroalimentación negativa.



**Figura E5-3.** Un complejo de señalización hipotético. La unión del ligando a la cara extracelular del receptor de la superficie celular resulta en la fosforilación de un residuo de tirosina en su dominio citosólico. El residuo de tirosina fosforilado es reconocido por un dominio SH2 en la proteína adaptadora. Por otro lado, en la proteína adaptadora, es un dominio SH3 el que se une a una secuencia rica en prolina (PPP) de otra proteína de señalización, de manera tal que la señal se retransmite dentro de la célula.



**Figura E5-4.** Transducción de la señal a través de un receptor asociado a un canal iónico.

Algunos receptores de la superficie celular requieren de la fosforilación de la tirosina para su actividad, pero carecen de un dominio de cinasa de tirosina. Estos receptores actúan a través de **cinasas de tirosina citoplásmicas** (o cinasas de tirosina sin receptor), las cuales se asocian con el receptor y fosforilan varias proteínas blanco. La familia más grande de cinasas de tirosina citoplásmicas es la **familia Src**, entre las cuales se incluyen la Src, Yes, Fyn y Lck, que en todos los casos contienen dominios SH<sub>2</sub> y SH<sub>3</sub>, y se localizan sobre la superficie citoplásmica de la membrana plasmática.

### Receptores ligados a canales iónicos

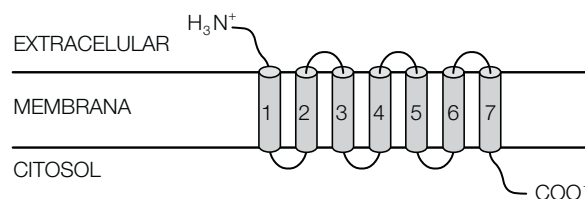
Los receptores ligados a canales iónicos (canales iónicos con compuertas transmisoras o receptores ionotróficos) intervienen en la señalización sináptica rápida entre células que se excitan en forma eléctrica. Aquí, la unión del ligando causa un cambio conformacional tal en la proteína que se abre un **canal iónico** específico (figura E5-4). Esto permite que un determinado ion fluya a su través y que subsecuentemente altere el **potencial eléctrico transmembranal**. Por ejemplo, en la unión neuromuscular, el **neurotransmisor acetilcolina** se une a receptores específicos, que permiten que los iones Na<sup>+</sup> fluyan hacia dentro y los iones K<sup>+</sup> fluyan hacia fuera de la célula blanco (véase la sección E6, para mayores detalles).

### Receptores acoplados a la proteína G

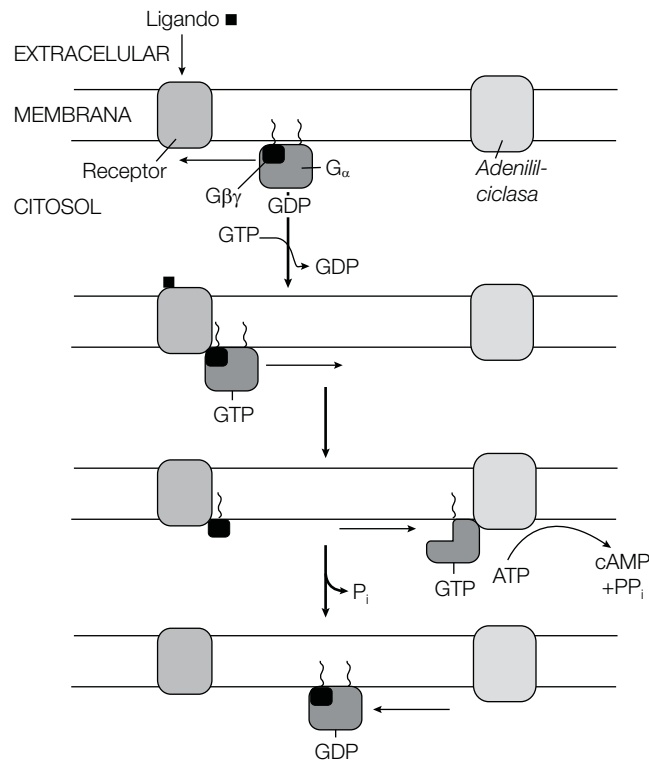
Los **receptores acoplados a la proteína G (GPCR)** forman un grupo muy grande de receptores de la superficie celular que están acoplados a proteínas triméricas G transductoras de señal. Todos los GPCR contienen siete regiones helicoidales  $\alpha$  que **atraviesan la membrana** con

sus N terminales hacia la cara extracelular de la membrana plasmática y sus C terminales hacia la cara citoplásmica de la membrana (figura E5-5). La familia GPCR incluye receptores para numerosas hormonas y neurotransmisores, receptores activados por la luz (rodopsinas) del ojo y miles de receptores odorantes en la nariz de los mamíferos. Al unirse su ligando, los GPCR activan a las **proteínas G triméricas** transductoras de señal [**proteínas de unión-trifosfato de guanosina (GTP)**], las cuales a su vez activan o inhiben a una proteína efectora. Las proteínas triméricas G constan de tres subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad G $\alpha$  es la **proteína interruptora de la GTP-asa** que se alterna entre un estado activo (encendido) y un estado inactivo (apagado) (véase más adelante). En el genoma humano hay múltiples copias de cada una de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , que proveen diversidad en la señalización a través de los GPCR.

Las subunidades G $\alpha$  y G $\gamma$  están asociadas a la superficie citosólica de la membrana plasmática por medio de lípidos de anclaje a los que se unen de manera covalente (sección E2). En el estado de reposo, cuando no hay ligandos unidos a los GPCR, la subunidad G $\alpha$  está unida al GDP y en complejos con G $\beta\gamma$  (figura E5-6). La unión del ligando a los GPCR cambia su conformación, lo que determina que se unan a la subunidad G $\alpha$  y de esta forma que el GDP sea desplazado y remplazado por el GTP. De inmediato, la subunidad G $\alpha$  se disocia de G $\beta\gamma$ , pero ambas permanecen fijas a la membrana. La subunidad G $\alpha$  con el GTP unido interactúa y activa a una **proteína efectora** asociada, como la adenilciclasa, o en algunos casos regula la abertura de un canal iónico que causa cambios en el potencial de membrana. Sin embargo, esta activación es de vida corta, ya que el GTP



**Figura E5-5.** Los GPCR contienen siete regiones de hélice transmembranales (cilindros 1-7), con su N terminal en el lado extracelular de la membrana y su C terminal en el citosol.



**Figura E5-6.** Transducción de señal a través de un receptor acoplado a una proteína G (véase texto para mayores detalles).

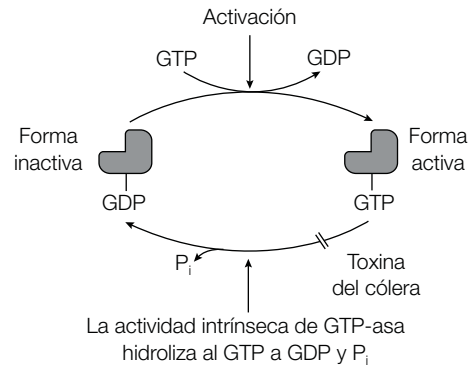
es rápidamente hidrolizado, en segundos, a GDP por la actividad de la GTP-asa intrínseca de la subunidad  $G\alpha$  (véase más adelante). La subunidad  $G\alpha$ , ahora con GDP unido, se disocia de la proteína efectora, la desactiva, y se reintegra con  $G\beta\gamma$ , lista para otra ronda de activación y de intercambio de nucleótidos (figura E5-6).

La hormona **adrenalina** se une a numerosos GPCR diferentes. Cuando se une a **receptores adrenérgicos  $\beta$  localizados** sobre la superficie de las células hepáticas y adiposas, promueve la glucogenólisis y la lipólisis, respectivamente (secciones J7 y K4). En las células del músculo liso que revisten los vasos sanguíneos del intestino, la piel y los riñones, la adrenalina se une al **receptor adrenérgico  $\alpha_2$**  y determina que las arterias se contraigan. Los receptores adrenérgicos  $\beta$  están acoplados a una **proteína G estimulante ( $G_s$ )** que activa a la adenilciclase unida a la membrana, mientras que el receptor adrenérgico  $\alpha_2$  está acoplado a una **proteína G inhibidora ( $G_i$ )** que inhibe a la adenilciclase. Por lo tanto, a través de la unión a diferentes receptores y a la activación de diferentes proteínas G, un ligando puede desencadenar una variedad de diferentes acciones en distintas células blanco.

### Proteínas GTP-asa interruptoras

La **familia GTP-asa** de proteínas es un grupo de **proteínas interruptoras intracelulares** (o de botones molecu-

lares de encendido y apagado), de las cuales hay dos clases principales: la subunidad  $G\alpha$  de las **proteínas triméricas G** (véase antes) y las **proteínas monoméricas G**, como las **familias Ras, Rho y Rab**. Las proteínas Ras, Rho y Rab, que se acoplan al receptor activado a través de proteínas adaptadoras de andamiaje (véase antes), actúan como transductores y en la bifurcación de la señalización por proteínas, ya que cambian la naturaleza de la señal y la envían a lo largo de múltiples vías corriente abajo. En el caso de Ras, se activa una cascada de fosforilación de serina/treonina corriente abajo, que incluye a las **quinasas de proteína activadas por mitógenos (MAP-kinasa)**. Como las subunidades  $G\alpha$ , las proteínas Ras están fijadas a la cara citosólica de la membrana plasmática mediante un enlace covalente con un grupo lipídico (sección E2). Cuando la GTP-asa tiene difosfato de guanosina (GDP) unido, se encuentra en el estado “apagado”. La activación, a través de un receptor de la superficie celular o **factor de intercambio del nucleótido guanina (GEF)**, lleva a que el GDP sea intercambiado por GTP, lo que conduce a la GTP-asa al estado “encendido” (figura E5-7). La GTP-asa activada con su GTP unido se disocia del receptor y se une y activa una enzima efectora (p. ej., la adenilciclase), la cual a su vez cataliza la formación de un segundo mensajero (p. ej., cAMP). La GTP-asa hidroliza el GTP unido y causa su reversión al estado ‘apagado’ (figura E5-7). La **toxina del cólera** actúa por inhibición de la actividad intrínseca de GTP-asa (figura E5-7), lo que



**Figura E5-7.** La ciclización de la GTP-asa modifica a las proteínas entre las formas activa e inactiva.

resulta en que, una vez activada al estado de GTP-unido, la GTP-asa no puede apagarse otra vez.

## Segundos mensajeros

La unión de ligandos a la mayoría de los receptores lleva a un incremento de vida corta en la concentración de ciertas **moléculas de señalización intracelulares** denominadas **segundos mensajeros**. (La hormona/ligando puede considerarse como el primer mensajero.) Los principales segundos mensajeros son el 3',5'-AMP cíclico (cAMP), 3',5'-GMP cíclico (cgMP), **1,4,5-trisfosfato de inositol** ( $IP_3$ ), **1,2-diaciglicerol** (DAG) y el  $Ca^{2+}$ . La elevación en el nivel de uno u otro de estos segundos mensajeros lleva a una rápida alteración de la función celular.

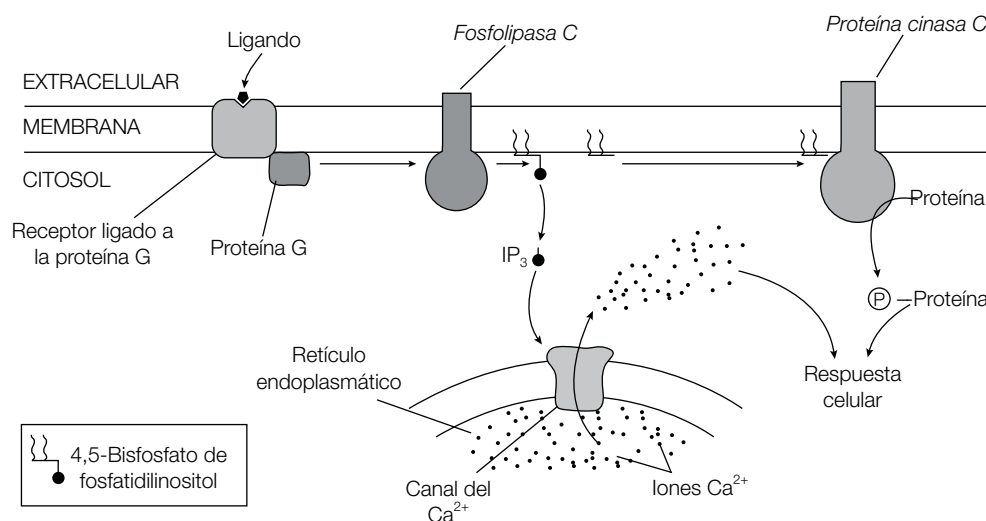
El cAMP y el cgMP derivan del ATP y el GTP por las acciones de la **adenilciclasa** y la **guanilciclasa**, respectivamente. Por ejemplo, la acción de la adrenalina y el glucagon en el metabolismo del glucógeno es mediada a través del segundo mensajero cAMP, el cual a su vez activa a la **proteína cinasa dependiente de cAMP** y a la **proteína cinasa A** (figura J7-3 en la sección J7). El cAMP y el cgMP son de vida corta, ya que resultan rápidamente degradados por las **fosfodiesterasas**.

El  $IP_3$  y el DAG derivan del lípido **4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol** de la membrana, que es un lípido, (el cual es un derivado fosforilado del fosfatidilinositol; sección E1) por la acción de la **fosfolipasa C**, la cual también se localiza en la membrana plasmática y, como la adenilciclasa, es activada a través de las proteínas G por los GPCR (figura E5-8). Una de las principales acciones del  $IP_3$  polar es difundirse a través del citosol e interactuar con los canales de  $Ca^{2+}$  de la membrana del ER (figura E5-8), lo que causa la liberación de los iones  $Ca^{2+}$  almacenados, los cuales a su vez median varias respuestas celulares. El DAG producido por la hidrólisis del 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol, junto con los iones calcio liberados desde el ER, activa a la **proteína cinasa C**, una cinasa de proteínas de serina/treonina unida a la membrana, que fosforila varias proteínas blanco, y otra vez conduce

a alteraciones de una diversidad de procesos celulares (figura E5-8).

## Iones calcio

Numerosas señales extracelulares inducen un incremento en el nivel de los **iones  $Ca^{2+}$**  en el citosol. Por ejemplo, en las células musculares, el  $Ca^{2+}$  desencadena la contracción. De manera habitual, la concentración del  $Ca^{2+}$  en el citosol se mantiene en valores muy bajos (alrededor de  $0.1 \mu M$ ), en tanto que su concentración en el líquido extracelular y en la luz del ER es alta (cercana a  $1 mM$ ). Por consiguiente, hay un **gradiente de los iones de  $Ca^{2+}$**  a través de la membrana plasmática y de la membrana del ER, de manera que cuando los **canales de  $Ca^{2+}$**  en estas membranas reciben estímulos para que se abran, los iones de  $Ca^{2+}$  fluyen con celeridad hacia el citosol, donde su concentración aumenta hasta en 10 a 20 veces y activa proteínas de respuesta al  $Ca^{2+}$  dentro de la célula. Existen tres tipos principales de canales de calcio: **canales de calcio dependientes de voltaje** en la membrana plasmática, que se abren en respuesta a la despolarización de la membrana, por ejemplo en las células nerviosas (sección E6); **canales de calcio con compuertas de  $IP_3$**  en el ER (véase antes), y **receptores de la rianodina** (así llamados debido a que el alcaloide vegetal rianodina los inhibe), que liberan  $Ca^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico de las células musculares (sección B5) o desde el ER de otras células. Bombas de  $Ca^{2+}$ , como la ATP-asa de  $Ca^{2+}$ , en el ER y la membrana plasmática ayudan a mantener la concentración baja de los iones de  $Ca^{2+}$  en el citosol de las células en reposo. Las **proteínas que unen  $Ca^{2+}$**  sirven como transductoras de la señal del  $Ca^{2+}$  citosólico. Estas proteínas que unen  $Ca^{2+}$  incluyen a la **troponina C** del músculo esquelético (sección B5) y a la **calmodulina**, una proteína ubicua que se encuentra en las células eucariotas. La calmodulina funciona como un receptor intracelular de  $Ca^{2+}$  para múltiples propósitos, en la mediación de muchos procesos regulados por el  $Ca^{2+}$ , y sufre un cambio conformacional tras la unión al  $Ca^{2+}$ . Una vez que sucede esto, la calmodulina puede



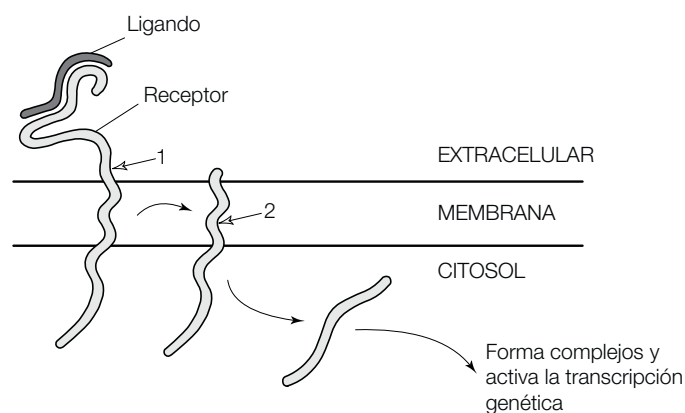
**Figura E5-8.** Generación de los segundos mensajeros intracelulares IP<sub>3</sub>, DAG y Ca<sup>2+</sup>.

unirse a varias proteínas blanco diferentes, como la familia de las **proteínas cinasas dependientes de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (CaM cinasas)**, las cuales son entonces capaces de fosforilar serinas o treoninas de otras proteínas.

### Proteólisis regulada

Existen varias vías de señalización inusuales para el relevo de señales que parten desde los receptores de la superficie celular hasta el interior de la célula que involucran la **proteólisis regulada**. Entre estas vías está la mediada por la proteína receptora **Notch** y la vía activada por las proteínas secretadas **Hedgehog**, que han sido altamente conservadas a lo largo de la evolución

y desempeñan papeles cruciales en el desarrollo animal. En el caso del receptor transmembranal **Notch**, la unión a su **ligando Delta** en la cara extracelular lleva primero a un corte proteolítico en la región adyacente de la membrana y luego a un segundo corte dentro de la región transmembranal hidrófoba (figura E5-9). El dominio citoplásmico liberado migra después hacia el núcleo, donde activa la transcripción de varios genes blanco (figura E5-9). El rompimiento proteolítico dentro de la región transmembranal hidrófoba es inusual, pero se han identificado más y más proteínas que son sujeto de esta **proteólisis intramembranal regulada (RIP)**. En este proceso, a medida que los enlaces peptídicos de la proteína receptora son cortados, el receptor no puede ser reutilizado.



**Figura E5-9.** Señalización de la célula a través del receptor Notch. La unión del ligando resulta en el corte proteolítico del receptor 1) en la cara extracelular de la membrana. El segmento unido a la membrana resultante es entonces cortado dentro del dominio transmembranal 2), donde libera la cola citosólica, la cual forma un complejo con otras proteínas y activan la transcripción de genes en el núcleo.

# E6 Función nerviosa

## Notas clave

|                               |   |   |
|-------------------------------|---|---|
| <b>Células nerviosas</b>      | Las células nerviosas o neuronas consisten en un cuerpo celular a partir del cual se extienden las dendritas y el axón. Las dendritas reciben información de otras células; el axón pasa su información a otra célula, la célula postsináptica. El axón está cubierto por una vaina membranosa de mielina excepto en los nodos de Ranvier. El axón acaba en la terminal nerviosa, donde se almacenan neurotransmisores químicos en vesículas sinápticas para ser liberados en la hendidura sináptica.   |   |
| <b>El potencial de acción</b> | Existe un potencial de membrana eléctrico a través de la membrana plasmática debido a la distribución desigual de iones $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$ , el cual es generado por la ATP-asa de $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Después de la estimulación, las neuronas despolarizan su potencial de membrana desde el estado de reposo ( $-60$ mV) a $+40$ mV, lo que genera un potencial de acción. El potencial de acción es causado por iones $\text{Na}^+$ que fluyen hacia el interior de la célula a través de canales de $\text{Na}^+$ sensibles al voltaje. Los iones $\text{K}^+$ que fluyen hacia fuera de la célula a través de canales de $\text{K}^+$ sensibles al voltaje restauran el potencial de membrana en reposo. El veneno tetrodotoxina actúa por bloqueo del canal de sodio. |   |
| <b>Neurotransmisores</b>      | Los neurotransmisores, la acetilcolina, las aminas biogénicas y los péptidos pequeños se almacenan en la terminal nerviosa presináptica, dentro de las vesículas sinápticas. Cuando el potencial de acción alcanza la terminal nerviosa, determina que las vesículas sinápticas se fusionen con la membrana plasmática de una manera dependiente del $\text{Ca}^{2+}$ y que liberen su contenido por exocitosis. A continuación, el neurotransmisor fluye a través de la hendidura sináptica, se une a receptores específicos de la membrana celular postsináptica y se inicia una respuesta en esa célula.   |   |
| <b>Temas relacionados</b>     | (E2) Estructura de la membrana<br>(E3) Transporte de membrana: moléculas pequeñas   | (E4) Transporte de membrana: macromoléculas<br>(E5) Transducción de señales |

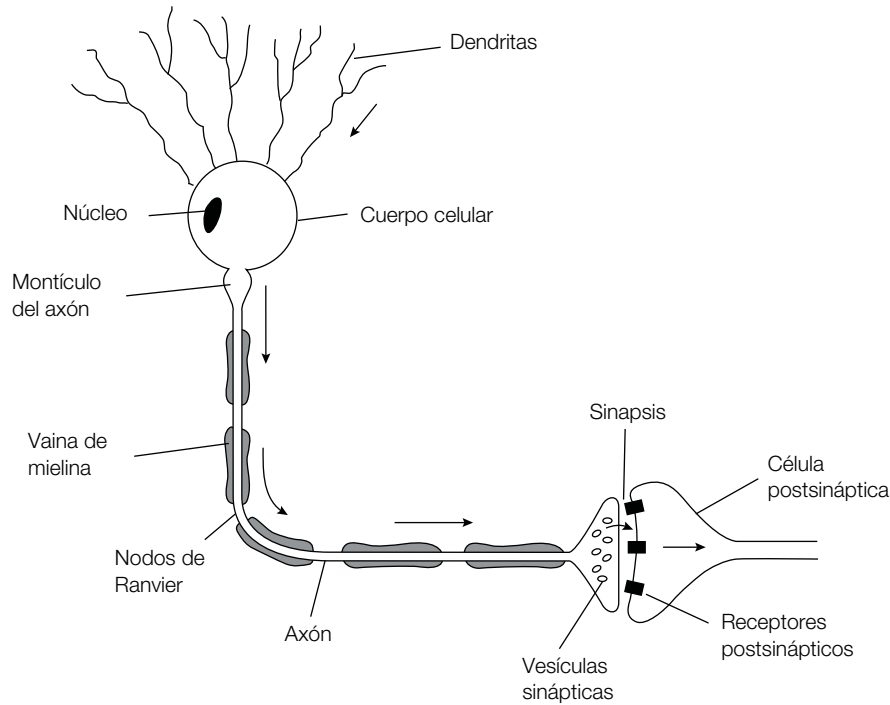
## Células nerviosas

En los eucariotas, probablemente la señalización más rápida y compleja es mediada por los **impulsos nerviosos**. Las células nerviosas (**neuronas**) constan de un cuerpo celular con numerosas proyecciones de la membrana plasmática denominadas **dendritas** (figura E6-1). Éstas interactúan con otras células y reciben información de ellas bajo la forma de impulsos nerviosos. Entonces, el cuerpo celular asimila la información derivada de varios contactos dendríticos y pasa la información como otro impulso nervioso hacia el gran **axón** (figura E6-1). El axón termina en la **sinapsis**, donde hace contacto con la **célula postsináptica** (célula objetivo o destino). El axón es mantenido en su lugar por la vaina membranosa de **mielina**, compuesta principalmente del lípido esfingomielina (sección E1), la cual actúa como un aislante eléctrico y permite que los impulsos nerviosos se transmitan por largas distancias, en ocasiones mayores

de 1 m, en los animales más grandes. Cada milímetro o más a lo largo del axón, la vaina de mielina es interrumpida por regiones desmielinizadas denominadas **nodos de Ranvier** (figura E6-1). El extremo del axón, la terminal nerviosa, está lleno de **vesículas sinápticas** que almacenan a los **neurotransmisores** químicos, como la acetilcolina. Cuando un impulso nervioso alcanza la terminal nerviosa, las vesículas sinápticas liberan su contenido en la **hendidura sináptica**, el espacio entre las células presináptica y postsináptica. Acto seguido, el neurotransmisor fluye a través del espacio e interactúa con receptores de la superficie de la célula postsináptica, donde origina una señal que será transducida por esa célula.

## El potencial de acción

Existe un potencial de acción eléctrico (el **potencial de membrana**) a través de la membrana plasmática de

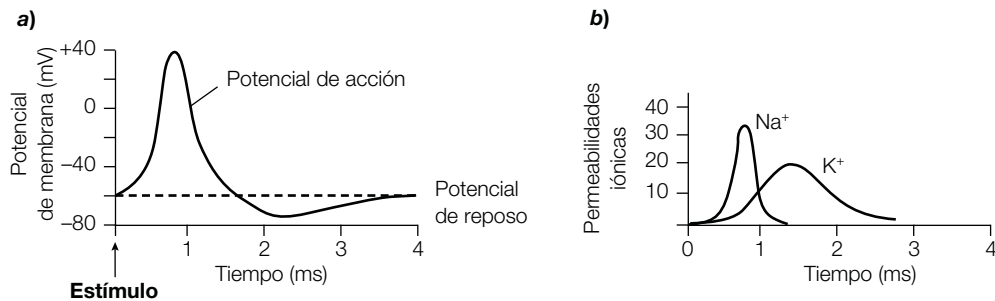


**Figura E6-1.** Diagrama esquemático de una célula nerviosa típica.

todas las células. La mayor parte de las células son inactivas desde el punto de vista eléctrico, ya que su potencial de membrana no varía con el tiempo. No obstante, las neuronas y las células musculares son **eléctricamente activas** ya que su potencial de membrana puede variar con el tiempo. En todas las células, el potencial de membrana se genera a través de la acción de la **ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$**  (sección E3), con una alta concentración de  $\text{K}^+$  dentro de la célula y una alta concentración de  $\text{Na}^+$  fuera de ella. Las neuronas varían su potencial eléctrico por cambios controlados en la **permeabilidad** de la membrana plasmática a los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Durante la estimulación, el potencial de membrana de una neurona aumenta con rapidez desde el **potencial de reposo** de  $-60$  mV (milivoltios) a cerca de  $+40$  mV (figura E6-2a); en este punto, se dice que la membrana se **despolariza** y

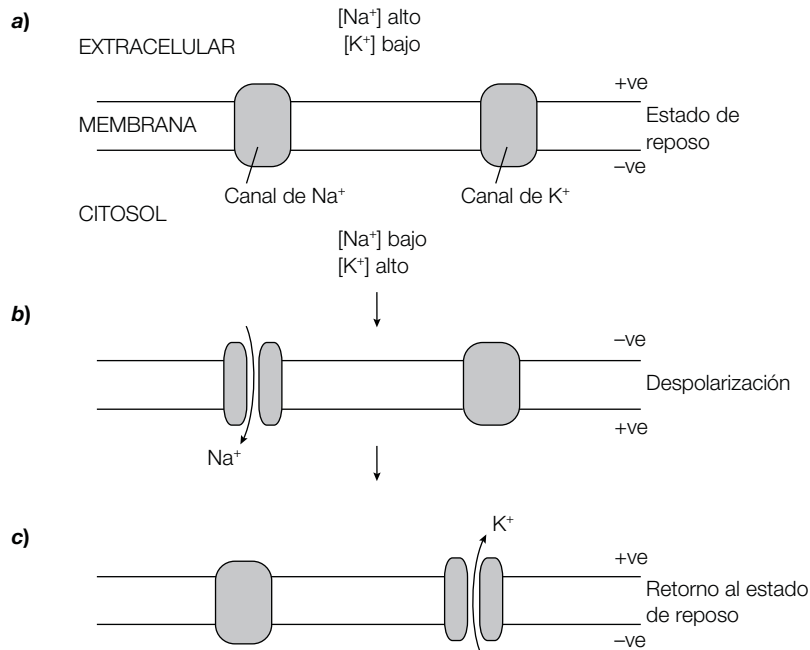
que se genera un **potencial de acción**. Con el fin de que lo anterior suceda, el potencial de membrana se despolariza más allá de un **nivel umbral** crítico (aproximadamente  $-40$  mV). Con el tiempo, el potencial de membrana recupera el potencial de reposo. El potencial de acción se propaga a lo largo del axón, comenzando en el montículo axónico (figura E6-1).

El potencial de acción se origina por cambios transitorios pero grandes en la permeabilidad de la membrana plasmática de la neurona a los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Están presentes dos tipos de **canales iónicos sensibles al voltaje** en la membrana: uno presenta permeabilidad selectiva a los iones  $\text{Na}^+$  y el otro a los iones  $\text{K}^+$  (figura E6-3a). Estas **proteínas integrales de membrana** (sección E2) son sensibles al potencial de membrana y sufren **cambios**



**Figura E6-2.** El potencial de acción: a) despolarización del potencial de membrana; b) cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática a  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$ .

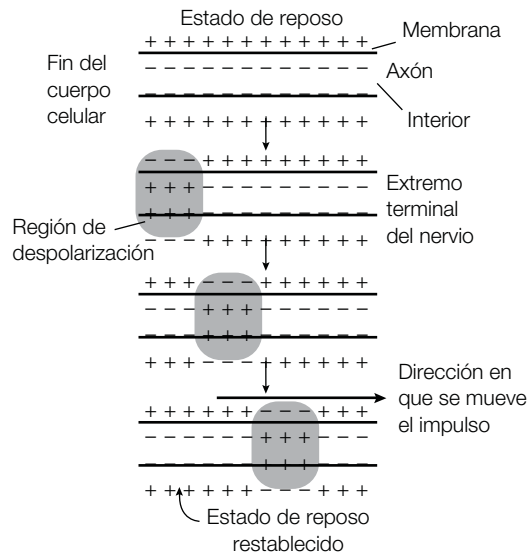




**Figura E6-3.** Mecanismo de despolarización de la membrana nerviosa por la abertura y cierre de los canales iónicos selectivos al  $Na^+$  y al  $K^+$ .

**conformacionales** a medida que los potenciales se alteran. Primero, cambia la conductancia de la membrana al  $Na^+$ . La despolarización de la membrana más allá del nivel umbral causa un cambio conformacional en el canal de  $Na^+$ , lo que permite que los iones  $Na^+$  fluyan a favor de su gradiente de concentración desde el exterior al interior de la célula (figura E6-3b). La entrada de sodio despolariza aún más la membrana, lo que causa la abertura de más canales de  $Na^+$ , de lo que resulta un influjo rápido de  $Na^+$  y un cambio en el potencial de la membrana de  $-60$  mV a  $+40$  mV en

un milisegundo. Entonces los canales de  $Na^+$  se cierran de manera espontánea y los canales de  $K^+$  se abren, lo que permite que los iones de potasio salgan de la célula y restauren el potencial de reposo negativo en unos pocos milisegundos (figura E6-3c). La onda de despolarización se propaga a lo largo del axón por la abertura de los canales de  $Na^+$  en el lado de la terminal nerviosa de la región despolarizada inicial (figura E6-4). El potencial de acción sólo puede moverse en una dirección, ya que los canales de  $Na^+$  tienen un **periodo refractario** durante el cual son insensibles a



**Figura E6-4.** Propagación del potencial de acción a lo largo de un axón.

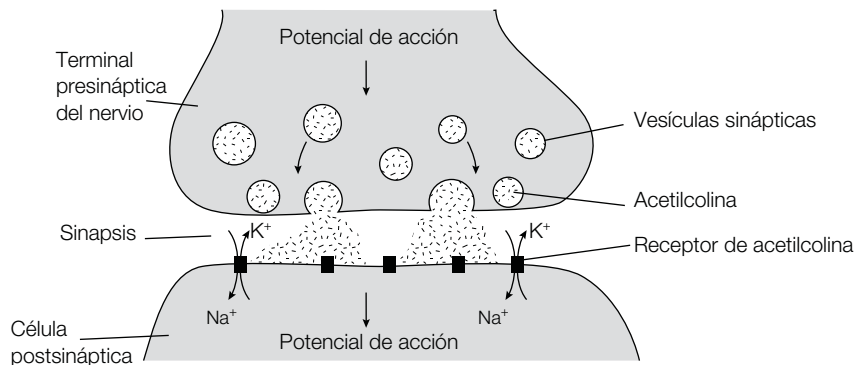
cualquier estimulación adicional. Sólo alrededor de uno en un millón de iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  de una neurona fluyen a través de la membrana plasmática durante el potencial de acción. Por tanto, ésta es una forma muy eficiente de señalización para distancias largas. Puede medirse la actividad de un solo canal por medio de la **técnica del parche fijo**, en la cual una pipeta de vidrio limpio con un diámetro en su punta de alrededor de 1  $\mu\text{m}$  es presionada contra una célula intacta para formar un sello.

La neurotoxina **tetrodotoxina**, un veneno muy potente extraído del pez globo, bloquea la conducción de los impulsos nerviosos a lo largo de los axones y de esa manera produce una parálisis respiratoria al unirse de manera muy estrecha al canal de sodio y bloquear su acción.

## Neurotransmisores

Cuando el potencial de acción alcanza la terminal nerviosa, causa la liberación de un **neurotransmisor químico** desde las vesículas sinápticas. El sistema nervioso de los mamíferos emplea numerosas sustancias como neurotransmisores. Entre éstas se incluyen los

**aminoácidos** glutamato y glicina, **acetilcolina**, **aminas biogénicas** como la **adrenalina** y la **dopamina** y una variedad de **péptidos pequeños** como las **encefalinas**. Por ejemplo, la acetilcolina es almacenada en **vesículas sinápticas**, una forma especializada de vesícula secretoria y es liberada en la **hendidura sináptica** por **exocitosis** (sección E4) a través de un mecanismo dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  (figura E6-5). Luego las moléculas de acetilcolina difunden a través de la membrana plasmática de la **célula postsináptica**, donde se unen a **receptores** específicos. El receptor de acetilcolina es un complejo de 250 kDa de cuatro cadenas polipeptídicas que forman **canales con compuerta** a través de la membrana (sección E5). Cuando se produce la unión de dos moléculas de acetilcolina, el canal se abre y permite que los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  fluyan hacia dentro y fuera de la célula, respectivamente. La despolarización resultante de la membrana postsináptica inicia un nuevo potencial de acción en la célula. La enzima **acetilcolinesterasa** degrada con rapidez a la acetilcolina de la hendidura sináptica, por lo cual es el objetivo de compuestos como el **diisopropilfosfofluoridato** (véase la sección D4 para revisar su estructura y el mecanismo de acción), usado como un componente de algunos gases nerviosos.



**Figura E6-5.** Liberación de un neurotransmisor en la hendidura sináptica.

# F1 Introducción al DNA

| Notas clave                      |  |
|----------------------------------|--|
| <b>Bases</b>                     | En el DNA hay cuatro bases: adenina (se abrevia A), guanina (G), timina (T) y citosina (C). La adenina y la guanina son purinas; la timina y citosina son pirimidinas.   |
| <b>Nucleósidos</b>               | Un nucleósido es una molécula formada por una base pirimidínica o púrica unida en forma covalente a un azúcar. En el DNA, el azúcar es desoxirribosa y por eso es un desoxirribonucleósido. Hay cuatro tipos de desoxirribonucleósidos en el DNA: desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina y desoxicitidina.   |
| <b>Nucleótidos</b>               | Un nucleótido está compuesto por una base, más un azúcar, más un fosfato, unidos todos de manera covalente. En el DNA, donde el azúcar es desoxirribosa, esta unidad es un desoxirribonucleótido.  |
| <b>Enlaces 3'5' fosfodiéster</b> | En el DNA, los nucleótidos están unidos de manera covalente por enlaces 3'5' fosfodiéster para formar una cadena repetitiva de azúcar-fosfato, que es el esqueleto a la cual se fijan las bases.   |
| <b>Secuencia del DNA</b>         | La secuencia del DNA es la secuencia de A, C, G y T a lo largo de la molécula del DNA, la cual es portadora de la información genética.  |
| <b>La doble hélice del DNA</b>   | En una hélice doble de DNA, las dos cadenas de DNA están enrolladas una alrededor de la otra con las bases en el interior y el esqueleto de azúcar-fosfato expuesto hacia el exterior. Las dos cadenas de DNA se mantienen juntas por puentes de hidrógeno entre pares de bases; la adenina (A) siempre se para con la timina (T), y la guanina (G) siempre se para con la citosina (C). |
| <b>Temas relacionados</b>        | (F3) Replicación del DNA en las bacterias (G2) Transcripción en procariotas<br>(F4) Replicación del DNA en los eucariotas (G4) Transcripción en eucariotas: descripción<br>(G1) Introducción al RNA  |

## Bases

Las bases del DNA tienen estructuras de anillo formados por átomos de carbono y nitrógeno; debido a los átomos de nitrógeno, se llaman bases nitrogenadas. Hay dos tipos de estructuras anulares. La **adenina** y la **guanina** son purinas (figura F1-1a), cada una de las cuales tiene dos anillos de carbono y nitrógeno fusionados pero con diferentes sustituyentes. La **timina** y la **citosina** son **pirimidinas** (figura F1-1a); cada una tiene sólo un anillo de carbono y nitrógeno y además difieren en sus sustituyentes.

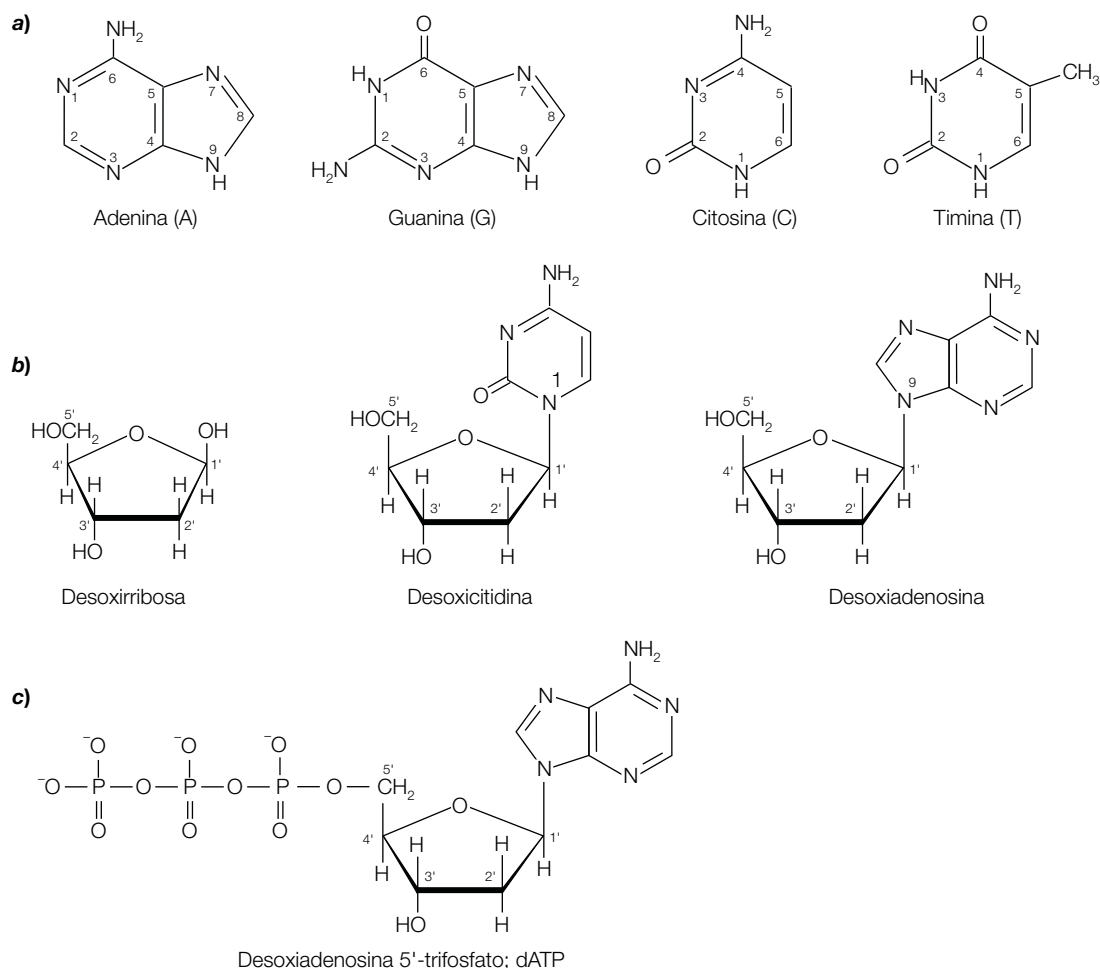
## Nucleósidos

En el RNA, el azúcar de los nucleósidos es la ribosa (sección G1) y por eso son ribonucleósidos. En el DNA, el azúcar

es desoxirribosa (figura F1-1b) (es decir, el grupo 2'-OH de la ribosa es reemplazado por un átomo de hidrógeno; por eso "desoxi") y de esta manera los nucleósidos son **desoxirribonucleósidos**. En el DNA, éstos son **desoxiadenosina**, **desoxiguanosina**, **desoxitimidina** y **desoxicitidina**. En cada caso, el C-1 del azúcar está unido a la base por medio de uno de sus átomos de nitrógeno. Si la base es una pirimidina, el nitrógeno de la posición 1 (es decir, N-1) participa en la unión del azúcar. Si la base es una purina, la unión es con la posición N-9 de la base (figura F1-1b).

## Nucleótidos

Un nucleótido es un éster fosfato de un nucleósido. Consiste en un grupo fosfato unido a un nucleósido en

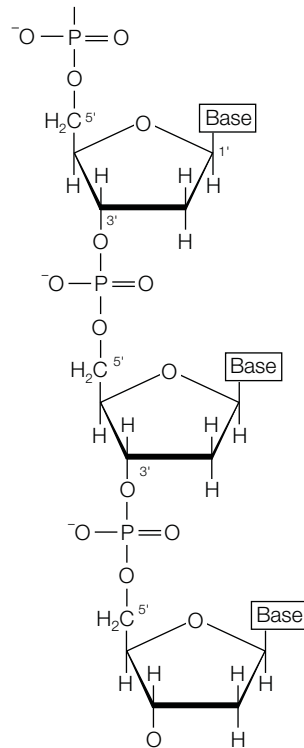


**Figura F1-1.** a) Las purinas, adenina y guanina, y las pirimidinas, timina y citosina; b) desoxirribosa y dos desoxirribonucleósidos, desoxicitidina y desoxiadenosina; c) un desoxirribonucleótido, desoxiadenosina 5' trifosfato (dATP).

el grupo hidroxilo del C-5 del azúcar, que es lo que lo convierte en un **nucleósido 5'-fosfato** o un **5'-nucleótido**. El número prima (') denota el átomo del azúcar al cual está unido el fosfato. En el DNA, los nucleótidos tienen desoxirribosa como su azúcar y por eso se denominan **desoxirribonucleótidos**. Los desoxirribonucleótidos pueden tener un grupo fosfato (**desoxirribonucleósido 5'-monofosfato**, dNMP), dos grupos fosfato (**desoxirribonucleósido 5'-difosfato**, dNDP) o tres grupos fosfato (**desoxirribonucleósido 5'-trifosfato**, dNTP). Estos últimos son los precursores para la síntesis de DNA. Éstos son la desoxiadenosina 5'-trifosfato (dATP) (figura 1c), desoxiguanosina 5'-trifosfato (dGTP), desoxicitidina 5'-trifosfato (dCTP) y desoxitimidina 5'-trifosfato (dTTP). En cada caso, la 'd' en la abreviatura (p. ej., el dATP) indica que el azúcar del nucleótido es desoxirribosa. Durante la síntesis del DNA (secciones F3 y F4) se separan dos de los fosfatos de cada desoxirribonucleótido (como pirofosfato) de manera que sólo un fosfato (el fosfato  $\alpha$ ) se incorpora al DNA.

## Enlaces 3'5' fosfodiéster

En una molécula de DNA, los diferentes nucleótidos están unidos mediante enlaces covalentes entre los fosfatos y los azúcares para formar un polímero largo. En cada uno de los nucleótidos, el fosfato enlazado al grupo hidroxilo en la posición 5' del azúcar está unido a su vez al hidroxilo del carbono 3' del azúcar del siguiente nucleótido. Como cada enlace fosfato-hidroxilo es un enlace éster, la ligadura entre los dos desoxirribonucleótidos es un **enlace 3'5' fosfodiéster** (figura F1-2). Por consiguiente, en una cadena de DNA, todos los grupos hidroxilo 3' y 5' participan en los enlaces fosfodiéster, excepto el primero y el último ribonucleótido de la cadena. El primer nucleótido tiene un fosfato libre en la posición 5', que no se une a ningún otro nucleótido, y el último nucleótido tiene un hidroxilo libre en la posición 3'. Por lo tanto, cada cadena de DNA tiene **polaridad**, puesto que tiene un **extremo 5'** y un **extremo 3'**.



**Figura F1-2.** Enlaces 3'5' fosfodiéster formados entre nucleótidos en una molécula de DNA.

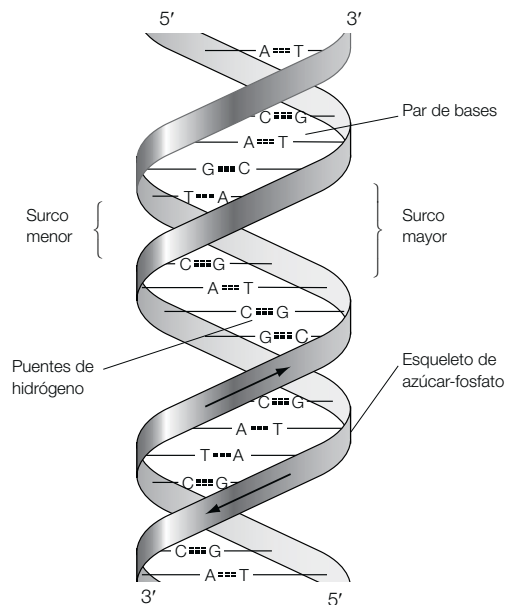
**Secuencia del DNA**

Cada nucleótido puede considerarse como una letra de un alfabeto que sólo tiene cuatro letras, A, G, C y T. Diferentes genes tienen distintas secuencias de estos cuatro nucleótidos y de esa manera codifican mensajes biológicos específicos. Como los desoxirribonucleótidos del DNA difieren sólo en las bases que contienen, esta secuencia de desoxirribonucleótidos puede registrarse simplemente como una **secuencia de bases**. Por ejemplo, **ACTTTCAGACC** es parte de la secuencia de bases de un gen y codifica parte de una proteína, en tanto que **TGGAACCGTCA** es parte de la secuencia de bases de un gen diferente que codifica una proteína distinta. Por convención, la secuencia de bases se escribe en un orden que parte del extremo 5' de la cadena de DNA al extremo 3', es decir, se **escribe en la dirección 5' → 3'**. Dado que hay cuatro tipos de nucleótidos, el número de diferentes secuencias posibles (o mensajes) en una cadena de DNA de *n* nucleótidos de largo es  $4^n$ . De manera típica, las moléculas de DNA son de muchos miles de nucleótidos de largo, de manera que el número de mensajes posibles es enorme.

**La doble hélice del DNA**

En 1953, Watson y Crick resolvieron la estructura tridimensional del DNA a partir de fotografías de difracción con rayos X obtenidas por Franklin y Wilkins. Ellos

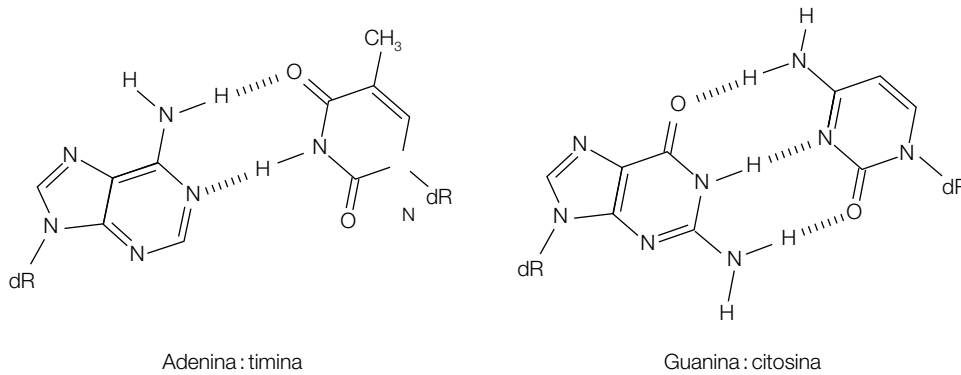
dedujeron que el DNA está arreglado como dos cadenas que giran una en torno a la otra para formar una doble hélice, con las bases en el lado interno y el esqueleto de azúcar-fosfato en el lado externo. En la doble hélice (figura F1-3), las dos cadenas de DNA están organizadas en



**Figura F1-3.** La doble hélice del DNA.

una disposición **antiparalela** (es decir, las dos cadenas corren en direcciones opuestas, una está orientada en la dirección 5' → 3' y la otra está orientada en la dirección 3' → 5'). Las bases de las dos cadenas forman puentes de hidrógeno una con la otra; la A se para con T, y G se para con C. Esto se llama **complementariedad de bases** (figura F1-4). En consecuencia, dos grandes anillos de una purina se paraan con un anillo más pequeño de una pirimidina y las dos bases se acomodan en el espacio que separa a las dos cadenas de azúcar-fosfato y mantienen la distancia correcta. Este espacio resulta pequeño para que dos purinas voluminosas puedan paraarse, y

demasiado grande para una pareja de pirimidinas pues se mantendrían demasiado alejadas para interactuar. El paraamiento de bases G:C y A:T también maximiza el número de puentes de hidrógeno efectivos que pueden formarse entre las bases; hay tres puentes de hidrógeno entre cada par de bases G:C y dos puentes de hidrógeno entre cada par de bases A:T. Por lo tanto, los pares de bases A:T y G:C dan lugar a la conformación más estable tanto desde cuestiones estéricas como desde el hecho de maximizar la formación de puentes de hidrógeno.



**Figura F1-4.** Los pares de bases del DNA. Los puentes de hidrógeno se muestran como líneas entrecortadas. dR, desoxirribosa.

## F2 Genes y cromosomas

### Notas clave

|  |   |
|--|---|
| <b>Concepto de gen</b>                   | El concepto original de un gen fue el de una región del DNA que codifica un polipéptido (o RNA). Sin embargo, ahora se sabe que los mecanismos postranscripcionales de los eucariotas pueden generar múltiples polipéptidos (relacionados en secuencia) a partir de un solo transcrito de RNA, de manera que esta definición necesita actualizarse.   |
| <b>Cromosomas procariotas</b>            | El DNA en una bacteria es una molécula circular de doble cadena, superenrollada, que está empacada en la región del nucleóide de la célula. El DNA está superenrollado de manera negativa, forma complejos con numerosas proteínas tipo histonas (sobre todo proteínas HU, HLP-1 y H-NS) y está organizado en alrededor de 50 dominios unidos a un andamio de proteínas.  |
| <b>Cromosomas eucariotas</b>             | Las células eucariotas contienen mucho más DNA que las procariotas. En el núcleo, el DNA está empacado en cromosomas, que consisten sobre todo en DNA y proteínas llamadas histonas, aunque también están presentes otras proteínas que no son histonas (NHP). Cada cromosoma contiene una molécula de DNA de cadena doble lineal.  |
| <b>Nucleosomas</b>                       | El DNA cromosomal forma complejos con cinco tipos de histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4). Éstas son proteínas muy básicas, ricas en arginina y lisina. Las secuencias de aminoácidos de las histonas están muy conservadas a lo largo de la evolución. El DNA está enrollado alrededor de un octámero de histonas (dos moléculas de cada una de H2A, H2B, H3 y H4) para formar un nucleosoma. El DNA situado entre nucleosomas vecinos (DNA conector) se une a la histona H1. El cociente de empacamiento de los nucleosomas es cercano a 7. |
| <b>La fibra de 30 nm</b>                 | Los nucleosomas están organizados en una fibra de 30 nanómetros (nm). El ordenamiento exacto de los nucleosomas en la fibra de 30 nm es poco claro; las posibilidades son de una hélice muy ordenada (denominada solenoide) o una disposición en zigzag. El cociente de empacamiento total es de alrededor de 40.   |
| <b>Estructuras de orden más elevados</b> | Durante la interfase, los cromosomas están dispersos y se supone que se presentan sobre todo como fibras de 30 nm. Durante la división celular, los cromosomas se compactan y condensan mucho, pero se sabe poco acerca de cómo sucede esto. Sin embargo, una estructura de orden más elevado es que la fibra de 30 nm esté fija a un andamio proteínico central en cada cromosoma en una serie de asas radiales.   |
| <b>Genomas de los organelos</b>          | La mayoría de los genomas mitocondriales y de los cloroplastos son moléculas de DNA circulares de doble cadena, pero el genoma puede distribuirse en varias moléculas circulares en lugar de una sola molécula. En algunos eucariotas unicelulares, el genoma mitocondrial es lineal, mientras que en otros eucariotas el genoma del organelo tiene forma circular y lineal. Los organelos también pueden tener múltiples copias del genoma.  |
| <b>Temas relacionados</b>                | (F1) Introducción al DNA (F4) Replicación del DNA en los eucariotas   |

### Concepto de gen

Para 1960, el gen se definió con claridad como la región del DNA que da origen a un polipéptido (o a un RNA, en el caso de los genes cuyo producto final es RNA y no una proteína, p. ej., los genes del RNA ribosomal). La

existencia de operones en los procariotas (sección G3) no pone en duda este concepto ya que, aunque numerosos genes agrupados producen un mRNA policistrónico, se pueden todavía identificar regiones individuales del DNA como genes basados en los diferentes polipéptidos que codifican. Este concepto de gen incluye también

el descubrimiento de que muchos genes que codifican proteínas en los eucariotas contienen regiones codificantes (exones) separadas por secuencias no codificantes (intrones; véase la sección G5) ya que, otra vez, sólo un polipéptido resulta de esa región del DNA. No obstante, en tiempos más recientes, se han descubierto otros mecanismos en las células eucariotas, como el de que una sola secuencia de DNA puede producir una variedad de polipéptidos diferentes; por ejemplo, el empalme alternativo del RNA, los sitios de poliadenilación alternativos y la edición del RNA (sección G7). Pese a esto, en cada uno de los casos mencionados, los productos proteínicos se tienen secuencias similares y todos derivan de la misma región individual del DNA. Por lo tanto, la definición original quizá necesite enmendarse para indicar que un gen codificador de proteína es una región del DNA que codifica un solo polipéptido o un conjunto de polipéptidos similares, pero por otro lado la definición se mantiene intacta. El escenario alternativo a considerar que una secuencia de DNA da origen, por ejemplo, a 10 polipéptidos que guardan una relación cercana por el procesamiento postranscripcional como representativos de 10 genes no parece razonable.

El genoma de un organismo incluye a todos los genes de ese organismo. Incluso en una célula bacteriana como *Escherichia coli* (*E. coli*), la cantidad de DNA requerido es sustancial (4.6 millones de pares de bases) y por eso es que el DNA debe estar empacado. En una célula eucariota, el problema es mayor. Una célula humana típica, por ejemplo, contiene cerca de mil veces más DNA que una célula de *E. coli*. El resto de esta sección describe cómo se empaqueta el DNA en células procariotas y eucariotas.

### Cromosomas procariotas

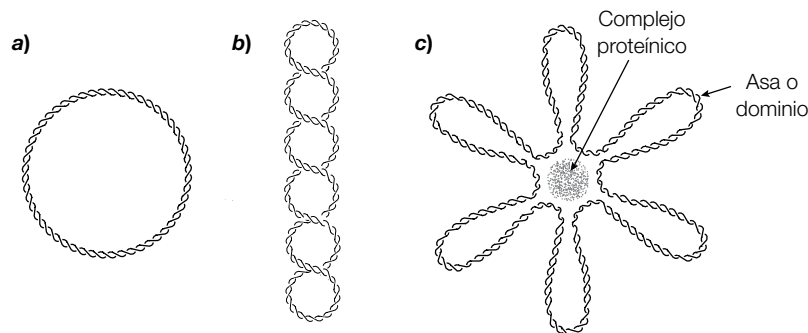
El concepto clásico, basado en estudios de *Escherichia coli*, es que el DNA bacteriano es una molécula circular de cadena doble (con frecuencia referido como el **cromosoma bacteriano**). Si fuera un círculo abierto, mediría alrededor de 1.6 mm de circunferencia, pero en realidad

está **superenrollado negativamente**, esto es, se retuerce sobre sí mismo (figura F2-1b). El DNA superenrollado es más compacto que el DNA circular abierto, de manera que el superenrollamiento es un buen recurso para el empacamiento del cromosoma bacteriano dentro de una célula bacteriana pequeña, la cual tiene sólo  $1 \times 2 \mu\text{m}$  de tamaño.

El DNA superenrollado se localiza en una región de la célula denominada **nucleoide** (sección A1), donde está organizado en 50 o más **asas** o **dominios** unidos a un **centro** o **andamio proteínico** central, fijo a la membrana celular. La figura F2-1c ilustra esta organización, aunque sólo se muestran seis asas para mayor claridad. Dentro de esta estructura, el DNA forma complejos con cuando menos **cuatro proteínas de unión del DNA**, que desempeñan un papel en su empacamiento, y entre las cuales están las proteínas **HU**, **HLP-1** y **H-NS**. La más abundante de éstas es la **HU**. Su estructura es muy diferente de las histonas (las cuales intervienen en el empacamiento del DNA eucariota; véase después) pero empacan al DNA bacteriano de una forma similar ya que forman un tetrámero alrededor del cual se enrollan aproximadamente 60 pares de bases (bp) de DNA.

En años recientes se ha descubierto que no todos los procariotas tienen un DNA organizado a la manera clásica de *E. coli*.

- Un segundo grupo de procariotas, denominado **arquea**, no contiene la proteína **HU**, pero tiene proteínas con mayor similitud a las histonas, las cuales forman un tetrámero alrededor del cual se enrollan cerca de 80 bp de DNA.
- La mayoría de los genomas bacterianos y arqueos son moléculas de DNA circulares como el de *E. coli* descrito antes, pero algunas bacterias con genomas lineales también se conocen en la actualidad, como los de *Streptomyces coelicolor*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Borrelia burgdorferi*.
- Algunos procariotas tienen genomas que están divididos en varias moléculas, es decir, tienen **genomas**



**Figura F2-1.** a) Una molécula de DNA de doble cadena circular; b) DNA superenrollado; c) asociación de DNA bacteriano circular con un complejo proteínico.



**multipartitas.** Por ejemplo, el genoma de *Vibrio cholerae*, la bacteria que causa el cólera, tiene sus genes esenciales distribuidos en dos moléculas circulares de DNA.

### Cromosomas eucariotas

La gran cantidad de DNA genómico en una célula eucariota se halla estrechamente empaçado en cromosomas dentro de un organelo especializado, el núcleo. Con excepción de los cromosomas sexuales, los organismos eucariotas diploides como los seres humanos tienen dos copias de cada cromosoma, uno heredado del padre y otro de la madre.

Los cromosomas contienen DNA y proteína. Si se toma como base el peso, la mayor parte de la proteína es de histonas, pero también hay muchos miles de otras proteínas que son mucho menos abundantes y que se denominan de manera colectiva **proteínas no histonas** (NHP). Este complejo nuclear de DNA-proteína se denomina **cromatina**.

En el núcleo, cada cromosoma contiene una molécula de DNA de doble cadena lineal. La longitud de la molécula de DNA empaçada varía. En los seres humanos, la molécula de DNA más corta de un cromosoma es de alrededor de 1.6 cm y la más larga es cercana a 8.4 cm. Durante la **metafase** de la mitosis, cuando los cromosomas se alinean en el huso mitótico listos para la segregación, están en su estado más condensado y su tamaño es de sólo 1.3  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de largo. Por lo tanto, el **cociente de empaçamento**, que es la relación de la longitud de la molécula lineal de DNA con la longitud del cromosoma en metafase, es de alrededor de  $10^4$ . En el lapso temporal entre el final de una mitosis y el comienzo de la siguiente (es decir, la **interfase**), la cromatina está más dispersa. Aquí, la relación de empaçamento está entre valores de  $10^2$  y  $10^3$ . En total, el empaçamento más extenso del DNA en los cromosomas resulta de tres niveles de plegamiento que incluyen a los nucleosomas, a los filamentos de 30 nm y a las asas radiales.

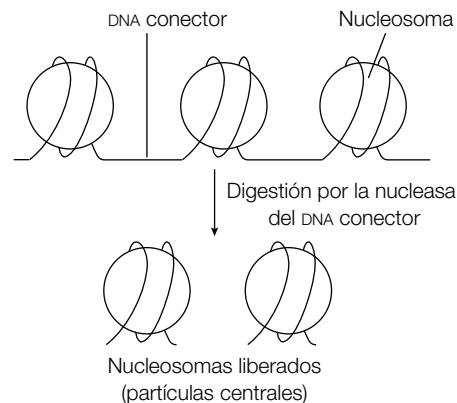
### Nucleosomas

El primer nivel de empaçamento incluye la unión del DNA cromosómico a las histonas. En general, en los cromosomas, la relación entre DNA e histonas con base en el peso es de alrededor de 1:1. Hay cinco tipos principales de histonas denominados H1, H2A, H2B, H3 y H4. Las histonas son proteínas muy básicas; alrededor de 25% de sus aminoácidos son lisina o arginina, de manera que las histonas tienen un número muy alto de aminoácidos cuyas cadenas laterales tienen carga positiva. En consecuencia, estos grupos con carga positiva se unen a los grupos fosfato con carga negativa del DNA. No es de sorprenderse, dada su importancia en el empaçamento del DNA, que las secuencias de aminoácidos de las histonas muestren un grado tan alto de conservación durante la

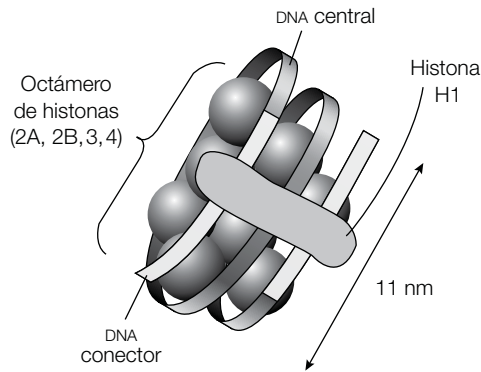
evolución. Las más conservadas son las histonas H3 y H4; por ejemplo, la H3 y la H4 de los chícharos y las vacas difieren sólo en cuatro y dos aminoácidos, respectivamente. La histona H1 es la menos conservada de todas, lo cual refleja de alguna forma un papel diferente en el empaçamento del DNA comparada con las otras histonas (véase más adelante). En las cabezas de los espermatozoides, el DNA está particularmente muy condensado y aquí pequeñas proteínas básicas denominadas **protaminas** reemplazan a las histonas.

Cuando los cromosomas se “descondensan” de manera discreta y se observan bajo el microscopio electrónico, tienen el aspecto de “cuentas en un collar” (figura F2-2). Las “cuentas” se denominan **nucleosomas** y consisten en complejos de DNA con histonas. El “collar” es DNA lineal de doble cadena entre nucleosomas adyacentes y se denomina **DNA conector** (figura F2-2). La distancia entre los nucleosomas, que es la longitud del DNA conector, varía de alrededor de 50 a 70 pares de bases (bp) entre los diferentes organismos. Incluso en un solo núcleo, la distancia entre los nucleosomas adyacentes varía en relación con, por ejemplo, la presencia de otras proteínas de unión de DNA con secuencias específicas.

Si una preparación de cromatina se incubaba con nucleasa de *Micrococcus sp.*, una enzima que degrada el DNA, el DNA conector se destruye y quedan **partículas centrales del nucleosoma** en las cuales las histonas protegen al DNA asociado de la digestión. Cada partícula central del nucleosoma contiene un fragmento de DNA de doble cadena de 140 a 150 bp de longitud (según la especie) unido a un complejo de ocho histonas, el **octámero de histonas**, que consiste en dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (figura F2-3). El DNA se enrolla alrededor del octámero de histonas en cerca de 1.65 vuelta, en un superserpentín con giro hacia la izquierda. Los contactos entre el DNA y las histonas se



**Figura F2-2.** Estructura de la cromatina similar a “cuentas en un collar”.



**Figura F2-3.** Diagrama esquemático de un nucleosoma, que consiste en la doble hélice de DNA enrollada alrededor de un octámero de histonas (dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4).

producen a lo largo de la cara interna de esta superhélice. En total, la relación de empaquetamiento es cercana a 7, que significa que la longitud del DNA se acorta alrededor de siete veces por el enrollamiento alrededor del nucleosoma.

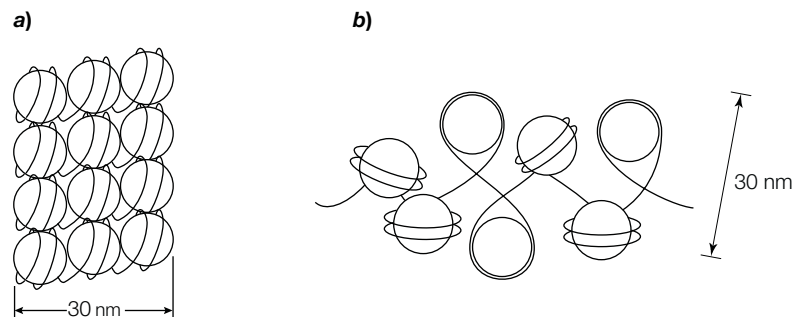
La histona H1 se denomina **histona conectora**. Hay una histona conectora fija a cada nucleosoma, pero su posición exacta no se conoce. Se pensó que se une al lado externo del octámero de histona, en la región del DNA conectador, y que su función consiste en mantener el DNA enrollado en el nucleosoma (figura F2-3), quizá incluso en mantener a los nucleosomas adyacentes juntos.

Sin embargo, algunos datos experimentales sugieren que la histona conectora puede localizarse entre el octámero de histona y el DNA y no sobre la superficie.

### La fibra de 30 nm

Si los núcleos se lisan con delicadeza, se observa que la cromatina existe como una fibra de 30 nm de diámetro. El diámetro es mucho mayor que el de un nucleosoma aislado (el cual es de alrededor de 11 nm) y sugiere que los nucleosomas forman parte de una estructura superior. Se desconoce la manera exacta en cómo los nucleosomas se organizan para formar la fibra de 30 nm; una posibilidad es que los nucleosomas se enrollen en una hélice muy ordenada de seis nucleosomas por vuelta y formen un **solenoides** (figura F2-4). Esto generaría una fibra de tres nucleosomas de ancho, lo que corresponde al diámetro observado. En un solenoide de estas características, la longitud lineal del DNA ha sido reducida por un factor adicional de 6 (equivalente a seis nucleosomas por vuelta del solenoide). Acoplado a la relación de empaque de 7 para el nucleosoma en sí (véase antes), esto da una relación de empaquetamiento para el solenoide de aproximadamente  $6 \times 7$  (es decir, cercana a 40). Un modelo alternativo es el **modelo en zigzag** (figura F2-4b). También existen otros modelos, incluido uno llamado listón helicoidal.

Es importante entender que no toda la proteína del octámero de histona está contenida dentro del cuerpo del nucleosoma. Cada molécula de histona tiene una cola N terminal flexible que se extiende fuera del octámero. Estas colas desempeñan un papel importante en el control del gen, de modo que, cuando se modifican químicamente, la fibra de 30 nm puede volverse



**Figura F2-4.** a) Modelo de solenoide propuesto de la estructura de la cromatina para producir una fibra de 30 nm. La estructura consta de seis nucleosomas por vuelta de la hélice y por lo tanto tendría tres nucleosomas de ancho. En el diagrama sólo son visibles tres nucleosomas de cada vuelta; los otros tres nucleosomas que le corresponderían a cada vuelta quedan atrás. b) Modelo del zigzag. En cada nucleosoma, el DNA se enrolla alrededor del lado externo (1.65 vueltas de una espiral dirigida a la izquierda). Sin embargo, en este diagrama simple, debido a la orientación de algunos nucleosomas, no se muestra todo el DNA superenrollado.

más accesible para la transcripción de los genes en los nucleosomas asociados.

**Estructuras de orden más elevado**

Durante la interfase (es decir, entre las divisiones nucleares), los cromosomas están dispersos en el núcleo y presumiblemente como fibras de 30 nm. A pesar de ello, durante la mitosis o meiosis, los cromosomas se condensan mucho. Poco se sabe acerca de cómo ocurre esta condensación. Cuando los cromosomas se disocian de las histonas, se observa que tienen un “**andamio proteínico**” fibroso central (o **matriz nuclear**) al cual el DNA se fija en asas (figura F2-5). Por consiguiente, *in vivo* se ve que el siguiente orden de empacamiento incluye la fijación de la fibra de 30 nm a múltiples localizaciones de este andamio proteínico central en una serie de asas radiales.

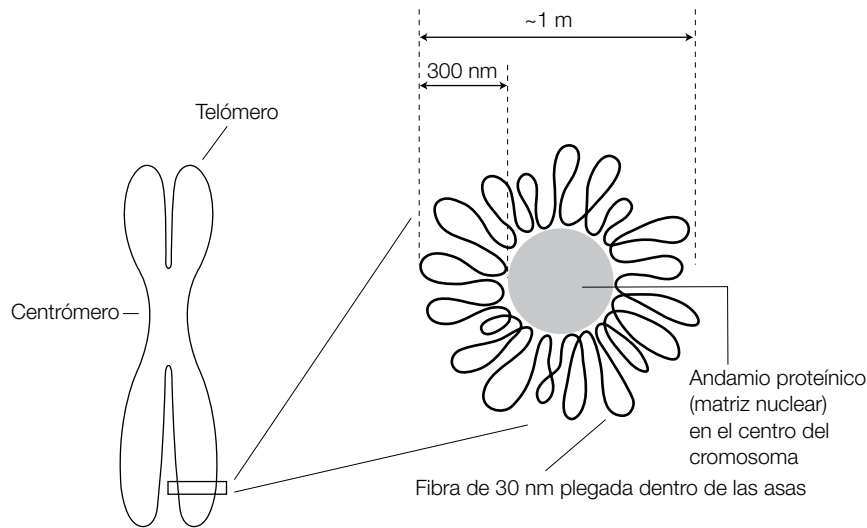
**Genomas de los organelos**

Las mitocondrias y los cloroplastos de las células eucariotas también contienen DNA pero, a diferencia del DNA

nuclear, la mayoría de los genomas mitocondriales y cloroplásticos son moléculas de DNA circular de doble cadena que se parecen a los cromosomas bacterianos. Sin embargo, la situación es más compleja que esto.

- El genoma del cloroplasto puede distribuirse en varias moléculas de DNA circular; en los dinoflagelados (algas marinas), el genoma del cloroplasto está presente en círculos múltiples, cada uno conteniendo aparentemente sólo un gen.
- Los genomas mitocondriales de *Paramecium*, *Chlamydomonas* y algunas levaduras (es decir, todos los eucariotas unicelulares) son moléculas lineales.
- En algunos eucariotas hay versiones lineales del genoma de los organelos que coexisten con formas circulares.

Además de esta complejidad está el hecho de que los genomas de los organelos pueden contener múltiples copias del genoma; por ejemplo, las mitocondrias humanas contienen cerca de 10 copias idénticas.



**Figure F2-5.** Fijación de la fibra de 30 nm al andamio proteínico central con las asas dispuestas en forma radial alrededor del andamio. El diagrama de la derecha muestra la representación de un corte transversal de un cromosoma.

# F3 Replicación del DNA en las bacterias

## Notas clave

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| <b>Polimerasa de DNA</b>         | La polimerasa I de DNA de <i>E. coli</i> requiere los cuatro desoxirribonucleósidos 5'-trifosfato (dNTP) como precursores, Mg <sup>2+</sup> , una plantilla de DNA y un cebador con un extremo terminal 3'-OH. La síntesis del DNA ocurre en la dirección 5' → 3'. La polimerasa I de DNA también tiene una actividad de exonucleasa 3' → 5' (corrección de errores) y una actividad de exonucleasa 5' → 3'. Las polimerasas de DNA II y III de <i>E. coli</i> carecen de la actividad de exonucleasa 5' → 3'. La polimerasa III de DNA de <i>E. coli</i> es la principal enzima que sintetiza DNA durante la replicación, mientras que la polimerasa I de DNA llena el espacio vacío entre los segmentos de DNA generados por la polimerasa III de DNA. La polimerasa II de DNA interviene sobre todo en la reparación del DNA. |
| <b>Horquillas de replicación</b> | La replicación comienza en un solo sitio, es bidireccional y semiconservativa. Cada burbuja (u ojo) de replicación consiste en dos horquillas de replicación.  |
| <b>Fragmentos de Okazaki</b>     | La síntesis del DNA avanza en una dirección 5' → 3' en cada cadena del DNA parental. En la cadena con la orientación 3' → 5' (la cadena adelantada), el nuevo DNA se sintetiza de manera continua. En la cadena que tiene la orientación 5' → 3' (la cadena retrasada), el DNA se sintetiza en forma discontinua como una serie de pequeños fragmentos de Okazaki, que luego son unidos.   |
| <b>Cebadores del RNA</b>         | La replicación del DNA requiere un cebador de RNA que sintetiza una polimerasa de RNA denominada primasa. Este cebador es extendido por la polimerasa III de DNA, la cual produce el DNA para ambas cadenas: la adelantada y la retrasada. La polimerasa I de DNA degrada el cebador y lo reemplaza con DNA. A continuación, la ligasa de DNA junta los extremos del DNA.  |
| <b>Proteínas accesorias</b>      | Una helicasa desenrolla la doble hélice de DNA y la proteína de unión al DNAmocatenario (SSB) estabiliza las regiones de cadena sencilla durante la replicación. La topoisomerasa I de DNA permite que la hélice se desenrolle sin causar una rotación extensa del cromosoma. La topoisomerasa II de DNA separa las dos moléculas circulares de DNA, productos de la replicación.  |
| <b>Temas relacionados</b>        | (F1) Replicación del DNA en bacterias<br>(F4) Replicación del DNA en eucariotas  |

## Polimerasas de DNA

La polimerasa I de DNA de *E. coli* cataliza la adición por pasos de desoxirribonucleótidos al extremo 3'-OH de una cadena de DNA:



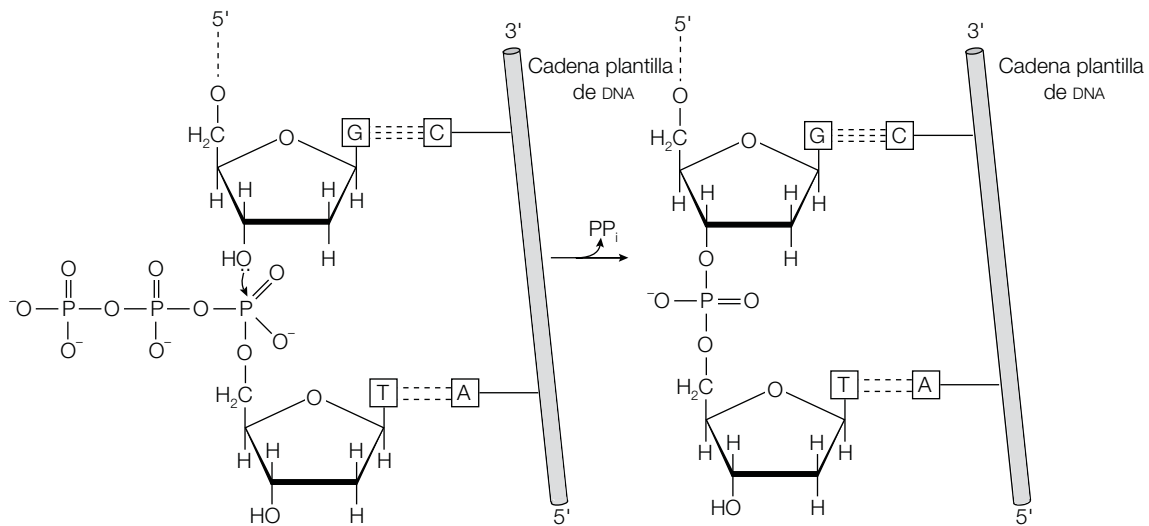
La enzima presenta los siguientes requerimientos:

- Los cuatro dNTPs (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) deben estar presentes para ser usados como precursores; también se requiere más Mg<sup>2+</sup>.
- Es esencial una **plantilla** de DNA para que la polimerasa de DNA la copie.

- Un **cebador** con un 3'-OH libre que la enzima pueda extender.

La polimerasa I de DNA es una enzima dirigida por la plantilla que reconoce al siguiente nucleótido de la plantilla de DNA y añade un nucleótido complementario al 3'-OH del cebador, con lo que forma un enlace 3'5' fosfodiéster y libera un pirofosfato. La reacción se muestra en la figura F3-1. Ésta incluye el ataque nucleófilo del 3'-OH del cebador en el grupo fosfato α del nucleótido siguiente. El cebador se extiende en la dirección 5' → 3'.

La polimerasa I del DNA también corrige errores en el DNA al eliminar los nucleótidos equivocados (es decir,



**Figura F3-1.** Síntesis del DNA. En este diagrama esquemático se muestran los puentes de hidrógeno y un enlace 3'5' fosfodiéster que se está formando entre la dTTP con la adenina de la cadena de la plantilla de DNA, con liberación de un pirofosfato.

tiene una actividad de corrección de errores). Por consiguiente, durante la polimerización, si el nucleótido que acaba de incorporarse es incorrecto (equivocado), es removido mediante la actividad de una exonucleasa 3' → 5'. Esto incrementa la fidelidad y se reduce la tasa de error a menos de 10<sup>-8</sup> por par de bases. La polimerasa I de DNA también exhibe una actividad de exonucleasa 5' → 3', es decir que puede hidrolizar un ácido nucleico comenzando desde el extremo 5' de la cadena. Esta actividad desempeña un rol clave en la remoción del cebador de RNA usado al inicio de la replicación (véase después). Por lo tanto, en general, la polimerasa I de DNA tiene tres sitios activos diferentes en su cadena polipeptídica: polimerasa 5' → 3', exonucleasa 3' → 5' y exonucleasa 5' → 3'.

*E. coli* también contiene otras dos polimerasas de DNA, la polimerasa II de DNA y la polimerasa III de DNA. Como sucede con la polimerasa I de DNA, estas enzimas catalizan asimismo la síntesis de DNA dirigida por una plantilla desde desoxirribonucleotidil 5'-trifosfato, necesitan un cebador con un grupo 3'-OH libre, sintetizan DNA en la dirección 5' → 3' y presentan actividad de exonucleasas 3' → 5'. Ninguna enzima tiene actividad de exonucleasa 5' → 3'.

Aunque la polimerasa I de DNA fue la primera polimerasa de DNA bacteriana aislada (en 1957, por Arthur Kornberg), de hecho es la polimerasa III de DNA (aislada en 1972) la principal enzima replicativa responsable de copiar la mayor parte de la plantilla del DNA. Sin embargo, la polimerasa I de DNA desempeña una función importante en la replicación; como se describe después, llena

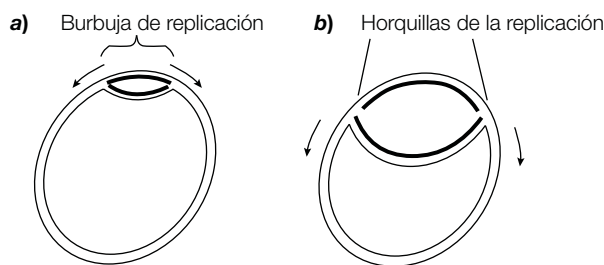
el espacio entre las regiones del DNA sintetizado por la polimerasa III de DNA. La polimerasa II de DNA participa sobre todo en la **reparación del DNA**, no en la replicación del genoma.

### Horquillas de replicación

Cuando el cromosoma circular bacteriano se replica, la replicación se inicia en un **origen único**. En *E. coli*, éste se llama **locus oriC** y contiene cinco copias de una secuencia de DNA que actúa como un sitio de unión para la proteína de reconocimiento del origen **DnaA**. Esta interacción facilita la unión de otras proteínas, como **DnaB**, una helicasa de DNA. Las regiones locales del oriC se desenrollan y quedan listas para que ambas cadenas sirvan de plantillas en la síntesis del nuevo DNA. Luego, la síntesis del DNA avanza en ambas direcciones desde el origen único (es decir, es **bidireccional**; figura F3-2). Los productos de la reacción son dos moléculas de DNA de cadena doble hijas, cada una de las cuales tiene una cadena de la plantilla original y una cadena del DNA que acaba de sintetizarse. En consecuencia, la replicación es **semiconservativa**. La región de replicación del DNA asociada con el origen único se denomina **burbuja de replicación** y consiste en dos **horquillas de replicación** que se mueven en direcciones opuestas alrededor del círculo de DNA (figura F3-2).

### Fragmentos de Okazaki

La doble cadena del DNA es **antiparalela** (sección F1); una cadena corre en dirección 5' → 3' y la cadena complementaria lo hace en dirección 3' → 5'. Como la

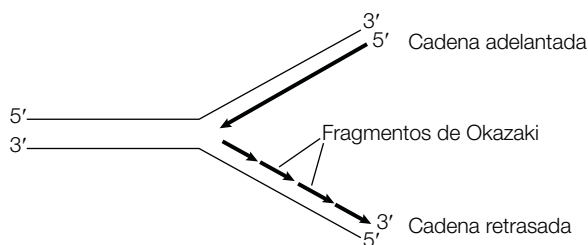


**Figura F3-2.** Replicación del cromosoma circular bacteriano. La replicación inicia en un origen único y avanza en dos direcciones, a) moviéndose alrededor del cromosoma en el transcurso del tiempo. b). Las dos horquillas de replicación acaban por encontrarse y unirse. Cada una de las dos moléculas hijas de DNA circular producidas tiene una cadena del DNA plantilla original (línea delgada) y una nueva cadena (línea gruesa).

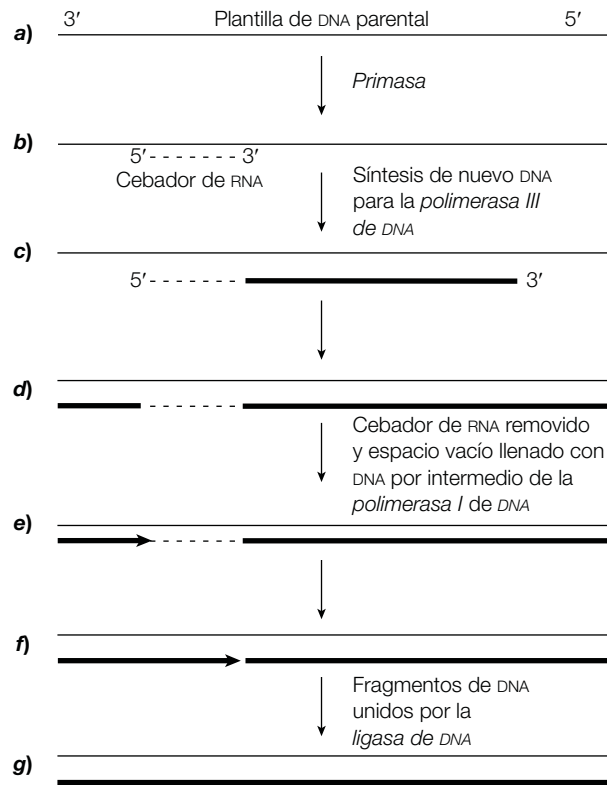
doble cadena original del DNA se abre en una horquilla de replicación, el nuevo DNA se sintetiza contra cada cadena plantilla. De manera superficial, por tanto, se puede esperar que el nuevo DNA sea  $5' \rightarrow 3'$  para una cadena hija y  $3' \rightarrow 5'$  para la otra cadena hija. Pese a ello, todas las polimerasas de DNA sólo producen DNA en la dirección  $5' \rightarrow 3'$  y nunca en la dirección  $3' \rightarrow 5'$ . En realidad lo que sucede es que en la cadena plantilla con orientación  $3' \rightarrow 5'$ , el nuevo DNA se hace en un fragmento continuo en la dirección correcta  $5' \rightarrow 3'$ . Este DNA nuevo se denomina la **cadena adelantada** (figura F3-3). En la otra cadena plantilla (que tiene orientación  $5' \rightarrow 3'$ ), la polimerasa III de DNA sintetiza piezas cortas de nuevo DNA (de alrededor de 1000 a 2000 nucleótidos de largo) en la dirección  $5' \rightarrow 3'$  (figura F3-3) que luego son unidos. Estos fragmentos pequeños se llaman **fragmentos de Okazaki** en honor a su descubridor. La nueva cadena de DNA, la cual se elabora mediante este método discontinuo, se llama **cadena retrasada**.

### Cebador de RNA

La polimerasa de DNA no puede iniciar la síntesis del DNA sin un cebador. Incluso en la cadena retrasada, cada fragmento de Okazaki requiere un cebador de RNA antes de que se pueda iniciar la síntesis del DNA. El cebador usado en cada caso es un fragmento corto de RNA [alrededor de 4-15 nucleótidos (nt) de longitud] y los sintetiza una polimerasa de RNA llamada **primasa** (figura F3-4a). La primasa puede sintetizar RNA directamente usando como plantilla DNA monocatenario debido a que, como todas las polimerasas de RNA, no requiere un cebador para comenzar la síntesis. El cebador de RNA producido por la primasa (figura F3 4b) es extendido luego por la polimerasa III de DNA (figura F3-4c). La polimerasa III de DNA sintetiza DNA para las cadenas adelantada y retrasada (figura F3-4d). Después de la síntesis del DNA por la polimerasa III de DNA, la polimerasa I de DNA, a través de su actividad de exonucleasa  $5' \rightarrow 3'$  hidroliza el cebador de RNA y sintetiza DNA para rellenar el espacio que quedó



**Figura F3-3.** Síntesis de DNA en una horquilla de replicación. A medida que el DNA parental (línea delgada) se abre, cada una de las dos cadenas parentales actúa como una plantilla para la síntesis de nuevo DNA (líneas gruesas). La cadena adelantada se sintetiza en forma continua, pero la cadena retrasada se sintetiza bajo la forma de pequeños fragmentos de DNA (Okazaki), que luego se unen.



**Figura F3-4.** Detalles de la replicación del DNA: a) la primasa se une a la cadena plantilla de DNA (línea delgada) y b) sintetiza un cebador corto de RNA (línea entrecortada); c) la polimerasa III de DNA extiende el cebador de RNA mediante la síntesis de nuevo DNA (línea gruesa); d) durante la síntesis de la cadena retrasada, los fragmentos de Okazaki adyacentes son separados por los cebadores de RNA; e) a su vez, los cebadores de RNA son removidos y los espacios vacíos llenados con DNA mediante la polimerasa I de DNA f), lo que genera fragmentos de DNA adyacentes a que son unidos por la ligasa de DNA g).

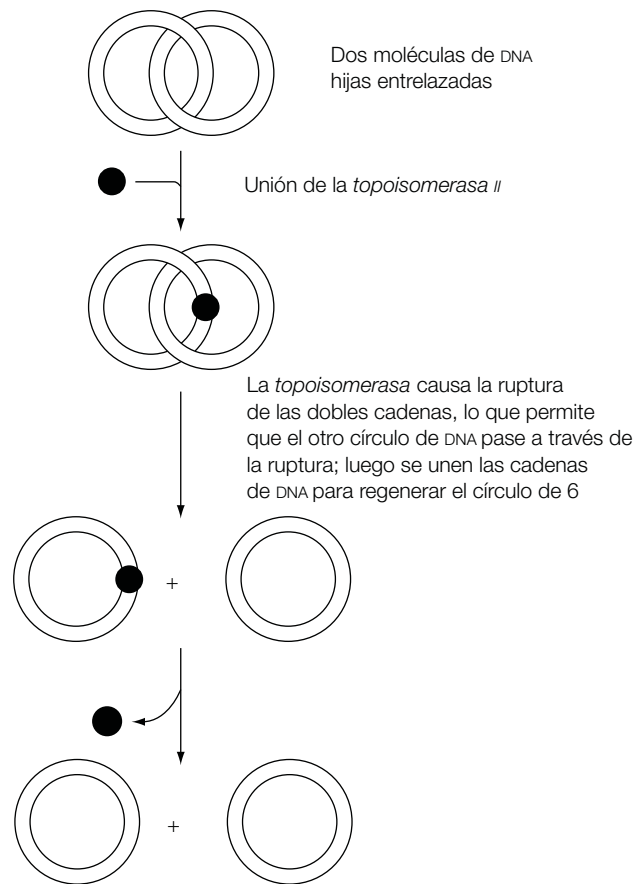
(figuras F3-4e y F3-4f). La polimerasa III de DNA no puede llevar a cabo esta actividad debido a que carece de la actividad de exonucleasa 5' → 3' de la polimerasa I de DNA. Para finalizar, la ligasa de DNA une los extremos de los fragmentos de DNA (figura F3-4g).

### Proteínas accesorias

Las polimerasas I y III de DNA, la primasa y la ligasa de DNA no son las únicas proteínas necesarias para la replicación del cromosoma bacteriano. La plantilla de DNA es una doble hélice con cada cadena enrollada de manera estrecha alrededor de la otra y por lo tanto las dos cadenas deben desenrollarse durante la replicación. ¿Cómo es que se resuelve el **problema del desenrollamiento**? La **helicasa DnaB** se usa para desenrollar la doble hélice en un evento que requiere ATP como fuente de energía y la **proteína SSB (de unión a una cadena de DNA)** evita que las bases de una región de una cadena se pareen otra vez, de manera que cada una de las dos cadenas

de DNA sea accesible para la replicación. En principio, para que una horquilla de replicación se mueva a lo largo de una región de DNA, la hélice de DNA necesitaría desenrollarse en la misma dirección, lo que determina que el DNA rote con rapidez. No obstante, como el cromosoma bacteriano es circular carece de extremos que roten libremente. La solución al problema consiste en que una enzima denominada **topoisomerasa I** rompa un enlace fosfodiéster en una de las cadenas del DNA (ruptura de una cadena) una pequeña distancia por delante de la horquilla, lo que permite que el DNA rote con libertad (giratoria) alrededor de la otra cadena (la intacta). Luego, la topoisomerasa reconstituye el enlace fosfodiéster.

Después que el DNA circular bacteriano ha sido replicado, el resultado es de dos moléculas de DNA circular de cadena doble que están entrelazadas. La **topoisomerasa II** las separa como sigue. Esta enzima trabaja de una manera similar a la topoisomerasa I, pero causa una



**Figura F3-5.** La topoisomerasa II separando las moléculas circulares hijas de DNA.

ruptura transitoria en cada cadena (ruptura de las dos cadenas) de una molécula de DNA de cadena doble. Por consiguiente, la topoisomerasa II se une a un círculo de DNA de cadena doble y determina una ruptura transitoria

en las dos cadenas que actúa como una abertura a través de la cual puede pasar el otro círculo de DNA (figura F3-5). A continuación, la misma topoisomerasa II repara las cadenas rotas.



# F4 Replicación del DNA en los eucariotas

## Notas clave

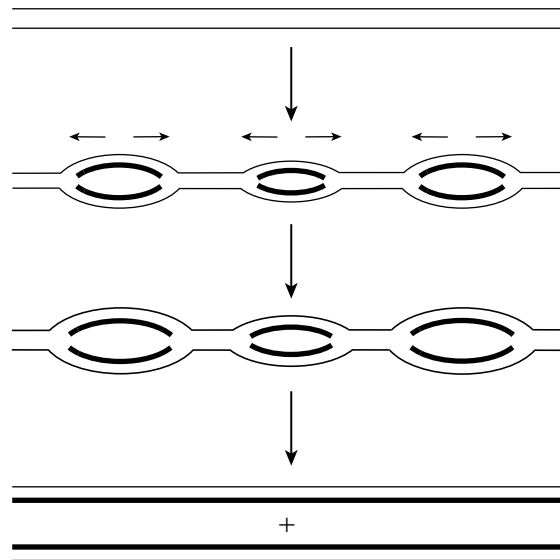
|   |   |
|---|---|
| <b>Replicones múltiples</b>                   | La replicación del DNA sólo ocurre en la fase S. Sucede en muchos orígenes cromosómicos, es bidireccional y semiconservativa. Conjuntos de 20 a 80 replicones actúan como unidades de replicación que se activan en secuencia. A diferencia de los orígenes de la replicación bacteriana, la de los mamíferos está menos bien definida.   |
| <b>Cuando menos, nueve polimerasas de DNA</b> | La polimerasa $\delta$ de DNA es la principal enzima responsable de la replicación del DNA cromosómico. La polimerasa $\alpha$ de DNA sintetiza el cebador en el proceso. Las polimerasas $\beta$ y $\epsilon$ de DNA reparan el DNA, y la polimerasa $\gamma$ de DNA replica el DNA mitocondrial.  |
| <b>Cadena adelantada y retrasada</b>          | Las polimerasas de DNA $\alpha$ y $\delta$ sintetizan la cadena retrasada a través de los fragmentos de Okazaki. La polimerasa $\alpha$ de DNA sintetiza los cebadores de RNA pues tiene una subunidad primasa. La polimerasa $\delta$ de DNA es la principal polimerasa de replicación y sintetiza DNA usando el cebador de RNA producido por la polimerasa $\alpha$ de DNA.   |
| <b>Replicación del telómero</b>               | Las regiones que se encuentran en los extremos de los cromosomas (telómeros) contienen múltiples copias de un hexanucleótido rico en G. La telomerasa se encarga de replicar el DNA del telómero. Es una transcriptasa reversa con una subunidad de RNA que contiene una secuencia que es el complemento invertido de la repetición del telómero. Extiende el extremo del telómero copiando la plantilla de RNA en múltiples rondas de síntesis y luego de translocación. |
| <b>Replicación de la cromatina</b>            | Los nucleosomas no se disocian del DNA durante la replicación de éste. En su lugar, deben abrirse para permitir que el aparato de replicación pase. Ambas moléculas de DNA hijas tienen histonas unidas a ellas, pero también deben sintetizarse nuevas histonas para permitir que todo el DNA se empaque en forma correcta en los nucleosomas.   |
| <b>Temas relacionados</b>                     | (A3) Crecimiento celular<br>(F1) Introducción al DNA<br>(F3) Replicación del DNA en las bacterias   |

## Replicones múltiples

En los eucariotas, la replicación del DNA cromosómico sólo ocurre en la fase S del ciclo celular (sección A3). Como en el caso de DNA bacteriano (sección F3), el DNA eucariota se replica en forma **semiconservativa**. La replicación de cada molécula de DNA lineal en un cromosoma comienza en **muchos orígenes**, uno cada 30 a 300 kilobases (kb) de DNA según la especie y el tejido, y avanza en **ambas direcciones** desde cada origen.

El uso de múltiples orígenes es esencial con el fin de asegurar que la gran cantidad de DNA cromosómico de una célula eucariota se replique dentro del lapso necesario;

una célula diploide humana debe copiar alrededor de 6 billones de pares de bases comparado con sólo los alrededor de 4.6 millones de pares de bases que necesita *E. coli* para replicarse. No es de sorprenderse que cada cromosoma en una célula humana tenga varios cientos de orígenes de replicación. A diferencia de *E. coli*, los orígenes de la replicación en los mamíferos no parecen tener secuencias claramente definidas de proteínas de unión que inician la replicación, pero se forman regiones más generales ricas en AT en las cuales se forman los **complejos de replicación** (orc). Cada orc contiene seis proteínas diferentes, cada una de las cuales es homóloga a la proteína DnaA de *E. coli*.



**Figura F4-1.** Replicación del DNA cromosómico eucariota. La replicación comienza en muchos orígenes y avanza en ambas direcciones en cada localización. Al final, las burbujas de replicación confluyen para producir dos moléculas hijas de DNA, cada una de las cuales consiste en una cadena de DNA parental (línea delgada) y una cadena del DNA que acaba de sintetizarse (línea gruesa).

En cada origen, se forma una **burbuja de replicación** que consiste en dos **horquillas de replicación** que se mueven en direcciones opuestas. El DNA replicado bajo el control de un solo origen se llama un **replicón**. La síntesis del DNA avanza hasta que las burbujas de replicación confluyen (figura F4-1).

No todas las regiones de un cromosoma se replican en forma simultánea. En una parte del cromosoma se pueden encontrar muchas burbujas de replicación y ninguna en otra sección. Por lo tanto, los orígenes de replicación se activan en grupos, denominados **unidades de replicación**, que consisten en 20 a 80 orígenes. Durante la fase S, las diferentes unidades de replicación se activan en un orden establecido hasta que al final se replica todo el cromosoma. El DNA activo para la transcripción parece replicarse al principio de la fase S, mientras que la cromatina que está condensada y no es activa para la transcripción se replica más tarde.

### Cuando menos, nueve polimerasas de DNA

Las células eucariotas contienen cuando menos nueve polimerasas de DNA diferentes, que se denotan por las letras griegas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , etc. La principal enzima que participa en la replicación del DNA cromosómico es la polimerasa  $\delta$  de DNA. La polimerasa  $\alpha$  de DNA también desempeña un papel importante en la replicación dado que ceba el proceso (véase más adelante).

La polimerasa  $\gamma$  de DNA es codificada por un gen nuclear, pero la enzima es dirigida a la mitocondria, donde replica el DNA mitocondrial.

Las polimerasas  $\beta$  y  $\epsilon$  de DNA intervienen sobre todo en la reparación del DNA, como lo son otras polimerasas de DNA que no se consideran aquí.

### Cadenas adelantada y retrasada

El esquema básico de la replicación de las dos cadenas del DNA cromosómico en los eucariotas es similar al de la replicación del DNA bacteriano (sección F3); se sintetizan una cadena adelantada y una retrasada, la última bajo la forma de una síntesis discontinua a través de los fragmentos de Okazaki. La polimerasa  $\alpha$  de DNA sintetiza los cebadores de RNA (8 a 12 nt de longitud) que se requieren, la cual cuenta con una **subunidad primasa**. La polimerasa  $\alpha$  de DNA inicia la síntesis de la cadena retrasada, para lo cual primero elabora el cebador de RNA y luego lo extiende con una región corta de DNA. A continuación, la polimerasa  $\delta$  de DNA sintetiza la parte restante del fragmento de Okazaki. De manera similar, la polimerasa  $\delta$  de DNA sintetiza la cadena adelantada. La enzima  $\delta$  presenta actividad de exonucleasa  $3' \rightarrow 5'$  y de esta manera puede corregir errores del DNA elaborado, algo que la polimerasa  $\alpha$  de DNA está impedida de hacer porque carece de esa actividad.

### Replicación del telómero

La replicación de una molécula de DNA lineal en un cromosoma eucariota genera un problema que no existe con la replicación de las moléculas de DNA circular bacteriano. El mecanismo normal de la síntesis de DNA (véase antes) implica que el extremo 3' de la cadena retrasada no se replica. Esto genera una brecha en el extremo del cromosoma y por lo tanto un acortamiento de la porción replicada de la doble cadena. El efecto sería que el DNA cromosómico debería hacerse más corto cada vez después de cada replicación. Varios mecanismos evolucionaron para resolver este problema. En muchos organismos, la solución es usar una enzima llamada **telomerasa** para replicar los extremos (**telómeros**) del cromosoma.

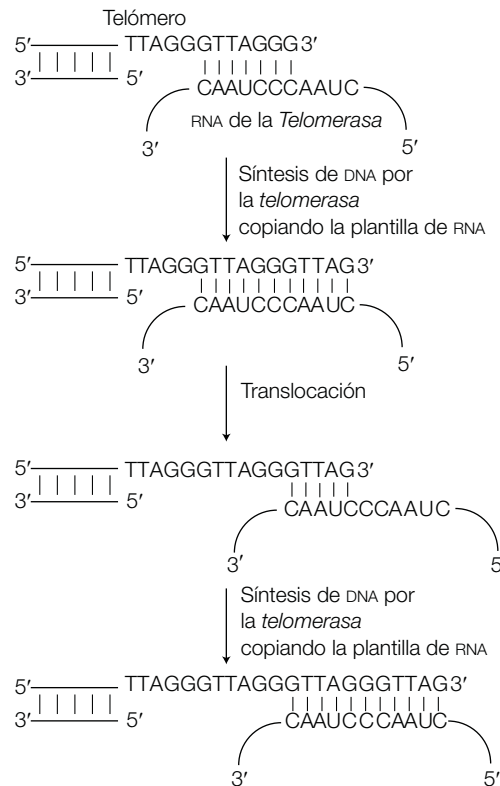
Cada telómero contiene muchas copias de una secuencia de hexanucleótido repetida rica en G; en los humanos, ésta es 5'-TTAGGG-3'. La telomerasa contiene una proteína y, como parte integral de su estructura, una molécula de RNA de alrededor de 450 nt de longitud. Cerca del extremo 5' de este RNA está la secuencia 5'-CUAACCUAAC-3', que es el complemento inverso del telómero humano repetido (5'-TTAGGG-3').

El mecanismo de acción de la telomerasa se muestra en la figura F4-2. El RNA de la telomerasa se une al extremo del

telómero mediante puentes de hidrógeno. Por lo tanto, al usar el RNA como una plantilla, la telomerasa (que es una transcriptasa reversa; sección I4) copia la plantilla de RNA y agrega desoxirribonucleótidos al extremo del telómero de DNA. Por consiguiente, la telomerasa se transloca a lo largo de la cadena hacia el nuevo extremo del telómero y repite el proceso de extensión. Esto puede hacerse ciento de veces antes de finalizarlo a través de su disociación. Este mecanismo de acción de la telomerasa se confirma al encontrar que en otras especies el telómero repetido difiere en secuencia del de los humanos (por ejemplo, en *Tetrahymena*, es 5'-TTGGGG-3'), pero la correspondiente telomerasa siempre contiene una secuencia de RNA que es el complemento invertido del de la secuencia repetida de cada especie.

Todavía no está claro cómo se extiende la otra cadena (la cadena rica en C) en el extremo del telómero, pero posiblemente se debe a que la cadena de DNA que acaba de extenderse actúa como una plantilla para la replicación normal del DNA (síntesis de la cadena retrasada por la polimerasa  $\alpha$  de DNA) para formar DNA cromosómico de cadena doble.

En los mamíferos, la telomerasa es activa en las etapas tempranas del desarrollo embrionario, pero después del



**Figura F4-2.** Replicación del DNA telomérico. La telomerasa es una transcriptasa reversa con una molécula de RNA integral que usa como plantilla para dirigir la síntesis del DNA y en esa medida extender los extremos del DNA cromosómico.

nacimiento es activa sólo en las células madre y en las células reproductivas, de manera que en las otras células de los mamíferos el DNA cromosómico se acorta cada vez que la célula se divide.

### **Replicación de la cromatina**

Cuando un cromosoma se replica, la maquinaria de replicación pasa a través de los nucleosomas sin remover las histonas del DNA. La manera como esto ocurre

todavía no se comprende del todo. Las dos moléculas de DNA hijas que resultan de la replicación tienen histonas viejas unidas al mismo, pero en total, ya que la cantidad de DNA resultó duplicada, se necesitan más histonas para empacar al DNA correctamente dentro de los nucleosomas. No debe sorprender, por lo tanto, que la fase S del ciclo celular es también el momento en el cual se sintetizan grandes cantidades de histonas.

# G1 Introducción al RNA

## Notas clave

|                                      |  |   |
|--------------------------------------|--|---|
| <b>Estructura covalente</b>          | El RNA es una cadena polimérica de ribonucleótidos unidos por enlaces 3'5' fosfodiéster. La estructura covalente es muy similar a la del DNA, excepto que el uracilo reemplaza a la timina y la ribosa reemplaza a la desoxirribosa. |   |
| <b>Estructura secundaria del RNA</b> | Las moléculas de RNA son en gran medida de una sola cadena, pero hay regiones de complementariedad donde la cadena de RNA forma regiones internas de doble cadena.   |   |
| <b>Temas relacionados</b>            | (F1) Introducción al DNA<br>(G2) Transcripción en procariotas<br>(G3) Operones<br>(G4) Transcripción en eucariotas: descripción  | (G5) Transcripción de genes codificantes de proteínas en eucariotas<br>(G6) Regulación de la transcripción de la polimerasa II de RNA |

## Estructura covalente

Como el DNA (sección F1), el RNA es un largo polímero que consiste en nucleótidos unidos por enlaces 3'5' fosfodiéster. Sin embargo, hay entre ellos algunas diferencias.

- Las bases del RNA son adenina (se abrevia A), guanina (G), uracilo (U) y citosina (C). Por lo tanto, la timina del DNA es reemplazada por el **uracilo** en el RNA, una pirimidina diferente (figura G1-1a). No obstante, como la timina (sección F1), el uracilo puede formar pares de bases con la adenina.

- El azúcar del RNA es la **ribosa**, en sustitución de la desoxirribosa del DNA (figura G1-1b).

Los ribonucleósidos correspondientes son adenosina, guanosina, citidina y uridina. Los ribonucleótidos correspondientes son adenosina 5'-trifosfato (ATP), guanosina 5'-trifosfato (GTP), citidina 5'-trifosfato (CTP) y uridina 5'-trifosfato (UTP).

Como en el DNA, la secuencia de nucleótidos del RNA también se escribe como una secuencia de bases en la dirección 5' → 3'. Por consiguiente, GUCAAGCCGGAC es la secuencia de una molécula corta de RNA.

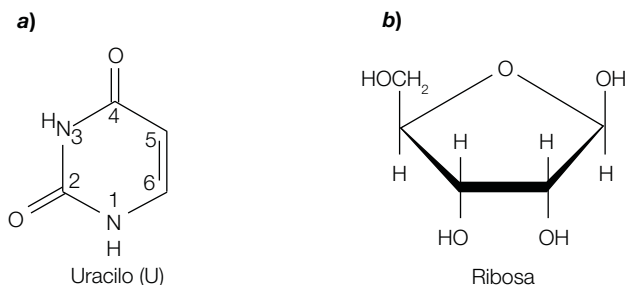
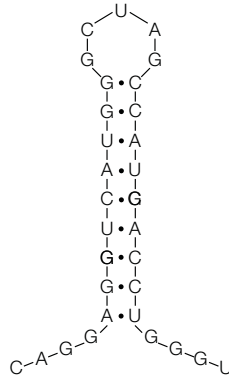


Figura G1-1. a) Uracilo; b) ribosa.

### Estructura secundaria del RNA

La mayor parte de las moléculas de RNA son cadenas simples, pero una molécula de RNA puede contener regiones que forman pares de bases complementarias donde la cadena de RNA forma asas sobre sí misma (figura G1-2).

De esta manera, el RNA tendrá algunas regiones de doble cadena. El RNA ribosómico (rRNA) y el RNA de transferencia (tRNA) (secciones G8 y G9, respectivamente) exhiben estructura secundaria sustancial, como lo hacen algunos RNA mensajeros (mRNA).



**Figura G1-2.** Un ejemplo de autocomplementariedad en el RNA, con la formación de una región interna de doble cadena; los puentes de hidrógeno entre las bases se muestran con el símbolo •.

# G2 Transcripción en procariotas

## Notas clave

### Tres fases de la transcripción

La transcripción por la polimerasa de RNA de *E. coli* sucede en tres fases: iniciación, elongación y terminación. La iniciación incluye la unión de la enzima a un promotor corriente arriba del gen. Durante la elongación, la cadena de DNA antisentido se usa como la plantilla, de manera que el RNA se hace con la misma secuencia de bases que la cadena con sentido (codificación), excepto que U reemplaza a T. Al final, se encuentra una señal de terminación que detiene la síntesis y causa la liberación del RNA completo.

### Promotores e iniciación

La holoenzima polimerasa de RNA (que contiene las subunidades  $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$ ) inicia la transcripción mediante la unión a una región de 40-60 pb que contiene dos elementos promotores conservados, la secuencia -10 (caja de Pribnow) con el consenso TATAAT, y la secuencia -35 con el consenso TTGACA. El factor  $\sigma$  es esencial para la iniciación. No se requiere cebador. Los promotores varían hasta en 1 000 veces en su eficiencia de iniciación, la cual depende de la secuencia exacta de los elementos del promotor clave así como de secuencias de los flancos. Algunos genes que se expresan mucho cuentan también con un elemento que se localiza 40 a 60 nucleótidos (nt) corriente arriba del sitio donde se inicia la transcripción que incrementa la eficiencia de la iniciación al actuar como un sitio de unión adicional de la polimerasa de RNA.

### Elongación

Después de la iniciación, la subunidad  $\sigma$  se disocia de la polimerasa de RNA para dejar al centro enzimático ( $\alpha_2\beta\beta'\omega$ ) que continúe la síntesis de RNA en la dirección 5' → 3' usando los cuatro ribonucleósidos 5'-trifosfato como precursores. La doble hélice del DNA está desenrollada para la transcripción, y forma una burbuja de transcripción, y luego vuelve a enrollarse después que pasa el complejo de transcripción.

### Terminación

Una señal de terminación común es una estructura en horquilla formada por una región palindrómica rica en GC, seguida por una secuencia rica en AT. También se usan otras señales, que requieren la asistencia de la proteína rho ( $\rho$ ) para que exista una terminación efectiva.

### Procesamiento del RNA

En los procariotas, los transcritos de RNA mensajero de genes que codifican proteínas requieren pequeñas modificaciones antes de la traducción o ninguna. El RNA ribosómico (rRNA) y el RNA de transferencia (tRNA) se sintetizan como moléculas precursoras que requieren el procesamiento por parte de ribonucleasas específicas para que liberen las moléculas de RNA maduras.

### Temas relacionados

|   |   |
|---|---|
| (F1) Introducción al DNA  | (G7) Procesamiento del pre-mRNA eucariota                   |
| (G1) Introducción al RNA  | (G8) Transcripción y procesamiento del RNA ribosómico       |
| (G3) Operones   | (G9) Transcripción y procesamiento del RNA de transferencia |
| (G4) Transcripción en eucariotas: descripción                       |   |
| (G5) Transcripción de genes codificantes de proteínas en eucariotas |   |
| (G6) Regulación de la transcripción de la polimerasa II de RNA      |   |

## Tres fases de la transcripción

La transcripción génica por la polimerasa de RNA de *E. coli* tiene lugar en tres fases: **iniciación**, **elongación** y **terminación**. Durante la iniciación, la polimerasa de RNA reconoce un sitio específico del DNA, corriente arriba del gen que será transcrito, denominado **sitio promotor**, al cual se une. Este complejo de polimerasa de RNA unida al promotor de cadena doble se denomina **complejo promotor cerrado**. A continuación, el DNA se desenrolla en forma local y crea un **complejo promotor abierto**, al mismo tiempo que la polimerasa de RNA comienza la transcripción de la cadena simple plantilla de DNA. Durante la elongación, la polimerasa de RNA usa la **cadena antisentido** (–) del DNA como plantilla y sintetiza una molécula de RNA complementaria a través de ribonucleósidos 5'-trifosfato como precursores. El RNA producido tiene la misma secuencia de la cadena que no funge como plantilla, denominada **cadena con sentido** (+) (o **cadena de codificación**), excepto que el RNA contiene U en lugar de T. En diferentes localizaciones del cromosoma bacteriano, a veces una cadena se usa como plantilla y en otras ocasiones la otra, lo que depende de cuál cadena es la codificadora del gen en cuestión. La polimerasa de RNA identifica la cadena correcta a usar como plantilla debido a la presencia del sitio promotor. Para terminar, la polimerasa de RNA encuentra una señal de terminación y concluye la transcripción, con liberación del RNA transcrito y su disociación del DNA.

## Promotores e iniciación

En *E. coli*, una polimerasa de RNA grande y única se encarga de transcribir todos los genes con la subunidad de estructura  $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$ . Esta enzima completa, llamada **holoenzima**, se necesita para iniciar la transcripción ya que el factor  $\sigma$  es esencial para el reconocimiento del promotor; este factor disminuye la afinidad de la enzima central por los sitios inespecíficos de unión al DNA e incrementa su afinidad por el promotor.

La holoenzima se une a una región promotora de alrededor de 40 a 60 bp de tamaño y después inicia la transcripción a una corta distancia corriente abajo (es decir, de 3' al promotor). Dentro del promotor hay dos

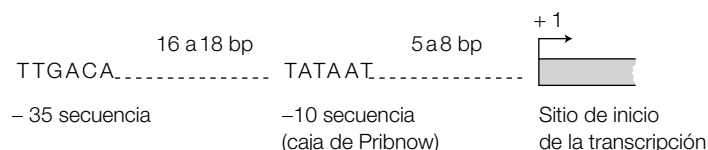
secuencias comunes de 6 bp que encierran una particular importancia para la función promotora y por lo cual han sido muy conservadas en las especies. Si se usa la convención de llamar +1 al primer nucleótido de una secuencia transcrita, sus dos elementos promotores se encuentran en las posiciones –10 y –35, que están alrededor de 10 y 35 bp, respectivamente, corriente arriba de donde debe iniciar la transcripción (figura G2-1).

- La **secuencia –10** tiene la **secuencia de consenso** (es decir, la secuencia promedio de muchos promotores) TATAAT. Debido a que este elemento fue descubierto por Pribnow, ahora también se la conoce como **caja de Pribnow**. Representa un sitio de reconocimiento importante que interactúa con el factor  $\sigma$  de la polimerasa de RNA.
- La **secuencia –35** tiene la secuencia de consenso TTGACA y es importante en el desenrollamiento del DNA durante la iniciación transcripcional.

La secuencia entre la secuencia –10 y la secuencia –35 no se conserva (es decir que varía de promotor en promotor), pero la distancia entre estos dos sitios es de extrema importancia para el funcionamiento correcto del promotor debido a que coloca a los dos elementos en el mismo lado de la doble hélice, donde son accesibles para unirse con la polimerasa de RNA.

Los promotores difieren hasta en 1000 veces en su eficiencia de iniciación de la transcripción, de manera que los genes con promotores fuertes son transcritos con mucha más frecuencia que los genes con promotores débiles. Las secuencias –10 y –35 de los promotores fuertes corresponden muy bien a las secuencias de consenso que se muestran en la figura G2-1, mientras que los promotores débiles tienden a diferir de las secuencias de consenso en numerosos nucleótidos. La naturaleza de las secuencias vecinas al sitio de iniciación de la transcripción también puede influir en la eficiencia de la iniciación.

Es común que los procariotas tengan varios factores  $\sigma$  que reconocen diferentes tipos de promotores. En *E. coli*, el factor  $\sigma$  más común es  $\sigma^{70}$  (así llamado debido a que tiene una masa de 70 kDa), el cual reconoce las secuencias de consenso promotoras descritas antes.



**Figura G2-1.** Se muestran la secuencia –10 y –35 del promotor procariota. Por convención, el primer nucleótido de la plantilla de DNA que se transcribe dentro del RNA se denota como +1, el sitio de inicio de la transcripción.



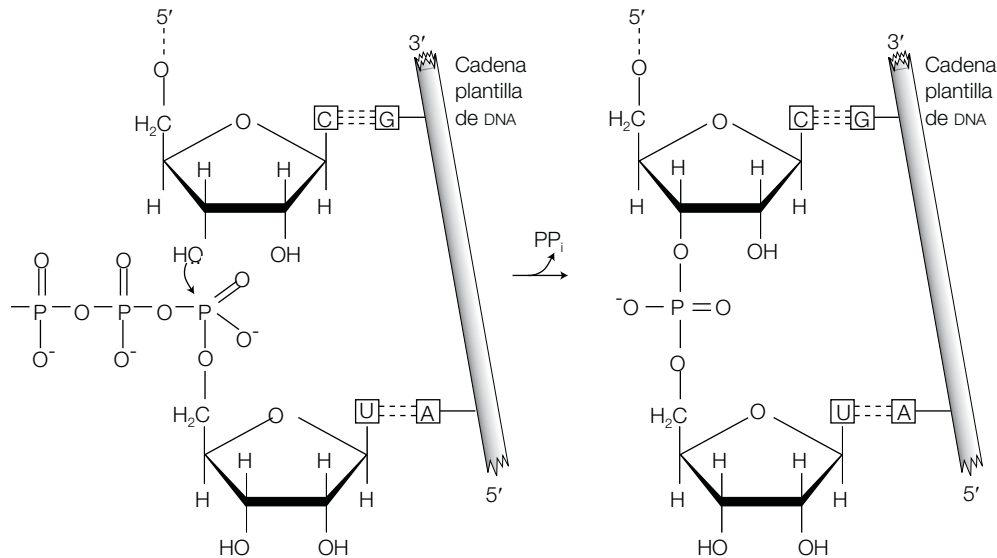
Pese a ello, bajo otras condiciones ambientales, como el agotamiento del nitrógeno o temperaturas elevadas (choque por calor), se expresan otros factores  $\sigma$ , los cuales se unen a los promotores con diferentes secuencias de consenso. Esto conduce a la transcripción preferencial de aquellos genes que portan a los diferentes promotores de consenso. En consecuencia, el factor  $\sigma$  juega un papel importante en el direccionamiento con el cual la polimerasa de RNA transcribe los genes.

De la misma manera que el promotor central, algunos genes de *E. coli* que se expresan mucho también tienen otra secuencia (llamada **elemento UP del elemento corriente arriba**) localizada 40 a 60 nucleótidos (nt) corriente arriba del sitio de iniciación transcripcional. Éste incrementa la eficiencia de la iniciación al actuar como un sitio de unión adicional de la polimerasa de RNA, para lo cual se une la subunidad  $\alpha$  de la polimerasa de RNA.

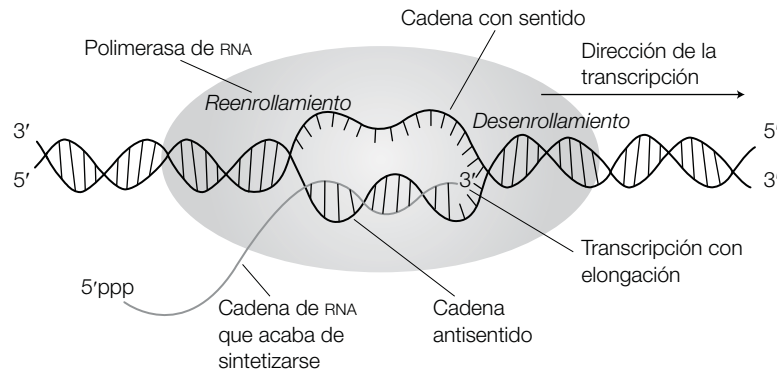
Cuando la polimerasa de RNA se une a un promotor, no necesita cebador para comenzar la transcripción (confróntese con las polimerasas de DNA, secciones F3 y F4); la polimerasa de RNA comienza la transcripción directamente.

## Elongación

Después de iniciarse la transcripción, el factor  $\sigma$  es liberado del complejo de transcripción y deja a la enzima central ( $\alpha_2 \beta \beta' \omega$ ), la cual continúa la elongación del transcrito de RNA. Por consiguiente, la enzima central contiene el sitio catalítico para la polimerización. El primer nucleótido del transcrito de RNA suele ser pppG o pppA. Después, la polimerasa de RNA sintetiza RNA en la dirección  $5' \rightarrow 3'$ , y para ello utiliza los cuatro ribonucleósidos 5'-trifosfato (ATP, CTP, GTP, UTP) como precursores. El  $3'-OH$  del final de la cadena de RNA en crecimiento ataca al grupo fosfato  $\alpha$  del siguiente ribonucleósido 5'-trifosfato entrante para formar un enlace  $3'5'$  fosfodiéster (figura G2-2). La región del DNA desenrollado que se está transcribiendo se denomina **burbuja de transcripción** (figura G2-3). El transcrito de RNA forma una hélice híbrida transitoria de RNA-DNA con su cadena plantilla, pero luego se desprende del DNA a medida que la transcripción avanza. El DNA se desenrolla hacia delante de la burbuja de transcripción y después que el complejo de transcripción pasa vuelve a enrollarse.



**Figura G2-2.** Transcripción por la polimerasa de RNA. En cada paso, el ribonucleótido entrante seleccionado es el que puede formar un par de bases con la base siguiente de la cadena plantilla del DNA. En el diagrama, el nucleótido entrante es rUTP para parearlo con el residuo A del DNA plantilla. Se formó un enlace  $3'5'$  fosfodiéster, que extendió la cadena del RNA en un nucleótido, al tiempo que se liberó un pirofosfato. En general, la molécula de RNA crece en la dirección  $5'$  a  $3'$ .



**Figura G2-3.** Burbuja de transcripción. La doble hélice de DNA es desenrollada y entonces la polimerasa de RNA sintetiza una copia de RNA a partir de la cadena plantilla de DNA. De manera transitoria, el RNA naciente forma una hélice híbrida de RNA-DNA, pero luego se separa del DNA, el cual de manera subsecuente se vuelve a enrollar en una hélice otra vez.

## Terminación

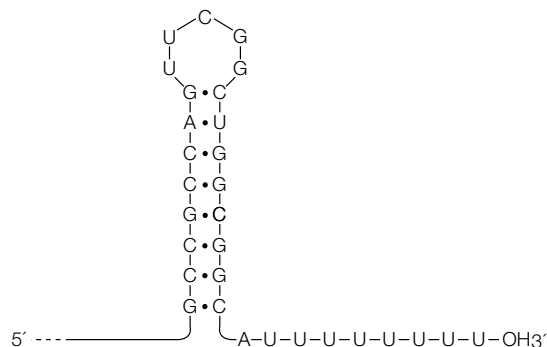
La transcripción continúa hasta que se alcanza una secuencia de terminación. En ese punto, la transcripción cesa, el transcrito de RNA y la polimerasa de RNA se disocian del DNA y la región de una cadena de DNA vuelve a enrollarse y así reintegra la hélice doble.

La señal de terminación más común es una región rica en GC que es un **palíndromo**, seguida por una secuencia rica en AT. El RNA elaborado a partir del palíndromo de DNA es asimismo autocomplementario y de esa manera los pares de bases forman hacia el interior una **estructura en horquilla** rica en pares de bases GC seguida por cuatro o más residuos U (figura G2-4). Sin embargo, no todos los sitios de terminación tienen esta estructura en horquilla. Aquellos que carecen de esa estructura re-

quieren una proteína adicional, denominada **rho** ( $\rho$ ), que ayude a reconocer el sitio de terminación y detenga la transcripción.

## Procesamiento del RNA

En los procariotas, el RNA transcrito de genes codificadores de proteínas (RNA **mensajero**, mRNA) requiere pocas modificaciones o ninguna modificación antes de la traducción. De hecho, muchas moléculas de mRNA comienzan a traducirse incluso antes que la síntesis de RNA haya terminado. No obstante, el RNA **ribosómico** (rRNA) y el RNA **de transferencia** (tRNA) se sintetizan como moléculas precursoras que requieren procesamiento postranscripcional (secciones G8 y G9, respectivamente).



**Figura G2-4.** Estructura típica en horquilla formada por el extremo 3' de una molécula de RNA durante la terminación de la transcripción.

# G3 Operones

## Notas clave

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| <b>Descripción general</b>            | Los operones son grupos de genes estructurales bajo el control de un sitio operador y un gen regulador, los cuales aseguran que la expresión de los genes estructurales se controle en forma coordinada.   |
| <b>El operón <i>lac</i></b>           | El operón <i>lac</i> contiene los genes <i>lacZ</i> , <i>lacY</i> y <i>lacA</i> que codifican a la galactosidasa beta, a la permeasa de galactósido y a la transacetilasa de tiogalactósido, respectivamente, precedido por un sitio operador ( $O_{lac}$ ) y un sitio promotor ( $P_{lac}$ ). La polimerasa de RNA transcribe el operón y produce un mRNA policistrónico que es traducido para generar las cuatro enzimas. Cuando la lactosa está presente, el nivel restante de galactosidasa beta convierte parte de la lactosa en alolactosa, la cual induce la transcripción del operón <i>lac</i> . El isopropiltiogalactósido (IPTG) también puede actuar como un inductor. La transcripción del operón es controlada por la proteína represora <i>lac</i> codificada por el gen <i>lacI</i> .  |
| <b>El represor <i>lac</i></b>         | En ausencia de un inductor, la polimerasa de RNA se une al promotor del gen <i>lacI</i> ( $P_{lacI}$ ) y transcribe el gen, lo que produce la proteína represora <i>lac</i> , que se une al sitio operador <i>lac</i> , $O_{lac}$ , y evita la transcripción del operón <i>lac</i> . En presencia de un inductor (por ejemplo, alolactosa o IPTG), el inductor se une al represor y cambia su conformación, con lo cual reduce su afinidad por el operador <i>lac</i> . El represor se disocia y permite que la polimerasa de RNA transcriba al operón <i>lac</i> .  |
| <b>CRP/CAP</b>                        | Cuando hay glucosa presente, la transcripción del operón <i>lac</i> es inhibida (represión por catabolito). La proteína activadora de catabolitos, CAP (también denominada proteína de respuesta al cAMP, CRP), es requerida para la transcripción de alto nivel del operón <i>lac</i> . Ésta se asocia con 3,5-cAMP para formar el complejo CRP-cAMP que se une al promotor <i>lac</i> e incrementa la unión de la polimerasa de RNA, que a su vez estimula la transcripción del operón <i>lac</i> . Cuando la glucosa está presente, el nivel intracelular de cAMP cae, la CRP sola no puede unirse al promotor <i>lac</i> y el operón <i>lac</i> apenas se transcribe. Cuando la glucosa está ausente, el nivel del cAMP intracelular asciende, se forma el complejo CRP-cAMP y se estimula la transcripción del operón <i>lac</i> , lo que permite que la lactosa se use como una fuente de carbono alternativa. |
| <b>Regulación positiva y negativa</b> | En la regulación negativa de la expresión génica procariota, la unión de represores evita la transcripción de los genes estructurales. En la regulación positiva de la expresión génica, un activador se une al DNA e incrementa la tasa de transcripción. El operón <i>lac</i> es sujeto de control negativo y positivo.  |
| <b>El operón <i>trp</i></b>           | El operón <i>trp</i> contiene cinco genes estructurales que codifican enzimas para la biosíntesis de triptófano, un promotor <i>trp</i> ( $P_{trp}$ ) y una secuencia del operador <i>trp</i> ( $O_{trp}$ ). El operón se transcribe sólo cuando el triptófano escasea.  |
| <b>El represor <i>trp</i></b>         | Cuando falta triptófano, se sintetiza la proteína represora <i>trp</i> (codificada por el operón <i>trp</i> ), pero no puede unirse al operador <i>trp</i> y de esta manera se transcribe el operón <i>trp</i> para producir la enzima sintética del triptófano. Cuando el triptófano está presente, se une al represor y lo activa, de manera que el represor se une al operador <i>trp</i> y detiene la transcripción del operón <i>trp</i> .  |

|                                    |   |   |
|------------------------------------|---|---|
| <b>Atenuación</b>                  | Una secuencia adelantada en el mRNA policistrónico transcrito a partir del operón <i>trp</i> puede formar varias estructuras secundarias posibles tallo-asa, una de las cuales puede actuar como un terminador de la transcripción. Un tallo-asa diferente puede actuar como un antiterminador. En presencia de triptófano, los ribosomas se unen al mRNA policistrónico <i>trp</i> que está siendo transcrito, para lo cual se instalan en la proximidad de la polimerasa de RNA y comienzan a traducir la secuencia adelantada. La posición de los ribosomas unidos evita la formación del tallo-asa antiterminadora, pero permite que se forme el asa terminadora, la que de esta forma inhibe de manera adicional la transcripción del operón <i>trp</i> . Si el triptófano es escaso, el ribosoma se detiene cuando intenta traducir los dos codones <i>trp</i> de la secuencia adelantada, la cual lleva a que la secuencia adelantada disponible forme el tallo-asa antiterminadora y la transcripción del operón <i>trp</i> continúe. |   |
| <b>Atenuación contra represión</b> | El operón <i>trp</i> es regulado por represión (la cual determina si habrá transcripción o no) y por atenuación (la cual adecua la transcripción). La represión y la atenuación o sólo la atenuación regulan otros operones de las vías biosintéticas de aminoácidos.   |   |
| <b>Temas relacionados</b>          | (F1) Introducción al DNA<br>(G1) Introducción al RNA<br>(G2) Transcripción en procariotas<br>(G4) Transcripción en eucariotas: descripción<br>(G5) Transcripción de genes codificantes de proteínas en eucariotas<br>(G6) Regulación de la transcripción de la polimerasa II de RNA   | (G7) Procesamiento del pre-mRNA eucariota<br>(G8) Transcripción y procesamiento del RNA ribosómico<br>(G9) Transcripción y procesamiento del RNA de transferencia |

## Descripción general

Muchos genes codificadores de proteínas de las bacterias están agrupados juntos en **operones**, los cuales sirven como unidades de transcripción que están reguladas de manera coordinada. Fueron Jacob y Monod, en el año 1961, quienes propusieron el modelo de operón para la regulación de la transcripción. El modelo de operón propone tres elementos:

- Un conjunto de **genes estructurales** (es decir, genes codificadores de las proteínas a regular)
- Un **sitio operador**, el cual es una secuencia de DNA que regula la transcripción de los genes estructurales
- Un **gen regulador**, el cual codifica una proteína que reconoce la secuencia operadora

## El operón *lac*

Uno de los operones más estudiados es el **operón *lac*** de *E. coli*. Éste codifica enzimas clave que intervienen en el metabolismo de la lactosa: **permeasa de galactósido** (también conocida como **permeasa de lactosa**, transporta galactosa hacia el interior de las células a través de la membrana celular) y la **galactosidasa  $\beta$**  (la cual hidroliza la lactosa a glucosa y galactosa). También codifica una tercera enzima, la **transacetilasa de tiogalactósido**. De manera habitual, las células *E. coli* producen muy pocas de cualquiera de estas tres proteínas, pero cuando la

lactosa está disponible provoca un incremento grande y coordinado de la cantidad de cada una de las enzimas a sintetizarse. Por consiguiente, cada enzima es **inducible** y el proceso se denomina **inducción**. El mecanismo consiste en que las pocas moléculas de galactosidasa  $\beta$  de las células antes de la inducción convierten la lactosa en alolactosa, la cual a su vez activa la transcripción de estos tres genes en el operón *lac*. En consecuencia, la alolactosa es un **inductor**. Otro inductor del operón *lac* es el **isopropiltiogalactósido (IPTG)**. A diferencia de la alolactosa, *E. coli* no metaboliza este inductor, que de esta manera es útil en estudios experimentales de inducción.

En el operón *lac* (figura G3-1), los **genes estructurales** son los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA*, que codifican la galactosidasa  $\beta$ , la permeasa y la transacetilasa, respectivamente. Son transcritos para que produzcan un **mRNA policistrónico**, que a su vez es traducido para producir las tres enzimas (figura G3-1). La existencia de un mRNA policistrónico asegura que las cantidades de los productos de los tres genes se regulan de manera coordinada. La transcripción se produce a partir de un promotor ( $P_{lac}$ ) situado cadena arriba de estos genes estructurales (figura G3-1) que une a la polimerasa de RNA (sección G2). Sin embargo, entre los genes promotor y estructurales, también están presentes un sitio operador ( $O_{lac}$ ) y el gen *lacI*, que codifica la proteína **represora *lac***.

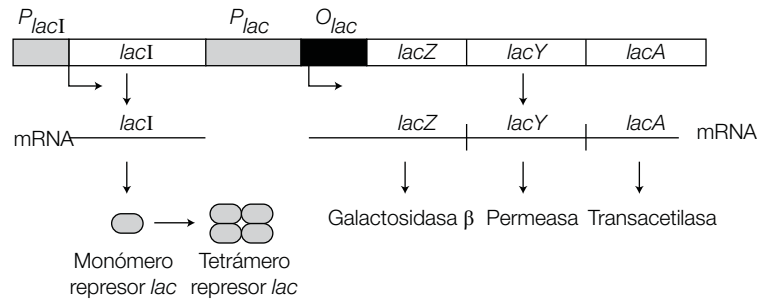


Figura G3-1. Estructura del operón *lac*.

### El represor *lac*

El gen *lacI* tiene su propio promotor ( $P_{lacI}$ ), que une a la polimerasa de RNA y la conduce a la transcripción del mRNA represor *lac* y así a la producción de monómeros de la proteína represora *lac*. Cuatro monómeros represores idénticos se reúnen para formar un tetrámero activo,

el cual puede unirse estrechamente al sitio operador *lac*,  $O_{lac}$ . La secuencia  $O_{lac}$  es **palindrómica**, lo que significa que tiene la misma secuencia de DNA cuando una cadena se lee en dirección 5' a 3' y la cadena complementaria también se lee en dirección 5' a 3'. Esta simetría del sitio operador es compartida por la simetría del tetrámero represor.

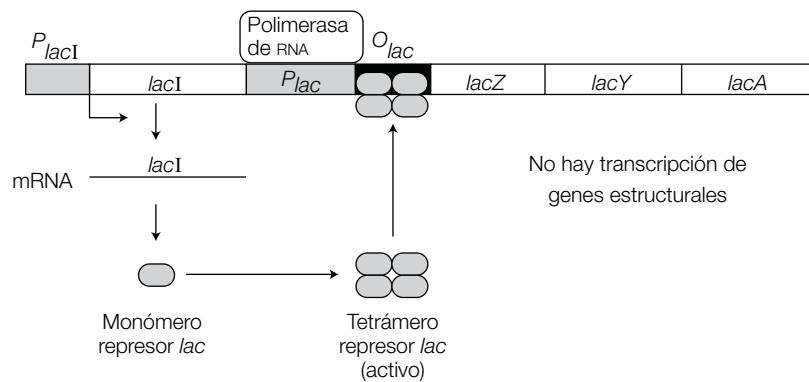


Figura G3-2. Represión de la transcripción por parte del represor *lac* en ausencia del inductor.

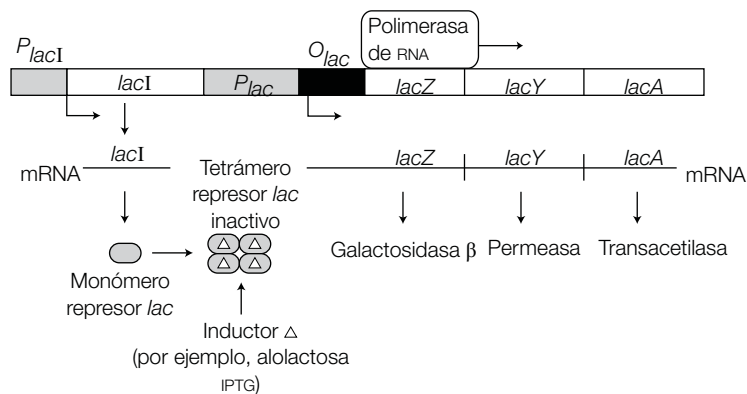


Figura G3-3. El inductor inactiva al represor *lac* y de esta manera permite la transcripción de los genes estructurales.

En ausencia de un inductor como la alolactosa o el IPTG, el gen *lacI* es transcrito y la proteína represora resultante se une al sitio operador del operón *lac*,  $O_{lac}$ , lo que evita la transcripción de los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA* (figura G3-2). Durante la inducción, el inductor se une al represor. Esto causa un cambio en la conformación del represor que reduce en gran medida su afinidad por el sitio operador *lac*. El represor *lac* se disocia a continuación del sitio operador y permite que la polimerasa de RNA (que ya estaba en el sitio promotor adyacente) comience la transcripción de los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA* (figura G3-3). Esto produce muchas copias del mRNA policistrónico y, después de la traducción, grandes cantidades de las tres enzimas.

Si el inductor se remueve, el represor *lac* se une con prontitud al sitio operador *lac* y la transcripción se inhibe casi de inmediato. El transcrito de RNA, *lacZYA*, es muy inestable y por eso se degrada con rapidez, de manera que la síntesis adicional de galactosidasa  $\beta$ , permeasa y transacetilasa cesa.

### CRP/CAP

Cuando *E. coli* crece con glucosa, no tiene necesidad de las enzimas que se requieren para metabolizar otros azúcares como la lactosa. En efecto, sintetizar tales enzimas bajo estas condiciones constituiría un dispendio energético. De esta manera, cuando la glucosa está presente, la transcripción del operón *lac* está inhibida, un fenómeno que se denomina **represión por catabolito**.

¿De qué forma los catabolitos reprimen el trabajo? La transcripción de niveles altos del operón *lac* requiere la presencia de una proteína activadora específica llamada **proteína activadora de catabolito** (CAP), también conocida como **proteína de respuesta al cAMP** (CRP). Esta proteína, que es un dímero, no puede unirse al DNA a menos que forme un complejo con el 3',5'-cAMP (cAMP). El complejo CRP-cAMP se une al promotor *lac* justo corriente arriba del sitio de unión de la polimerasa de RNA. Esto incrementa la unión de la polimerasa de RNA y de esta manera estimula la transcripción del operón *lac*.

La glucosa inhibe a la **ciclase de adenilato**, la enzima que sintetiza cAMP a partir del ATP. En consecuencia, en presencia de glucosa, el nivel intracelular de cAMP descende, de manera que la CRP no puede unirse al promotor *lac*, y el operón *lac* es sólo débilmente activo (incluso en presencia de lactosa). Cuando la glucosa está ausente, la ciclase de adenilato no es inhibida, el nivel de cAMP intracelular aumenta y se une a la CRP. Cuando la glucosa está ausente pero la lactosa está presente, el complejo CRP-cAMP estimula la transcripción del operón *lac* y permite que la lactosa se utilice como una fuente alternativa de carbono. En ausencia de lactosa, desde luego, el represor *lac* asegura que el operón *lac* permanezca inactivo. Estos controles combinados aseguran que los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA* se transcriban

con fuerza sólo si la glucosa está ausente y la lactosa está presente.

## Regulación positiva y negativa

El operón *lac* es un buen ejemplo de **control negativo (regulación negativa)** de la expresión génica en que la unión del represor evita la transcripción de los genes estructurales. El **control positivo (regulación positiva)** de la expresión génica se presenta cuando la proteína reguladora se une al DNA e incrementa la tasa de transcripción. En este caso, la proteína reguladora se denomina activador. El CAP/CRP que interviene en la regulación del operón *lac* representa un buen ejemplo de un activador. En consecuencia, el operón *lac* es sujeto tanto de control negativo como positivo.

### El operón *trp*

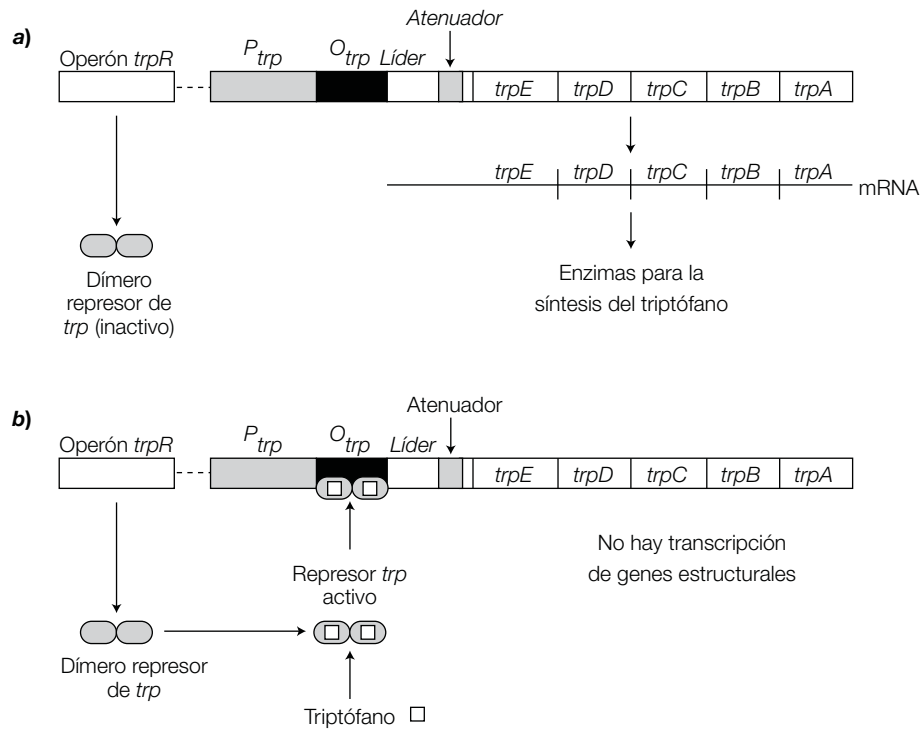
El operón del triptófano (*trp*) (figura G3-4) contiene cinco genes estructurales que codifican enzimas para la biosíntesis del triptófano con un promotor *trp* corriente arriba ( $P_{trp}$ ) y una secuencia operadora *trp* ( $O_{trp}$ ). La región operadora *trp* se superpone parcialmente con el promotor *trp*. La regulación del operón está diseñada para que la transcripción se produzca cuando la existencia de triptófano en la célula sea baja.

### El represor *trp*

En ausencia de triptófano (figura G3-4a), se sintetiza una proteína represora *trp* en un operón diferenciado, *trpR*, que codifica y forma un dímero. Sin embargo, es inactivo y de esta manera es incapaz de unirse al operador *trp* y los genes estructurales del operón *trp* continúan siendo transcritos. Cuando el triptófano está presente (figura G3-4b), las enzimas para la biosíntesis del triptófano no son necesarias y de esta manera la expresión de estos genes se detiene. Esto se logra mediante la unión del triptófano al represor para activarlo, de manera que éste se una al operador para que detenga la transcripción de los genes estructurales. En esta forma, se dice que el triptófano es un **correpresor**. Éste es un control negativo debido a que la unión al represor evita la transcripción, pero nótese que el operón *lac* y el operón *trp* muestran dos formas a través de las cuales puede lograrse el control negativo; esto es (como en el operón *lac*) al tener un represor unido activo que es inactivado por un ligando unido (el inductor) o (como en el operón *trp*) al tener un represor que suele ser inactivo pero que se activa por la unión del ligando. Como en el caso del operador *lac*, el sitio de unión central para el represor *trp* en el operador *trp* es palindrómico.

### Atenuación

Un segundo mecanismo, llamado **atenuación**, también se usa para controlar la expresión del operón *trp*. El extremo final 5' del mRNA policistrónico transcrito por



**Figura G3-4.** Regulación del operón *trp*: a) transcripción en ausencia de triptófano; b) no hay transcripción en presencia de triptófano.

el operón *trp* tiene una **secuencia adelantada** corriente arriba de la región codificadora del gen estructural *trpE* (figura G3-4). Esta secuencia adelantada codifica un **péptido adelantado** de 14 aminoácidos que contiene dos residuos triptófano. La función de la secuencia líder es ajustar la expresión del operón *trp* basada en la disponibilidad de triptófano dentro de las células. Esto sucede como se menciona a continuación.

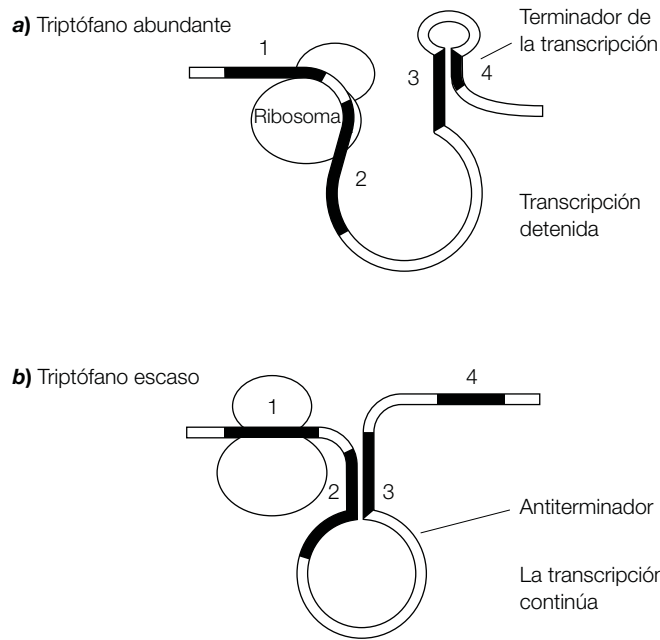
La secuencia adelantada contiene cuatro regiones (figura G3-5, nombradas 1-4) que pueden formar una variedad de estructuras secundarias **tallo-asa** (“**horquilla**”) de bases apareadas. Considérense las dos situaciones extremas: la presencia o ausencia de triptófano. La atenuación depende del hecho de que, en las bacterias, los ribosomas se fijan al mRNA a medida que se sintetiza y de esa manera la traducción comienza incluso antes de que la transcripción del mRNA se complete. Cuando el triptófano es abundante (figura G3-5a), los ribosomas se unen al mRNA policistrónico *trp* que se está transcribiendo y comienzan a producir la secuencia adelantada. Acto seguido, los dos codones *trp* para el péptido adelantado yacen dentro de la secuencia 1 y el codón de detención de la traducción (sección H1) se sitúa entre las secuencias 1 y 2.

Durante la traducción, los ribosomas permanecen muy cerca de la polimerasa de RNA y sintetizan el péptido adelantado, con la detención de la traducción final entre las secuencias 1 y 2. En este punto, la posición

del ribosoma evita que la secuencia 2 interactúe con la secuencia 3. En su lugar, los pares de bases de la secuencia 3 con la secuencia 4 forman un tallo-asa 3:4, que actúa como un **terminador de la transcripción**. Por lo tanto, cuando el triptófano está presente, se evita la transcripción adicional del operón *trp*.

Si, en cambio, hay poca cantidad de triptófano (figura G3-5b), el ribosoma se detiene en los dos codones *trp* contenidos dentro de la secuencia 1, lo que deja a la secuencia 2 sin unirse al ribosoma y por lo tanto libre para que el par de bases forme con la secuencia 3 una estructura 2:3 (también denominada **antiterminador**). Debido a que se forma el tallo-asa 2:3, la secuencia 3 no está disponible para la formación del tallo-asa 3:4 y la transcripción continúa hasta el final del operón *trp*. Así, la disponibilidad del triptófano controla si la transcripción del operón se detendrá temprano (atenuación) o continuará sintetizando un mRNA policistrónico completo.

Desde el punto de vista histórico, la atenuación fue descubierta cuando se advirtió que la delección de una secuencia corta de DNA entre el operador y el primer gen estructural, *trpE*, incrementaba el nivel de transcripción. Esta región se denominó el **atenuador** (figura G3-4) y corresponde al DNA que codifica la parte de la secuencia adelantada que forma el tallo-asa terminador de la transcripción.



**Figura G3-5.** Atenuación del operón *trp*: a) cuando la cantidad de triptófano es satisfactoria, los pares de bases de las secuencias 3 y 4 forman una estructura 3:4 que detiene la transcripción; b) cuando la cantidad de triptófano es insuficiente, el ribosoma se sitúa en la secuencia 1 de los codones *trp*, lo que deja a la secuencia 2 disponible para interactuar con la secuencia 3. Por lo tanto, no puede formarse una estructura terminadora de la transcripción 3:4 y la transcripción continúa.

### Atenuación contra represión

En general, para el operón *trp*, la represión a través del represor *trp* determina si la transcripción sucederá o no y si la atenuación ajustará la transcripción. La atenuación se produce en cuando menos seis operones diferentes

que codifican enzimas para las vías biosintéticas de aminoácidos. En algunos casos, como el del operón *trp*, la represión y la atenuación regulan la expresión. En contraste, en algunos otros operones, como el *his*, *thr* y *leu*, sólo la atenuación regula la transcripción.



# G4 Transcripción en eucariotas: descripción

## Notas clave

|   |   |                          |   |                          |  |                                       |   |               |  |   |   |   |  |
|---|---|--------------------------|---|--------------------------|--|---------------------------------------|---|---------------|--|---|---|---|--|
| <b>Tres polimerasas de RNA</b>  | En eucariotas, tres polimerasas de RNA se encargan de sintetizar este ácido: la polimerasa I de RNA es una enzima nucleolar que transcribe rRNA; la polimerasa II de RNA se localiza en el nucleoplasma y transcribe mRNA, la mayoría del snRNA, snoRNA y miRNA; la polimerasa III de RNA es también nucleoplásmica y transcribe tRNA, 5S rRNA, U6 snRNA, y el 7S RNA de la partícula de reconocimiento de señal (SRP).   |                          |   |                          |  |                                       |   |               |  |   |   |   |  |
| <b>Síntesis de RNA</b>  | Cada polimerasa de RNA transcribe sólo una cadena, la cadena antisentido (–), de una plantilla de DNA de cadena doble, dirigida por un promotor. La síntesis ocurre en la dirección 5' → 3' y no requiere un cebador.   |                          |   |                          |  |                                       |   |               |  |   |   |   |  |
| <b>Subunidades de la polimerasa de RNA</b>                                | Cada una de las tres polimerasas de RNA contiene 12 o más subunidades, algunas de las cuales son similares a las de la polimerasa de RNA de <i>E. coli</i> . Sin embargo, cuatro de las siete subunidades de cada enzima son exclusivas de una enzima.  |                          |   |                          |  |                                       |   |               |  |   |   |   |  |
| <b>Organelos</b>  | Los cloroplastos y las mitocondrias contienen cada uno un tipo de polimerasa de RNA. La enzima del cloroplasto es similar a la polimerasa de RNA bacteriana, mientras que la enzima mitocondrial tiene similitudes con algunas polimerasas de RNA del bacteriófago.   |                          |   |                          |  |                                       |   |               |  |   |   |   |  |
| <b>Temas relacionados</b>   | <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td>(F1) Introducción al DNA</td> <td>(G7) Procesamiento del pre-mRNA eucariota</td> </tr> <tr> <td>(G1) Introducción al RNA</td> <td></td> </tr> <tr> <td>(G2) Transcripción en los procariotas</td> <td>(G8) Transcripción y procesamiento del RNA ribosómico</td> </tr> <tr> <td>(G3) Operones</td> <td></td> </tr> <tr> <td>(G5) Transcripción de los genes que codifican proteínas en los eucariotas</td> <td>(G9) Transcripción y procesamiento del RNA de transferencia</td> </tr> <tr> <td>(G6) Regulación de la transcripción por la polimerasa II de RNA</td> <td></td> </tr> </table> | (F1) Introducción al DNA | (G7) Procesamiento del pre-mRNA eucariota | (G1) Introducción al RNA |  | (G2) Transcripción en los procariotas | (G8) Transcripción y procesamiento del RNA ribosómico | (G3) Operones |  | (G5) Transcripción de los genes que codifican proteínas en los eucariotas | (G9) Transcripción y procesamiento del RNA de transferencia | (G6) Regulación de la transcripción por la polimerasa II de RNA |  |
| (F1) Introducción al DNA  | (G7) Procesamiento del pre-mRNA eucariota   |                          |   |                          |  |                                       |   |               |  |   |   |   |  |
| (G1) Introducción al RNA  |   |                          |   |                          |  |                                       |   |               |  |   |   |   |  |
| (G2) Transcripción en los procariotas                                     | (G8) Transcripción y procesamiento del RNA ribosómico   |                          |   |                          |  |                                       |   |               |  |   |   |   |  |
| (G3) Operones   |   |                          |   |                          |  |                                       |   |               |  |   |   |   |  |
| (G5) Transcripción de los genes que codifican proteínas en los eucariotas | (G9) Transcripción y procesamiento del RNA de transferencia   |                          |   |                          |  |                                       |   |               |  |   |   |   |  |
| (G6) Regulación de la transcripción por la polimerasa II de RNA           |   |                          |   |                          |  |                                       |   |               |  |   |   |   |  |

## Tres polimerasas de RNA

A diferencia de los procariotas, en los que todo el RNA es sintetizado por una sola polimerasa de RNA, el núcleo de la célula eucariota tiene tres polimerasas de RNA responsables de la transcripción de los diferentes tipos de RNA.

- La **polimerasa I de RNA (RNA Pol I)** se localiza en el nucleolo y transcribe los genes **rRNA 28S, 18S y 5.8S**.
- La **polimerasa II de RNA (RNA Pol II)** se localiza en el nucleoplasma y transcribe a los **genes que codifican proteínas** para producir pre-mRNA y genes de los **RNA nucleares pequeños (snRNA)** que participan en el procesamiento del mRNA (sección G7) (excepto en el snRNA U6). También sintetiza el **RNA nucleolar pequeño (snoRNA)** que interviene en el procesamiento del rRNA (sección G8), y el **microRNA (miRNA)** (sección G7).

- La **polimerasa III de RNA (RNA Pol III)** se localiza asimismo en el nucleoplasma. Transcribe a los genes de **tRNA, rRNA 5S, y snRNA U6** y al **RNA 7S** asociado con la partícula de reconocimiento de señal (SRP), que interviene en la translocación de proteínas a través de la membrana del retículo endoplásmico (sección H4).

## Síntesis del RNA

El mecanismo básico de la síntesis del RNA por parte de las tres polimerasas de RNA eucariotas es el mismo que el de la enzima procariota (sección G2), que consiste en:

- La iniciación de la síntesis del RNA por la polimerasa de RNA es dirigida por la presencia de un sitio promotor en el lado 5' del sitio de inicio de la transcripción

- La polimerasa de RNA transcribe una cadena, la **cadena antisentido** (–), de la plantilla de DNA
- La síntesis del RNA no requiere un cebador
- La síntesis del RNA ocurre en la dirección 5' → 3', cuando la polimerasa de RNA cataliza un ataque nucleófilo por parte del 3'-OH de la cadena de RNA en crecimiento sobre el átomo de fósforo  $\alpha$  del nucleósido de 5'-trifosfato entrante

### Subunidades de la polimerasa de RNA

Cada una de las tres polimerasas de RNA eucariotas contienen 12 o más subunidades y por eso son grandes complejos enzimáticos. Los genes de codificación de algunas de las subunidades de cada una de las enzimas eucariotas muestran similitudes en la secuencia del DNA con los genes que codifican las subunidades de la enzima central ( $\alpha_2\beta\beta'\omega$ ) de la polimerasa de RNA de *E. coli* (sección G2). Sin embargo, cuatro de las siete subunidades

de cada polimerasa de RNA eucariota son exclusivas y no muestran ninguna similitud con las subunidades de la polimerasa de RNA bacteriana ni con las subunidades de las otras polimerasas de RNA eucariotas.

### Organelos

En general, se acepta que las mitocondrias y los cloroplastos fueron bacterias de manera original, por lo cual, durante la evolución inicial, formaron una interrelación simbiótica con una célula eucariota primitiva (la **teoría endosimbiótica**). En apoyo de ello, en estos organelos, muchas de las características de la organización y expresión génica son similares a lo que sucede en las bacterias. Por ejemplo, los cloroplastos contienen un solo tipo de polimerasa de RNA similar en estructura al de la polimerasa de RNA bacteriana. Las mitocondrias también contienen un solo tipo de polimerasa de RNA, la cual tiene similitudes con algunas polimerasas de RNA del bacteriófago.

# G5 Transcripción de los genes que codifican proteínas en los eucariotas

## Notas clave

|  |   |   |
|--|---|---|
| <b>Organización genérica</b>                 | La mayoría de los genes que codifican proteínas en los eucariotas consiste en secuencias de codificación llamadas exones interrumpidas por secuencias no codificantes llamadas intrones. El número de intrones y sus tamaños varían de gen en gen. El transcrito primario (pre-mRNA) se somete a reacciones de procesamiento que producen mRNA maduros, los cuales tienen de manera típica un casquete o caperuza 5' y una cola poli(A) 3', con una región de codificación central flanqueada por una región no traducida 5' (UTR) y una 3'.  |   |
| <b>Promotores de la polimerasa II de RNA</b> | La transcripción de los genes de codificación de proteínas eucariotas está controlada por una combinación de elementos de secuencia en el promotor central, cerca del sitio de inicio de la transcripción, y por elementos de control corriente arriba. Las dos principales secuencias de consenso en el promotor central son la caja TATA y la secuencia iniciadora (Inr). Los genes transcritos por la polimerasa II de RNA pueden tener ambos elementos, sólo uno o ninguno. Los genes que carecen de una caja TATA tienen con frecuencia un elemento promotor corriente abajo (DPE). Los genes que carecen de una caja TATA y de un elemento Inr tienden a ser transcritos a tasas bajas y no en un sitio de inicio transcripcional definido. |   |
| <b>Iniciación de la transcripción</b>        | La unión de la polimerasa de RNA al promotor requiere la formación de un complejo de iniciación de la transcripción que incluye numerosos factores de transcripción generales (basales), los cuales se ensamblan en un orden estricto. En los genes que tienen una caja TATA en su promotor central, el evento inicial clave es la unión del complejo de proteínas del factor de transcripción IID (TFIID) a la caja TATA.  |   |
| <b>Elongación y terminación</b>              | Después que el TFIIF fosforila el dominio C terminal (CTD) de la polimerasa II de RNA, esta enzima comienza a moverse a lo largo de la plantilla de DNA, al tiempo que sintetiza RNA. La elongación continúa hasta que la transcripción llega a su fin después que se sintetiza una secuencia con la señal poli(A).   |   |
| <b>Temas relacionados</b>                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>(F1) Introducción al DNA</li> <li>(G1) Introducción al RNA</li> <li>(G2) Transcripción en los procariotas</li> <li>(G3) Operones</li> <li>(G4) Transcripción en los eucariotas: descripción</li> <li>(G6) Regulación de la transcripción por la polimerasa II de RNA</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>(G7) Procesamiento del pre-mRNA eucariota</li> <li>(G8) Transcripción y procesamiento del RNA ribosómico</li> <li>(G9) Transcripción y procesamiento del RNA de transferencia</li> </ul> |

## Organización génica

En marcado contraste con los genes procariotas, donde las proteínas son codificadas por una secuencia continua de codones tripletes, la vasta mayoría de los genes que codifican proteínas en los eucariotas es **discontinua**.

Secciones no codificantes del DNA (llamadas **intrones**; figura G5-1) interrumpen las secciones codificantes del gen (denominadas **exones**). No obstante, los codones tripletes dentro de los exones y el orden de los exones en sí mismo en el gen son todavía **colineales** con la

secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado. El número de intrones en un gen que codifica proteínas varía y sus límites oscilan entre alrededor de 80 bp a más de 10000 bp.

El transcrito primario de un gen eucariota que codifica proteínas es una molécula **pre-mRNA** que debe procesarse para producir mRNA maduros listos para la traducción; el pre-mRNA recibe un **casquete o caperuza 5'** (en general pero no siempre) y una **cola poli(A)** de alrededor de 200 residuos de AA, en tanto que las secuencias intrónicas son removidas por el **corte y empalme del RNA**. Estas reacciones de procesamiento del RNA se describen en detalle en la sección G7, pero se debe destacar que las mismas están ligadas de manera muy cercana al proceso de transcripción. Por ejemplo, la adición de un casquete o caperuza sucede muy pronto después que el extremo 5' del pre-mRNA ha sido sintetizado y mientras la elongación de la transcripción continúa. Del mismo modo, la poliadenilación es una parte integral del proceso de terminación de la transcripción para la mayoría de los genes que codifican proteínas.

De manera típica, la molécula de mRNA maduro tiene un casquete o caperuza 5' y una cola poli(A) 3' con los diferentes exones (es decir, exones 1, 2 y 3 de la figura G5-1) unidos para formar una **región codificante central**. Durante la síntesis de las proteínas (sección H3), la región codificante es traducida para producir

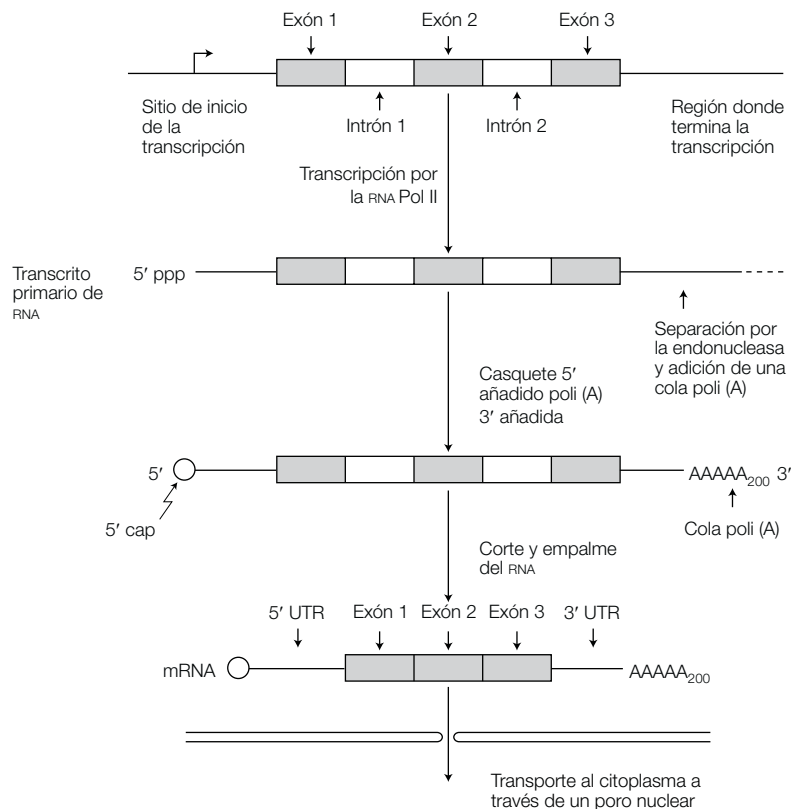
el correspondiente polipéptido del gen. Las regiones situadas entre el casquete o caperuza 5' y la región codificante y entre la región codificante y la cola poli(A) 3' no se traducen y de esta manera se denominan **región no traducida 5' (5' UTR)** y **región no traducida 3' (3' UTR)**, respectivamente (figura G5-1).

### Promotores de la polimerasa II de RNA

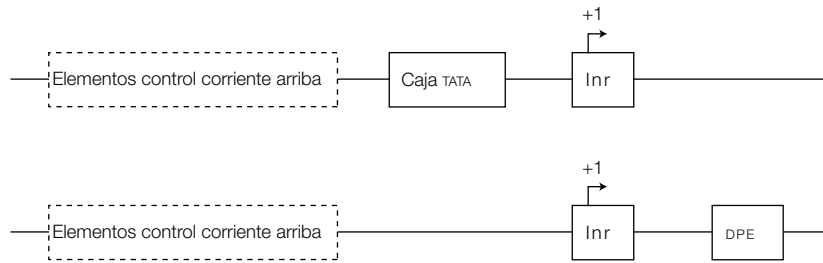
La transcripción de los genes eucariotas que codifican proteínas es controlada por una variedad de elementos de secuencia. Algunos de éstos son cercanos al sitio de inicio transcripcional y tienen secuencias conservadas; se llaman el **promotor central**. Sin embargo, si actúan solos, carecen de la eficiencia necesaria y por ello requieren interactuar con **elementos de control corriente arriba** para dirigir la iniciación eficiente de la transcripción. Por lo tanto, para estos genes, el promotor es una combinación de secuencias cercanas al sitio de inicio de la transcripción y de secuencias localizadas más corriente arriba.

En el promotor central se encuentran dos secuencias de consenso principales (figura G5-2).

- La mayor parte de los sitios promotores de la polimerasa II de RNA incluye una secuencia muy conservada que se localiza alrededor de 25-35 bp corriente arriba (es decir, en el lado 5') del sitio de iniciación (aunque



**Figura G5-1.** Estructura y expresión de un gen que codifica proteínas en un eucariota.



**Figura G5-2.** Ejemplo de promotores centrales de la polimerasa II de RNA. Cuando se presenta, la caja TATA se localiza alrededor de 25 a 35 bp corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (que se denota como +1), mientras que las secuencias Inr se dispersan en el sitio de inicio de la transcripción debido a que se localiza entre -3 y +5. El DPE se localiza corriente abajo del sitio de inicio, en la región +28 a +32.

también puede ocurrir tan lejos corriente arriba como en -100). Esta secuencia tiene el consenso 5'-TATA (A/T)AA(A/G)-3' y se llama **caja TATA** (figura G5-2). Como el sitio de iniciación se denota como la posición +1, se dice que la posición de la caja TATA se localiza en alrededor de -25 a -35. La secuencia de la caja TATA recuerda a la secuencia -10 (sección G2) de los procariotas (TATAAT), pero se localiza más lejos corriente arriba. Ambos elementos tienen en esencia la misma función, designada reconocimiento por la polimerasa de RNA, con el fin de posicionar la enzima en la localización correcta para iniciar la transcripción. La secuencia alrededor de la caja TATA también es importante porque influye en la eficiencia de la iniciación.

- Una **secuencia iniciadora (Inr)** se encuentra con frecuencia en el sitio de inicio de la transcripción en la región -3 a +5. Ésta tiene el consenso (en genes de mamíferos) de 5-YCANTYY-3, donde N es cualquiera de los cuatro nucleótidos estándar y Y representa a C o T.

Los genes transcritos por la polimerasa II de RNA suelen tener una caja TATA y una secuencia Inr, pero otros sólo tienen un elemento, no los dos.

Los genes que carecen de una caja TATA con frecuencia tienen una tercera secuencia denominada **elemento promotor corriente abajo (DPE)**, localizado corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción, en la región +28 a +32 (figura G5-2). El DPE no tiene una secuencia de consenso definida (es decir, su secuencia varía), pero se sabe que interviene en la iniciación de la transcripción al unirse a TFIIID, una de las proteínas clave que participa (véase más adelante).

Algunos genes transcritos por la polimerasa II de RNA carecen de una caja TATA y del elemento Inr; estos genes tienden a ser transcritos a tasas bajas e inician la transcripción en algún lugar dentro de una región amplia del

DNA (alrededor de 200 bp o más) en lugar de hacerlo en un sitio de inicio definido de la transcripción.

Como se menciona antes, la transcripción también es regulada por elementos de control corriente arriba; éstos se describen en la sección G6.

## Iniciación de la transcripción

Con el fin de iniciar la transcripción, la polimerasa II de RNA requiere la asistencia de varias otras proteínas o complejos proteínicos denominados **factores de transcripción general (o basal)**, los cuales deben ensamblarse dentro de un complejo en el promotor con el fin de que la polimerasa de RNA se una e inicie la transcripción (figura G5-3). Todas éstas tienen el nombre genérico de TFII (factor de transcripción de la polimerasa II de RNA).

En los genes que tienen una caja TATA, el primer evento en la iniciación es la unión del complejo proteínico del **factor de transcripción IID (TFIID)** a la caja TATA a través de una de sus subunidades llamada **TBP (proteína de unión de la caja TATA)**. Tan pronto como el complejo TFIID se une, TFIIA se une y estabiliza la interacción TFIID-caja TATA. A continuación, TFIIIB se une a TFIID. Sin embargo, TFIIIB también se puede unir a la polimerasa II de RNA y de esa manera actuar como una proteína de conexión. En consecuencia, la polimerasa II de RNA, la cual ya ha formado un complejo con TFIIF, está lista para unirse. A esto le sigue la unión de TFIIIE y TFIIH. Este complejo proteínico final contiene cuando menos 40 polipéptidos y se llama **complejo de iniciación de la transcripción**.

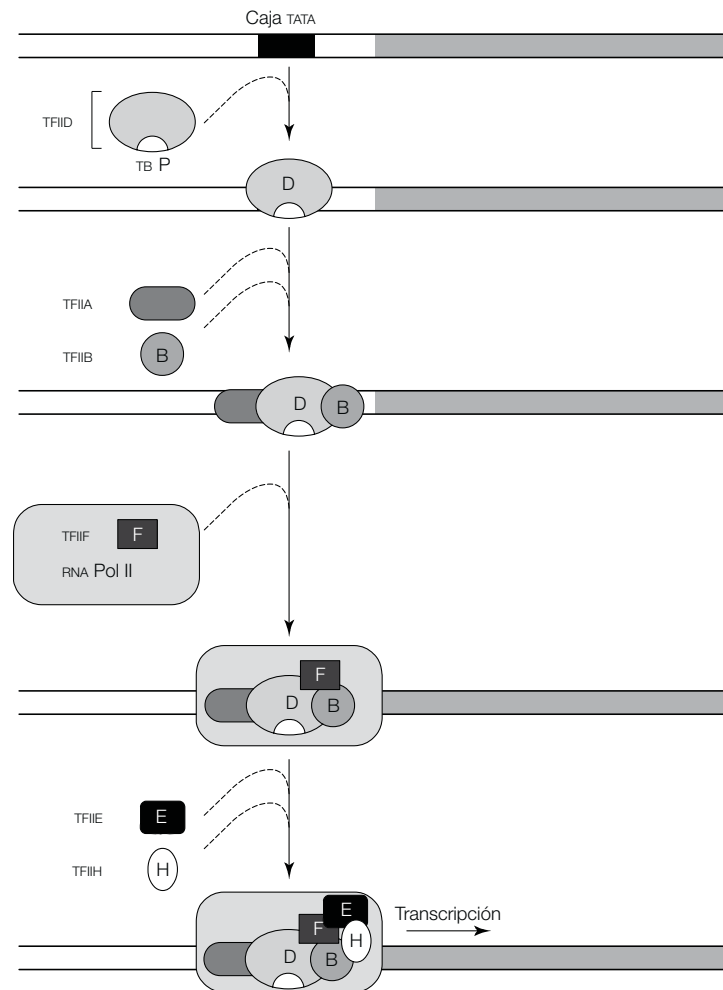
## Elongación y terminación

El TFIIH tiene dos funciones. Es una helicasa, lo que significa que puede utilizar ATP para desenrollar la hélice de DNA y convertir el complejo promotor cerrado en un complejo promotor abierto, lo que permite que la transcripción comience. Además, fosforila a la polimerasa II de RNA, lo que determina que la enzima cambie su conformación y

se disocie de otras proteínas del complejo de iniciación. A partir de entonces, la polimerasa II de RNA comienza a moverse a lo largo de la plantilla de DNA, mientras sintetiza RNA, esto es, que el proceso ingresa en la **fase de elongación**. La fosforilación clave sucede en una cola C terminal larga denominada **dominio C terminal (CTD)** de la molécula de la polimerasa II de RNA. Éste representa un hecho sustancial; el CTD de los mamíferos consta de 52 repeticiones de la secuencia Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser y dos de las tres serinas de cada repetición pueden ser fosforiladas. Como hecho de interés, sólo la polimerasa II de RNA que tiene un CTD no fosforilado puede iniciar la transcripción, pero sólo una polimerasa II de RNA con un CTD fosforilado puede elongar el RNA.

La elongación de la cadena de RNA continúa hasta que se produce la terminación. La mayor parte del mRNA

eucariota tiene una **cola poli(A)** en su extremo 3', es decir hasta de 250 residuos A. Este tramo de residuos A no es codificado por el DNA pero es adicionado al RNA por una enzima llamada **polimerasa de poli(A)** en un proceso denominado **poliadenilación**. La poliadenilación requiere la existencia de una **secuencia señal de poliadenilación** cercana al extremo 3' del pre-mRNA. Hasta recientemente, la poliadenilación fue considerada como un evento que se esperaba después que la transición hubiera terminado, es decir, un evento postranscripcional. Sin embargo, ahora no es tan claro que la transcripción se detenga tan pronto después que la secuencia señal poli(A) se haya sintetizado y que la poliadenilación es una parte clave del proceso de terminación de la transcripción. Todo esto se describe con más detalle en la sección G7.



**Figura G5-3.** Inicio de la transcripción por la polimerasa II de RNA. El TFIIID se une a la caja TATA seguido en el siguiente orden por la unión del TFIIA, TFIIB y el complejo preformado de TFIIF-polimerasa II de RNA. En el paso siguiente, TFIIE y TFIIH se unen en ese orden y entonces comienza la transcripción alrededor de 25 bp corriente abajo desde la caja TATA. Nótese que la colocación de varios factores en este diagrama es arbitraria; sus posiciones exactas en el complejo son desconocidas.

# G6 Regulación de la transcripción por la polimerasa II de RNA

## Notas clave

|  |  |
|--|--|
| <b>Mecanismo de regulación</b>                                 | Muchos genes son activos en todas las células, pero algunos se transcriben sólo en tipos celulares específicos, en momentos específicos y sólo en respuesta a estímulos externos específicos. La regulación de la transcripción ocurre a través de factores de transcripción que se unen a elementos de control cortos asociados con los genes objetivo y entonces interactúan unos con otros y con el complejo de iniciación de la transcripción para aumentar o disminuir la tasa de transcripción del gen objetivo.   |
| <b>Elementos reguladores</b>                                   | Muchos factores de transcripción se unen a los elementos de control localizados corriente arriba dentro de unos pocos cientos de pares de bases del gen codificador de proteínas. Algunos elementos reguladores (por ejemplo, la caja GC y la caja CAAT) se hallan corriente arriba de la mayoría de los genes que codifican proteínas, pero otros elementos se relacionan con sólo unos pocos genes y son responsables de la regulación transcripcional de genes específicos (por ejemplo, elemento de respuesta al AMP, elementos de respuesta a hormonas).  |
| <b>Potenciadores</b>   | Los potenciadores son elementos de control transcripcional positivos, de manera típica de 100 a 200 bp de largo que pueden localizarse corriente arriba o corriente abajo del gen objetivo, son activos en cualquier orientación y pueden activar la transcripción del gen objetivo incluso cuando se localizan a una gran distancia del mismo (en ocasiones, de 10 a 50 kb). Los factores de transcripción unidos a estos elementos distantes interactúan con el complejo de iniciación de la transcripción mediante la formación de asas de DNA.   |
| <b>Los factores de transcripción tienen múltiples dominios</b> | Los factores de transcripción que incrementan la tasa de transcripción suelen tener como mínimo dos dominios de estructura proteínica, un dominio de unión al DNA que reconoce el elemento de control del DNA para unirse a él, y un dominio de activación que interactúa con los otros factores de transcripción o con la polimerasa de RNA. Muchos factores de transcripción que operan como dímeros (homodímeros o heterodímeros) se mantienen juntos a través de dominios de dimerización. Algunos factores de transcripción interactúan con ligandos pequeños por medio de un dominio de unión de ligandos.   |
| <b>Dominios de unión de DNA</b>                                | Los dominios de unión de DNA contienen motivos de proteínas característicos. El motivo hélice-giro-hélice (HTH) contiene dos hélices $\alpha$ separadas por una vuelta $\beta$ corta. Cuando el factor de transcripción se une al DNA, la hélice de reconocimiento se halla en el surco mayor de la hélice doble de DNA. El motivo dedo de cinc consiste en un asa peptídica con dos cisteínas y dos histidinas (el dedo $C_2H_2$ ) o cuatro cisteínas (el dedo $C_4$ ) en la base del asa que coordina por medio de una configuración tetraédrica un ion de cinc. La estructura secundaria del dedo de cinc es de dos cadenas $\beta$ y una hélice $\alpha$ . Con frecuencia, los factores de transcripción contienen varios dedos de cinc; en cada caso, la hélice alfa se une al surco mayor de la hélice doble de DNA. Algunos factores de transcripción (por ejemplo, las proteínas bZIP y las proteínas básicas HLH) contienen dominios básicos que interactúan con el DNA objetivo. |

|                                 |  |   |
|---------------------------------|--|---|
| <b>Dominios de dimerización</b> | Una cremallera de leucina tiene una leucina cada siete aminoácidos y forma una hélice $\alpha$ con las leucinas que se presentan en el mismo lado de la hélice cada dos giros, lo que proporciona una superficie hidrófoba. Dos monómeros del factor de transcripción pueden interactuar a través de las caras hidrófobas de sus motivos cremallera de leucina para formar un dímero. El motivo hélice-asa-hélice (HLH) contiene dos hélices $\alpha$ separadas por un asa no helicoidal. La hélice $\alpha$ C terminal tiene una cara hidrófoba; dos monómeros del factor de transcripción, cada uno con un motivo HLH, pueden dimerizarse por interacción entre las caras hidrófobas de las dos hélices $\alpha$ C terminales. |   |
| <b>Dominios de activación</b>   | No se conocen motivos estructurales comunes de los dominios de activación de los factores de transcripción. Han sido reportados dominios de activación que son ricos en aminoácidos ácidos, glutaminas o prolinas.   |   |
| <b>Represores</b>               | Las proteínas represoras que inhiben la transcripción de genes específicos en eucariotas pueden unirse a elementos control cercanos al gen objetivo o a silenciadores que pueden localizarse a una gran distancia. El represor puede inhibir la transcripción del gen objetivo de manera directa o puede hacerlo mediante la interferencia con la función de una proteína activadora que se requiere para la transcripción eficiente del gen.  |   |
| <b>Temas relacionados</b>       | (F1) Introducción al DNA<br>(G1) Introducción al RNA<br>(G2) Transcripción en procariotas<br>(G3) Operones<br>(G4) Transcripción en eucariotas: descripción<br>(G5) Transcripción de genes que codifican proteínas en eucariotas   | (G7) Procesamiento del pre-mRNA eucariota<br>(G8) Transcripción y procesamiento del RNA ribosómico<br>(G9) Transcripción y procesamiento del RNA de transferencia |

## Mecanismo de regulación

Varios genes que codifican proteínas son activos en todas las células y se requieren para las llamadas funciones de “mantenimiento domésticas”, como las enzimas de la glucólisis (sección J3), las del ciclo del ácido cítrico (sección L1) y las proteínas de la cadena de transporte de electrones (sección L2). Pese a ello, algunos genes sólo son activos en determinados tipos celulares y son responsables de la definición de las características y funciones específicas de tales células; por ejemplo, los genes de las inmunoglobulinas en los linfocitos y de la miosina en las células musculares. Además, las proteínas expresadas por cualquier célula pueden cambiar en el transcurso del tiempo (p. ej., durante el desarrollo temprano) o en respuesta a estímulos externos como las hormonas. Las células eucariotas pueden regular la expresión de los genes que codifican proteínas en varios niveles, pero un sitio principal de regulación es en la transcripción.

La regulación transcripcional en una célula eucariota (es decir, qué genes se transcriben y a qué tasa) es mediada por **factores de transcripción** (diferentes de los factores de transcripción generales; sección G5), los cuales reconocen y se unen a secuencias reguladoras cortas de DNA (**elementos de control**) relacionadas con el gen. Estas secuencias también se denominan **elementos de**

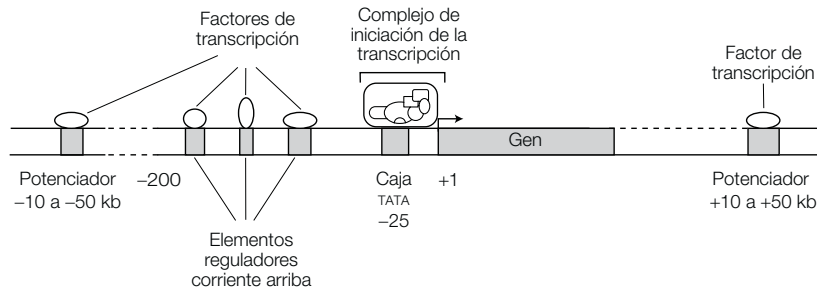
**acción *cis*** (o simplemente **elementos *cis***) ya que están en la misma molécula de DNA en la que el gen se controla (en latín, *cis* significa “en este lado”). Los factores de transcripción de proteínas que se unen a estos elementos también se conocen como **factores de acción *trans*** (o simplemente **factores *trans***) porque los genes que los codifican pueden estar en diferentes moléculas de DNA (es decir, en diferentes cromosomas). Los factores de transcripción que regulan la transcripción de genes específicos lo hacen mediante la interacción con las proteínas del complejo de iniciación de la transcripción y pueden incrementar (activar) o disminuir (reprimir) la tasa de transcripción del gen objetivo.

De manera típica, cada gen que codifica proteínas en una célula eucariota tiene varios elementos de control en su promotor (figura G6-1) y por lo tanto está bajo el control de numerosos factores de transcripción, los cuales interactúan con los otros y con el complejo de iniciación de la transcripción mediante la interacción entre proteínas para determinar la tasa de transcripción del gen.

## Elementos reguladores

Se regulan muchos factores de transcripción que se unen a las secuencias de control (**elementos reguladores**)





**Figura G6-1.** Regiones de control que regulan la transcripción de un gen eucariota típico que codifica proteínas. Aunque se muestran como entidades diferentes en este ejemplo para mayor claridad, *in vivo*, las diferentes proteínas reguladoras se unen a los elementos control y potenciadores distantes e interactúan con cada uno y con los factores de transcripción general del complejo de iniciación de la transcripción para modular la tasa de iniciación de la transcripción.

dentro de unos pocos cientos de pares de bases de genes que codifican proteínas. Los elementos de control positivo que se sitúan corriente arriba del gen, por lo regular dentro de 200 bp del sitio de inicio transcripcional (figura G6-1), incrementan la actividad de transcripción del gen bastante más que el promotor basal.

Algunos de estos elementos, por ejemplo la **caja GC** y la **caja TATA**, se encuentran en los promotores de muchos de los genes eucariotas que codifican proteínas; en efecto, los genes con frecuencia tienen numerosas copias de uno o ambos elementos. La caja CAAT tiene la secuencia de consenso 5'-GGCCAATCT-3' y une los factores de transcripción NF-1 y NF-Y, mientras que la caja GC tiene la secuencia de consenso 5'-GGGCGG-3' y une el factor de transcripción SP1, el cual luego interactúa con el factor de transcripción general TFIIID (sección G5).

En contraste, algunos elementos reguladores corriente arriba se asocian sólo con unos pocos genes específicos y son responsables de limitar la transcripción de tales genes para ciertos tejidos o en respuesta a ciertos estímulos. Por ejemplo:

- El elemento de respuesta (CRE) al AMP cíclico (cAMP) presenta la secuencia de consenso 5'-WCGTCA-3' (donde W es A o T) y participa en la modulación del cAMP de la transcripción génica al unirse al factor de transcripción CREB, el cual activa la transcripción.
- El elemento de la célula hipofisaria (secuencia de consenso 5'-ATATTCAT-3') se une al factor de transcripción Pit-1 y activa la transcripción de genes específicos en las células hipofisarias.
- Las hormonas esteroideas también controlan la transcripción génica. Ingresan en la célula objetivo y se unen a **receptores de hormonas esteroideas** específicos en el citoplasma. La unión de la hormona libera al receptor de una proteína inhibidora que, de manera habitual, mantiene al receptor en el

citoplasma. El complejo hormona-receptor, ahora libre del inhibidor, se dimeriza y transita hasta el núcleo, donde se une a un elemento de control transcripcional, denominado **elemento de respuesta a la hormona**, en los promotores de los genes objetivo. Luego, como otros factores de transcripción, el complejo hormona-receptor unido interactúa con el complejo de iniciación de la transcripción para aumentar la tasa de transcripción del gen. El resultado es la transcripción específica hormonal de un subgrupo de genes en las células objetivo que contienen el receptor de la hormona esteroidea apropiado. Aquí, el receptor hormonal es en sí mismo un factor de transcripción que se activa por la unión del ligando hormonal.

Los múltiples elementos reguladores asociados con los genes eucariotas significan que múltiples factores de transcripción se unen e interactúan entre sí y con el complejo de iniciación de la transcripción para activar o reprimir la transcripción. De esta manera, la actividad transcripcional de estos genes depende de la **combinación** de factores que se unen a ellos en un determinado momento.

## Potenciadores

Aunque muchos elementos de control positivo se ubican cerca del gen que regulan, otros pueden localizarse a largas distancias (a veces 10 a 50 kb), ya sea corriente arriba o corriente abajo del gen (figura G6-1). Una secuencia de control positivo de larga distancia de este tipo se llama un **potenciador** si el factor de transcripción que se le une incrementa la tasa de transcripción. De manera típica, un potenciador tiene 100 a 200 bp de largo y contiene varios elementos de secuencia que actúan juntos para producir la actividad potenciadora total. Los potenciadores tienen las siguientes características:

- Pueden activar la transcripción a largas distancias.
- Pueden localizarse corriente arriba o corriente abajo del gen que controlan.
- Son activos en cualquier orientación con respecto al gen.

En potenciadores localizados a largas distancias del gen que controlan, la interacción entre los factores de transcripción unidos al potenciador y a los elementos promotores cercanos al gen puede suscitarse mediante la formación de asas externas de DNA entre los dos grupos de elementos (figura G6-2).

### Los factores de transcripción tienen múltiples dominios

En la mayoría de los casos, en eucariotas, los factores de transcripción que se unen a secuencias potenciadoras o promotoras son proteínas activadoras que inducen la transcripción. Por lo regular, estas proteínas tienen cuando menos dos dominios diferentes de estructura proteínica, un **dominio de unión al DNA** que reconoce la secuencia de DNA específica a la que se une, y un **dominio de activación** responsable de lograr la activación transcripcional por interacciones con otros factores de transcripción, la molécula de polimerasa de RNA o ambos. Muchos factores de transcripción operan como dímeros, ya sea **homodímeros** (subunidades idénticas) o **heterodímeros** (subunidades disímiles), y las unidades se mantienen juntas mediante **dominios de dimerización**. Los dominios de unión del DNA y los dominios de dimerización contienen estructuras proteínicas características (**motivos**) que se describen después. Por fin, algunos factores de transcripción (p. ej., los receptores de hormonas esteroideas) responden a moléculas pequeñas específicas (**ligando**) que regulan la actividad del factor de transcripción. En tales casos, el ligando se une a un **dominio de unión del ligando**.

### Dominios de unión del DNA

Se conocen numerosos dominios de unión del DNA, pero no serán cubiertos aquí. Algunos de los más destacados son los que se indican a continuación.

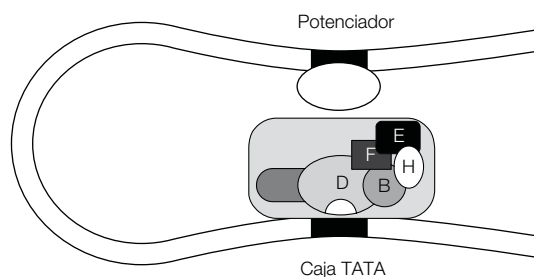
### Hélice-giro-hélice (motivo HTH)

El motivo HTH consiste en dos hélices  $\alpha$  separadas por una secuencia peptídica corta (cuatro aminoácidos) que forma un **giro  $\beta$**  (figura G6-3a). Cuando el factor de transcripción se une al DNA, una de las hélices, llamada la **hélice de reconocimiento**, se sitúa en el surco mayor de la hélice doble de DNA (figura G6-3b). De manera original, el motivo HTH en eucariotas se descubrió en ciertos factores de transcripción que desempeñan funciones principales en el desarrollo temprano de la *Drosophila*. Cada una de estas proteínas contiene una región de unión de DNA de 60 aminoácidos denominada un **homeodominio** (codificada por una secuencia de DNA llamada **homeocaja**). El homeodominio tiene cuatro hélices  $\alpha$ , en las hélices II y III son el clásico motivo HTH. Desde el descubrimiento original, el motivo HTH ha sido encontrado en un amplio espectro de factores de transcripción eucariotas, entre los que se incluyen muchos que no tienen un papel en el desarrollo. Lo anterior también se encuentra en muchas proteínas reguladoras procariontas, como el represor *lac* que controla el operón *lac* (sección G3).

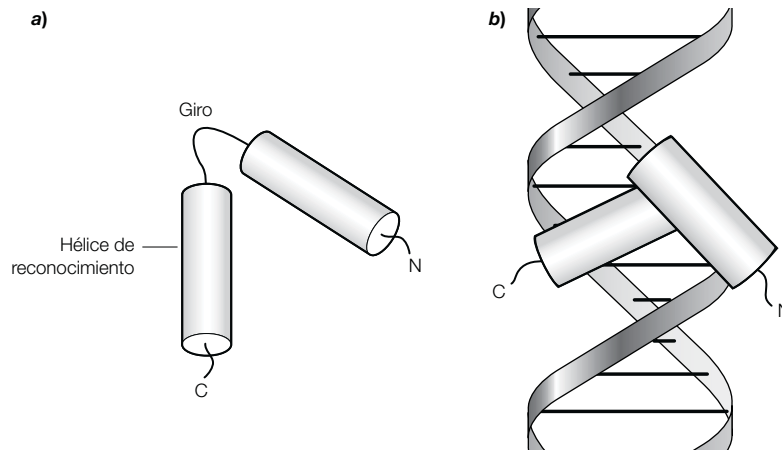
### Dedo de cinc

Cuando menos se han reportado seis tipos de dedos de cinc, dos de los cuales son el **dedo  $C_2H_2$**  y el **dedo  $C_4$** . El dedo de cinc  $C_2H_2$  es un asa de 12 o menos aminoácidos con dos cisteínas y dos histidinas en la base del asa que coordina tetraédricamente un ion de cinc (figura G6-4a). Éste forma una estructura compacta de dos cadenas  $\beta$  y una hélice  $\alpha$  (figura G6-4b). La hélice  $\alpha$  contiene varios aminoácidos básicos conservados e interactúa de manera directa con el DNA, con el que se une en el surco mayor de la doble hélice. Los factores de transcripción que contienen dedos de cinc con frecuencia contienen varios motivos de éstos, ordenados como la hélice  $\alpha$  de cada contacto con el DNA. En efecto, el factor de transcripción A de la polimerasa III de RNA (TFIIIA; sección G8) contiene ¡nueve dedos de cinc! El factor de transcripción SP1, el cual se une a la caja GC, tiene tres dedos de cinc.

El dedo de cinc  $C_4$  también se encuentra en varios factores de transcripción, como las proteínas receptoras de hormonas esteroideas. Este motivo forma una estructura



**Figura G6-2.** Formación de un asa externa de DNA que permite la interacción del factor potenciador de enlaces con el complejo de iniciación de la transcripción.



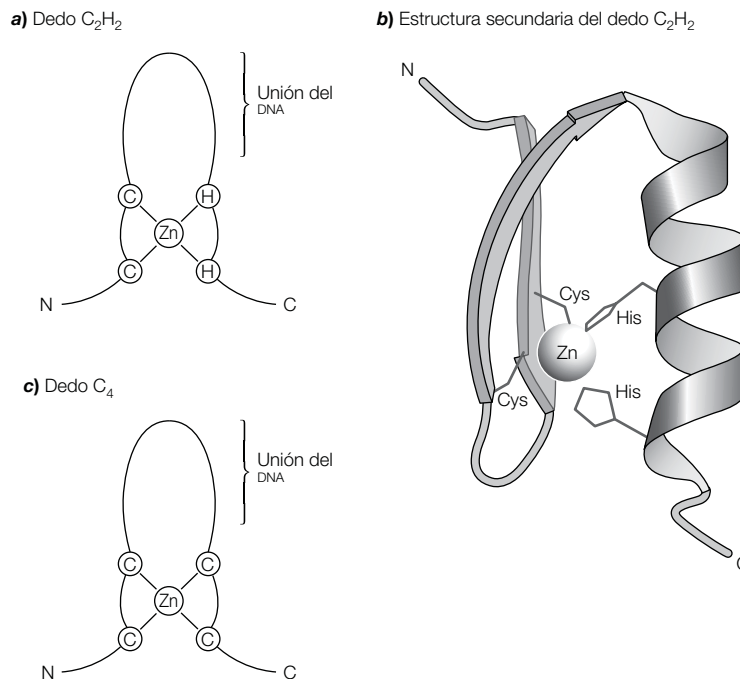
**Figura G6-3.** a) Un motivo hélice-giro-hélice (HTH) de una proteína de unión del DNA; b) unión del motivo HTH al DNA objetivo en la que se muestra que la hélice de reconocimiento se localiza en el surco mayor del DNA.

similar a la de un dedo de cinc  $C_2H_2$ , pero tiene cuatro cisteínas coordinadas con el ion de cinc en lugar de dos cisteínas y dos histidinas (figura G6-4c).

### Dominios básicos

Los dominios de unión de DNA llamados **dominios básicos** (una hélice  $\alpha$  rica en aminoácidos básicos) se presentan a veces en los factores de transcripción

en combinación con los dominios de dimerización cremallera de leucina o hélice-asa-hélice (HLH) (véase más adelante). La combinación de dominios básicos y dominios de dimerización da a estas proteínas sus nombres de **proteínas en cremallera de leucina básicas (bZIP)** o **proteínas HLH básicas**, respectivamente. En cada caso, la dimerización significa que dos dominios básicos (uno de cada monómero) interactúan con el DNA objetivo.



**Figura G6-4.** a) Un dedo de cinc  $C_2H_2$ ; b) estructura secundaria del dedo de cinc  $C_2H_2$ . Adaptado de Travers, A. (1993), *DNA-Protein Interactions*, Chapman & Hall; c) un dedo de cinc  $C_4$ .

## Dominios de dimerización

### Cremallera de leucina

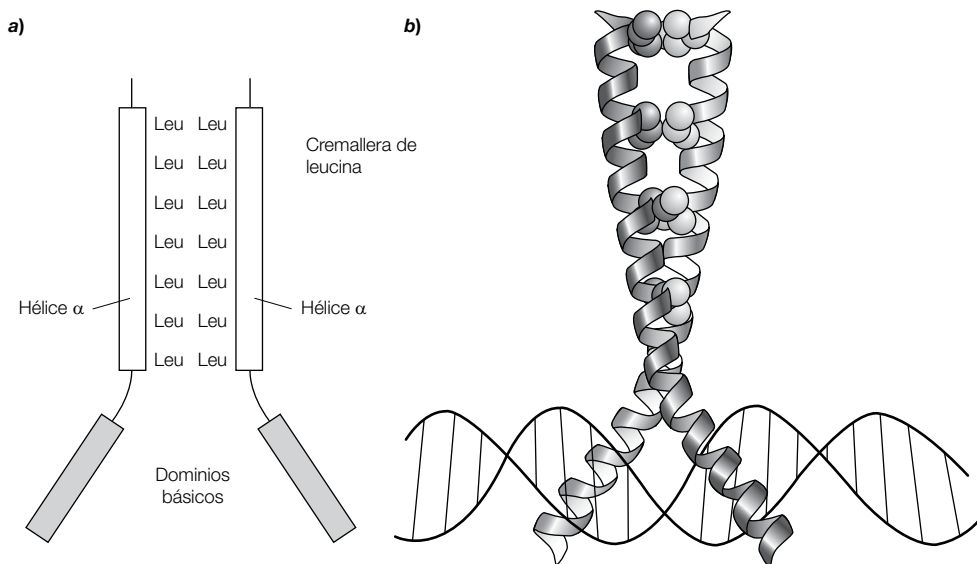
El motivo de la cremallera de leucina contiene una leucina cada siete aminoácidos en la secuencia primaria y forma una hélice  $\alpha$  con las leucinas que se presentan en el mismo lado de la hélice cada dos giros, lo que proporciona una superficie hidrófoba. El dímero del factor de transcripción se forma por los dos monómeros que interactúan a través de las caras hidrófobas de sus motivos cremallera de leucina (figura G6-5a). En el caso de las proteínas bZIP, cada monómero también tiene un dominio básico de unión del DNA localizado en el N terminal de la cremallera de leucina. Por lo tanto, el dímero de la proteína bZIP tiene dos dominios básicos. En realidad, tales dominios se hallan en direcciones opuestas, lo cual les permite unirse a las secuencias de DNA que tienen simetría invertida. Ellos se unen en el surco mayor del DNA objetivo (figura G6-5b). El dominio cremallera de leucina también actúa como el dominio de dimerización en factores de transcripción que utilizan dominios de unión al DNA diferentes al dominio básico. Por ejemplo, algunas proteínas con homeodominio, que contienen el motivo HTH para la unión del DNA, tienen dominios de dimerización en cremallera de leucina. En todos los casos, los dímeros que forman pueden ser homodímeros o heterodímeros.

### Hélice-asa-hélice (motivo HLH)

El dominio de dimerización HLH es muy diferente del motivo HTH descrito antes (el cual interviene en la unión al DNA sin dimerización) y no debe confundirse con él. El dominio HLH consiste en dos hélices  $\alpha$  separadas por un asa no helicoidal. El C terminal de la hélice  $\alpha$  tiene aminoácidos hidrófobos en una de sus caras. Por consiguiente, dos factores de transcripción monoméricos, cada uno con un motivo HLH, pueden dimerizarse por interacción entre las caras hidrófobas de los dos C terminales de las hélices alfa. Como la cremallera de leucina (véase antes), el motivo HLH se encuentra con frecuencia en factores de transcripción que contienen dominios básicos de unión al DNA. Otra vez, como la cremallera de leucina, el motivo HLH puede dimerizar monómeros de factores de transcripción y formar homodímeros o heterodímeros. Esta capacidad para formar heterodímeros aumenta en gran medida la variedad de factores de transcripción activos posibles y de esa manera eleva el potencial de la regulación génica.

### Dominios de activación

A diferencia de los dominios de unión de DNA y de los dominios de dimerización, se han identificado motivos estructurales excepcionales en los dominios de activación de diversos factores de transcripción. Algunos tipos de dominios de activación son los siguientes:



**Figura G6-5.** a) Un dímero de proteína bZIP donde se muestra el dominio de dimerización de la cremallera de leucina y los dos dominios básicos; b) estructura plegada de una proteína bZIP donde se muestra la unión de los dominios básicos en el surco mayor del DNA objetivo. Adaptado de Travers A. (1993) *DNA-Protein Interactions*, Chapman & Hall.

- Los **dominios de activación ácidos** son ricos en aminoácidos ácidos (ácidos aspártico y glutámico). Por ejemplo, las proteínas receptoras de glucocorticoides de mamíferos contienen este tipo de dominios de activación.
- **Dominios ricos en glutamina** (p. ej., como en el factor de transcripción SP1).
- **Dominios ricos en prolina** (p. ej., como en el factor de transcripción *c-jun*).

## Represores

Las proteínas represoras de genes que inhiben la transcripción de genes específicos en eucariotas también

existen. Pueden actuar al unirse a los elementos de control de la región promotora cercana al gen o en sitios localizados a larga distancia del gen, denominados **silenciadores**. La proteína represora puede inhibir la transcripción directamente. Un ejemplo es el **receptor de hormona tiroidea de mamíferos**, el cual, en ausencia de hormona tiroidea, reprime la transcripción de los genes objetivo. Sin embargo, otros represores inhiben la transcripción mediante el bloqueo de la activación. Ésta puede alcanzarse en una de diferentes formas: mediante el bloqueo de los sitios de unión al DNA de una proteína activadora, unión y enmascaramiento del dominio de activación del factor de activación, o al formar un complejo que no se une al DNA con la proteína activadora. Se conocen numerosos ejemplos de cada modo de acción.

# G7 Procesamiento del pre-mRNA eucariota

## Notas clave

### Descripción

Una serie de reacciones de procesamiento del transcrito del RNA primario de un gen que codifica proteínas en una célula eucariota lo modifican con el fin de volver funcional el mRNA. El extremo 5' se modifica con una estructura en casquete o caperuza 5'. La mayoría de los pre-mRNA se escinde cerca del extremo 3' y se le añade una cola poli(A). Las secuencias de intrones se remueven mediante el empalme del RNA. La transcripción por la polimerasa II de RNA y el procesamiento del pre-mRNA guardan un acoplamiento estrecho; los componentes decisivos que intervienen en los pasos del procesamiento se relacionan con el dominio C terminal (CTD) de la polimerasa II de RNA y se transfieren a la molécula de RNA en crecimiento para que lleve a cabo los pasos del proceso.

### Procesamiento 5': formación del casquete o caperuza

Inmediatamente después de la transcripción, el 5'fosfato es removido, la guaniltransferasa agrega un residuo G ligado a través de un enlace covalente 5' y 5', y es metilado para formar un casquete o caperuza 7-metilguanosina (m<sup>7</sup>G). Los residuos de ribosa del nucleótido adyacente o de los dos nucleótidos adyacentes también pueden metilarse. El casquete o caperuza protege el extremo 5' del mRNA contra la degradación de la ribonucleasa y también funciona en la iniciación de la síntesis de proteínas.

### Corte y empalme del RNA

Las secuencias de intrones son removidas por el corte y empalme del RNA que divide al RNA en los límites entre exones e intrones y une los extremos de las secuencias de exones. Los sitios de división están marcados por secuencias de consenso conservadas; en la mayor parte de los casos el intrón comienza con GU y termina con AG, un tramo de polipirimidina que yace corriente arriba del AG, y una secuencia de punto de ramificación conservada se localizada alrededor de 20 a 50 nt corriente arriba del sitio de corte y empalme 3'. La reacción de empalme incluye dos pasos de transesterificación, los cuales liberan el intrón como una estructura en lazo ramificada que contiene un enlace 2'5', con un residuo A conservado en la secuencia del punto de ramificación. Las reacciones de empalme del RNA requieren snRNP y proteínas accesorias que se ensamblen dentro de un espliceosoma. Los componentes de RNA de la snRNP son complementarios de las secuencias conservadas y por lo tanto pueden formar pares de bases con ellas. Los intrones AT-AC comienzan con AU y terminan con AC, en lugar de GU y AG, respectivamente, y sus empalmes requieren un conjunto diferente de snRNP que las usadas para el corte y empalme de la forma principal del intrón, excepto que ambos usan snRNP U5. Unos pocos organismos pueden empalmar exones juntos desde dos moléculas de RNA diferentes: *trans*-corte y empalme. Algunos intrones son autoempalmantes; las secuencias de RNA del intrón catalizan su propia escisión sin la participación de un espliceosoma.

|  |   |  |
|--|---|--|
| <p><b>Procesamiento 3':<br/>escisión y poliadenilación</b></p> | <p>La mayoría de los transcritos del pre-mRNA es dividida cerca del extremo 3' entre una secuencia de la señal de poliadenilación (5-AAUAAA-3') y una secuencia corriente abajo rica en GU (o rica en U). Proteínas específicas se unen a estas secuencias para formar un complejo. Una de las proteínas que se unen, la polimerasa de poli(A), agrega una cola poli(A) de alrededor de 200 a 250 residuos A al nuevo extremo 3' de la molécula de RNA y moléculas de las proteínas de unión poli(A) se unen a ella. La terminación de la transcripción por la polimerasa II de RNA está acoplada a la poliadenilación; la transcripción se detiene muy pronto después que la polimerasa II de RNA sintetiza la secuencia de la señal de poliadenilación. La función exacta de la cola de poli(A) no es clara pero puede servir para proteger el extremo 3' del mRNA final contra la degradación de la nucleasa y así incrementar la eficiencia de la traducción del mRNA. Algunos pre-mRNA (p. ej., el pre-mRNA de la histona) son escindidos cerca del extremo 3' pero no se les agrega una cola poli(A).</p> |  |
| <p><b>Procesamiento alternativo</b></p>                        | <p>Algunos pre-mRNA contienen más de un grupo de sitios para la escisión y poliadenilación del extremo 3'. El uso de sitios alternativos puede conducir a mRNA que contienen diferentes regiones 3' no codificadoras o que tienen diferentes capacidades de codificación. Algunas vías de corte y empalme alternativas afectan los exones que serán retenidos en el mRNA final, lo que permite que se sinteticen varias proteínas diferentes a partir de un mismo gen.</p>  |  |
| <p><b>Edición del RNA</b></p>                                  | <p>La edición del RNA puede cambiar la secuencia de una molécula de mRNA después de la síntesis y el procesamiento; los nucleótidos pueden ser sustituidos, agregados o eliminados. En el hígado humano, el pre-mRNA de la apolipoproteína B no sufre edición y la traducción produce la apolipoproteína B100. En el intestino delgado, la edición del RNA convierte un residuo C del pre-mRNA de la apolipoproteína B en U, por lo que cambia un codón de la glutamina (CAA) a un codón de terminación (UAA). La traducción del mRNA editado produce una proteína más corta, la apolipoproteína B48, que carece de un dominio proteínico para la unión del receptor. Se producen muchos otros ejemplos de edición, como el del mRNA mitocondrial del tripanosoma, donde más de la mitad de las uridinas del mRNA final se adquieren a través del proceso de edición.</p>   |  |
| <p><b>Silenciamiento del mRNA</b></p>                          | <p>Los microRNA (miRNA) pueden inhibir la traducción de mRNA específicos, un proceso denominado silenciamiento del mRNA. La polimerasa II de RNA transcribe la mayoría de los miRNA y la polimerasa III de RNA unos pocos más. El miRNA deriva del procesamiento de un precursor grande de RNA transcrito a partir de un gen de miRNA o mediante el procesamiento de un intrón que contiene una secuencia de miRNA dentro de un gen que codifica proteínas. El miRNA maduro forma un complejo miRNP con proteínas (denominado el miRISC) y se une a secuencias complementarias (por lo general, en la UTR 3') del mRNA objetivo, con lo cual inhibe la traducción.</p>  |  |
| <p><b>Temas relacionados</b></p>                               | <p>(F1) Introducción al DNA<br/>(G1) Introducción al RNA<br/>(G2) Transcripción en procariotas<br/>(G3) Operones<br/>(G4) Transcripción en eucariotas: descripción<br/>(G5) Transcripción de genes que codifican proteínas en eucariotas</p>  | <p>(G6) Regulación de la transcripción por la polimerasa II de RNA<br/>(G8) Transcripción y procesamiento del RNA ribosómico<br/>(G9) Transcripción y procesamiento del RNA de transferencia</p> |

## Descripción

En eucariotas, el producto de la transcripción de un gen codificante de proteínas es el **transcrito primario del RNA, el pre-mRNA** (sección G5), el cual requiere procesamiento para generar mRNA funcional. Como se describe antes (sección G5), la transcripción y el procesamiento del RNA en eucariotas son eventos estrechamente acoplados. Varias de las enzimas que intervienen en los pasos del procesamiento se relacionan con el dominio C terminal (CTD) de la polimerasa II de RNA y se transfieren a la molécula del RNA en crecimiento conforme se requieren para los pasos del procesamiento.

Suceden numerosas reacciones del procesamiento. Inmediatamente después que la polimerasa II de RNA lo sintetiza, el extremo 5' terminal del pre-mRNA es modificado por la adición de un **casquete o caperuza 5'** (un proceso conocido como **formación del casquete o caperuza**). El transcrito de RNA primario incluye regiones de codificación (exón) y no codificantes (intrón) (sección G5, figura G5-1). La última necesita removerse y las secuencias de exones unirse por corte y empalme del RNA (sección G5, figura G5-1) para generar una secuencia de codificación del RNA continua lista para la traducción. Las reacciones de corte y empalme del RNA son catabolizadas por un gran complejo de RNA con proteínas llamado **espliceosoma** (véase más adelante), que ensambla el transcrito primario del RNA a medida que se va sintetizando, de manera que el corte y empalme del RNA ocurre muy pronto después de la síntesis del RNA relevante. Los extremos 3' de la mayoría (pero no de todos) de los pre-mRNA son también modificados por división y adición de alrededor de 200 a 250 residuos A para formar una **cola poli(A)**. Esta reacción de **poliadenilación** se produce durante la terminación de la

transcripción. Las secciones siguientes describen cada reacción del procesamiento del RNA con mayor detalle.

## Procesamiento 5': formación del casquete o caperuza

La formación del casquete o caperuza del pre-mRNA ocurre muy pronto después de la síntesis del extremo 5' de la molécula y suele ocurrir antes de que este RNA sea mayor de 30 nt de longitud. Incluye la adición de **7-metilguanosina (m<sup>7</sup>G)** al extremo 5 (figura G7-1). Para lograrlo, en primer lugar, la fosfatasa remueve el 5' fosfato terminal. Luego, la **guaniltransferasa** cataliza una reacción donde el extremo 5' difosfato resultante ataca al átomo de fósforo  $\alpha$  de una molécula de GTP para agregarle un residuo G en un enlace inusual de 5'5' trifosfato (figura G7-1). Acto seguido, la **metiltransferasa de guanina** metila el residuo G, lo que logra al agregar un metilo en la posición N-7 del anillo de guanina, y para ello usa la **S-adenosilmetionina** como donadora del grupo metilo. Esta estructura, con el grupo m<sup>7</sup>G en posición, se denomina estructura en **casquete o caperuza 0**. La ribosa del nucleótido adyacente (nucleótido 2 en la cadena del RNA) o las ribosas de los nucleótidos 2 y 3 también pueden ser metiladas para dar estructuras en **casquete o caperuza 1 o 2**, respectivamente. En estos casos, los grupos metilo se añaden a los grupos 2-OH de las ribosas (figura G7-1).

El casquete o caperuza protege el extremo 5' del transcrito primario contra el ataque de las ribonucleasas, que tienen especificidad por los enlaces 3'5' fosfodiéster y por eso no pueden hidrolizar el enlace 5'5' en la estructura del casquete o caperuza. Además, el casquete o caperuza desempeña un papel en el paso inicial de la

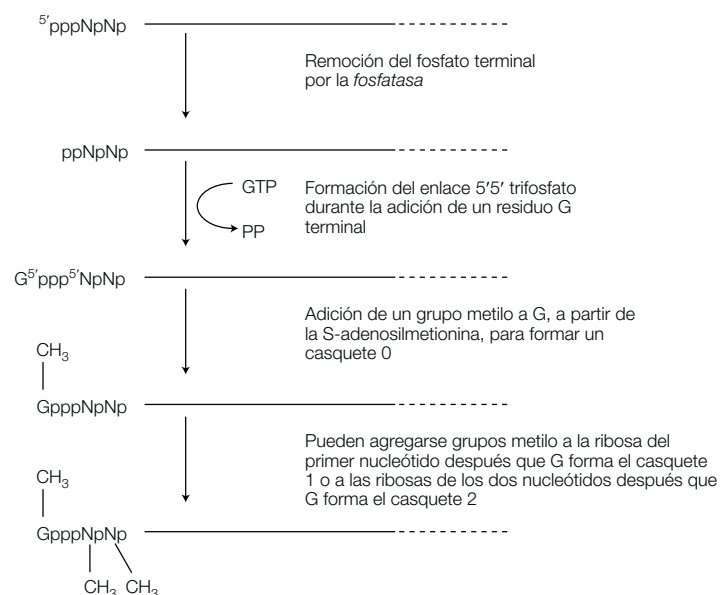
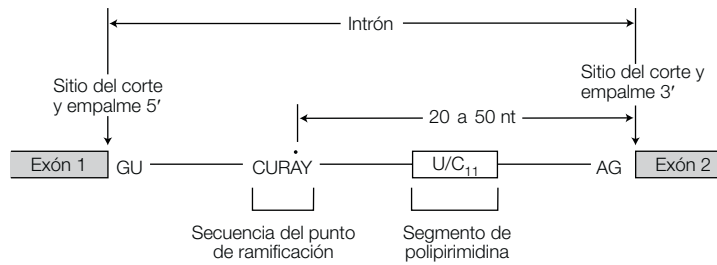


Figura G7-1. Pasos participantes en la formación del casquete 5'.





**Figura G7-2.** Secuencias conservadas por el corte y empalme del RNA. Los residuos marcados con  $\hat{A}$  en la secuencia del punto de ramificación son el sitio de formación de la ramificación 2'5'.

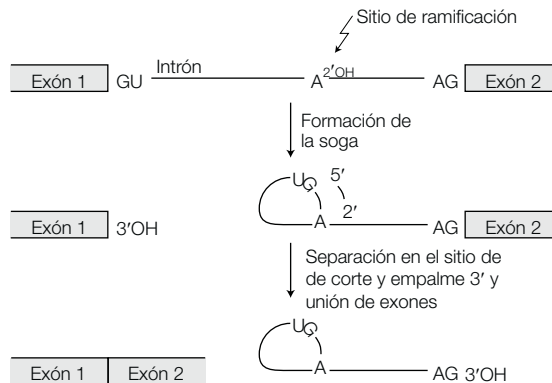
síntesis de proteínas en los eucariotas. Sólo los transcritos de RNA de genes eucariotas que codifican proteínas se someten al revestimiento con el casquete o caperuza; el mRNA procariota y el rRNA y tRNA eucariotas no son revestidos con un casquete o caperuza.

### Corte y empalme del RNA

Un paso clave en el procesamiento del RNA es la remoción precisa de las secuencias de intrones y la unión de los extremos de los exones vecinos para producir una molécula de mRNA funcional, un proceso denominado **corte y empalme del RNA**. Los límites entre exones e intrones están marcados por secuencias específicas (figura G7-2). En la mayoría de los casos, en el límite 5' entre exón e intrón (el **sitio de corte y empalme 5'**), el intrón comienza con la secuencia GU y en el límite entre exón e intrón 3' (el **sitio de corte y empalme 3'**) el intrón termina con la secuencia AG. Cada una de estas dos secuencias forma parte de una secuencia de consenso más grande. Por ejemplo, en los vertebrados, la secuencia de consenso del sitio de corte y empalme 5' es 5'-AGGUAAGU-3' (el invariable GU está subrayado). Un **segmento de polipirimidinas** (un tramo observado de alrededor de 11 pirimidinas) se encuentra corriente arriba del AG en el sitio de corte y empalme 3' (figura G7-2).

Una secuencia señal clave es la **secuencia del punto de ramificación**, la cual se localiza alrededor de 20 a 50 nt corriente arriba del sitio de corte y empalme 3'. En los vertebrados, esta secuencia es 5'-CURAY-3', donde la R representa una purina y la Y una pirimidina (en las levaduras esta secuencia es 5'-UACUAAC-3').

El corte y empalme del RNA ocurre en dos pasos (figura G7-3). En el primer paso, el 2'-OH del residuo A en el sitio de ramificación (indicado como A en la figura G7-2) ataca el enlace 3'5' fosfodiéster en el sitio de corte y empalme 5', lo que determina la rotura del extremo 5' del intrón y que forme un asa alrededor y un enlace inusual 2'5' con el residuo A en la secuencia del punto de ramificación. Debido a que este residuo A ya tiene enlaces 3'5' con sus vecinos en la cadena del RNA, el intrón se ramifica en este punto para formar lo que se conoce como **soga** intermedia (nombrada como tal ya que recuerda al lazo de un vaquero). El nuevo extremo 3'-OH del exón 1 ataca a continuación el enlace fosfodiéster en el sitio de corte y empalme 3', con lo cual provoca que los exones se unan y liberen el intrón, todavía como una reata. En cada una de las dos reacciones de corte y empalme, un enlace de fosfato-éster se intercambia por otro (es decir, éstas son **reacciones de transesterificación**). Como el número de enlaces fosfato-éster no cambia, no se consume energía (ATP).

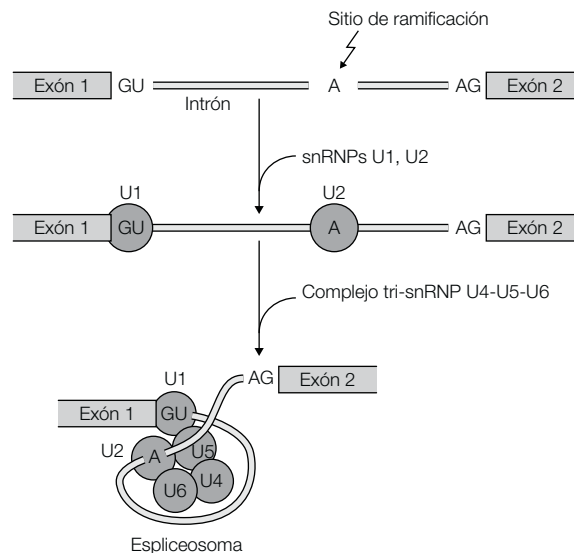


**Figura G7-3.** Los dos pasos del corte y empalme del RNA.

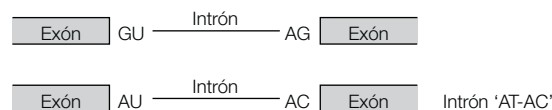
El corte y empalme del RNA requiere la participación de varios RNA nucleares pequeños (snRNA), cada uno de los cuales se relaciona con diversas proteínas para formar una pequeña partícula de ribonucleoproteína nuclear o **snRNP**. Debido a que los snRNA son ricos en residuos U, se denominan U1, U2, etc. Los componentes de RNA de las snRNP tienen regiones que son complementarias con las secuencias de los sitios de corte y empalme 5' y 3' y con otras secuencias conservadas en el intrón y por lo tanto pueden formar pares de bases con ellas. La snRNP U1 se une al sitio de corte y empalme 5' y la snRNP U2 se une a la secuencia del punto de ramificación (figura G7-4). Un **complejo de tres snRP** de U4, U5 y U6 se une, como lo hacen otras proteínas accesorias, de manera que se forma un complejo de múltiples componentes (denominado **espliceosoma**) en el intrón a removerse y que determina que el intrón se convierta en un asa sobresaliente (figura G7-4). Por lo tanto, a través de interacciones entre los snRNA y el pre-mRNA, el espliceosoma toma los exones corriente arriba y corriente abajo y los deja listos para el corte y empalme. A continuación, el espliceosoma cataliza la reacción de corte y empalme de dos pasos para remover el intrón y ligar los dos exones vecinos. Acto seguido, el espliceosoma se disocia y las snRNP liberadas pueden tomar parte en reac-

ciones de corte y empalme adicionales en otros sitios del pre-mRNA. Nótese que así como las snRNP, cientos de otras proteínas denominadas **factores de corte y empalme** también intervienen en un espliceosoma y las funciones de la mayoría de éstas sigue pendiente de determinarse.

Aunque la vasta mayoría de los intrones de pre-mRNA comienza con GU en el sitio de corte y empalme 5' y termina con AG en el sitio de corte y empalme 3', algunos intrones (quizá alrededor de 1%) tienen diferentes secuencias de consenso del sitio de corte y empalme. En estos casos, el intrón comienza con AU y termina con AC en lugar de hacerlo con GU y AG, respectivamente (figura G7-5). Como el corte y empalme del RNA incluye el reconocimiento de las secuencias de consenso del sitio de corte y empalme por snRNP clave (véase antes) y dado que estas secuencias son diferentes en la clase de intrones menores, snRNP U1, 2, 4 y 6 no toman parte en estos cortes y empalmes llamados "**intrones AT-AC**" (AT-AC se refiere, por supuesto, a la secuencia correspondiente del DNA). En su lugar, intervienen snRNP U11, U12, U4<sup>atac</sup> y U6<sup>atac</sup> que reemplazan las funciones de U1, U2, U4 y U6, respectivamente, y se ensamblan para formar el "**espliceosoma AT-AC**". La snRNP U5 se requiere para el corte y empalme de ambas clases de intrones.



**Figura G7-4.** Formación del espliceosoma.



**Figura G7-5.** Comparación de las secuencias conservadas del sitio de corte y ramificación de la mayoría de los intrones (parte superior del diagrama) con las de los intrones AT-AC (parte inferior del diagrama).



polimerasa II de RNA a la molécula del RNA y se unen a los elementos de la secuencia. Se forma un complejo de proteínas que incluye cuando menos dos **factores de separación** adicionales (CFI y CFII) y una enzima llamada **polimerasa de poli(A) (PAP)**. Este complejo separa el RNA entre las secuencias AAUAAA y la secuencia rica en GU (figura G7-6). Entonces, la polimerasa de poli(A) agrega alrededor de 200 a 250 residuos A al nuevo extremo 3' de la molécula de RNA y para ello usa ATP como precursor. Una vez que está formada, la cola poli(A) une de inmediato múltiples copias de una proteína de unión poli(A).

Es esencial una señal de poliadenilación intacta para que concluya la transcripción de los genes que codifican proteínas en, por ejemplo, las células humanas, y de esta forma se sabe que la conclusión de la transcripción y la poliadenilación están ligadas.

El CPSF se une al TFIID y de esa manera queda incorporado dentro del complejo de iniciación de la transcripción durante su iniciación (sección G5). Éste permanece asociado con la polimerasa II de RNA durante la elongación y así está listo para unirse a la secuencia de la señal de poliadenilación tan pronto como sea sintetizado. La transcripción se detiene de inmediato después que la secuencia de la señal de poli(A) ha sido sintetizada. No se entiende por completo cómo es que ocurre esto. Se han propuesto dos modelos y parece probable que el proceso real sea una combinación de ambos modelos. El primer modelo (modelo alostérico o modelo antiterminador) propone que la transcripción a través de la secuencia de señal de poli(A) (la cual por supuesto es seguida con rapidez por la formación del complejo de poliadenilación) causa un cambio conformacional en el complejo de elongación de la polimerasa II de RNA que desencadena la terminación en lugar de producir la elongación adicional. En este contexto, es notable que tanto el CPSF como el CstF pueden interactuar con el CTD de la polimerasa II de RNA. El segundo modelo (modelo torpedo) propone que después de la separación en el sitio de poli(A), una exonucleasa 5' a 3' se une al nuevo extremo 5' creado y degrada con rapidez el RNA, se empareja con la polimerasa II de RNA y promueve su liberación de la plantilla de DNA.

El papel exacto de la cola poli(A) todavía no se comprende del todo. Se ha sugerido que protege el extremo 3' del mRNA final contra la digestión de la ribonucleasa y que

en esa medida estabiliza el mRNA. También incrementa la eficiencia de la traducción del mRNA. Sin embargo, algunos mRNA, de manera notable el pre-mRNA de las histonas, carecen de una cola poli(A). (El pre-mRNA de las histonas también se somete a un procesamiento de 3'. Es escindido cerca del extremo 3' por un complejo proteínico que reconoce señales específicas, una de las cuales es una estructura tallo-asa, para generar el extremo 3' de la molécula de mRNA maduro.)

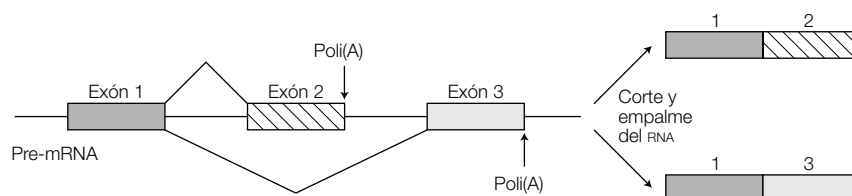
## Procesamiento alternativo

### Sitios de poliadenilación alternativos

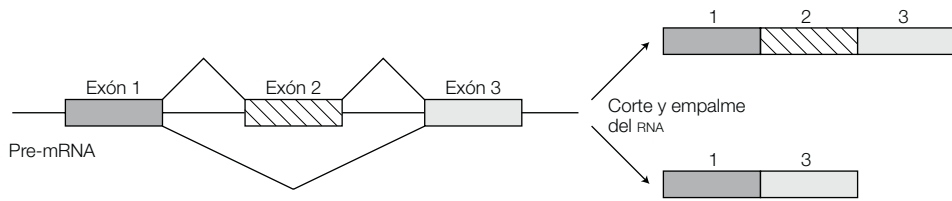
Ciertos pre-mRNA contienen más de un conjunto de secuencias señal para la separación y poliadenilación del extremo 3'. En algunos casos, la localización de los sitios de poliadenilación alternativos es tal que, según el sitio elegido, pueden perderse o retenerse exones particulares en las reacciones de corte y empalme subsecuentes (figura G7-7). Aquí el efecto es cambiar la capacidad de codificación del mRNA final de manera que sea posible producir diferentes proteínas de acuerdo con el sitio de poliadenilación usado. En otros casos, los sitios alternativos se sitúan dentro de la región no codificadora 3' del pre-mRNA, de modo que se incluyan las mismas secuencias de codificación en el mRNA final sin relación con el sitio que se use, pero la región no codificadora 3' puede variar. Como la secuencia no codificadora 3' puede contener señales para controlar la estabilidad del mRNA, la elección del sitio de poliadenilación en esta situación puede afectar la vida del mRNA resultante.

### Corte y empalme alternativo

Ahora se conocen muchos casos en los que diferentes tejidos cortan y empalman el transcrito primario del RNA de un solo gen en formas alternativas, donde los exones que se pierden y los que se retienen en el mRNA final dependen de la vía elegida (figura G7-8). Es presumible que algunos tejidos contengan proteínas reguladoras que promueven o suprimen el uso de ciertos sitios de corte y empalme para dirigir la vía de corte y empalme seleccionada. Estas **vías de corte y empalme alternativos** son muy importantes ya que permiten que las células sintetizen una diversidad de proteínas con funcionalidades diferentes a partir del transcrito primario de un gen.



**Figura G7-7.** Uso de sitios de poliadenilación alternativos.



**Figura G7-8.** Vías alternativas para el corte y empalme del RNA. En el ejemplo simple que se muestra, el transcrito puede ser cortado y empalmado por vías alternas que conducen a dos mRNA con diferentes capacidades de codificación, es decir, los exones 1, 2 y 3 o sólo los exones 1 y 3. En genes que contienen muchos exones, puede existir un número sustancial de vías de corte y empalme alternativas, las cuales son capaces de generar muchos mRNA posibles desde un solo gen.

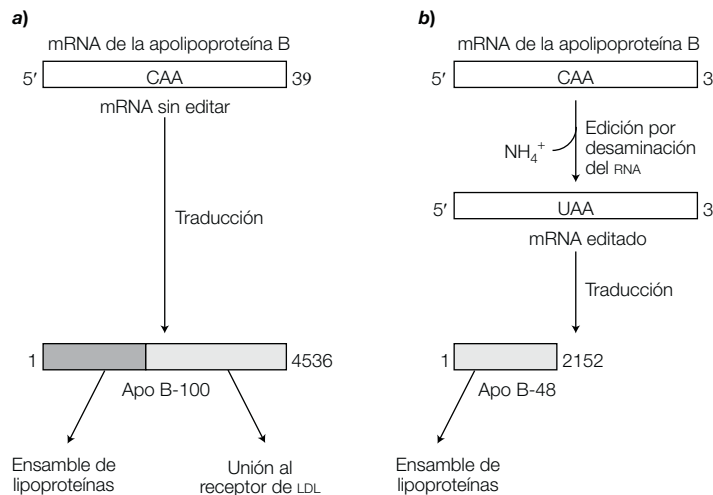
**Edición del RNA**

Éste es el nombre que se le da a diversas reacciones por medio de las cuales la secuencia de nucleótidos de una molécula de mRNA puede ser cambiada por mecanismos diferentes al del corte y empalme del RNA. Dentro del mRNA, pueden cambiarse nucleótidos individuales por otros nucleótidos, eliminarlos por completo o insertar nucleótidos adicionales. El efecto de la edición del RNA es cambiar la capacidad de codificación del mRNA de manera que codifique un polipéptido diferente del que de manera original codifica el gen. Un ejemplo de edición del RNA en humanos es el del **mRNA de la apolipoproteína B**. En el hígado, el mRNA no es editado y la proteína producida después de la traducción se denomina **apolipoproteína B100** (figura G7-9a). En células del intestino delgado, la edición del RNA (figura G7-9b) causa la conversión de un residuo C en el mRNA por uno U y, si se hace esto, cambia un codón para la

glutamina (CAA) por un codón de terminación (UAA). La traducción subsecuente del mRNA editado produce la **apolipoproteína B48**, mucho más corta (48% del tamaño de la apolipoproteína B100). Esto no representa un cambio trivial; la apolipoproteína B48 carece de un dominio proteínico necesario para la unión al receptor, que la apolipoproteína B100 sí posee, y por lo tanto las actividades funcionales de las dos proteínas son diferentes. Se conocen muchos otros casos de edición del RNA. Los mRNA mitocondriales del tripanosoma, por ejemplo, sufren edición extensa del RNA, la cual resulta en que más de la mitad de las uridinas en el mRNA final se adquieren a través del proceso de edición.

**Silenciamiento del mRNA**

Los micro-RNA (**miRNA**) son una clase de RNA que sólo se encuentra en eucariotas y que apenas tienen alrededor de 21 nt de largo. El primer miRNA se descubrió en

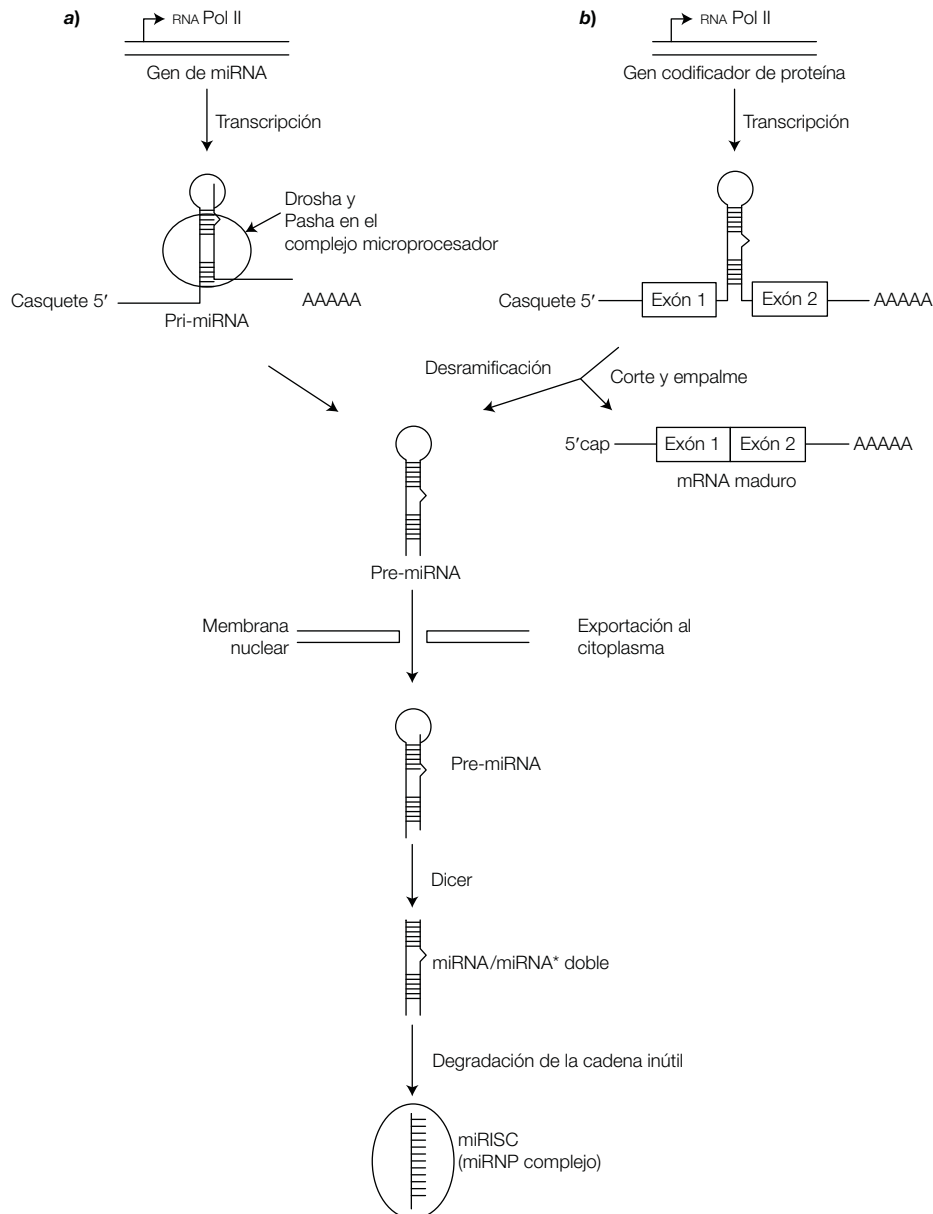


**Figura G7-9.** Edición del RNA: a) el mRNA de la apolipoproteína B sin editar es traducido para producir apoB-100, un polipéptido de 4536 aminoácidos de largo con dominios estructurales para el ensamblaje de lipoproteínas y funciones de unión del receptor; b) la traducción del mRNA editado produce la apoB-48 más corta, que carece del dominio de unión del receptor.

1993, pero desde el año 2000 se han identificado muchos más (se han reportado más de 5000) y se los ha reconocido como una nueva clase importante de moléculas reguladoras del RNA. Se ha predicho que en los mamíferos los miRNA regulan hasta 50% de todos los genes que codifican proteínas. Éstos desempeñan su función al inhibir la traducción del mRNA objetivo, es decir, causan el **silenciamiento del mRNA**.

### Síntesis de miRNA

La polimerasa II de RNA transcribe la mayoría de los miRNA con unos pocos más que son transcritos por la polimerasa III de RNA. La polimerasa II de RNA (figura G7-10) sintetiza el miRNA a través de dos vías. En la primera, un gen de RNA con su propio promotor es transcrito para producir un largo transcrito primario denominado **primiRNA**, que contiene hasta seis



**Figura G7-10.** Síntesis de los miRNA: a) la polimerasa II de RNA transcribe un gen de miRNA para producir un primRNA. Luego, éste es escindido por el complejo microprocesador para formar pre-miRNA, seguido por su exportación al citoplasma y la separación por Dicer para producir un miRNA/miRNA\* doble. b) Transcripción de un gen que codifica proteínas, un intrón del cual contiene una secuencia miRNA. El corte y empalme genera el mRNA maduro y libera el intrón, el cual produce primRNA, que es procesado como en a) para dar un miRNA/miRNA\* doble. Finalmente, se forma un complejo miRISC que contiene la cadena de RNA simple y proteínas asociadas.

secuencias de miRNA. El pre-miRNA sufre reacciones de procesamiento que agregan una caperuza 5' y una cola poli(A)3'. Dentro de esta molécula, las secuencias de miRNA forman típicas asas internas en horquilla, cada una de las cuales contiene alrededor de 70 nt. Una proteína denominada **Pasha** (también conocida como DGCR8) se une a una proteína llamada **Drosha** para formar un **complejo microprocesador** que reorganiza estos RNA con pliegues invertidos en el núcleo. La Drosha corta las regiones en horquilla individuales del pri-miRNA para formar precursores de miRNA denominados **pre-miRNA** (figura G7-10). Los pre-miRNA se exportan al citoplasma, donde una ribonucleasa denominada **Dicer** corta las asas y recorta los extremos para dejar una molécula de miRNA de doble cadena de alrededor de 21 nt de largo. Las dos cadenas no presentan de manera habitual un apareamiento de bases perfecto (es decir, en algunas regiones, las dos secuencias no son complementarias) y de esa manera se tiene un RNA doble imperfecto. Una cadena del RNA doble es **miRNA** y la otra se llama **miRNA\*** (también llamada **cadena "inútil"**).

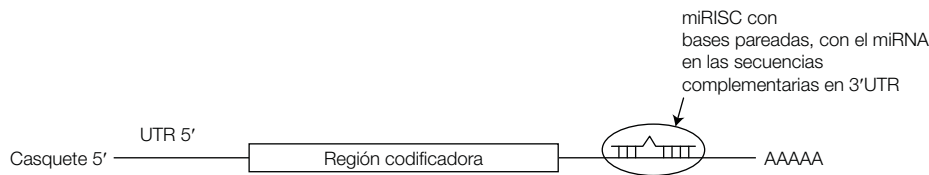
La segunda vía para la síntesis de miRNA depende del hecho de que, aunque resulte increíble, algunos miRNA son codificados por secuencias que residen en los intrones de los genes que codifican proteínas (figura G7-10) conocidos como **mirtrones**. El asa del intrón eliminado por corte y empalme externo es removida por una

enzima que degrada las ramificaciones y que libera el pre-miRNA.

### Mecanismo de acción del miRNA

Un miRNA maduro existe como un complejo de **miRNP** (microrribonucleoproteína), que sólo contiene la cadena de miRNA del RNA doble; el miRNA\* ("inútil") es degradado. El complejo miRNP también contiene varias proteínas como la Argonauta que son importantes para la función del miRNP. Debido a que la función del complejo miRNP es inhibir la traducción de los mRNA, con frecuencia se lo denomina **miRISC (complejo silenciador inducido por el miRNA)**.

El miRNA del miRISC es complementario de una secuencia en uno o más mRNA. En los animales (figura G7-11), la mayor parte del miRISC se une a secuencias de la región no traducida 3' (UTR 3' ; sección G5); en efecto, múltiples miRNA pueden unirse a diferentes sitios de esta región de una molécula de mRNA. También se ha reportado que algunos miRNA se unen a regiones codificantes del mRNA o a secuencias de la UTR 5' (sección G5). La unión del miRISC al mRNA determina la inhibición de la traducción, es decir, resulta en el "silenciamiento" del mRNA. El mecanismo exacto permanece oscuro, pero en algunos casos incluye la separación del mRNA en la región de las bases apareadas, y en otros casos en una desadenilación, es decir, en la remoción de los residuos A de la cola poli(A).



**Figura G7-11.** Silenciamiento del mRNA. El complejo miRISC se une de manera habitual a la región no traducida 3' (3'UTR) del mRNA objetivo mediante la formación de pares de bases entre el miRNA y una secuencia complementaria en el mRNA. El apareamiento de bases puede ser perfectamente armónico o, como se muestra aquí, puede contener una o más regiones donde las dos secuencias difieren y no se forman pares de bases.

# G8 Transcripción y procesamiento del RNA ribosómico

## Notas clave

### Ribosomas

Un ribosoma procariota de 70S abarca dos subunidades (50S y 30S). La subunidad de 50S forma un complejo de rRNA de 23S y 5S y 34 polipéptidos, mientras que la subunidad de 30S contiene un rRNA de 16S y 21 polipéptidos. Un ribosoma eucariota de 80S abarca dos subunidades (60S y 40S). La subunidad de 60S tiene rRNA de 28S, 5.8S y 5S formando un complejo con alrededor de 49 polipéptidos, mientras que la subunidad de 40S contiene un rRNA de 18S y cerca de 33 polipéptidos. La estructura tridimensional de los ribosomas bacterianos muestra que depende de los rRNA que se pliegan y forman pares de bases con los otros para formar la estructura total del ribosoma, con las proteínas que se localizan en la periferia. De manera adicional, los sitios A, P y E, e incluso el sitio catalítico para la formación de enlaces peptídicos, están formados por rRNA, el cual por lo tanto tiene una función catalítica así como una función estructural.

### Transcripción y procesamiento del rRNA

*E. coli* tiene siete unidades de transcripción de rRNA, cada una con una copia de los genes del rRNA de 23S, 16S y 5S, así como uno a cuatro genes tRNA. La transcripción produce un transcrito de pre-rRNA de 30S. Éste se pliega para formar estructuras tallo-asa, se une a proteínas ribosómicas y varios nucleótidos son metilados. El transcrito modificado de pre-rRNA es entonces escindido en sitios específicos por la RN-asa III y los extremos son recortados por las ribonucleasas M5, M6 y M23 para liberar los rRNA maduros.

### Síntesis del rRNA eucariota de 28S, 18S y 5.8S

Los genes de rRNA de 28S, 18S y 5.8S están presentes como copias múltiples agrupadas juntas como repeticiones en tándem. Estas unidades de transcripción de rRNA son transcritas en el nucleolo por la polimerasa I de RNA. El promotor contiene un elemento central que se extiende hacia ambos lados del sitio de inicio de la transcripción y un elemento de control corriente arriba (UCE) de alrededor de 50 a 80 bp de tamaño localizado alrededor de 100 bp corriente arriba. Cuatro complejos proteínicos, uno de los cuales contiene la proteína de unión TATA (TBP) como un componente, interactúan entre sí y con la polimerasa I de RNA para formar un complejo de iniciación de la transcripción unido a los elementos promotores. La transcripción produce un pre-rRNA de 45S, el cual tiene espaciadores transcritos externos (ETS) en los extremos 5' y 3' y espaciadores transcritos internos (ITS) que separan en forma interna las secuencias del rRNA. Los pre-rRNA se pliegan para formar una estructura secundaria definida con tallos-asa, proteínas ribosómicas unidas a secuencias seleccionadas y se producen múltiples reacciones de metilación e isomerización (de uridina a pseudouridina) en sitios específicos, guiadas por la interacción del pre-rRNA con el snoRNA (como snoRNP). En ese momento, se escinde la molécula de pre-rRNA de 45S, y libera precursores de rRNA de 32S y 20S que se procesan de manera adicional para generar rRNA maduros de 28S, 18S y 5.8S.



|   |   |  |
|---|---|--|
| <b>Ribosimas</b>                        | En las <i>Tetrahymena</i> , la molécula de pre-rRNA contiene un intrón que se remueve por autocorte y empalme (en presencia de guanosina, GMP, GDP o GTP), sin necesidad de incluir alguna proteína. Ésta fue la primera ribozima descubierta, pero desde entonces se han reportado varias más.   |  |
| <b>Síntesis de rRNA eucariota de 5S</b> | Las células eucariotas contienen múltiples copias del gen de rRNA de 5S. A diferencia de otros genes de rRNA eucariotas, los genes de rRNA de 5S son transcritos por la polimerasa III de RNA. Dos elementos de control, una caja A y una caja C, se encuentran corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción. La caja C se une al TFI <sub>IIA</sub> , el cual entonces recluta al TFI <sub>IIIC</sub> . A continuación, el TFI <sub>IIIB</sub> se une e interactúa con la polimerasa III de RNA para formar el complejo de iniciación de la transcripción. La transcripción produce un rRNA maduro de 5S que no requiere procesamiento. |  |
| <b>Temas relacionados</b>               | (F1) Introducción al DNA<br>(G1) Introducción al RNA<br>(G2) Transcripción en procariotas<br>(G3) Operones<br>(G4) Transcripción en eucariotas: descripción<br>(G5) Transcripción de genes que codifican proteínas en eucariotas  | (G6) Regulación de la transcripción de la polimerasa II de RNA<br>(G7) Procesamiento del pre-mRNA eucariota<br>(G9) Transcripción y procesamiento del RNA de transferencia |

## Ribosomas

Cada ribosoma consiste en dos subunidades, una subunidad pequeña y una grande, cada una de las cuales es un complejo de múltiples componentes de RNA **ribosómico (rRNA)** y **proteínas ribosómicas** (figura G8-1). Una forma de distinguir entre partículas como ribosomas y subunidades ribosómicas es colocar la muestra en un tubo dentro de un rotor centrífugo y hacerla girar a gran velocidad. Esto provoca que las partículas sedimenten en el fondo del tubo. Las partículas que difieren en masa, forma y densidad sedimentan a diferentes velocidades (velocidades de sedimentación). Por eso, una partícula con una masa que duplica a la de otra siempre sedimentará más rápido en tanto ambas partículas tengan la misma forma y densidad. La velocidad de sedimentación de una partícula dada es también directamente proporcional a las fuerzas gravitacionales (el campo centrífugo) que experimentan durante la centrifugación, la cual puede incrementarse simplemente al hacer girar el rotor a una velocidad más alta. Sin embargo, es posible definir un **coeficiente de sedimentación** que depende exclusivamente del tamaño, forma y densidad de la partícula y que es independiente del campo centrífugo. Los coeficientes de sedimentación se miden de manera habitual en **unidades Svedberg (S)**. Un ribosoma procariota tiene un coeficiente de sedimentación de 70S, mientras que las subunidades grandes y pequeñas tienen coeficientes de sedimentación de 50S y 30S, respectivamente (nótese que los valores S no son adicionables). La subunidad de 50S contiene dos rRNA (23S y 5S) que forman complejos con 34 polipéptidos, en tanto que la subunidad de 30S contiene un rRNA de 16S y 21

polipéptidos (figura G8-1). En los eucariotas, los ribosomas son más grandes y más complejos; el monómero de ribosoma es de 80S y consiste en las subunidades de 60S y 40S. La subunidad de 60S contiene tres rRNA (28S, 5.8S y 5S) y alrededor de 49 polipéptidos, en tanto que la subunidad de 40S tiene un rRNA de 18S y cerca de 33 polipéptidos (figura G8-1). Pese a ello, no obstante esta complejidad extra, la estructura y función generales de los ribosomas eucariotas son muy similares a las de las bacterias. En cada caso, alrededor de dos terceras partes de la estructura es de rRNA y un tercio es de proteínas.

Una amplia gama de estudios ha construido un cuadro detallado de la estructura fina de los ribosomas, y mapeado la localización de varios RNA y componentes proteínicos así como sus interacciones. La forma general de un ribosoma de 70S, obtenida a través de estudios de microscopía electrónica, se muestra en la figura G8-2. La estructura tridimensional de las subunidades ribosómicas bacterianas, determinada hace pocos años, muestra que los diferentes rRNA están plegados en forma estrecha y forman pares de bases extensos con los otros para constituir el centro de las subunidades ribosómicas, con las proteínas restringidas en la superficie y cerrando brechas entre los pliegues de RNA. Los rRNA son los principales responsables de la estructura general del ribosoma procariota y también forman los tres principales sitios de unión (los sitios A, P y E) que intervienen en la síntesis de las proteínas (sección H2). Además, el rRNA de 23S, más que una proteína, forma el sitio catalítico donde se construyen los enlaces peptídicos (sección H2). Por lo tanto, la síntesis de las proteínas incluye rRNA que actúan como ribozimas.

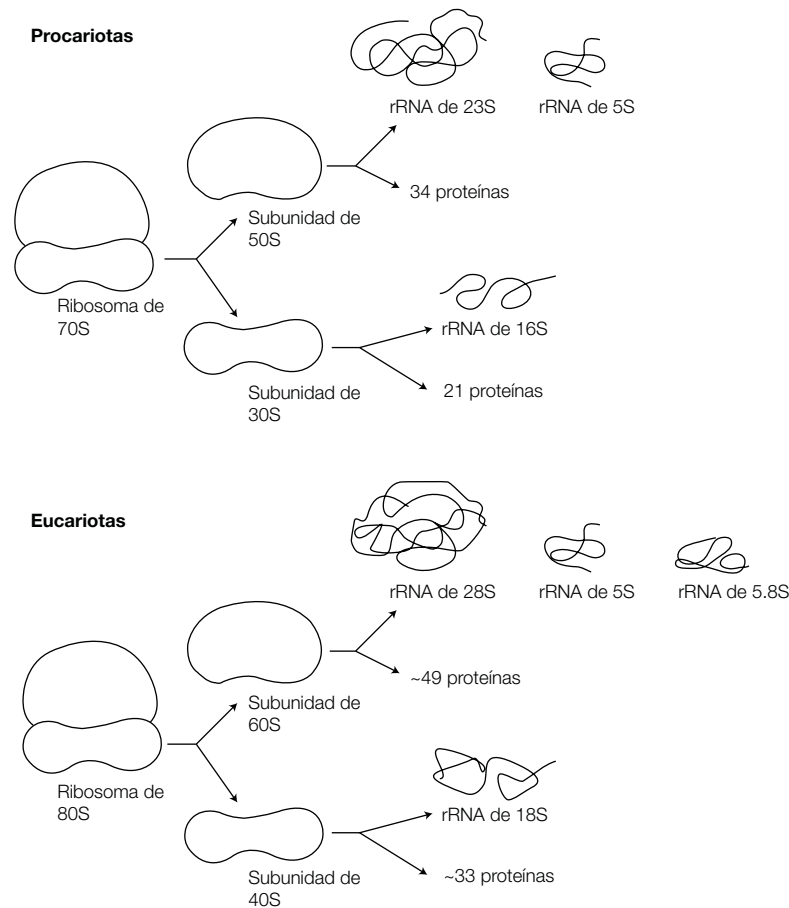


Figura G8-1. Composición de los ribosomas en las células procariotas y eucariotas.

### Transcripción y procesamiento del rRNA procariota

En *E. coli* hay siete unidades de transcripción de rRNA dispersas a través del genoma, cada una de las cuales contiene una copia de los genes de rRNA de 23S, 16S y 5S y una a cuatro copias de varios genes de tRNA (figura G8-3). Este ensamblado de genes es transcrito por la polimerasa de RNA procariota para producir un **transcrito de pre-rRNA de 30S** (cerca de 6 000 nt de tamaño). Este ordenamiento asegura que cantidades estequiométricas de varios rRNA sean sintetizadas por el ensamble del ribosoma. Después de la transcripción, la molécula de pre-rRNA de 30S forma regiones de bases pareadas hacia dentro para dar origen a una serie de estructuras tallo-asa y proteínas ribosómicas unidas para formar un **complejo de ribonucleoproteínas (RNP)**. Varios nucleótidos de la molécula de pre-rRNA plegada son entonces metilados, en el componente ribosa, para lo cual se sirven de la S-adenosilmetionina como el donador de metilos. A continuación, la **RN-asa III** escinde la molécula de pre-rRNA en sitios específicos para liberar los precursores de los rRNA de 23S, 16S y 5S.

Los precursores son entonces recortados en sus extremos 5' y 3' por las ribonucleasas **M5**, **M16** y **M23** (las cuales actúan sobre los precursores de rRNA 5S, 16S y 23S, respectivamente) para generar los rRNA maduros.

### Síntesis de los rRNA de 28S, 18S y 5.8S eucariotas

En eucariotas, los genes para el rRNA de 28S, 18S y 5.8S están **agrupados** de manera típica en forma estrecha y **repetidos en tándem**, en los que existe una copia de cada uno de los genes de 18S, 5.8S y 28S, seguidos por un espaciador de DNA no transcrito, tras el cual hay otro grupo de genes de 18S, 5.8S y 28S, etc. (figura G8-4a). En los seres humanos hay cerca de 200 copias de esta unidad de transcripción de rRNA ordenada bajo la forma de cinco grupos de alrededor de 40 copias en cromosomas separados. Estas unidades de transcripción de rRNA son transcritas por la **polimerasa I de RNA (RNA Pol I)** en una región del núcleo conocida como nucleolo (sección A2). El nucleolo contiene aspas de DNA que se extienden desde cada uno de los grupos de genes de rRNA en

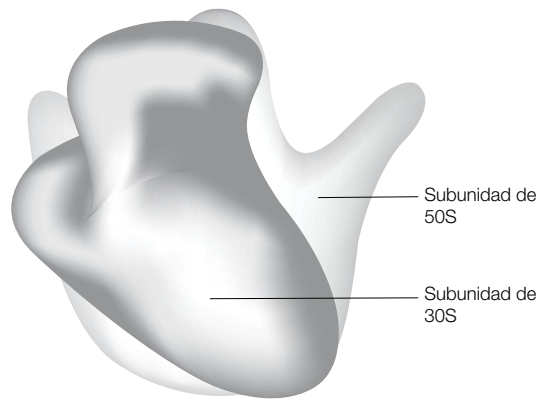


Figura G8-2. El ribosoma procariota de 70S.

los diferentes cromosomas y por tanto cada grupo se denomina **organizador nucleolar**.

El promotor de rRNA consiste en un **elemento central**, el cual se dispersa en el sitio de inicio de la transcripción (designado como posición +1) y está localizado entre los residuos -45 a +20, además de un **elemento de control corriente arriba (UCE)** de alrededor de 50 a 80 bp de tamaño y que se localiza cerca de 100 bp corriente arriba (figura G8-4b). Un factor de transcripción denominado **factor de unión corriente arriba (UBF)** se une al UCE así como a la región vecina y se superpone con el elemento central.

Como hecho de interés, la **proteína de unión a la caja TATA (TBP; sección G5)** también se une al promotor del

rRNA (de hecho, el TBP se requiere para la iniciación de las tres polimerasas de RNA eucariotas).

En total, cuatro complejos proteínicos interactúan con la polimerasa I de RNA para iniciar la transcripción del gen ribosómico. El primer complejo multiproteínico (llamado **sL1** en humanos) contiene TBP, el segundo complejo es UBF y los otros dos complejos proteínicos incluidos son TIF1A y TIF1C. Los cuatro complejos interactúan entre sí y con la polimerasa I de RNA para formar un **complejo de iniciación de la transcripción** unido al promotor del rRNA. Después, la polimerasa I de RNA transcribe la unidad de transcripción completa de los genes de 28S, 18S y 5.8S para sintetizar una molécula grande de pre-rRNA (figura G8-4b).

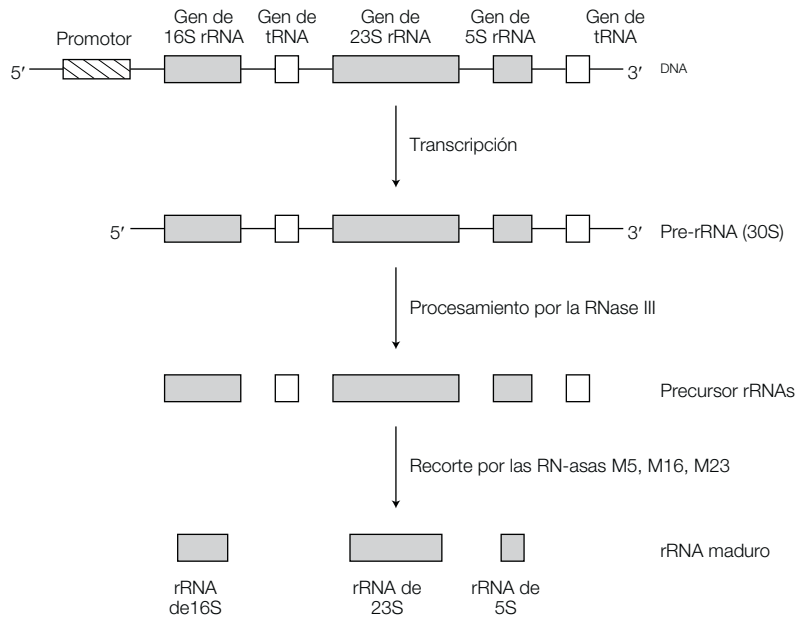
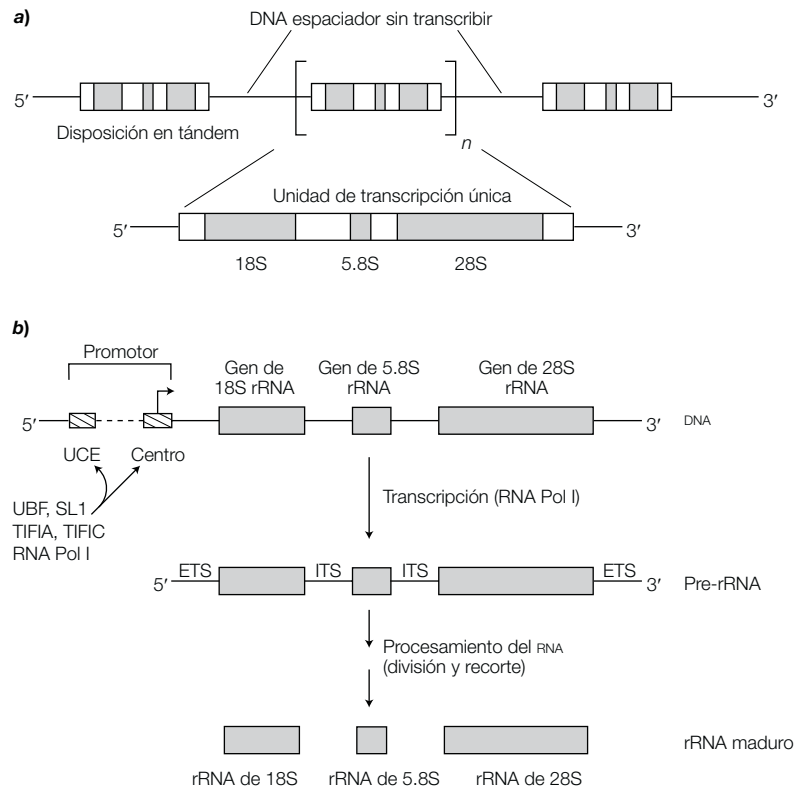


Figura G8-3. Transcripción y procesamiento del rRNA procariota.



**Figura G8-4.** a) Unidades de transcripción del rRNA; b) transcripción de una unidad de transcripción única por la polimerasa I de RNA y procesamiento del pre-rRNA.

En los seres humanos, el producto de la transcripción es un **pre-rRNA de 45S**, el cual tiene **espaciadores de transcritos externos** que no son rRNA (ETS) en los extremos 5' y 3' y **espaciadores de transcritos internos** que no son rRNA (ITS) que separan internamente las secuencias de rRNA (figura G8-4b). Esta molécula de 45S se pliega hasta formar una estructura secundaria definida con tallos-asas, las proteínas ribosómicas se unen a secuencias seleccionadas, se produce la **metilación** del constituyente ribosa (en más de 100 sitios de nucleótidos) y alrededor de 95 residuos de uridina son modificados a pseudouridina ( $\Psi$ ), un proceso de isomerización denominado **pseudouridilación**. La molécula de pre-rRNA de 45S es dividida en ese momento, primero en los ETS y luego en los ITS, para liberar los rRNA precursores, los cuales son divididos de manera adicional y recortados para liberar los RNA maduros de 28S, 18S y 5.8S (figura G8-4b).

En los eucariotas, la selección de los sitios del pre-rRNA que serán metilados depende de los RNA pequeños (70 a 100 nt de longitud) encontrados en el nucleolo y llamados **RNA nucleolares pequeños (snoRNA)**, que existen en complejos de ribonucleoproteínas llamados **snoRNP**. Los snoRNA contienen largas regiones (10 a 21 nt) que son complementarias de regiones específicas de la molécula de pre-rRNA con las que forman pares

de bases y luego guían dónde se debe producir la metilación de residuos ribosómicos específicos (metilación 2'O) y la isomerización de la uridina a pseudouridina.

Hay dos familias diferentes de snoRNA llamadas **snoRNA caja C/D** y **snoRNA caja H/ACA** antisentido. El nombramiento de estos snoRNA se basa en las secuencias conservadas que contienen; los snoRNA caja C/D contienen dos secuencias conservadas pequeñas, C (UCAUGA) y D (CUGA), y de modo similar los snoRNA caja H/ACA contienen otras secuencias conservadas denominadas caja H y caja ACA. En general, las snoRNP caja C/D dirigen la metilación y las snoRNP caja H/ACA dirigen la pseudouridilación. Cuando la snoRNP se une al rRNA, se cree que los componentes proteínicos de la snoRNP llevan a cabo la modificación química requerida.

## Ribozimas

En cuando menos un eucariota, *Tetrahymena*, la molécula de pre-rRNA contiene un intrón. La remoción del intrón durante el procesamiento del pre-rRNA ¡no requiere la asistencia de ninguna proteína! En su lugar, en presencia de guanosina, GMP, GDP o GTP, el intrón se escinde a sí mismo, un fenómeno conocido como **autocorte y empalme**. Ésta fue la primera demostración de las **ribozimas**, es decir, de moléculas de RNA catalítico

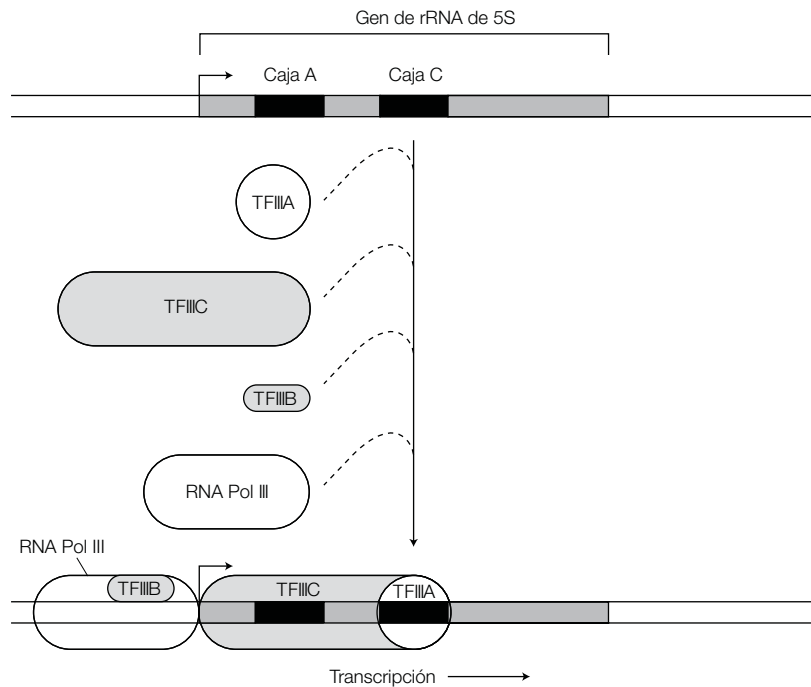
que catalizan reacciones específicas. El autocorte y empalme de los intrones también se ha descubierto en algunos mRNA eucariotas e incluso la peptidiltransferasa, una enzima cuya actividad es clave en la síntesis de las proteínas, es ahora conocida como una ribozima (sección H2).

### Síntesis de rRNA de 5S eucariota

En eucariotas, el gen del rRNA de 5S también está presente en múltiples copias (2000 copias en las células humanas, todos agrupados juntos en un sitio cromosómico). A diferencia de otros genes del rRNA eucariotas, los genes del rRNA de 5S son transcritos por la **polimerasa III de RNA (RNA Pol III)**, la misma enzima que transcribe los genes del tRNA.

Los promotores de la polimerasa III de RNA varían en estructura según el gen que será transcrito. Los promotores de los genes del tRNA contienen elementos de

control llamados la caja A y la caja B, que se localizan corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción (sección G9). El promotor de los genes del rRNA de 5S también tienen dos elementos de control que se localizan corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción, pero éstos son una **caja A** y una **caja C** (figura G8-5). La caja C une el **factor de transcripción IIIA (TFIIIA)**, el cual a su vez interactúa con el **TFIIIC** para causar su unión, un proceso que probablemente también incluye el reconocimiento de la caja A. Cuando el **TFIIIC** se ha unido, el **TFIIIB** se une e interactúa con la polimerasa III de RNA, por lo cual su unión contribuye a formar el **complejo de iniciación de la transcripción**. Una de las tres subunidades del **TFIIIB** es **TBP** (sección G5), el factor de transcripción que se requiere para la transcripción de las tres polimerasas de RNA eucariotas. Después de la transcripción, el transcrito del rRNA de 5S no requiere procesamiento. Éste migra hacia el nucleolo y es reclutado durante el ensamblaje del ribosoma.



**Figura G8-5.** Iniciación de la transcripción de un gen de rRNA de 5S por la polimerasa III de RNA.

# G9 Transcripción y procesamiento del RNA de transferencia

## Notas clave

### Estructura del tRNA

Cada tRNA tiene una estructura secundaria en forma de trébol que contiene un brazo anticodón, un brazo D (o DHU), un brazo T o TΨC, y un tallo aceptor de aminoácidos en el cual los aminoácidos relevantes establecen enlaces covalentes en el grupo 3'-OH. Algunos tRNA también tienen un brazo variable (u opcional). La estructura tridimensional es más compleja debido a las interacciones adicionales entre los nucleótidos.

### Transcripción y procesamiento del rRNA en procariotas

*E. coli* contiene grupos de hasta siete genes de tRNA separados por regiones espaciadoras, así como genes de tRNA dentro de las unidades de transcripción del RNA ribosómico. Después de la transcripción, el transcrito primario de RNA se pliega en estructuras tallo-asa específicas y apenas entonces es procesado por las ribonucleasas D, E, F y P en una serie de reacciones ordenadas para liberar las moléculas individuales de tRNA.

### Transcripción y procesamiento del rRNA en eucariotas

En eucariotas, los genes del tRNA están presentes en múltiples copias y son transcritos por la polimerasa III de RNA. Pueden transcribirse varios genes del tRNA para producir un pre-tRNA único, que luego se procesa para que libere los tRNA individuales. El promotor de tRNA incluye dos elementos de control llamados la caja A y la caja B, que se localizan dentro del gen del tRNA en sí y por lo tanto corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción. El inicio de la transcripción requiere el factor de transcripción IIIIC (TFIIIC), el cual se une a las cajas A y B, y el TFIIIB, que se une corriente arriba de la caja A. El transcrito primario del tRNA se pliega en estructuras tallo-asa y no se remueve ninguna secuencia que no sea tRNA por acción de las ribonucleasas. A diferencia de los procariotas, en los eucariotas la secuencia CCA del extremo 3' del tRNA se añade después de las reacciones de recorte (por la nucleotidiltransferasa de tRNA). A diferencia de los procariotas, las moléculas de pre-tRNA de eucariotas también pueden contener un intrón corto en el asa del brazo anticodón. El intrón es eliminado por reacciones de corte y empalme del tRNA, que incluyen la escisión por la endonucleasa de ambos extremos del intrón y la ligadura de los extremos cortados del tRNA.

### Modificación del tRNA

Después de la síntesis, los nucleótidos de la molécula de tRNA pueden sufrir modificación para crear nucleótidos inusuales como la 1-metilguanosina (m<sup>1</sup>G), pseudouridina (Ψ), dihidouridina (D), inosina (I) y 4-tiouridina (S<sup>4</sup>U).

### Temas relacionados

- |   |  |
|---|--|
| (F1) Introducción al DNA  | (G6) Regulación de la transcripción de la polimerasa II de RNA |
| (G1) Introducción al RNA  | (G7) Procesamiento del pre-mRNA eucariota                      |
| (G2) Transcripción en procariotas                                 | (G8) Transcripción y procesamiento del RNA ribosómico          |
| (G3) Operones   |  |
| (G4) Transcripción en eucariotas: descripción                     |  |
| (G5) Transcripción de genes que codifican proteínas en eucariotas |  |

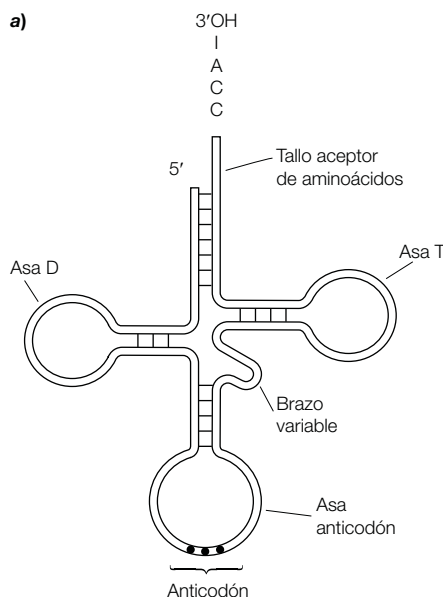
## Estructura del tRNA

Las moléculas del RNA de transferencia (tRNA) desempeñan una función importante en la síntesis de proteínas (secciones H2 y H3). Cada tRNA adquiere enlaces covalentes con un aminoácido específico, con el cual forma **aminoacil-tRNA**, el cual reconoce el codón correspondiente en el mRNA y asegura que se añada el aminoácido correcto a la cadena polipeptídica en crecimiento. Los tRNA son pequeñas moléculas, de sólo 74 a 95 nt de longitud, las cuales forman estructuras secundarias **en forma de trébol** características (figura G9-1A) por el apareamiento interno de bases. Los tallo-asa de la hoja de trébol se conocen como **brazos**:

- El **brazo anticodón** contiene en sus **asas** los tres nucleótidos del **anticodón**, el cual formará pares de bases con el codón complementario del mRNA durante la traducción.
- El **brazo D** o DHU (con su **asa D**) contiene **dihidrouracilo**, una pirimidina inusual.
- El **brazo T** o TΨC (con su **asa T**) contiene otra base inusual, **seudouracilo** (que se denota con Ψ) en la secuencia TΨC.
- Algunos tRNA también tienen un **brazo variable (brazo opcional)**, que tiene 3 a 21 nt de tamaño.

La otra característica notable es el **tallo aceptor de aminoácidos**. Éste es aquél donde el aminoácido se fija, en el grupo 3'-OH de la secuencia 3'CCA.

La estructura tridimensional del tRNA (figura G9-1b) es incluso más compleja debido a las interacciones adicionales entre las diversas unidades de la estructura secundaria.

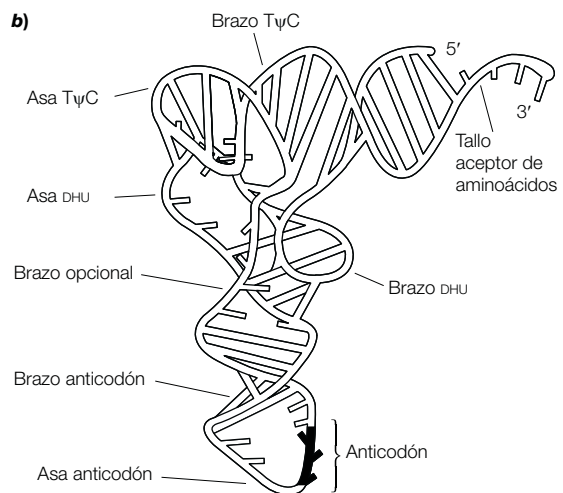


## Transcripción y procesamiento del tRNA en procariontas

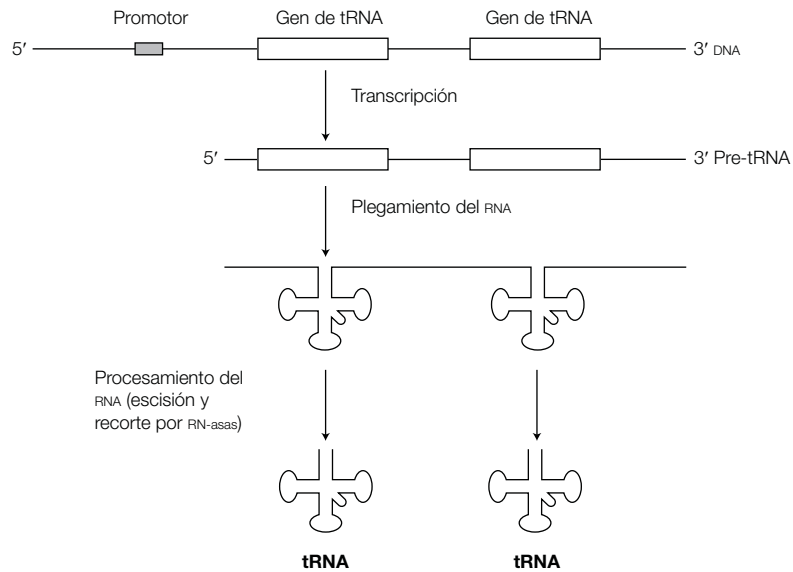
Las unidades de transcripción del rRNA en *E. coli* contienen algunos genes del tRNA que son transcritos y procesados en el momento de la transcripción del rRNA (sección G8). Otros genes del tRNA se presentan en grupos de hasta siete secuencias de tRNA separadas por regiones espaciadoras. Después de la transcripción por la polimerasa de RNA procarionta única, el transcrito primario de tRNA se pliega en estructuras características tallo-asa (figura G9-2) y en ese momento es procesado en una serie ordenada de escisiones por parte de las ribonucleasas (RN-asas), las cuales liberan y recortan los tRNA hasta sus longitudes finales. Las reacciones de división y recorte en los extremos 5' y 3' de los tRNA precursores incluyen a las RN-asas **D, E, F y P**. Las RN-asas E, F y P son **endonucleasas**, o sea que cortan internamente el RNA, en tanto que la RN-asa D es una **exonucleasa**, o sea que recorta los extremos de las moléculas de tRNA.

## Transcripción y procesamiento del tRNA en eucariotas

En eucariotas, los genes del tRNA existen en múltiples copias y son transcritos por la **polimerasa III de RNA (RNA Pol III)**. Como los procariontas, varios tRNA pueden ser transcritos al mismo tiempo para producir una sola **molécula de pre-tRNA**, que luego se procesa para liberar los diferentes tRNA. Los promotores de los genes del tRNA eucariotas son inusuales por el hecho de que los elementos de control transcripcional se localizan corriente abajo (es decir, en el lado 3') del sitio de inicio de la transcripción (en la posición +1). De hecho, se localizan dentro del gen en sí mismo. Se han identificado



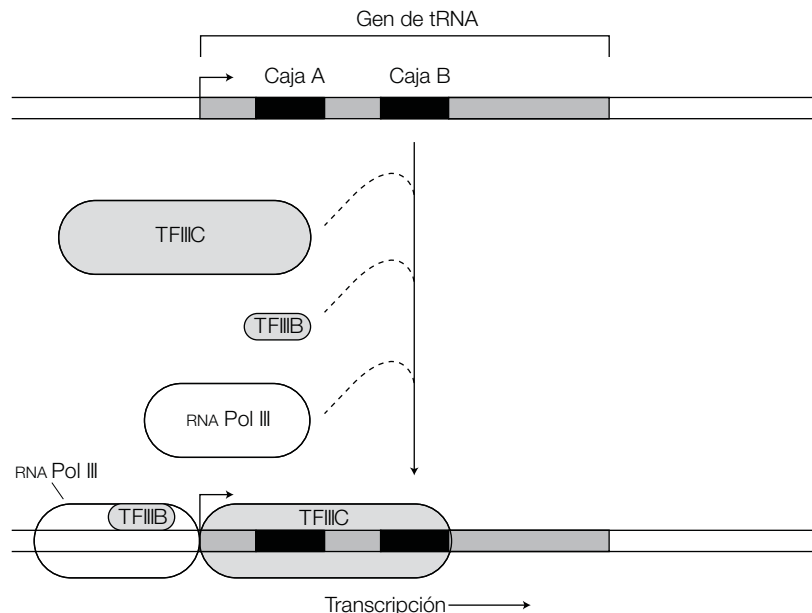
**Figura G9-1.** a) Estructura secundaria del tRNA en forma de trébol; b) estructura terciaria del tRNA. Adaptado de Freifelder, D. (1986), *Molecular Biology*, 2a. ed., Jones and Bartlett.



**Figura G9-2.** Transcripción y procesamiento del tRNA en procariontes.

dos de tales elementos que se denominan **caja A** y **caja B** (figura G9-3). La transcripción de los genes del tRNA por la polimerasa III de RNA requiere la presencia del **factor de transcripción III C (TFIIIC)** así como del **TFIIIB**. El **TFIIIC** se une a las cajas A y B, mientras que el **TFIIIB** se une corriente arriba de la caja A. El **TFIIIB** contiene tres subunidades, una de las cuales es **TBP**, el polipéptido requerido por las tres polimerasas de RNA eucariotas.

Después de la síntesis, la molécula de pre-tRNA se pliega en estructuras tallo-asa características (figura G9-1) y la secuencia que no es tRNA es separada de los extremos 5' y 3' por las ribonucleasas. En los procariontes, la secuencia **CCA** del extremo 3' del tRNA (que es el sitio unión de los aminoácidos), es codificado por el gen del tRNA, pero no sucede así en los eucariotas. En sustitución, el **CCA** es añadido al extremo 3' por la **nucleotidiltransferasa de tRNA** después de las reacciones de recorte.



**Figura G9-3.** Iniciación de la transcripción de un gen de tRNA por la polimerasa III de RNA.



Otra diferencia entre procariontes y eucariotas es que las moléculas de pre-tRNA eucariotas contienen con frecuencia un **intrón** corto en el asa del brazo del anticodón (figura G9-4). Este intrón debe ser removido con el fin de crear una molécula de tRNA funcional. Su remoción se produce por división mediante una **endonucleasa de corte y empalme de tRNA** en cada extremo del intrón y luego la **ligasa de tRNA** une los extremos del tRNA. Esta vía de corte y empalme del tRNA por remoción de intrones es totalmente diferente de la que participa en la remoción de intrones de las moléculas de pre-mRNA

en eucariotas (sección G7) y debe haber evolucionado de manera independiente.

### Modificación del tRNA

Las moléculas de RNA de transferencia son notables por contener nucleótidos inusuales (figura G9-5), como la **1-metilguanosa (m<sup>1</sup>G)**, **seudouridina (Ψ)**, **dihidrouridina (D)**, **inosina (I)** y **4-tiouridina (S<sup>4</sup>U)**. Éstas fueron creadas por modificación de la guanosina y la uridina después de la síntesis de tRNA. Por ejemplo, la inosina se genera por la desaminación de la guanosina.

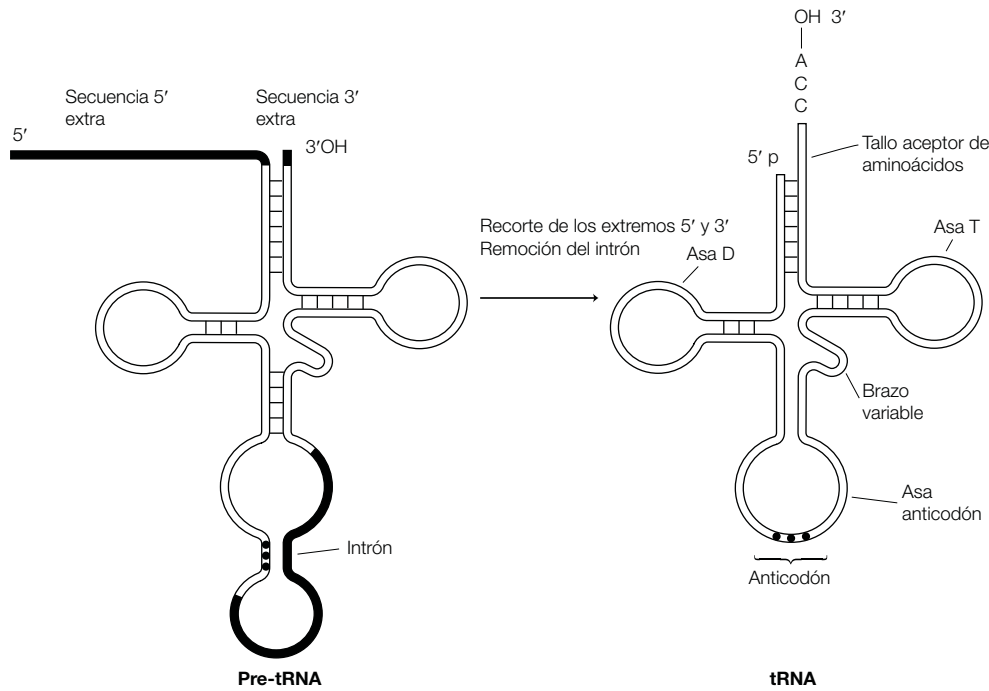


Figura G9-4. Procesamiento de una molécula típica de pre-tRNA eucariota.

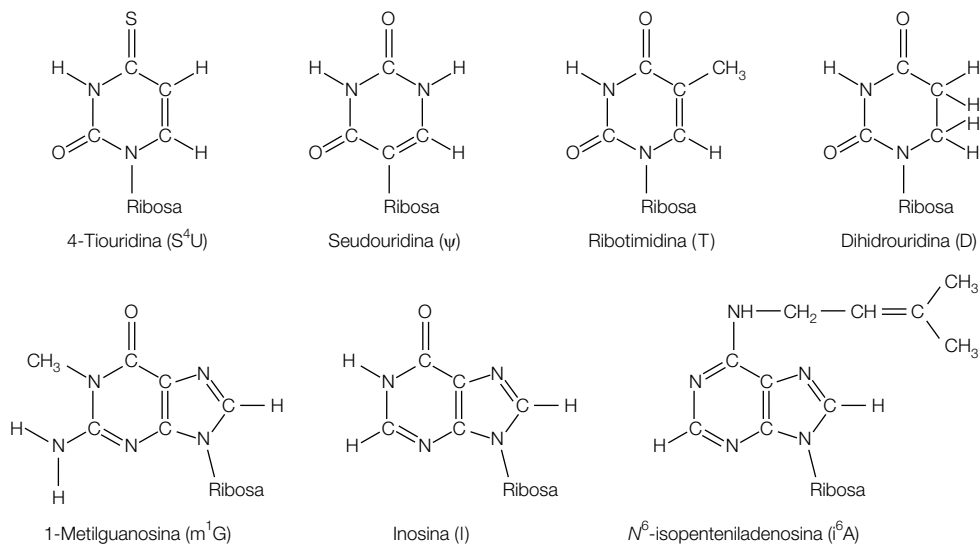


Figura G9-5. Algunos nucleósidos modificados encontrados en las moléculas de tRNA.

# H1 El código genético

## Notas clave

### El código genético es un código de tripletes

El código genético es la regla que especifica en qué forma se traduce la secuencia de nucleótidos de un mRNA en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. La secuencia de nucleótidos se lee como tripletes llamados codones. Los codones UAG, UGA y UAA no especifican aminoácidos y se denominan codones de terminación o codones de detención. El AUG codifica la metionina y también actúa como un codón de iniciación (comienzo).

### Los codones son reconocidos por los anticodones y por las moléculas de tRNA

A medida que el ribosoma lee el mRNA, una molécula de tRNA específica lleva el aminoácido correcto de un codón al ribosoma, la cual se une al codón a través de un apareamiento de bases entre codón y anticodón. Los aminoácidos se unen en forma covalente al extremo 3' del tRNA, con el que forman una molécula de aminoacil-tRNA. El pareo de bases del codón con el anticodón se produce en un ordenamiento antiparalelo. Por lo tanto, la molécula de tRNA actúa como un adaptador, ya que funge como un mediador entre la secuencia de nucleótidos del mRNA y la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se está sintetizando.

### El código genético es degenerado

La mayoría de los aminoácidos de las proteínas es especificada por más de un codón (es decir, el código genético es degenerado). Con frecuencia, el reconocimiento de tales codones ocurre a través de diferentes tRNA (con los anticodones correspondientes para dichos codones), que se unen con el mismo aminoácido (isoaceptación de tRNA). Además, los codones que especifican el mismo aminoácido (sinónimos) suelen diferir sólo en la tercera base, la posición tambaleante, donde el apareamiento de bases con el anticodón puede ser menos estricta que con las primeras dos posiciones del codón, lo que permite que un tRNA reconozca más de un codón.

### Universalidad del código genético

El código genético no es universal pero es el mismo en la mayor parte de los organismos. Se encuentran excepciones en los genomas mitocondriales, donde algunos codones especifican aminoácidos diferentes a los que los genes nucleares codifican de manera habitual. En las mitocondrias, el codón UGA no especifica la terminación de la traducción sino que codifica al triptófano. De manera similar, en ciertos protozoarios, UAA y UAG codifican ácido glutámico en lugar de actuar como codones de terminación. La presencia de una secuencia de inserción de selenocisteína (elemento SECIS) en el mRNA también puede determinar que un codón de UGA particular conduzca a la incorporación de selenocisteína (Se-Cys) en lugar de actuar como un codón de detención.

### Marcos de lectura

La secuencia del mRNA puede ser leída por el ribosoma en tres marcos de lectura posibles. Por lo regular, un marco de lectura sólo codifica para una proteína funcional ya que los otros dos marcos de lectura contienen múltiples codones de terminación. En algunos genomas de bacteriófagos, se produce la superposición de genes, la cual usa diferentes marcos de lectura.

### Marcos de lectura abiertos

Un marco de lectura abierto (ORF) es un conjunto de codones que comienza con ATG y termina con un codón de terminación, TGA, TAA o TAG. Las regiones de codificación de los genes contienen ORF relativamente largos, a diferencia del DNA que no codifica, donde los ORF son comparativamente cortos. La presencia de un marco de lectura abierto largo en una secuencia de DNA puede indicar, por lo tanto, la presencia de una región de codificación. El análisis computarizado del ORF puede usarse para deducir la secuencia de la proteína codificada.

|                           |   |                                |
|---------------------------|---|--------------------------------|
| <b>Temas relacionados</b> | (G1) Introducción al RNA                                    | (H2) Traducción en procariotas |
|                           | (G8) Transcripción y procesamiento del RNA ribosómico       | (H3) Traducción en eucariotas  |
|                           | (G9) Transcripción y procesamiento del RNA de transferencia |                                |
|                           |   |                                |

### El código genético es un código de tripletes

Durante la traducción, la secuencia de una molécula de mRNA es leída desde su extremo 5' por los ribosomas, los cuales entonces sintetizan un polipéptido apropiado. Tanto en procariotas como en eucariotas, la secuencia de DNA de un solo gen es colineal con la secuencia de aminoácidos del polipéptido que codifica. En otras palabras, la secuencia de nucleótidos de la cadena codificante del DNA, 5' a 3', especifica exactamente en el mismo orden la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado, del N terminal al C terminal.

La interrelación entre la secuencia de nucleótidos del mRNA y la secuencia de aminoácidos del polipéptido se denomina **código genético**. La secuencia del mRNA

se lee en grupos de tres nucleótidos llamados codones, donde cada codón especifica un aminoácido particular (figura H1-1). Sin embargo, tres codones particulares, UAG, UGA y UAA, no codifican un aminoácido. Siempre que un ribosoma encuentra uno de estos codones, significa que debe terminar la síntesis de la proteína. Por consiguiente, estos tres codones se denominan **codones de terminación** o **codones de detención**. El codón AUG codifica la metionina. Aunque la metionina se encuentra en posiciones internas en las cadenas polipeptídicas, todos los polipéptidos eucariotas comienzan con metionina (sección H3) y todos los polipéptidos procariotas comienzan con una metionina modificada (*N*-formilmetionina; sección H2). En consecuencia, el primer codón AUG que el ribosoma lee en un mRNA se llama **codón de iniciación** o **codón de comienzo**.

Secuencia de codón

|   | 1a. base<br>(Extremo 5')<br>↓ | 2a. base | 3a. base<br>(Extremo 3')<br>↓ |
|---|-------------------------------|----------|-------------------------------|
| U | U                             | C        | A                             |
|   |                               |          | G                             |
|   | Phe                           | Ser      | Tyr                           |
|   | Phe                           | Ser      | Tyr                           |
|   | Leu                           | Ser      | <b>Detención</b>              |
|   | Leu                           | Ser      | <b>Detención</b>              |
|   |                               |          | Trp                           |
| C | Leu                           | Pro      | His                           |
|   | Leu                           | Pro      | His                           |
|   | Leu                           | Pro      | Gln                           |
|   | Leu                           | Pro      | Gln                           |
| A | Ile                           | Thr      | Asn                           |
|   | Ile                           | Thr      | Asn                           |
|   | Ile                           | Thr      | Lys                           |
|   | Met                           | Thr      | Lys                           |
| G | Val                           | Ala      | Asp                           |
|   | Val                           | Ala      | Asp                           |
|   | Val                           | Ala      | Glu                           |
|   | Val                           | Ala      | Glu                           |

Figura H1-1. El código genético.

### Los codones son reconocidos por los anticodones de las moléculas de tRNA

Durante la traducción, a medida que los ribosomas se mueven a lo largo del mRNA, leen un codón por vez. Una **molécula de tRNA** lleva al ribosoma el aminoácido correcto que corresponde al codón. La molécula de tRNA con su aminoácido unido de manera covalente se llama **aminoacil-tRNA**. Como ya se estudió (sección G9), cada molécula de tRNA tiene una estructura secundaria en forma de hoja de trébol. El aminoácido se une de manera covalente al residuo A de la secuencia CCA del extremo 3' del tRNA (figura H1-2a).

La nomenclatura correcta es, por ejemplo, tRNA<sup>Gly</sup> para el tRNA que aceptará la glicina, mientras que el correspondiente aminoacil-tRNA es Gly-tRNA<sup>Gly</sup>, que es el aminoacil-tRNA que se muestra en la figura H1-2a.

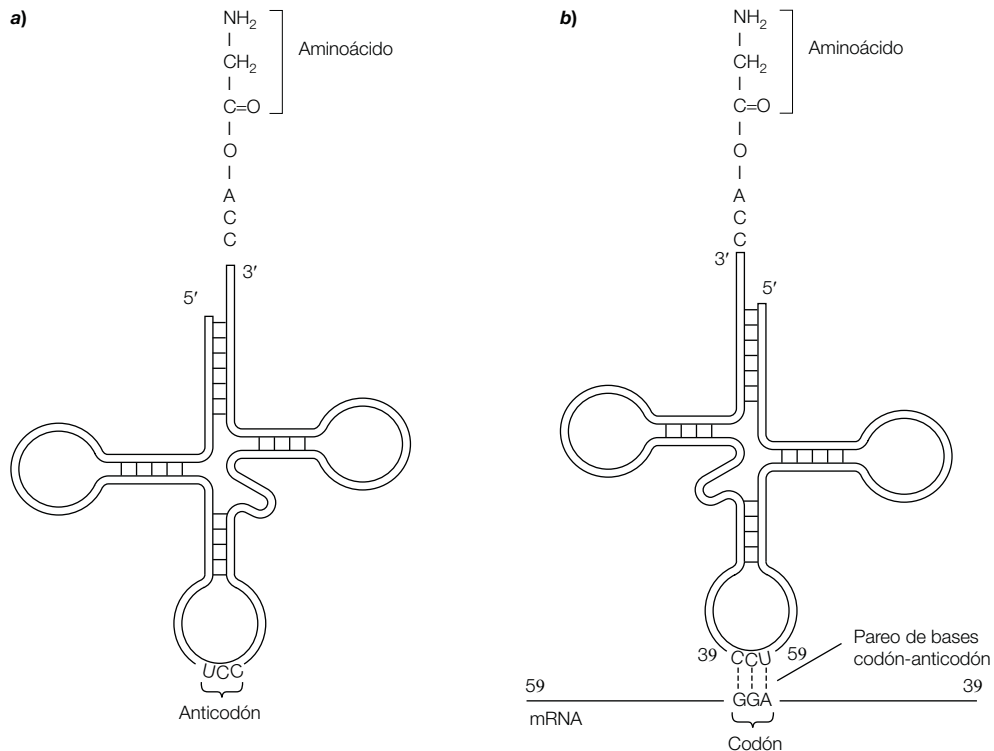
Cada codón de una molécula de mRNA que esté leyendo un ribosoma durante la traducción se une al aminoacil-tRNA correcto debido a que el codón es reconocido por un triplete de bases llamado anticodón integrado en una molécula específica de tRNA (figura H1-2a). De esta forma, el tRNA funciona como una molécula

adaptadora, ya que traduce la secuencia de nucleótidos del mRNA en una secuencia de polipéptidos compuesta por la secuencia correcta de aminoácidos.

Cada base del codón se para con la base complementaria del anticodón. Nótese que la interacción del codón con el anticodón es un enlace de hidrógeno del codón de la molécula de mRNA en una orientación de 5' a 3' con el anticodón del tRNA en una orientación de 3' a 5' (figura H1-2b). Este ordenamiento antiparalelo significa que la primera base del codón se para con la tercera base del anticodón, las segundas bases se corresponden mediante un enlace de hidrógeno y la tercera base del codón establece un enlace de hidrógeno con la primera base del anticodón.

### El código genético es degenerado

Como el RNA está compuesto por cuatro tipos de nucleótidos, hay  $4^3 = 64$  codones posibles, que representan 64 tripletes de nucleótidos posibles con diferentes secuencias. Sin embargo, sólo se encuentran de manera habitual 20 aminoácidos en las proteínas (sección B1), de manera que, en la mayoría de los casos, un solo aminoácido es codificado por varios codones diferentes (figura



**Figura H1-2.** a) Estructura de un aminoacil-tRNA, Gly-tRNA<sup>Gly</sup>. b) Pareo de bases entre codón y anticodón; en la molécula de mRNA (5' a 3'), el codón está unido por enlaces de hidrógeno que se establecen entre las bases apareadas complementarias con el anticodón del tRNA en una orientación 3' a 5'.

H1-1). Se dice, por lo tanto, que el código genético está **degenerado**. En los hechos, sólo la metionina y el triptófano están representados por un solo codón. Los diferentes codones que especifican el mismo aminoácido se llaman **sinónimos**.

Como resultado de la degeneración del código genético, una mutación que cambie un solo nucleótido en el DNA (**mutación puntual**), y que por lo tanto cambie sólo un nucleótido en el correspondiente mRNA, suele carecer de efecto en la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado.

De los 64 codones posibles con un código de tripletes (véase antes), hay tres codones de terminación o detención, y los otros 61 codones se destinan a la codificación de aminoácidos (los llamados codones “**con sentido**”). Las bacterias tienen alrededor de 30 a 45 tRNA diferentes y las células eucariotas tienen hasta 50 tRNA. Varios de estos tRNA tienen anticodones distintos —y por lo tanto reconocen codones diferentes—, pero se unen al mismo aminoácido; éstos se conocen como **tRNA de isoaceptación**. Por ejemplo, existen cuatro tRNA de isoaceptación para la arginina en *E. coli* y éstos se indican usando números en superíndices, por ejemplo, tRNA<sup>Arg1</sup>, tRNA<sup>Arg2</sup>, etcétera.

No obstante, no hay suficientes tRNA de isoaceptación para representar a todos los codones con sentido. Otro aspecto es también importante en este punto. El apareamiento de la tercera base de un codón es menos estricto que el de las primeras dos bases (es decir, hay algunos “**pareos de bases tambaleantes**”), de manera que en algunos casos un solo tRNA puede aparearse con más de un codón. Por ejemplo, el tRNA<sup>Leu3</sup> en *E. coli* tiene el anticodón 3'-GAG-5' y reconoce los codones 5'-CUU-3' y 5'-CUC-3' (es decir, ya sea que esté U o C como la tercera base del codón puede formar el pareo de bases con G, la primera base del anticodón). La tercera posición del codón es, por consiguiente, llamada la **posición tambaleante**.

Juntos, la existencia de tRNA de isoaceptación y el pareo tambaleante permiten a los 61 codones con sentido ser leídos correctamente, es decir, *E. coli* tiene cuatro tRNA isoaceptores de tRNA<sup>Arg</sup> para la lectura de seis codones CGN de arginina (donde N significa cualquiera de los cuatro posibles nucleótidos) y AGA/G.

## Universalidad del código genético

- Por muchos años, se pensó que el código genético era “universal”, esto es, que todos los organismos vivos usaban el mismo código. Ahora se sabe que el código genético es casi el mismo en todos los organismos, pero que existen algunas diferencias.
- Las mitocondrias contienen DNA de doble cadena circular que codifica alrededor de 10 a 20 proteínas. De manera sorprendente, en los **mRNA mitocondriales**, algunos codones tienen diferentes significados que

sus contrapartes del mRNA citosólico. A continuación, se presentan unos pocos ejemplos (N denota a cualquiera de los cuatro nucleótidos A, G, C o U):

mitocondrias de los mamíferos

AUA = Met no a Ile

UGA = Trp no a **Detención**

AGA y AGG = **Detención** no a Arg

mitocondrias de las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*)

AUA = Met no a Ile

UGA = Trp no a **Detención**

CUN = Thr no a Leu

- También se sabe que algunos organismos unicelulares usan un código genético diferente. Por ejemplo:

algunos protozoarios ciliados

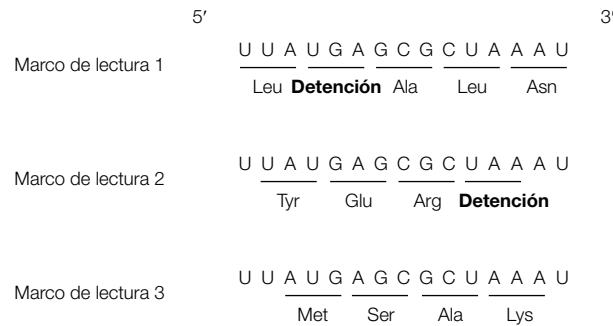
UAA y UAG = Glu no a **Detención**

- En procariontes y eucariotas se producen algunas otras variaciones porque diversas enzimas clave contienen selenocisteína (Se-Cys), en las cuales un átomo de selenio reemplaza al átomo de azufre de la cisteína. Estas proteínas se llaman selenoproteínas (p. ej., las peroxidasas de glutatión, las reductasas de glicina). No hay un codón que codifique sólo Se-Cys. En su lugar, el mRNA contiene una secuencia llamada secuencia de inserción de selenocisteína (elemento SECIS), que determina que un codón UGA particular incorpore Se-Cys en lugar de actuar como un codón de detención.

## Marcos de lectura

Como la secuencia de una molécula de mRNA es leída en grupos de tres nucleótidos (codones) desde el extremo 5', puede leerse en tres posibles **marcos de lectura**, lo que depende de qué nucleótido se use como la primera base del primer codón (figura H1-3). Por lo regular, sólo un marco de lectura (marco de lectura 3 en la figura H1-3) produce una proteína funcional, dado que los otros dos marcos de lectura incluyen varios codones de terminación (**Detención**). *In vivo*, el ribosoma selecciona el marco de lectura correcto al reconocer el codón de iniciación, AUG, al inicio de la secuencia de codificación.

De manera usual, una secuencia de bases codifica una sola proteína. Pese a ello, en algunos DNA de los bacteriófagos, se superponen numerosos genes, y cada uno de los genes está en un marco de lectura diferente. Esta organización de **genes superpuestos** sucede por lo general cuando el tamaño del genoma es más pequeño que el que puede albergar los genes necesarios para la estructura y ensamble del fago usando sólo un marco de lectura.



**Figura H1-3.** Tres marcos de lectura potenciales de cualquier secuencia de mRNA, dependiendo del nucleótido que se lea primero.

### Marcos de lectura abiertos

En muchos casos en estos días, la proteína codificada por un gen particular se deduce por clonación (sección I4) y después por la secuenciación del DNA correspondiente. A continuación, se explora la secuencia del DNA mediante un programa de computadora para identificar los conjuntos de codones que comienzan con ATG y terminan con TGA, TAA o TAG. Estos conjuntos de codones se llaman **marcos de lectura abiertos (ORF)** e identifican regiones de codificación potenciales.

Debido a que los genes desarrollan importantes funciones celulares, la secuencia del DNA codificante (y de importantes secuencias reguladoras) se conservó con más firmeza en la evolución que los DNA no codificantes. En particular, las mutaciones pueden conducir a la creación de codones de terminación dentro de la región codificante y por lo tanto la terminación prematura durante la traducción se selecciona por contraste. Esto significa que las regiones de genes codificantes contienen

con frecuencia ORF comparativamente largos, mientras que en los DNA no codificantes los tripletes correspondientes a los codones de terminación no se seleccionan por contraste y los ORF son comparativamente cortos. Por consiguiente, cuando se analizan los ORF desplegados por un particular DNA clonado, suele ser cierto que un ORF largo tiene más probabilidades de ser un DNA que codifica, mientras que es probable que los ORF cortos no lo sean. No obstante, se puede estar seguro de que algunos exones pueden ser cortos y de esta manera algunos ORF cortos pueden ser también de DNA codificante. El análisis por computadora puede detectar esto mediante la detección de las secuencias conservadas en los límites entre el exón y el intrón y la secuencia en el punto de ramificación de corte y empalme (sección G7). Para finalizar, al referirse al código genético, el análisis por computadora puede predecir la secuencia de proteínas codificada por cada ORF. Esto se denomina **secuencia de proteínas deducida**.

# H2 Traducción en procariotas

## Notas clave

|   |   |
|---|---|
| <b>Descripción</b>                            | Durante la traducción, el mRNA es leído en dirección 5' a 3' y las proteínas se sintetizan en una dirección N terminal a C terminal. La transcripción se basa en los aminoacil-tRNA que transportan a aminoácidos específicos y reconocen los codones correspondientes en el mRNA por el apareamiento de bases entre el anticodón y el codón. La traducción tiene lugar en tres fases: iniciación, elongación y terminación.  |
| <b>Síntesis de aminoacil-tRNA</b>             | Cada molécula de tRNA tiene una estructura secundaria en forma de hoja de trébol que consiste en tres tallos-asas, uno de los cuales es portador del anticodón en su extremo. Los aminoácidos se unen de manera covalente al grupo 2'-OH o al 3'-OH en el extremo 3' por una aminoacilsintetasa clase I o clase II, respectivamente, para formar aminoacil-tRNA. La reacción, llamada activación del aminoácido, sucede en dos pasos y requiere ATP para formar un intermediario, el aminoaciladenilato.  |
| <b>Iniciación de la síntesis de proteínas</b> | Cada ribosoma procariota tiene tres sitios de unión del tRNA; un sitio A donde el aminoacil-tRNA entrante se une, un sitio P donde está unido el tRNA enlazado a la cadena polipeptídica en crecimiento, y el sitio E, donde el tRNA se une antes de ser liberado del ribosoma. La traducción en los procariotas comienza por la formación de un complejo de iniciación de 30S entre la subunidad ribosómica de 30S, mRNA, factores de iniciación y fMet-tRNA <sub>f</sub> <sup>Met</sup> . La subunidad de 30S se une a la secuencia de Shine-Dalgarno, la cual se encuentra a 5' del codón de inicio AUG y es complementaria del rRNA de 16S de la subunidad ribosómica pequeña. Luego el ribosoma se mueve en dirección 3' a lo largo del mRNA hasta que encuentra el codón AUG. La subunidad ribosómica de 50S se une entonces al complejo de iniciación de 30S para formar el complejo de iniciación de 70S. En este complejo, el anticodón del fMet-tRNA <sub>f</sub> <sup>Met</sup> parea sus bases con el codón de iniciación AUG (codón de inicio) en el sitio P.  |
| <b>Elongación</b>                             | El ciclo de elongación consta de tres pasos: unión de aminoacil-tRNA, formación del enlace peptídico y translocación. En el primer paso, el aminoacil-tRNA correspondiente al segundo codón se une al sitio A del ribosoma como un complejo de aminoacil-tRNA/EF-Tu/GTP. Después del correcto apareamiento de bases entre el anticodón del tRNA y el codón del mRNA, el GTP se hidroliza y se libera EF-Tu/GBP. El EF-Tu se regenera a través del ciclo de intercambio EF-Tu/EF-Ts. La peptidiltransferasa cataliza la formación de enlaces peptídicos entre el C terminal del residuo aminoacil en el sitio P y el grupo amino del aminoacil-tRNA en el sitio A. En el paso final (translocación), el EF-G/GTP se une al ribosoma, el desacilado tRNA se mueve del sitio P al sitio E, el dipeptidil-tRNA que está en el sitio A se mueve hacia el sitio P y el ribosoma se mueve a lo largo del mRNA para colocar el siguiente codón en el sitio A. El GTP es hidrolizado a GDP y fosfato inorgánico. Cuando el siguiente aminoacil-tRNA se une al sitio A en la ronda de elongación subsecuente, el tRNA desacilado se libera del sitio E. |
| <b>Terminación</b>                            | La aparición de un codón de terminación (detención) UAA o UAG en un sitio A causa la liberación del factor RF-1, que se une donde RF-2 reconoce UGA. El RF-3 ayuda a RF-1 y RF-2. Los factores liberados provocan que la peptidiltransferasa transfiera el polipéptido a una molécula de agua en lugar de hacerlo al aminoacil-tRNA. El polipéptido, el mRNA y el tRNA libre abandonan el ribosoma, que se disocia en sus subunidades listo para comenzar una nueva ronda de traducción.  |

**Temas relacionados**

(G1) Introducción al RNA  
 (G2) Transcripción en procariotas  
 (G3) Operones  
 (G4) Transcripción en eucariotas: descripción  
 (G5) Transcripción de genes que codifican proteínas en eucariotas  
 (G6) Regulación de la transcripción por la polimerasa II de RNA

(G7) Procesamiento del pre-mRNA en eucariotas  
 (G8) Transcripción y procesamiento del RNA ribosómico  
 (G9) Transcripción y procesamiento del RNA de transferencia  
 (H1) El código genético  
 (H3) Traducción en eucariotas

**Descripción**

De manera habitual, los ribosomas existen en subunidades separadas que se juntan para formar un ribosoma cuando se unen a un mRNA cerca de su extremo 5'. El ribosoma lee la secuencia de nucleótidos en la dirección 5' a 3', tras lo cual sintetiza la correspondiente proteína a partir de los aminoácidos en la dirección N terminal (amino terminal) a C terminal (carboxilo terminal). Los aminoácidos que se utilizan están unidos de manera covalente a las moléculas del tRNA (RNA de transferencia) para formar aminoacil-tRNA. Cada aminoacil-tRNA transporta un triplete de bases llamado **anticodón**. El ribosoma lee cada triplete de un codón de mRNA por vez y una molécula de aminoacil-tRNA con un anticodón que es complementario del codón se une a éste mediante enlaces de hidrógeno. A continuación se forma un enlace peptídico entre el aminoácido entrante y el extremo en crecimiento de la cadena de polipéptido.

En general, la síntesis de proteínas (o **traducción**) tiene lugar en tres etapas: **iniciación**, **elongación** y **terminación**. Durante la iniciación se forma el complejo mRNA-ribosoma y el primer codón (siempre AUG) se une al primer aminoacil-tRNA (llamado **tRNA iniciador**). Durante la fase de elongación, los otros codones se leen en forma secuencial y el polipéptido crece por la adición de aminoácidos a su extremo C terminal. Este proceso continúa hasta que se llega a un codón de terminación (codón de detención), el cual carece del aminoacil-tRNA correspondiente con el cual parearse. En este punto, la síntesis de proteínas cesa (fase de terminación) y el polipéptido concluido se libera del ribosoma. Por lo regular, en cualquier momento, muchos ribosomas se hallan traduciendo un mRNA de manera simultánea, lo que forma una estructura denominada **polirribosoma** o **polisoma**.

**Síntesis de aminoacil-tRNA**

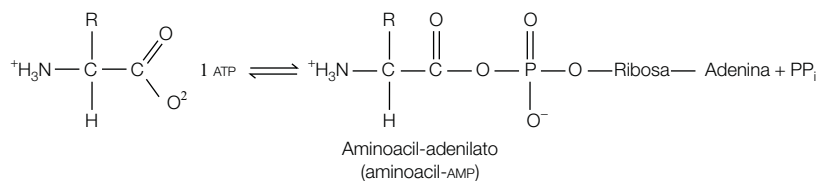
La síntesis de aminoacil-tRNA tiene importancia crucial por dos razones. Primero, cada aminoácido debe unirse en forma covalente a una molécula de tRNA con el fin de tomar parte en la síntesis de proteínas, la cual depende de la función “adaptadora” del tRNA para asegurar que se incorporan los aminoácidos correctos. Segundo, el enlace covalente que se forma entre el aminoácido y el tRNA es un enlace de alta energía que permite que el aminoácido reaccione con el extremo final de la cadena polipeptídica en crecimiento para formar un nuevo enlace peptídico. Por esta razón, la síntesis de aminoacil-tRNA también se refiere como una **activación de aminoácidos**. Los aminoácidos que no se unen al tRNA no pueden agregarse al polipéptido en crecimiento.

La función de un aminoacil-tRNA es catalizada por una enzima denominada **sintetasa de aminoacil-tRNA**. Existe una sintetasa de aminoacil-tRNA exclusiva para cada aminoácido, por lo que hay 20 sintetetas en total. La reacción de síntesis se produce en dos pasos.

1. El primer paso es la reacción de un aminoácido y un ATP para formar un **aminoacil-adenilato** (también conocido como **aminoacil-AMP**) (véase la reacción al final de la página).
2. En el segundo paso, sin abandonar la enzima, el grupo aminoacil del aminoacil-AMP se transfiere a la adenosina terminal del extremo 3' de la molécula de tRNA para formar aminoacil-tRNA:



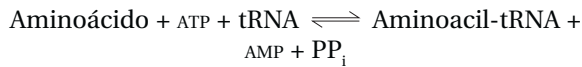
Esto sucede mediante la formación de un enlace éster entre el grupo -COOH del aminoácido y el 2'-OH o 3'-OH de la ribosa de la adenosina. Si se usa el 2'-OH o el 3'-OH depende del tipo de sintetasa de aminoacil-tRNA que interviene en la reacción; las sintetetas de



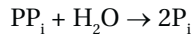


aminoacil-tRNA clase I fijan el aminoácido en el grupo 2'-OH y las sintetetas de aminoacil-tRNA clase II usan el grupo 3'-OH.

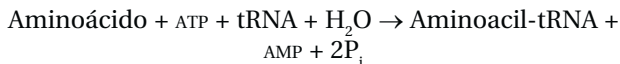
La suma de estas dos reacciones es:



La reacción continúa hasta completarse (es decir, la síntesis de aminoacil-tRNA) por la hidrólisis subsecuente del pirofosfato (PP<sub>i</sub>) a fosfato inorgánico (P<sub>i</sub>):



La reacción general es como sigue:



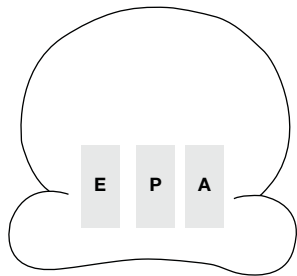
### Iniciación de la síntesis de proteínas

Cada ribosoma procarriota, se muestra de manera esquemática en la figura H2-1 (véase la sección G8 para mayores detalles de la estructura del ribosoma), tiene tres sitios de unión de los tRNA. El **sitio de unión del aminoacil-tRNA** (o **sitio A**) es donde, durante la elongación, se une el aminoacil-tRNA entrante. El **sitio de unión del peptidil-tRNA** (o **sitio P**) es donde se une el tRNA enlazado a la cadena polipeptídica en crecimiento. El **sitio de salida** (o **sitio E**) es el sitio de unión para el tRNA después de su papel en la traducción y antes de su liberación del ribosoma.

Los tres sitios (A, P y E) están formados por moléculas de rRNA del ribosoma (sección G8) y unen las subunidades ribosómicas grandes y pequeñas; la interacción entre anticodón y codón se relaciona con la subunidad pequeña, en tanto que la parte aminoacil del tRNA se vincula con la subunidad grande.

Nótese que el sitio E es único para los ribosomas procarriotas. Los ribosomas eucariotas no tienen un sitio de salida; el tRNA se limita a disociarse del ribosoma después de ser usado.

El primer codón traducido en todos los mRNA es AUG, el cual codifica la metionina. El AUG se llama **codón de**



**Figura H2-1.** Esquema de un ribosoma procarriota de 70S en el que se muestra el sitio peptidil-tRNA (sitio P), el sitio aminoacil-tRNA (sitio A) y el sitio de salida (sitio E).

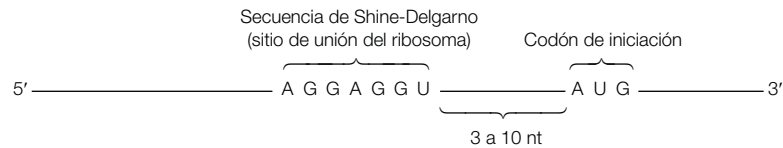
**inicio** o **codón de iniciación**. De manera natural, también pueden presentarse otros codones AUG en la parte interna del mRNA, donde codifican residuos de metionina internos de las proteínas. Participan dos tRNA diferentes en estos dos tipos de codones AUG; el tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup> se usa para el codón de iniciación y se llama **tRNA iniciador**, mientras que el tRNA<sub>m</sub><sup>Met</sup> se utiliza para los codones AUG internos. En procarriotas, el primer aminoácido de una nueva proteína es **N-formilmietionina** (abreviado, **fMet**). Por consiguiente, el aminoacil-tRNA usado en la iniciación es **fMet-tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup>**, el cual se abrevia fMet-tRNA<sub>f</sub>.

El uso de *N*-formilmietionina, que tiene un grupo formilo (-COH) fijo a su grupo amino, evita que el grupo amino participe en la formación de un enlace peptídico. De esta manera, sólo el grupo carboxilo de la *N*-formilmietionina puede formar un enlace peptídico, y esto asegura que la síntesis polipeptídica ocurra en la dirección N a C (sección H1).

Resulta esencial que se use el AUG correcto como el codón de iniciación, dado que éste coloca el marco de lectura correcto para la traducción (sección H1). Una corta secuencia rica en purinas (5'-AGGAGGU-3'), llamada **secuencia de Shine-Delgarno**, se ubica en 5' del codón de iniciación AUG (figura H2-2) y es complementaria con parte del rRNA de 16S en la subunidad ribosómica pequeña, denominada **secuencia anti-SD**. La subunidad ribosómica de 30S se une a la secuencia de Shine-Delgarno y migra en dirección 3' a lo largo del mRNA hasta que encuentra el codón de inicio AUG. Por lo tanto, la secuencia de Shine-Delgarno libera la subunidad ribosómica hacia el AUG correcto para iniciar la traducción.

La iniciación de la síntesis de proteínas requiere proteínas llamadas **factores de iniciación (IF)**. En procarriotas, son esenciales tres factores de iniciación (IF-1, IF-2 e IF-3). Debido a la complejidad del proceso, el orden exacto de unión de los componentes, y en particular de IF-1, todavía no se conoce. Un modelo actual se muestra en la figura H2-3 y se describe más adelante.

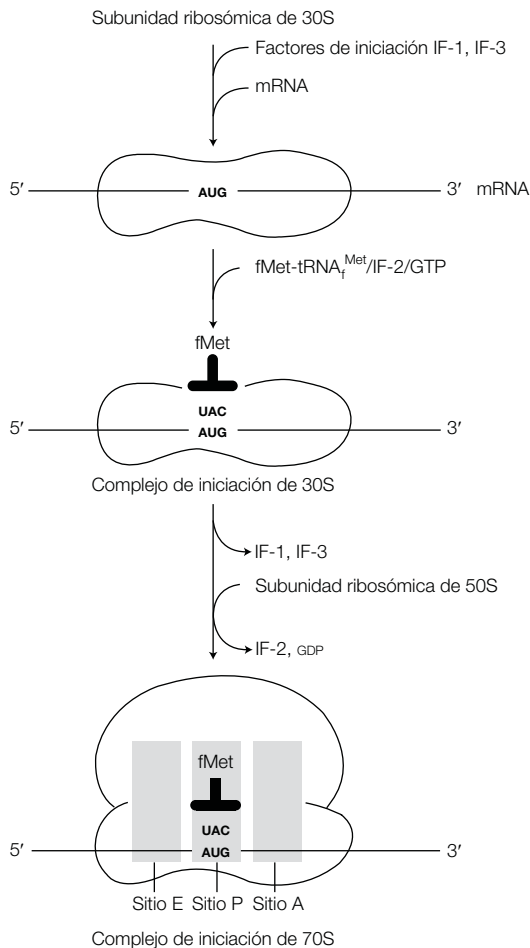
- La iniciación comienza con la unión de IF-1 e IF-3 a la subunidad ribosómica pequeña (de 30S). La unión de IF-3 detiene la unión de la subunidad de 30S a la subunidad de 50S en ausencia de mRNA y de fMet-tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup>, lo cual podría resultar en un ribosoma afuncional.
- En ese momento, la subunidad pequeña se une al mRNA a través de la secuencia de Shine-Delgarno y se mueve 3' a lo largo del mRNA hasta que localiza al codón de iniciación AUG.
- Luego se une el iniciador de tRNA cargado con *N*-formilmietionina en un complejo con IF-2 y GTP (fMet-tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup>/IF-2/GTP).
- Este complejo de mRNA, fMet-tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup>, IF-1, IF-2, IF-3 y la subunidad ribosómica de 30S se llama **complejo de iniciación 30S**.



**Figura H2-2.** La secuencia de Shine-Delgarno en el mRNA procariota.

- IF-1 e IF-3 son liberados.
- A continuación se une la subunidad ribosómica grande (50S). El GTP unido a IF-2 es hidrolizado a GDP y P<sub>i</sub>, y desencadena la liberación de IF-2. La estructura resultante es un **complejo de iniciación 70S**.

Otro aspecto importante a destacar es que, a diferencia de todas las otras moléculas de aminoacil-tRNA (las cuales se unen al sitio A; véase más adelante), la unión de fMet-tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup> se produce directamente en el sitio P.



**Figura H2-3.** Iniciación de la síntesis de proteínas en las células procariotas.

## Elongación

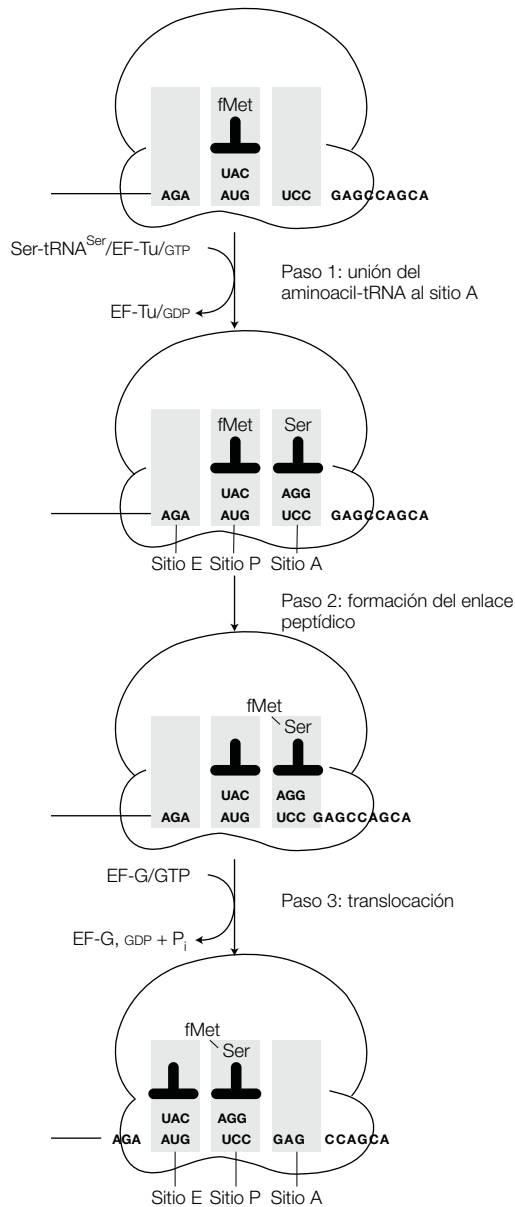
Al comienzo de la primera ronda de elongación (figura H2-4), el codón de iniciación (AUG) se posiciona en el sitio P con fMet-tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup> unido al mismo a través del pareo de bases entre codón y anticodón. El siguiente codón del mRNA se posiciona en el sitio A. La elongación de la cadena polipeptídica se produce en tres pasos llamados el **ciclo de elongación**, es decir, la **unión de aminoacil-tRNA**, la **formación del enlace peptídico** y la **translocación**:

1. **Unión de aminoacil-tRNA:** es el primer paso, el correspondiente aminoacil-tRNA para el segundo codón se une al sitio A a través de la interacción entre codón y anticodón (figura H2-4). Pero la unión del aminoacil-tRNA no es un proceso pasivo, se requiere el **factor de elongación EF-Tu** (el cual es una GTP-asa) y GTP. Éstos se unen al aminoacil-tRNA para formar un complejo de aminoacil-tRNA/EF-Tu/GTP, el cual libera el aminoacil-tRNA al sitio A. Si el anticodón del aminoacil-tRNA forma pares de bases correctos con el codón, el GTP es hidrolizado a GDP, el aminoacil-tRNA es transferido al ribosoma y el EF-Tu es liberado como EF-Tu/GBP (figura H2-4). Sin embargo, si el anticodón y el codón noorean bases de manera correcta, no se produce la hidrólisis del GTP y el aminoacil-tRNA no se transfiere al ribosoma.

Antes de que la molécula de EF-Tu pueda catalizar la unión de otro tRNA cargado al ribosoma, debe regenerarse en un proceso que incluye otro factor de elongación, **EF-Ts**. Esta regeneración se denomina **ciclo de intercambio EF-Tu-EF-Ts** (figura H2-5). Primero, el EF-Ts se une a EF-Tu y desplaza al GDP. Luego, el GTP se une al EF-Tu y desplaza al EF-Ts. El EF-Tu/GTP se encuentra listo en ese momento para tomar parte en otra ronda de elongación.

Nótese que el EF-Tu no se une a fMet-tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup>, lo que evita que el tRNA iniciador se una al sitio A y detenga la unión de los codones AUG internos al tRNA iniciador. En contraste, el IF-2 se une al fMet-tRNA<sub>f</sub><sup>Met</sup> pero no a Met-tRNA<sub>m</sub><sup>Met</sup> (o a cualquier otro aminoacil-tRNA), lo que significa que, de todos los tRNA disponibles, sólo tiene lugar la colocación del tRNA iniciador en el sitio P en respuesta a un codón de iniciación AUG.

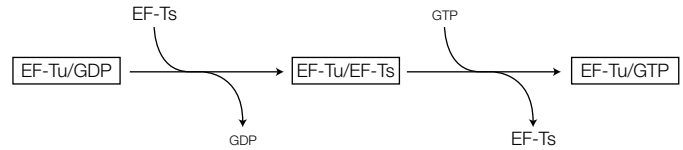
2. **Formación del enlace peptídico:** el segundo paso, la formación del enlace peptídico, es catalizado por



**Figura H2-4.** Fase de elongación de la síntesis de proteínas en los procariotas.

la **peptidiltransferasa**. En esta reacción, el extremo carboxilo del aminoácido unido al tRNA en el sitio P es desacoplado del tRNA y se une por un enlace peptídico al grupo amino del aminoácido ligado al tRNA en el sitio A (figura H2-4). Nunca se ha aislado una proteína con actividad de peptidiltransferasa. Ahora, esta razón está clara; en *E. coli*, cuando menos, la actividad de peptidiltransferasa se asocia con parte del rRNA de 23S de la unidad ribosómica grande. En otras palabras, la peptidiltransferasa es una **ribozima**, una actividad catalítica que radica en una molécula de RNA (sección G8).

3. **Translocación:** en el tercer paso, un complejo de **factor de elongación EF-G** (también llamado **translocasa**) y



**Figura H2-5.** Ciclo de intercambio EF-Tu-EF-Ts.

GTP (es decir EF-G/GTP) se une al ribosoma. En este momento se producen tres movimientos concertados, que de manera colectiva se llama **translocación**:

- El tRNA desacylado se mueve desde el sitio P al sitio E
- El dipeptidil-tRNA del sitio A se mueve hacia el sitio P
- El ribosoma se mueve a lo largo del mRNA (5' a 3') por tres nucleótidos para colocar el siguiente codón en el sitio A

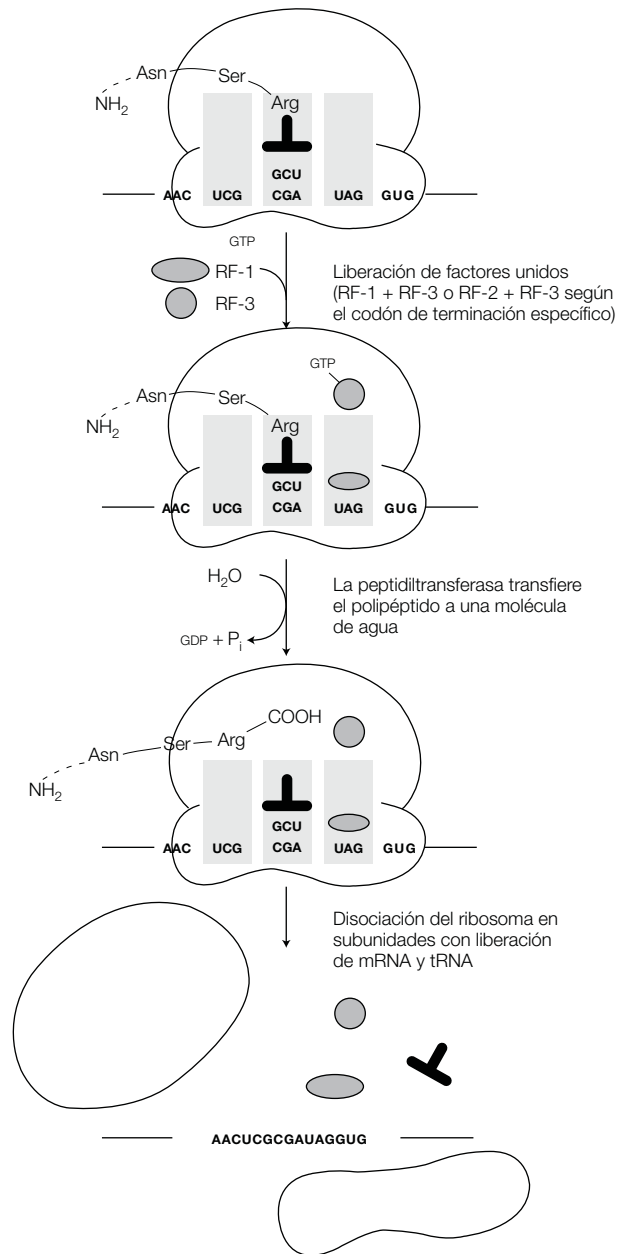
Durante los sucesos de la translocación, el GTP es hidrolizado a GDP y un fosfato inorgánico, y EF-G es liberado listo para unirse a más GTP en una nueva ronda de elongación.

Después de la translocación, el sitio A está vacío y listo para recibir el siguiente aminoacil-tRNA. El sitio A y el sitio E no pueden ser ocupados de manera simultánea. Por consiguiente, el tRNA desacylado debe ser liberado del sitio E antes de que el siguiente aminoacil-tRNA se una al sitio A para iniciar una nueva ronda de elongación.

La elongación continúa mediante la añadidura de un aminoácido al extremo C terminal del polipéptido en crecimiento por cada codón leído, con el peptidil-tRNA en un movimiento continuo de ida y vuelta desde el sitio P al sitio A a medida que crece.

## Terminación

Al final, uno de los tres **codones de terminación** (también llamados **codones de detención**) se posiciona en el sitio A (figura H2-6). Éstos son UAG, UAA y UGA. A diferencia de otros codones, las células procariotas no contienen aminoacil-tRNA complementarios para codones de detención. En su lugar, uno de los dos **factores de liberación (RF-1 y RF-2)** se une en su reemplazo. El RF-1 reconoce UAA y UAG, mientras que el RF-2 reconoce UAA y UGA. Un tercer factor de liberación, **RF-3**, también es necesario para asistir a RF-1 o RF-2 en su interacción con el ribosoma. Por lo tanto, ya sea RF-1 + RF-3 o RF-2 + RF-3, la unión depende del codón de terminación exacto en el sitio A. El RF-1 (o RF-2) se une en el sitio A o cerca del mismo, mientras que el RF-3/GTP se une en cualquier sitio del ribosoma. Los factores de liberación determinan que la actividad de la peptidiltransferasa se transfiera del polipéptido a una molécula de agua en lugar de hacerlo a un aminoacil-tRNA, y separan efectivamente el enlace entre el polipéptido y el tRNA en el sitio P.



**Figura H2-6.** Terminación de la síntesis de proteínas en células procariotas.

Para comprender esto, es importante advertir que, de manera normal, el ribosoma excluye al agua del centro de reacción porque de otro modo ésta podría hidrolizar el enlace éster peptidil-tRNA y provocar la liberación prematura del polipéptido. Los factores de liberación parecen trabajar para permitir que una molécula de agua

acceda al centro de reacción de la peptidiltransferasa, de manera que se produzca la hidrólisis. El polipéptido libre deja al ribosoma, seguido por el mRNA y el tRNA libre, y el ribosoma se disocia en sus subunidades 30S y 50S listo para comenzar la traducción otra vez.

# H3 Traducción en eucariotas

## Notas clave

### Iniciación por exploración

Los ribosomas eucariotas son más grandes (80S) y más complejos que los ribosomas procariotas (70S). La iniciación es básicamente similar en procariotas y eucariotas, excepto que en estos últimos se han identificado cuando menos 13 factores de iniciación (tres factores en los procariotas), el aminoácido de iniciación es metionina (*N*-formilmetionina en procariotas) y que la mayor parte de los mRNA eucariotas no contienen sitios de unión internos del ribosoma, de manera que el codón de iniciación AUG se detecta por exploración del ribosoma desde el extremo 5' en reemplazo de lo anterior. En los eucariotas, la iniciación mediante exploración incluye la formación de un complejo de preiniciación entre la subunidad ribosómica 40S, un complejo ternario de metionina-tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub>/factor de iniciación eucariota (eIF)-2/GTP y eIF-1, eIF-1A y eIF-3. El complejo de preiniciación se fija al extremo 5' del mRNA al interactuar con el eIF-4, que se une al casquete 5'. Este complejo unido al extremo 5' se llama complejo de iniciación. A continuación, este complejo explora a lo largo del mRNA para localizar el codón de iniciación AUG (con frecuencia contenido en una secuencia corta denominada consenso Kozak). La subunidad ribosómica de 60S se une ahora para formar el complejo de iniciación de 80S.

### Iniciación sin exploración

Algunos mRNA derivados de genes que codifican proteínas eucariotas, así como el RNA del picornavirus, contienen sitios internos para entrada del ribosoma (IRES) y la iniciación de la síntesis de las proteínas puede suceder sin ninguna exploración.

### Elongación

La elongación en eucariotas requiere tres factores de iniciación eucariotas que tienen funciones similares a las de las proteínas procariotas correspondientes.

### Terminación

Un factor de liberación eucariota, eRF-1, reconoce los tres codones de terminación, pero necesita asistencia por parte del eRF-3.

### Temas relacionados

- |   |   |
|---|---|
| (G1) Introducción al RNA  | (G7) Procesamiento del premRNA eucariota                    |
| (G2) Transcripción en procariotas                                 | (G8) Transcripción y procesamiento del RNA ribosómico       |
| (G3) Operones   | (G9) Transcripción y procesamiento del RNA de transferencia |
| (G4) Transcripción en eucariotas: descripción                     | (H1) El código genético                                     |
| (G5) Transcripción de genes que codifican proteínas en eucariotas | (H2) Traducción en procariotas                              |
| (G6) Regulación de la transcripción de la polimerasa II de RNA    |   |

## Iniciación por exploración

El mecanismo general de la síntesis de proteínas en eucariotas es básicamente el mismo que en los procariotas, con tres fases definidas como iniciación, elongación y terminación. Sin embargo, hay algunas diferencias significativas, en particular durante la iniciación.

unidades de 30S y 50S, un ribosoma eucariota tiene un coeficiente de sedimentación de 80S con subunidades de 40S y 60S (G8). La composición de las subunidades ribosómicas eucariotas también es más compleja que las subunidades procariotas (sección G8), pero la función de cada subunidad es en esencia la misma que en los procariotas.

- En tanto que un ribosoma procariota tiene un coeficiente de sedimentación (sección G8) de 70S y sub-
- En casi todos los casos, cada mRNA eucariota tiene sólo un sitio de iniciación y por consiguiente codifica

una sola proteína. En los procariotas, muchos mRNA son **policistrónicos**, esto es, que codifican numerosas proteínas. Cada secuencia de codificación en un mRNA procariota tiene sus propios codones de iniciación y terminación.

- La iniciación de la síntesis de proteínas en eucariotas incluye muchos más factores de iniciación que en los procariotas; cuando menos, se han reportado 13 diferentes **factores de iniciación eucariotas (eIF)** (cuadro H3-1) comparados con los tres factores de iniciación (IF) de los procariotas (sección H2).
- En los eucariotas, el aminoácido de iniciación es **metionina**, no *N*-formilmetionina como en los procariotas.
- Como los procariotas, se requiere un iniciador especial de tRNA para la iniciación y es distinto del tRNA que reconoce y se une a los codones de la metionina en posiciones internas del mRNA. Cuando está cargado con metionina y listo para comenzar la iniciación, esto se conoce como **Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>** (donde “i” significa iniciación).
- La principal diferencia entre iniciación de la traducción en procariotas y eucariotas es que en las bacterias una secuencia de Shine-Dalgarno (sección H2) se sitúa a 5' del codón de iniciación AUG y es el sitio de unión de la subunidad ribosómica 30S, lo que marca a este AUG como el único que se puede usar en la iniciación, en lugar de cualquier otro AUG interno del mRNA. El complejo de iniciación se ensambla directamente sobre este codón de iniciación. En contraste, la mayor parte de los mRNA eucariotas carecen de sitios de unión internos para el ribosoma. En su lugar, una unidad ribosómica de 40S se fija al extremo 5' del mRNA y se mueve corriente abajo (es decir en la dirección 5' a 3') hasta que encuentra el codón de iniciación AUG. Este proceso se denomina **exploración**.

Los detalles completos de la iniciación en eucariotas todavía no se conocen por completo, pero en forma amplia el proceso sucede como sigue.

1. El primer paso es la formación de un **complejo de preiniciación**, que consiste en la subunidad ribosómica pequeña de 40S, un llamado “complejo ternario” de Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, eIF-2 y GTP, y los factores de iniciación eIF-1, eIF-2 y eIF-3.
2. El complejo de preiniciación se une luego al extremo 5' del mRNA eucariota. Esta unión requiere **eIF-4** (un complejo de eIF-4A, eIF-4E y eIF-4G), también llamado **complejo de unión del casquete**. El complejo de unión del casquete se une al casquete 5' del mRNA y de esta manera fija al complejo de preiniciación en el extremo 5' del mRNA. Una vez unido al extremo 5', este complejo pasa a llamarse **complejo de iniciación**.

La cola poli(A) presente en el extremo 3' de la mayoría de los mRNA eucariotas también puede influir en la iniciación. Parece ser que esto se logra por la interacción entre eIF-4 y la **proteína de unión de poli(A)**, la cual se fija a la cola poli(A), lo que por supuesto implica que el mRNA se dobla hacia atrás sobre sí mismo para formar una molécula circular que permite que esta interacción se produzca. El papel de esta interacción no está suficientemente claro, pero la existencia de una cola poli(A) y por lo tanto de un extremo 3' del mRNA intacto puede facilitar la iniciación.

3. El complejo de iniciación se mueve a continuación a lo largo del mRNA en dirección 5' a 3' hasta que localiza el codón de iniciación AUG (es decir, exploración). El codón de iniciación suele ser reconocible debido a que con frecuencia (pero no siempre) contiene una secuencia corta denominada **consenso de Kozack** (5'-ACCAUGG-3'). Las regiones sin traducir 5' de los mRNA eucariotas varían en longitud, pero pueden ser de varios cientos de nucleótidos de largo y pueden contener estructuras secundarias como las asas

**Cuadro H3-1. Comparación de factores para la síntesis de proteínas en procariotas y eucariotas.**

| Procariotas                                 | Eucariotas  | Función  |
|---|---|--|
| Factores de iniciación<br>IF-1, IF-2, IF-3  | Cuando menos, 13 factores de iniciación; identificados hasta ahora: eIF-1, eIF-1A, eIF-2, eIF-2B, eIF-3, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4E, eIF-4F, eIF-4G, eIF-4H, eIF-5, eIF-6 | Los factores individuales tienen funciones que difieren entre procariotas y eucariotas (consúltese el texto) |
| Factores de elongación<br>EF-Tu             | eEF-1 $\alpha$  | Liberación de aminoacil-tRNA hacia el ribosoma   |
| EF-Ts                                       | eEF-1 $\beta\gamma$   | Reciclamiento de EF-Tu o EF-1 $\alpha$   |
| EF-G  | eEF-2   | Translocación  |
| Factores de terminación<br>RF-1, RF-2, RF-3 | eRF-1, eRF-3  | Liberación de la cadena polipeptídica  |

en horquilla. El eIF-4A, y tal vez también el eIF-4B, es una helicasa de RNA dependiente de ATP que desenrolla cualquier estructura secundaria, lo que permite al complejo de inicio pasar a lo largo del mRNA.

4. Cuando el complejo se posiciona sobre el codón de iniciación, la subunidad ribosómica grande de 60S se une para formar un **complejo de iniciación de 80S**, un paso que requiere la hidrólisis de GTP y lleva a la liberación de varios factores de iniciación.

### Iniciación sin exploración

Un grupo de virus llamado **picornavirus** (que incluye al virus del resfriado común [rinovirus]) que infecta células eucariotas tiene genomas de RNA sin casquetes. Estos genomas de RNA se traducen como mRNA y usan un **sitio interno de entrada para el ribosoma** (IRES, *internal ribosome entry site*). Las secuencias IRES de diferentes picornavirus son más variables que las secuencias Shine-Dalgarno en procariotas, pero funcionan de una manera similar, ya que permiten que la iniciación se produzca en la parte interna del mRNA.

Ahora también se sabe que algunos mRNA derivados de genes eucariotas que codifican proteínas contienen IRES,

por ejemplo, la proteína de unión de la cadena pesada de las inmunoglobulinas de mamíferos. En estos casos, en consecuencia, la iniciación puede producirse sin exploración.

### Elongación

La etapa de elongación de la traducción en eucariotas requiere tres factores de elongación, **eEF-1 $\alpha$** , **eEF-1 $\beta\gamma$**  y **eEF-2**, los cuales tienen funciones similares a los de sus contrapartes procariotas EF-Tu, EF-Ts y EF-G (cuadro H3-1).

Durante la elongación en las bacterias, el tRNA desacilado en el sitio P se mueve hacia el sitio E antes de abandonar el ribosoma (sección H2). En contraste, los ribosomas eucariotas parecen no tener un sitio E y el tRNA desacilado se expulsa directamente desde el ribosoma.

### Terminación

Los eucariotas tienen sólo un factor de liberación (eRF-1) que reconoce los tres codones de terminación (UAA, UAG y UGA). Un segundo factor de liberación, eRF-3, puede contribuir con eRF-1 para que concluya la traducción (cuadro H3-1).

# H4 Direccionamiento de proteínas

## Notas clave

### Descripción

Tanto en procariotas como en eucariotas, las proteínas de reciente síntesis deben liberarse en una localización celular específica o secretarse desde las células para su correcta actividad. Este fenómeno se llama direccionamiento de la proteína.

### Proteínas secretoras

Las proteínas secretoras tienen un péptido señal N terminal, el cual determina que la proteína se sintetice en el RER. El péptido señal es reconocido por el SRP, el cual dirige al complejo mRNA-ribosoma hacia el receptor SRP situado sobre la membrana del RER. El SRP se disocia y es reciclado, lo que permite que la cadena polipeptídica en crecimiento sea translocada a través de la membrana por medio de un translocón por la llamada translocación cotraduccional. Las vesículas que brotan del RER llevan la proteína al complejo de Golgi. Otras vesículas la llevan hacia la membrana plasmática. La fusión de estas vesículas de transporte con la membrana plasmática libera la proteína al exterior de las células.

### Proteínas de la membrana plasmática

Las proteínas de la membrana plasmática también se sintetizan en el RER, pero primero se insertan en la membrana del RER (y acaban en la membrana plasmática). Éstas pueden ser proteínas que atraviesan una sola vez la membrana (proteínas integrales de la membrana tipo I y tipo II) o proteínas que atraviesan múltiples veces la membrana (proteína integral de la membrana tipo IV). Secuencias topógenas de la cadena polipeptídica determinan la orientación de la proteína en la membrana. Las proteínas de tipo I tienen una secuencia señal N terminal y una secuencia de detención-transferencia hidrófoba, las de tipo II tienen una secuencia señal no escindida en el N terminal que funciona como la secuencia de fijación en la membrana, y la de tipo IV tiene múltiples secuencias señal y secuencias de detención-transferencia. Las proteínas destinadas a fijarse a la membrana por una estructura GPI tienen una secuencia señal N terminal escindida y una secuencia hidrófoba C terminal que dirige la adición del GPI fijador preformado.

### Proteínas del retículo endoplásmico

Las proteínas destinadas al RER tienen un péptido señal N terminal y son translocadas mientras se cotraducen a la luz del RER o insertadas en la membrana del RER. Las secuencias de aminoácidos C terminal (KDEL en las proteínas solubles de la luz del RER, KKXX o KXKXX en las proteínas integrales de la membrana tipo I) son reconocidas por proteínas receptoras específicas y retienen las proteínas en el ER.

### Proteínas lisosómicas

Las proteínas lisosómicas son dirigidas hacia los lisosomas por medio de la adición de una señal de manosa 6-fosfato que se agrega en el compartimiento *cis* del aparato de Golgi y que resulta reconocida por una proteína receptora del compartimiento *trans* de este mismo aparato. Luego, vesículas especializadas que maduran dentro del lisosoma se encargan de transportar la proteína. El receptor de manosa 6-fosfato se recicla hacia el aparato de Golgi para su reutilización.

### Proteínas mitocondriales y del cloroplasto

La mayoría de las proteínas mitocondriales y del cloroplasto se elabora en ribosomas citosólicos, se libera en el citosol y luego es tomada por los organelos. La captación dentro de la matriz mitocondrial requiere una secuencia direccionada por la matriz y sucede en sitios donde las membranas mitocondriales externa e interna entra en contacto. Las proteínas hsc70 y hsc60 median el proceso y requieren la hidrólisis de ATP y un gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna.



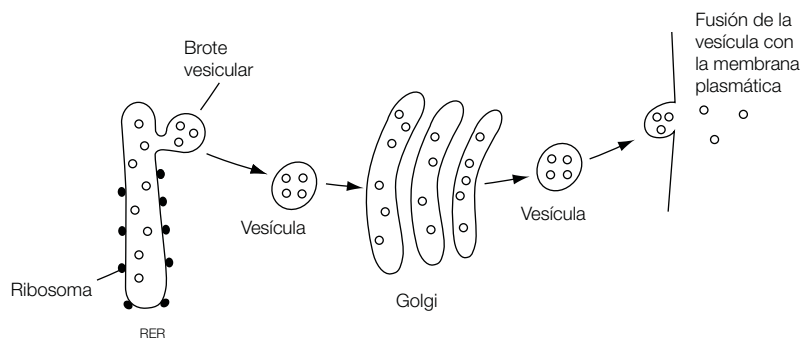
|                            |   |  |
|----------------------------|---|--|
| <b>Proteínas nucleares</b> | Las proteínas destinadas a la importación dentro del núcleo requieren de manera típica una señal de localización nuclear de cuatro a ocho aminoácidos de largo, donde además imperen los aminoácidos con carga positiva, localizada en el interior de la proteína. La captación se produce a través de los poros nucleares y requiere la hidrólisis de ATP. |  |
| <b>Temas relacionados</b>  | (A1) Células procariotas<br>(A2) Células eucariotas<br>(B2) Estructura y función de las proteínas   | (E2) Estructura de la membrana<br>(E4) Transporte de membrana: macromoléculas<br>(H5) Glucosilación de proteínas |

## Descripción

Las células deben asegurarse de que cada proteína de reciente síntesis es destinada a su localización correcta, donde puede efectuar la función apropiada. Este proceso se llama **direccionamiento de la proteína**. En una célula eucariota, la proteína puede destinarse para que permanezca en el citosol, por ejemplo una enzima que interviene en la glucólisis (sección J3). De manera alternativa, puede ser necesario dirigirla a un organelo (como una mitocondria, lisosoma, peroxisoma, cloroplasto o el núcleo) o a ser insertada dentro de la membrana plasmática o liberada fuera de la célula (sección A2). En bacterias como *E. coli*, la proteína puede permanecer en el citosol, ser insertada en la membrana plasmática o en la membrana externa, ser enviada al espacio entre estas dos membranas (espacio citoplásmico) o ser exportada fuera de la célula (sección A1). Tanto en procariotas como en eucariotas, si la proteína se destina al citosol, se elabora en los ribosomas del citosol y se libera directamente en éste. Si se destina a otras localizaciones finales, intervienen mecanismos específicos de direccionamiento de proteínas.

## Proteínas secretoras

Ribosomas unidos al RER sintetizan las proteínas destinadas a secretarse desde la célula eucariota. A medida que la proteína se sintetiza, es translocada a través de la membrana del RER hacia la luz de éste, donde se pliega a su conformación final. El ER emite entonces vesículas que llevan la proteína hacia el **aparato de Golgi** (figura H4-1) (sección A2). El aparato de Golgi tiene una **cara cis** (por donde ingresan las vesículas) y una **cara trans** (por donde las vesículas salen). Por lo tanto, las vesículas del RER se fusionan con el **compartimiento cis** del aparato de Golgi, en cuya luz liberan la proteína. Después la proteína se mueve a través del complejo de Golgi hasta el **compartimiento trans**, donde es modificada *en ruta* por la adición de residuos de carbohidratos (glucosilación; sección H5). Para finalizar, brotan vesículas desde el compartimiento *trans* y transportan a las proteínas secretoras glucosiladas hacia la membrana plasmática, donde las vesículas se fusionan, al tiempo que liberan su contenido hacia el exterior de la célula. Esta fusión y liberación extracelular de proteínas se llama **exocitosis** (véase la sección E4 para mayores detalles).



**Figura H4-1.** Síntesis y exocitosis de proteínas secretoras (véase el texto para mayores detalles). Los ribosomas fijos al RER se muestran como círculos macizos, en tanto que los círculos huecos en la luz del RER, vesículas y complejo de Golgi representan moléculas de proteínas secretoras.

## Translocación a través de la membrana del ER

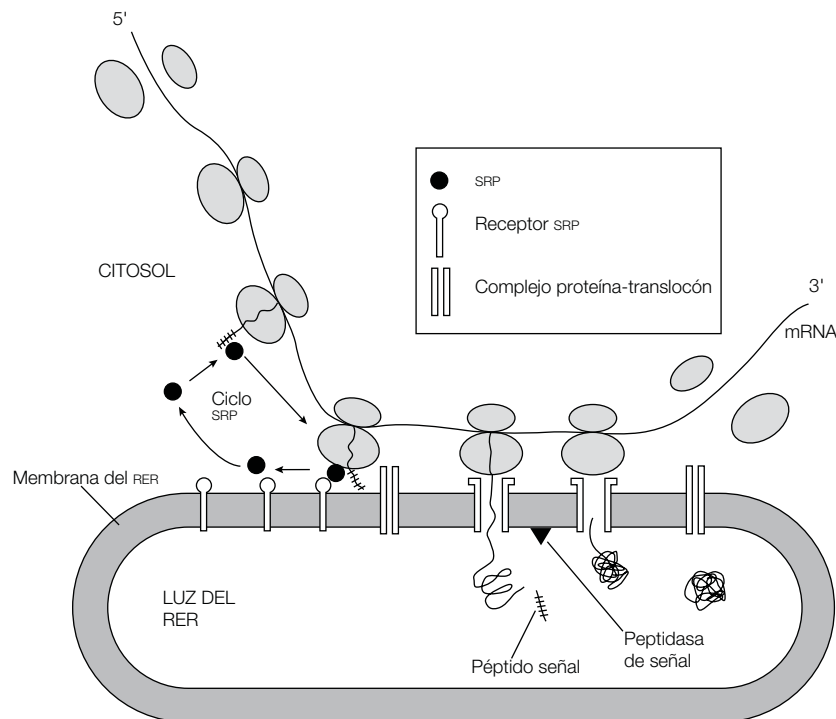
Una proteína secretora típica difiere de una proteína citosólica por tener una secuencia de alrededor de 13 a 35 aminoácidos de largo en su extremo N terminal llamada **secuencia señal** o **péptido señal**. Los péptidos señal de diferentes proteínas secretoras son distintos en sus secuencias de aminoácidos, pero tienen algunas características comunes: el centro de la secuencia suele consistir en 10 a 15 aminoácidos hidrófobos flanqueados por varios residuos relativamente hidrófilos entre los que se incluyen uno o más residuos con carga positiva (Arg, Lys), cerca del N terminal. El péptido señal dirige la proteína secretora hacia la membrana del RER y acto seguido la dirige para que cruce hasta la luz del RER y acabe por ser secretada. Una versión simplificada del mecanismo se muestra en la figura H4-2.

El mRNA de las proteínas secretoras se une a un ribosoma citoplásmico libre y comienza la síntesis de la proteína. La primera parte de la proteína elaborada es el péptido señal N terminal. Un SRP, el cual es un largo complejo de un RNA de 7S y seis proteínas, se une al péptido señal y detiene la síntesis adicional de proteína. Esto evita que la proteína secretora se libere en forma prematura hacia el citosol. El complejo ribosoma-mRNA-SRP se une luego a un **receptor SRP**, una proteína de la superficie del RER para formar el complejo ribosoma-translocón. En una serie concertada de reacciones, el SRP es liberado del péptido señal y la traducción continúa una vez más,

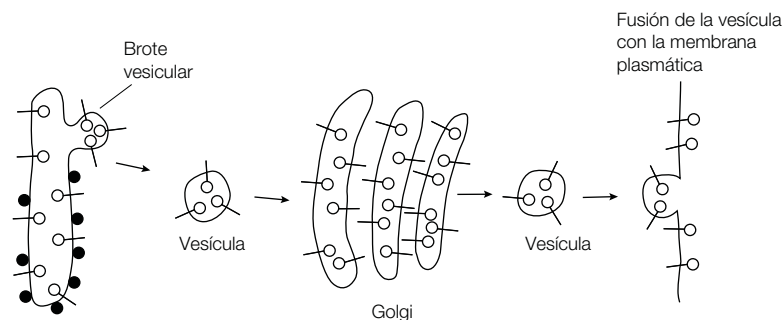
con el polipéptido naciente pasando a través de un poro acuoso de la membrana creado por el **translocón**. El translocón es un complejo proteínico, cuyo poro transmembrana está hecho a partir de la proteína **Sec61**, en mamíferos, y de la **SecY**, en procariontas. A medida que pasa a través del translocón, una **peptidasa de señal** separa al péptido señal de la cara luminal del RER (figura H4-2) y lo degrada, en tanto el resto de la proteína es translocado a través de la membrana del RER hacia su luz. Dado que el transporte a través de la membrana del RER se produce durante la síntesis de proteínas, el proceso se llama **translocación cotraduccional**. Después, la proteína es transportada a través del aparato de Golgi hacia el exterior de la célula, como ya fue descrito. El SRP liberado se recicla y queda listo para unirse a otro péptido señal (el **ciclo SRP**) (figura H4-2).

## Proteínas de la membrana plasmática

Las proteínas integrales de la membrana plasmática también son sintetizadas por ribosomas en el RER, pero son insertadas en la membrana del RER en lugar de transportarse a la luz de éste. Durante el transporte hacia el aparato de Golgi y luego hacia la superficie celular, estas proteínas permanecen fijas en la membrana, y las vesículas finales que se fusionan con la membrana plasmática se convierten en nueva membrana plasmática (figura H4-3). Nótese que, después de la inserción en la membrana del RER, una parte de las proteínas mira hacia la luz de éste, pero en la superficie celular acaban por mirar hacia fuera. Ésta es la parte de la proteína que



**Figura H4-2.** Versión simplificada de la hipótesis de la señal (véase el texto para mayores detalles).



**Figura H4-3.** Síntesis de proteínas de la membrana plasmática (véase el texto para mayores detalles). Los ribosomas fijos al RER se muestran como círculos macizos, en tanto que las proteínas de la membrana plasmática que acaban de sintetizarse se muestran como círculos huecos con un cabo.

recibe al carbohidrato durante la glucosilación en el RER y en el complejo de Golgi, de manera que el carbohidrato es expuesto sobre la superficie celular (sección H5).

La translocación de la proteína de la membrana plasmática a través de la membrana del RER se produce durante su síntesis por el mismo mecanismo que las proteínas secretoras. Sin embargo, por definición, la proteína está destinada a permanecer fija en la membrana y a no ingresar por completo en la luz del RER. Existen formas diversas para alcanzar el logro anterior y depende del tipo de proteína de membrana. Algunas proteínas integrales de la membrana son **proteínas que atraviesan la membrana una sola vez**, es decir, que la cadena polipeptídica cruza la membrana sólo una vez, mientras que en otros casos la proteína es una **proteína que atraviesa la membrana numerosas veces** (sección E2). La orientación de la proteína en la membrana y el número de veces que atraviesa la bicapa lipídica dependen de **secuencias topógenas** específicas del interior de la cadena polipeptídica. Estas secuencias topógenas son regiones donde predominan los aminoácidos hidrófobos y pertenecen a tres tipos: **secuencias señal N terminal**, **secuencias señal internas** y **secuencias de detención-transferencia**.

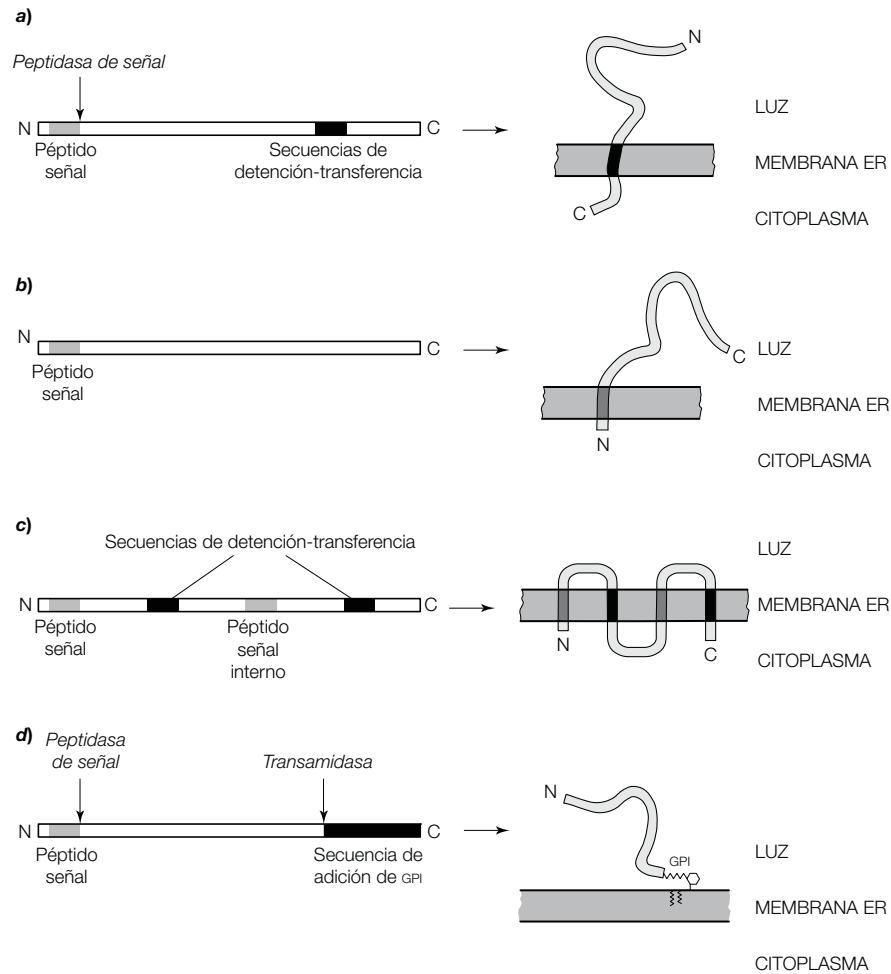
En las **proteínas integrales de la membrana tipo I** que atraviesan una sola vez la membrana (figura H4-4a), además de hacia la secuencia señal N terminal, la cual es separada de la proteína por la peptidasa de señal como las proteínas secretoras, hay una segunda secuencia hidrófoba localizada en el interior de la proteínas. Por lo tanto, la proteína comienza a cruzar la membrana del RER durante su síntesis de la misma forma que una proteína secretora, pero luego esta transferencia es detenida antes de que la proteína completa sea translocada y así la proteína permanece insertada en la membrana mediante la interacción de la secuencia hidrófoba de detención-transferencia con el translocón y con el interior hidrófobo de la bicapa. En las **proteínas integrales de la membrana tipo II** que atraviesan la membrana una sola vez (figura H4-4b), hay sólo una secuencia

señal N terminal, como en las proteínas secretoras. No obstante, en este caso la secuencia señal no es separada de la proteína de membrana por una peptidasa de señal y funciona como el fijador de membrana. Las proteínas de la membrana que la atraviesan en múltiples ocasiones (referidas como **proteínas integrales de la membrana tipo IV**) (figura H4-4c), las cuales cruzan varias veces la membrana, tienen múltiples secuencias de señal interna alternativas y secuencias de detención-transferencia para organizar este ordenamiento durante la translocación. La orientación final del N terminal y el C terminal depende de si la secuencia señal N terminal es separada y de si la secuencia topógena final es una secuencia de señal interna o una secuencia de detención-transferencia, respectivamente.

Aquellas proteínas que están fijadas en la membrana a través de una estructura GPI fijada de manera covalente en el C terminal (sección E2, figura E2-4d) poseen una secuencia señal N terminal para dirigirla hacia la membrana del RER y una segunda secuencia hidrófoba en el mismo C terminal. La secuencia señal N terminal es separada por la peptidasa de señal, mientras que la secuencia C terminal dirige la adición de una estructura GPI preformada a un residuo aminoácido interno cerca del C terminal una vez que la proteína ha sido translocada a través de la membrana del RER. La estructura GPI se construye mediante la adición secuencial de azúcares (glucosamina y manosa) y fosfato de etanolamina al fosfatidilinositol (sección E2) de la membrana del RER. Una enzima **transamidasa** separa entonces la secuencia señal C terminal y de manera concomitante la agrega en el fijador GPI completo.

### Proteínas del retículo endoplásmico

El RER contiene las proteínas llamadas **chaperonas** (sección B2), las cuales desempeñan el papel de asistir a las proteínas nacientes para que se plieguen de manera correcta en su conformación nativa. Las proteínas residentes en el RER se elaboran en éste y luego pasan a la luz (como las proteínas secretoras) o se fijan en la membrana (como las proteínas integrales de la



**Figura H4-4.** Inserción de las proteínas integrales de la membrana en la membrana del RER durante la síntesis: a) proteína integral de la membrana de tipo I, con una secuencia señal N terminal separable; b) proteína integral de membrana de tipo II, con una secuencia señal N terminal unida; c) proteína integral de la membrana de tipo IV, con múltiples secuencias señal y de detención-transferencia; d) proteína de membrana fija al GPI, con una secuencia señal N terminal separable y una secuencia C terminal agregada de fijación al GPI.

membrana tipo I). No obstante, estas proteínas contienen una **señal de retención** en el C terminal que reconocen proteínas receptoras específicas, las cuales retienen a estas proteínas en el RER y de ese modo evitan que se muevan a lo largo de la vía secretora hacia el aparato de Golgi. En el caso de las proteínas solubles que están en la luz del RER, la señal de retención es Lys-Asp-Glu-Leu (o KDEL si se usa el código de aminoácidos de una sola letra) en el C terminal. En el caso de las proteínas integrales de la membrana tipo I en la membrana del RER, la señal de retención es KXXX o KXXXX en el C terminal citosólico.

### Proteínas lisosómicas

Las enzimas lisosómicas y las proteínas de la membrana lisosómica se sintetizan en el RER y son transportadas hasta el compartimiento *cis* del complejo de Golgi. Una

vez *en ruta*, son N-glucosiladas y luego se les añade un residuo fosfato a uno o más residuos de manosa para formar **manosa 6-fosfato** en el compartimiento *cis* del complejo de Golgi. La manosa 6-fosfato es la señal que dirige a la proteína lisosómica a su destino correcto. Allí es reconocida por las proteínas **receptoras de manosa 6-fosfato** en el compartimiento *trans* del complejo de Golgi, el cual se une a la proteína lisosómica y la empaqueta en vesículas de transporte que brotan del aparato de Golgi (figura H4-5). Acto seguido, las vesículas de transporte se fusionan con las vesículas de distribución, cuyo contenido es ácido. El pH bajo causa la disociación de la proteína lisosómica de su receptor y una fosfatasa remueve el fosfato de la manosa 6-fosfato, con lo que evita que se vuelva a unir al receptor. Brotan vesículas de las vesículas de distribución para regresar el receptor al aparato de Golgi para reutilizarlo (**reciclamiento del receptor**) y la proteína lisosómica es liberada hacia

el lisosoma por la fusión de la vesícula con éste (figura H4-5). En la **enfermedad de la célula I**, este direccionamiento selectivo de las proteínas hacia el lisosoma fracasa debido a la deficiencia de la enzima requerida en la fosforilación de los residuos de manosa en el complejo de Golgi *cis*.

No todas las proteínas lisosómicas siguen la ruta normal del direccionamiento proteínico; las células terminan por exportar algunas y deben recuperarse. Esta **vía de desecho** trabaja como sigue. La glucoproteína lisosómica se une a los receptores de la manosa 6-fosfato en la membrana plasmática y vuelve a internalizarse por endocitosis (figura H4-5). Este proceso, denominado **endocitosis mediada por el receptor**, crea una vesícula endocítica (o **endosoma**) que libera la proteína lisosómica hacia el lisosoma por fusión (sección E4).

### Proteínas mitocondriales y de los cloroplastos

Las mitocondrias y los cloroplastos contienen su propio DNA, ribosomas, mRNA, etc., y realizan síntesis de proteínas, pero muy pocas proteínas mitocondriales o de los cloroplastos se elaboran de esta forma. En su lugar, la gran mayoría de las proteínas mitocondriales y de los cloroplastos es codificada por el genoma nuclear, los ribosomas las sintetizan en el citosol, se liberan después de su síntesis y luego se translocan a través de la membrana del organelo. Por consiguiente, este proceso se refiere como **translocación postraduccional**. La proteína puede necesitar ser dirigida a cualquiera de varias localizaciones; en el caso de la mitocondria, ésta podría ser la **membrana mitocondrial externa**, la **membrana interna**, el **espacio intramembranoso** o la **matriz mitocondrial**. Los cloroplastos tienen los

mismos subcompartimientos más otros dos destinos potenciales: la **membrana** y el **espacio tilacoide** (secciones A2 y L3).

Las proteínas son dirigidas a la matriz mitocondrial por una **secuencia de direccionamiento hacia la matriz N** terminal. De manera típica, esta secuencia tiene 25 a 50 aminoácidos de longitud y es rica en aminoácidos hidrófobos, los aminoácidos hidroxilados Ser y Thr, y de los aminoácidos con carga positiva Arg y Lys. Es probable que estas secuencias de direccionamiento hacia la matriz asuman una conformación helicoidal  $\alpha$ , en la que los aminoácidos con carga positiva se sitúan en un lado de la hélice y los aminoácidos hidrófobos en el otro, de manera que estas secuencias son anfipáticas. Después de la síntesis por los ribosomas citosólicos, la proteína es liberada al citosol pero se mantiene en un estado desplegado por **proteínas chaperonas** de la familia de proteínas **hsc70**, las cuales se unen a ella durante la síntesis (sección B2). Esto es necesario porque las mitocondrias no pueden importar las proteínas plegadas. Luego, las hsc70 transfieren la proteína desplegada a un **receptor importador** localizado en la membrana mitocondrial externa que se cree se desliza a lo largo de la membrana hasta que alcanza un sitio donde la membrana interna y la membrana externa están en contacto (**sitio de contacto**). En este punto, la proteína pasa hacia la matriz a través de una proteína translocón formada por los componentes de ambas membranas (figura H4-6). Las proteínas de la membrana mitocondrial externa que intervienen en el direccionamiento y la importación se designan proteínas **Tom** para el translocón de la membrana externa, mientras que aquéllas de la membrana interna se designan proteínas **Tim**. A medida que pasan a través del poro, se libera la proteína citoplásmica hsc70, el péptido señal es separado por la

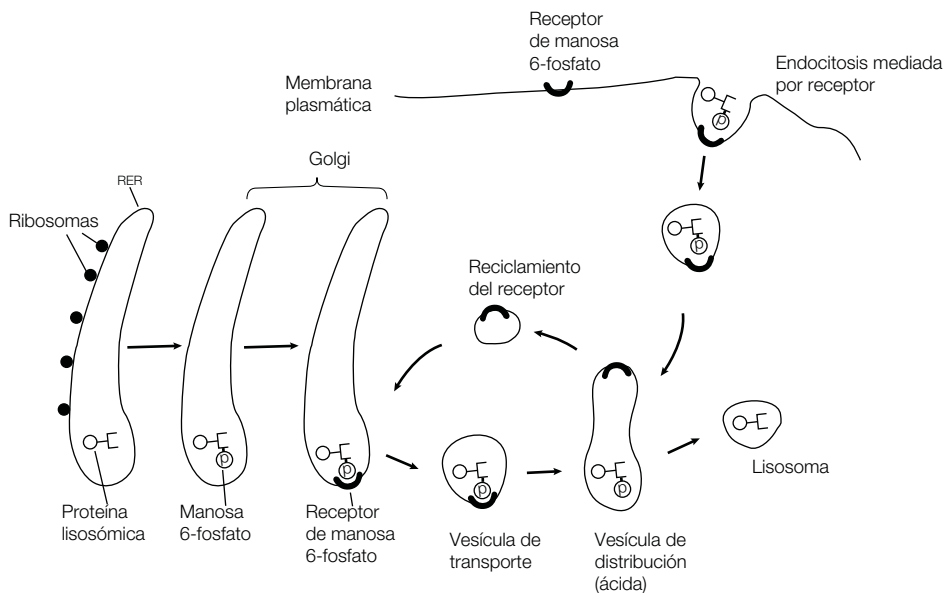
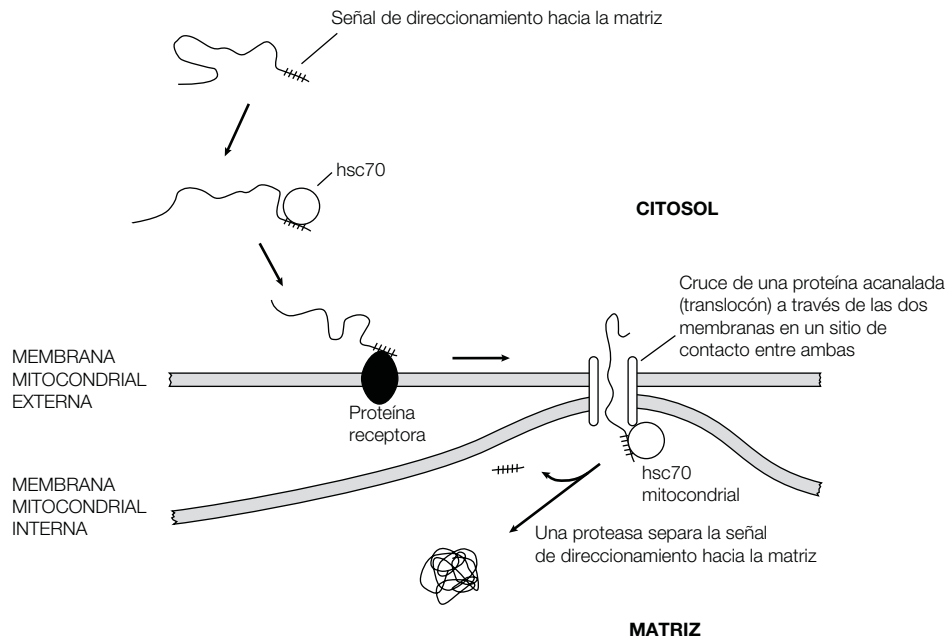


Figura H4-5. Síntesis y direccionamiento de proteínas lisosómicas.



**Figura H4-6.** Captación de proteínas en la matriz mitocondrial (véase el texto para mayores detalles).

peptidasa de señal y la proteína es unida en la matriz por la **chaperona mitocondrial hsc70**. Luego la hsc70 es reemplazada por la **chaperona mitocondrial hsc60**, la cual colabora con la proteína para que se pliegue de manera correcta a su estado final. La importación de proteínas hacia la mitocondria requiere energía del gradiente electroquímico a través de la membrana interna (sección L2) así como hidrólisis del ATP. La importación de proteínas dentro de la membrana interna mitocondrial y en el espacio intramembranoso necesita dos señales; en primer lugar, la proteína es importada hacia la matriz como se describe antes y luego una segunda secuencia señal dirige la proteína de regreso hacia la membrana interna o a través del espacio intramembranoso.

La importación de proteínas por los cloroplastos sigue mecanismos similares a los de la mitocondria, pero las señales usadas son diferentes ya que mitocondrias y cloroplastos están juntos en algunas células vegetales

y producen proteínas que son dirigidas hacia el destino correcto.

### Proteínas nucleares

El núcleo tiene una membrana interna y una membrana externa (sección A2) y está perforado por 3 000 a 4 000 **poros nucleares**. Cada poro consta de un **complejo del poro nuclear** de más de 100 proteínas diferentes organizadas en una disposición hexagonal. Aunque las moléculas pequeñas pueden pasar a través del poro por difusión libre, las proteínas grandes que ingresan en el núcleo requieren una **señal de localización nuclear**. Ésta es de cuatro a ocho aminoácidos de largo y a la vez rica en aminoácidos con carga positiva como la Lys y la Arg, así como de manera usual contiene Pro, y se localizan en la parte interna de la cadena polipeptídica. La proteína es llevada a través del poro en un paso que requiere ATP e ingresa en el núcleo sin separarse de la señal de localización.

# H5 Glucosilación de proteínas

## Notas clave

### Glucosilación de proteínas: descripción

Muchas proteínas sintetizadas por los ribosomas del RER contienen cadenas cortas de carbohidratos (oligosacáridos) y son llamadas glucoproteínas. Los oligosacáridos pertenecen a dos tipos principales: enlazados a O (con el OH de la cadena lateral de la Ser o Thr) y enlazados a N (con el NH<sub>2</sub> de la cadena lateral del Asn). Para ser modificados por los glucanos enlazados a N, los residuos Asn deben estar en la secuencia de consenso Asn-X-Ser o Asn-X-Thr.

### Síntesis de oligosacáridos enlazados al O

Los oligosacáridos enlazados al O son sintetizados por la adición secuencial de monosacáridos a la proteína a medida que ésta pasa a través del complejo de Golgi. De manera habitual, estos oligosacáridos consisten en sólo cuatro a cinco residuos de azúcar.

### Síntesis de oligosacáridos enlazados al N

De manera inicial, los oligosacáridos enlazados al N se sintetizan en un transportador de dolicolfosfato que está fijo a la membrana del RER. La enzima transferasa de oligosacáridos transfiere luego a la proteína la estructura precursora completa con la composición (Glc)<sub>3</sub>(Man)<sub>9</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>. Antes de abandonar el RER, los tres residuos de glucosa terminal son removidos. El tipo de oligosacárido resultante alto en manosa puede ser recortado a un centro de pentasacárido con la composición (Man)<sub>3</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub> y a monosacáridos adicionales añadidos en el aparato de Golgi para producir un tipo complejo de oligosacárido.

### Temas relacionados

(H4) Direccionamiento de proteínas      (J1) Monosacáridos y disacáridos

## Glucosilación de proteínas: descripción

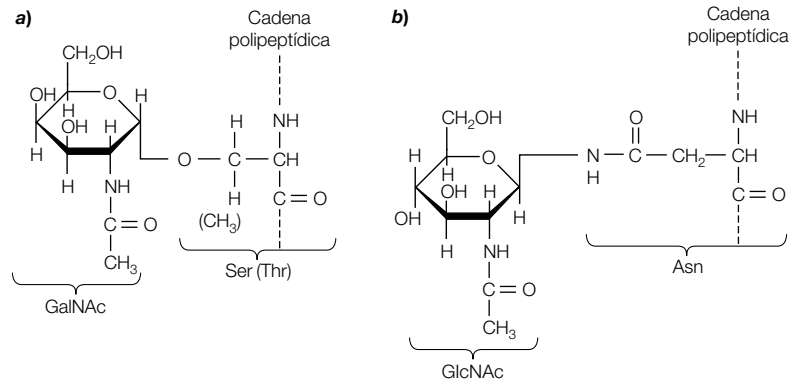
La mayoría de las proteínas elaboradas por los ribosomas en el RER (sección H4) son glucoproteínas, es decir, que contienen cadenas cortas de carbohidratos (oligosacáridos) unidos en forma covalente a ellas durante el paso a través del RER y el complejo de Golgi. Existen dos tipos principales de enlaces en los oligosacáridos:

- Los **oligosacáridos enlazados al O** suelen fijarse a la proteína a través de enlaces glucosídicos O con los grupos OH de las cadenas laterales de la Ser o Thr (figura H5-1a). Con frecuencia, los residuos que se modifican están en una región de la cadena peptídica que es rica en residuos de Ser/Thr. En glucoproteínas vegetales, los grupos OH de los residuos de hidroxiprolina (Hyp) pueden ser glucosilados, mientras que los residuos de hidroxilisina (Hyl) en la proteína colágena de los mamíferos pueden ser glucosilados en el O (sección B4).
- Los **oligosacáridos enlazados a N** están unidos a la proteína a través de enlaces glucosídicos N a los grupos NH<sub>2</sub> de las cadenas laterales del Asn (figura H5-1b), donde el Asn se presenta en la secuencia Asn-

X-Ser o Asn-X-Thr, y en la cual X es cualquier aminoácido excepto Pro. Pese a ello, no todas las presentaciones de Asn en tales secuencias están glucosiladas; los sitios que son glucosilados dependen del tipo de célula que sintetiza la proteína. Si el Asn está N glucosilado en el residuo Ser o Thr, este motivo no pertenece a los glucosilados O.

## Síntesis de oligosacáridos enlazados al O

La síntesis de oligosacáridos enlazados al O se produce por la adición secuencial de unidades de monosacáridos a la proteína recientemente sintetizada a medida que ésta pasa a través del complejo de Golgi. Primero, la transferasa de GalNAc transfiere la *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) al residuo relevante de Ser o Thr de la proteína, una enzima que usa UDPGalNAc como precursor (figura H5-2). A continuación se añaden otros monosacáridos [galactosa, *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), ácido siálico, fucosa] (sección J1) usando el azúcar de los nucleótidos correspondientes como precursores. El tipo y número exacto (por lo general, sólo cuatro o cinco) de monosacáridos añadido depende de la proteína que se esté modificando.



**Figura H5-1.** Estructuras de enlace de los oligosacáridos: a) enlace glucosídico de unión al O entre GalNAc y un residuo de Ser (o Thr); b) enlace glucosídico de unión al N entre GlcNAc y un residuo de Asn.

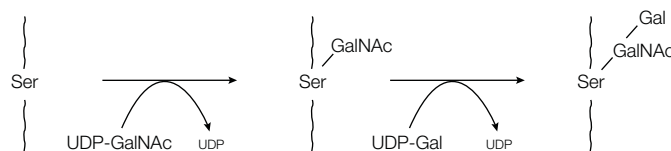
### Síntesis de oligosacáridos enlazados a N

En contraste con los oligosacáridos enlazados a O, los cuales se elaboran en forma secuencial en la proteína, los oligosacáridos enlazados a N se sintetizan como una estructura precursora larga, ramificada, que luego se añade en bloque al residuo aceptor Asn. El oligosacárido se produce sobre un transportador de lípidos denominado **dolicolfosfato**. Éste consiste en 22 unidades de isopreno (C5) (sección K5) con un grupo fosfato terminal y se localiza en la membrana del RER.

La síntesis del oligosacárido comienza con la aceptación de monosacáridos por parte del dolicolfosfato en la cara citosólica de la membrana del RER (figura H5-3), pero cuando se ha formado el producto intermedio (Man)<sub>5</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>-dolicolfosfato, que cambia de orientación y pasa a aceptar monosacáridos adicionales del lado luminal de la membrana del RER (figura H5-3). Todos éstos se transfieren de manera subsecuente de monosacáridos enlazados al dolicolfosfato que se elaboran en el lado citoplásmico de la membrana del RER, luego de invertir su orientación a través de la membrana

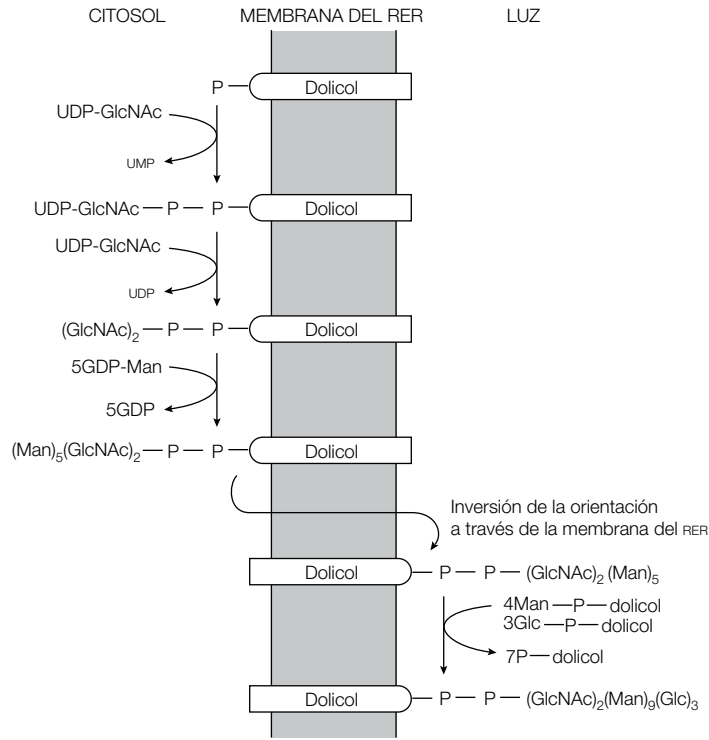
para actuar como donadores. El oligosacárido final, con la composición (Glc)<sub>3</sub>(Man)<sub>9</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>, está unido al dolicol mediante un enlace pirofosfato de alta energía (figura H5-3). Éste proporciona la energía para la transferencia del oligosacárido a la proteína, una reacción catalizada por una enzima **transferasa de oligosacárido** unida a la membrana, que de manera esencial ocurre en la luz del RER tan pronto como la cadena de polipéptido en crecimiento aparece a través del translocón (figura H5-4).

Mientras la proteína se halla todavía en el RER, los tres residuos de glucosa son removidos (figuras H5-4 y H5-5). Como hecho de interés, los residuos de glucosa se vuelven a añadir a la proteína, si ésta se encuentra desplegada o ligeramente plegada. Por lo tanto, sólo cuando la proteína está correctamente plegada, todos los residuos de glucosa acaban por removerse y la proteína puede continuar a lo largo de la vía secretora. La glucoproteína plegada con sus **oligosacáridos del tipo de la alta manosa** (sección J2, figura J2-3) se transporta a continuación hacia el complejo de Golgi a través de

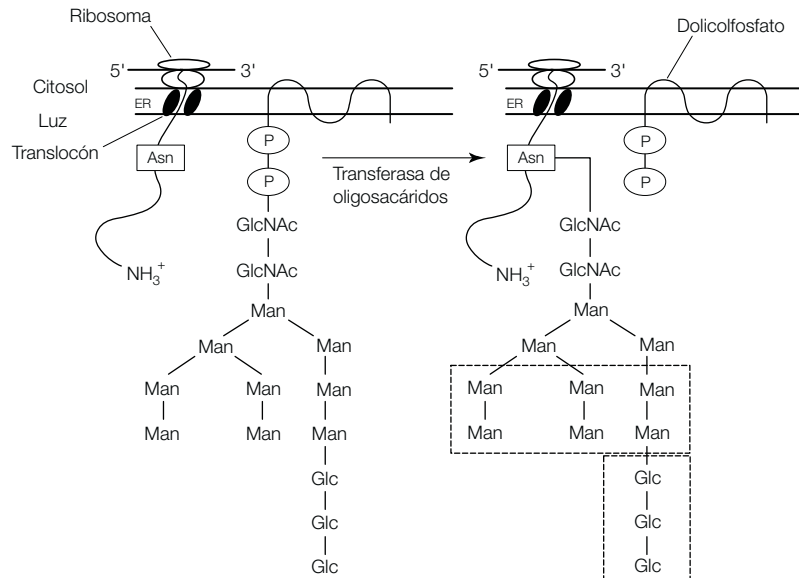


**Figura H5-2.** Síntesis de un oligosacárido unido a O. El ejemplo muestra un oligosacárido enlazado al O en la inmunoglobulina A (IgA) humana.





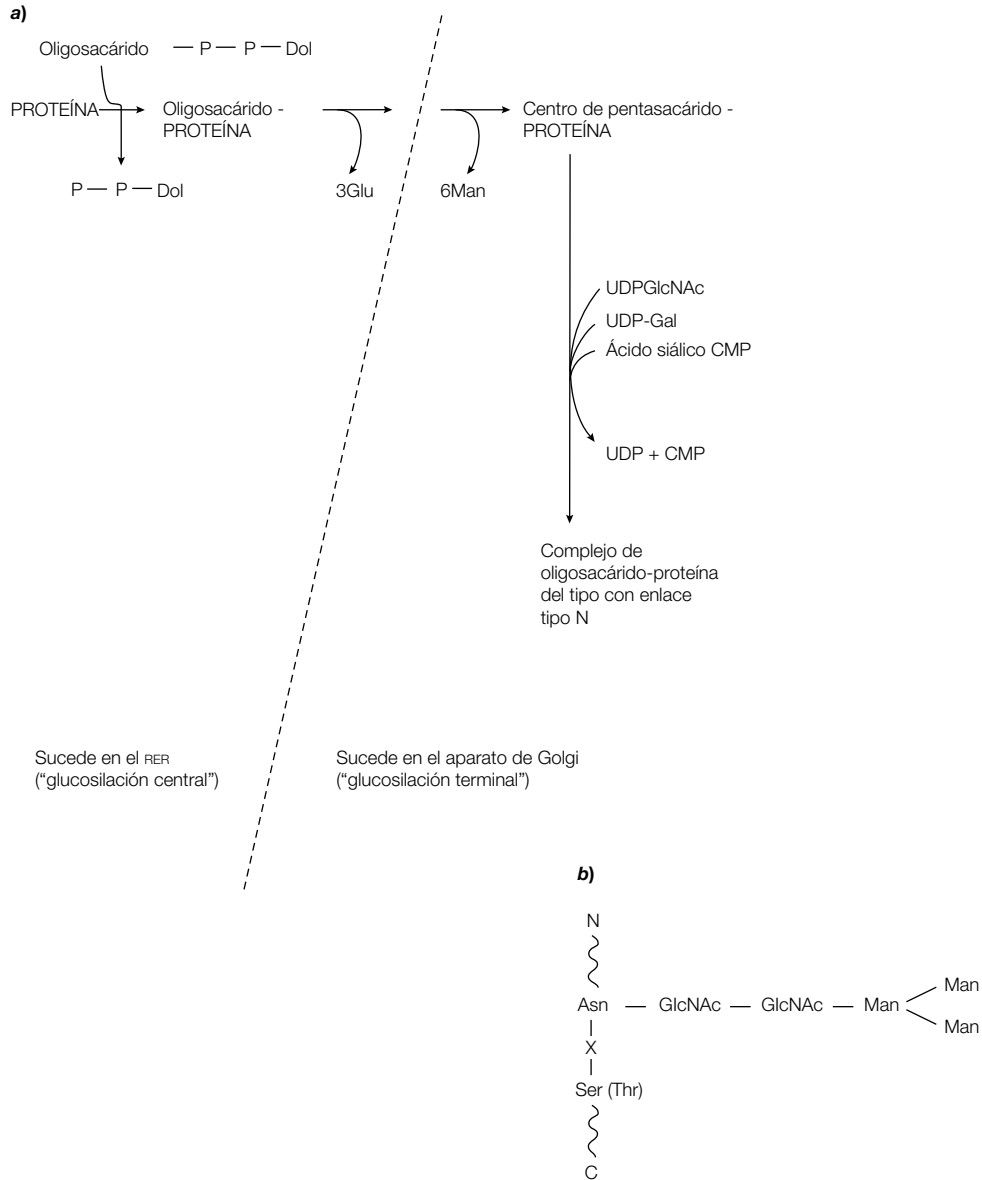
**Figura H5-3.** Síntesis de oligosacáridos unidos al N en un transportador de dolicolfosfato de la membrana del RER.



**Figura H5-4.** La transferasa de oligosacáridos transfiere un oligosacárido enlazado al N desde el transportador de dolicolfosfato a un residuo de Asn aceptador en una cadena polipeptídica en crecimiento. Se indican los tres residuos de glucosa terminal y los seis residuos de manosa que se remueven durante el recorte del oligosacárido.

vesículas (sección H4). A medida que se mueve a través del complejo de Golgi, el oligosacárido es “**recortado**” o “**procesado**” con frecuencia, con los seis residuos de manosa terminales, que se remueven para dejar el **centro de pentasacárido** (figuras H5-4 y H5-5). Entonces,

en el complejo de Golgi, pueden añadirse residuos adicionales de manosa y otros monosacáridos al oligosacárido para generar el **tipo complejo de oligosacáridos** (figura H5-5; sección J2, figura J2-3).



**Figura H5-5.** a) Transferencia del oligosacárido enlazado al N a una proteína y su procesamiento ulterior en el RER y el aparato de Golgi (véase el texto para mayores detalles); b) estructura del centro de pentasacárido de los oligosacáridos enlazados al N.

# 11 El poder de los métodos de DNA recombinante

## Notas clave

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| <b>Genómica</b>                     | La genómica se refiere a los estudios del genoma de un organismo. El análisis de la función génica (genómica funcional) descansa en un espectro de técnicas que incluyen la genética inversa y la interferencia del RNA (RNAi).   |
| <b>Transcriptómica y proteómica</b> | La transcriptómica es el estudio del transcriptoma (el RNA expresado), en tanto que la proteómica es el estudio del proteoma (las proteínas que se sintetizan).   |
| <b>Metabolómica</b>                 | La metabolómica es el estudio de los componentes moleculares pequeños de una célula, es decir, el metaboloma.   |
| <b>Organismos transgénicos</b>      | Los organismos transgénicos son aquellos que han sido modificados por la inserción de un(unos) gen(es) clonado(s).  |
| <b>Temas relacionados</b>           | (C3) Secuenciación de proteínas y síntesis de péptidos<br>(I2) Enzimas de restricción<br>(I3) Hibridación de ácidos nucleicos<br>(I4) Clonación del DNA<br>(I5) Secuenciación del DNA<br>(I6) Reacción en cadena de la polimerasa |

## Genómica

En la actualidad se vive en una era de descubrimientos biológicos sin precedentes, así como de aplicación del conocimiento biológico. El primer genoma secuenciado, en 1977, fue el de un pequeño virus bacteriano (bacteriófago) denominado  $\phi$ X174 —con sólo 11 genes y alrededor de 5000 pares de bases de DNA, es decir, A pareada con T, y G pareada con C—. En contraste, el genoma humano consiste en alrededor de ¡3.2 miles de millones de pares de bases! El **Proyecto del genoma humano** —diseñado para secuenciar el genoma humano— comenzó de manera oficial en 1990. Los avances en la secuenciación automatizada del DNA permitieron el anuncio del primer borrador del genoma humano (alrededor de 90%) el 26 de junio del año 2000. Para 2003, la secuencia estaba esencialmente completa.

En junio de 2010, sólo 10 años después que se anunció el primer borrador del genoma humano, el Wellcome Trust, en Reino Unido, puso en marcha un proyecto para secuenciar 10 000 genomas humanos ¡en los siguientes tres años! Este proyecto, apodado UK10K, intentará identificar variables genéticas raras que son importantes en la enfermedad genética humana al enfocarse en las regiones que contienen genes de estos genomas (llamadas “**exomas**”). La evolución del cambio tecnológico

es asombrosa; tomó 10 años secuenciar un genoma y tomará sólo tres años secuenciar 10 mil.

Esta vasta riqueza de datos de la secuencia del DNA en constante crecimiento es un activo importante de la **genómica**, el estudio del genoma de un organismo. Uno de los objetivos clave es entender las funciones de grandes números de los nuevos genes previstos por la secuenciación del genoma, un campo conocido como **genómica funcional**. Un planteamiento para revelar la función de un gen se denomina **genética inversa**, por la cual puede crearse una mutación en un gen clonado y el gen modificado puede introducirse dentro de una célula hospedadora para estudiar los efectos de la mutación. El método se llama genética *inversa* ya que se comienza con un gen y luego con la creación de un mutante, lo que representa la ruta inversa de la genética tradicional, en la cual los mutantes se usaron para identificar genes. Otro método útil es la **interferencia del RNA** (RNAi), donde en las células se introduce un RNA de doble cadena (dsRNA) que se corresponde con las cadenas con sentido y antisentido del gen bajo investigación. El dsRNA es degradado *in vivo*, y determina que los fragmentos resultantes de los pares de bases de mRNA del gen objetivo se degraden también, lo que significa que se anula la expresión del gen. El estudio

de los efectos celulares de esta pérdida de la función proporciona evidencia del papel del gen *in vivo*.

### Transcriptómica y proteómica

Por analogía con el término “genoma”, el **transcriptoma** es toda la secuencia del RNA transcrita del genoma de una célula y el **proteoma** son todas las proteínas expresadas de esa célula. Mientras todas las células de un organismo como el humano contienen en esencia el mismo genoma, el transcriptoma y el proteoma de diferentes tipos de células varían de acuerdo con los genes que se expresan. Por ejemplo, el transcriptoma y el proteoma de una célula hepática son diferentes de los de una neurona.

La **transcriptómica** se refiere a estudios del transcriptoma e incluye, por ejemplo, el uso de microordenamientos de DNA (sección I3) para determinar los perfiles de expresión. La **proteómica** es el estudio del proteoma. La metodología usada para estudiar un proteoma se llama **perfilamiento de proteínas** o **proteómica de expresión**.

El **perfilamiento de proteínas** depende en gran medida del uso de la electroforesis bidimensional en gel (sección C2) para separar las proteínas expresadas por una célula o tejido, seguida por la espectrometría de masa para producir las **huellas digitales de las masas de péptidos** de cada proteína (sección C3). Las proteínas expresadas pueden entonces identificarse por comparación de estas huellas digitales con las bases de datos de las huellas digitales, incluidas aquellas previstas a partir de los datos de la secuencia del DNA. En vista de la extensa escala de tales técnicas, muchos de estos procedimientos están automatizados por necesidad.

### Metabolómica

Juntas, la genómica, transcriptómica y proteómica son métodos poderosos para incrementar el conocimiento no sólo de cómo funcionan las células normales sino también sobre cuáles son los cambios clave en la enfermedad. Así, estas técnicas encontrarán un uso cada vez mayor en el diagnóstico de enfermedades específicas y en la identificación y valoración de nuevos agentes quimioterápicos.

La **metabolómica** representa quizá el más nuevo de estos campos de estudio y se relaciona con el estudio de los componentes moleculares pequeños de las células. La colección completa de metabolitos de una célula o tejido bajo condiciones específicas se denomina el **metaboloma**. Por análisis de los metabolitos de una célula, se puede generar un **perfil metabólico** que indica la actividad metabólica de la célula; la información que puede proveer es útil para una diversidad de aplicaciones, como el diagnóstico clínico y el descubrimiento de fármacos.

El estudio del metaboloma depende de los métodos para separar las diversas clases de moléculas pequeñas (como la cromatografía líquida y de gases, la cromatografía líquida de alto desempeño y la electroforesis capilar) y de métodos poderosos para la identificación y cuantificación de metabolitos (p. ej., la espectrometría de masa, la espectroscopia infrarroja, la resonancia magnética nuclear).

Cuando esta información se combina con información acerca de las tasas de reacción de los diferentes pasos de las vías metabólicas, es posible construir modelos del **flujo metabólico**, es decir, del flujo de metabolitos a lo largo de diferentes vías. De manera ideal, se podría decir que se es capaz de conocer el flujo metabólico de los tejidos sanos y compararlo con el de varios estados de enfermedad. Esta información puede conducir al diseño de fármacos para invertir o superar la actividad metabólica indeseable relacionada con los estados de enfermedad. Ahora mismo, estos métodos para estudiar las células eucariotas están en sus albores, con una gran parte del trabajo centrado en organismos simples como las levaduras. Pero si pueden idearse técnicas para el análisis metabólico a gran escala junto a las líneas de las técnicas que se emplean en la genómica, proteómica y transcriptómica, pueden esperarse progresos futuros rápidos.

### Organismos transgénicos

Como se están conociendo las funciones de los genes individuales, el poder de esta nueva biología puede utilizarse para modificar organismos de manera predecible y deseable. Los organismos que han sido modificados por la inserción de un gen clonado se denominan **organismos transgénicos**; las **plantas transgénicas** y los **animales transgénicos** son posibles. Tales métodos no son sólo de importancia académica sino que están aumentando el descubrimiento de aplicaciones comerciales. Por ejemplo, las plantas modificadas con resistencia aumentada a las plagas o resistencia a los virus encierran obvios atractivos para la agricultura. Sin embargo, hay consideraciones éticas importantes que deben aplicarse para usar esta nueva tecnología tanto en plantas como, incluso más controversiales, en animales (incluidos los seres humanos).

Esta riqueza de conocimiento acerca del genoma y su expresión, y la aplicación de este conocimiento, dependen de una amplia gama de herramientas y técnicas con el DNA recombinante. Muchos de los métodos experimentales actuales son complejos en extremo y están más allá de la perspectiva de este texto introductorio. Pese a ello, las secciones siguientes proporcionan información de parte de la metodología central: la capacidad de cortar el DNA en sitios específicos mediante el uso de endonucleasas de restricción (**enzimas de restricción**; sección I2), procedimientos que permiten la detección

de secuencias específicas de DNA (y RNA) con gran precisión (**hibridación de ácidos nucleicos**; sección I3), métodos para la preparación de secuencias específicas de DNA en grandes cantidades en forma pura (**clonación del DNA**; sección I4) y **secuenciación rápida del DNA** (sección I5). Más recientemente, el desarrollo de la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** (sección I6) revolucionó el campo de la biología molecular y de aplicaciones clave como en la medicina forense. Para terminar, esta sección pone en evidencia la capacidad actual para

modificar las secuencias del DNA a voluntad mediante la **mutagénesis dirigida al sitio** (sección I7), lo que permite diseñar nuevas proteínas.

Dado que este libro se enfoca en el asunto central de la bioquímica, hay muchos aspectos excitantes en la tecnología del DNA recombinante que no pueden incluirse debido a la falta de espacio. Para una descripción más extensa, se recomienda al lector consultar *BIOS Notas instantáneas de biología molecular*.

# 12 Enzimas de restricción

## Notas clave

### Digestión de la enzima de restricción

Las enzimas de restricción identifican secuencias de reconocimiento específicas y cortan el DNA, al que dejan extremos coherentes o desprolijos. Las enzimas de restricción tienen un nombre de tres letras basado en el género y nombre de la especie de la bacteria a partir de la cual fue aislada, junto con un numeral romano diseñado para indicar la identidad de la enzima en casos en los que la bacteria contiene varias enzimas de restricción diferentes. De los tres tipos de enzimas de restricción (tipos I, II y III), las enzimas de tipo II son las de mayor uso en el trabajo con el DNA recombinante debido a que siempre lo cortan en el mismo sitio en relación con la secuencia de reconocimiento. Los extremos de las moléculas de DNA restringidas pueden unirse para crear nuevas moléculas de DNA recombinante.

### Electroforesis en gel

Los fragmentos de DNA en un digerido de restricción pueden separarse por tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa. El gel de poliacrilamida se usa para separar las moléculas de DNA más pequeñas, mientras que el gel de agarosa tiene poros de tamaño más grande y de esa manera puede separar fragmentos de DNA de mayor tamaño. El espectro de tamaño exacto de los fragmentos de DNA que pueden separarse en un gel determinado depende de la concentración de gel usada, ya que el tamaño de los poros del gel disminuye a medida que la concentración de gel se incrementa.

### Mapas de restricción

Un mapa que muestra la posición de los sitios de corte de una diversidad de enzimas de restricción se denomina mapa de restricción para esa molécula de DNA. Los mapas de restricción son útiles en los experimentos con DNA recombinante para la planeación del sitio y la manera de cortar moléculas específicas de DNA y a veces también para estudiar el progreso de un experimento.

### Polimorfismos de longitud del fragmento de restricción

Un polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP) es una diferencia común entre los DNA de individuos de una población (es decir, un polimorfismo) que afecta el tamaño de los fragmentos producidos por una enzima de restricción específica. Si los RFLP se hallan cerca de un gen, cuyas mutaciones pueden causar una enfermedad genética humana, pueden ser usados como un marcador para tal gen. En el pasado, los RFLP han demostrado valor para detectar pacientes con un defecto genético y también en estudios dirigidos a la clonación de un gen. Sin embargo, los RFLP se usan cada vez menos en tales trabajos ya que los genes en sí se han identificado. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el método de elección cada vez más extendido para la detección.

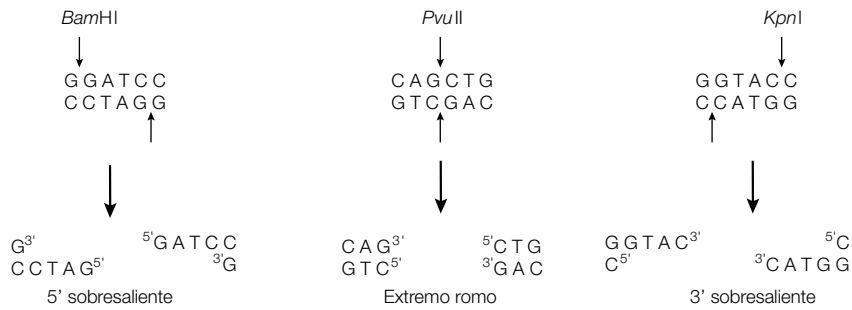
### Temas relacionados

(F1) Introducción al DNA  
(I3) Hibridación de ácidos nucleicos  
(I4) Clonación del DNA

## Digestión de la enzima de restricción

Las enzimas de restricción reconocen secuencias de nucleótidos específicas (**secuencias de reconocimiento**)

en el DNA de cadena doble, las cuales suelen ser de cuatro, cinco o seis nucleótidos de longitud, y por lo tanto cortan ambas cadenas del DNA en sitios específicos.



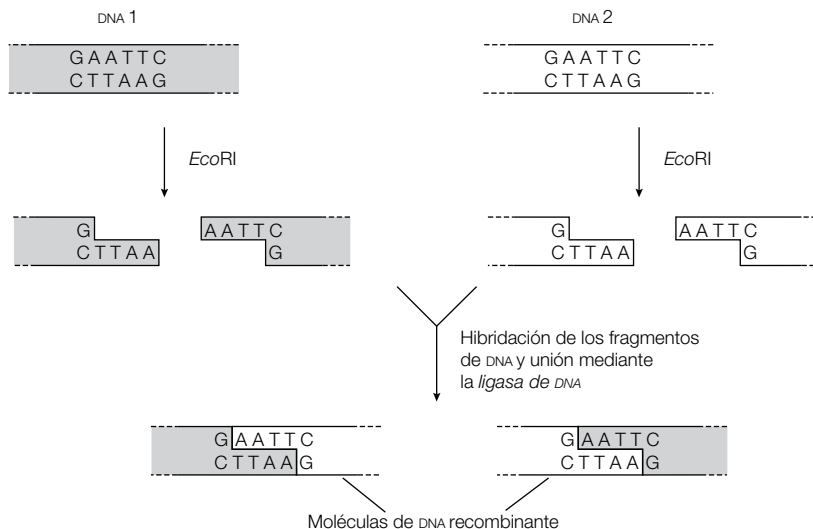
**Figura I2-1.** Los tres tipos de escisiones de la enzima de restricción de uso más amplio.

Hay tres tipos de enzimas de restricción: tipos I, II y III. Las enzimas de tipo I y III no cortan el DNA en localizaciones específicas con respecto a la secuencia de reconocimiento y de esta manera son menos útiles para el trabajo con el DNA recombinante en el laboratorio. No obstante, las enzimas de tipo II siempre cortan en la misma localización dentro de la secuencia de reconocimiento o cerca de ella, lo cual las vuelve herramientas experimentales poderosas.

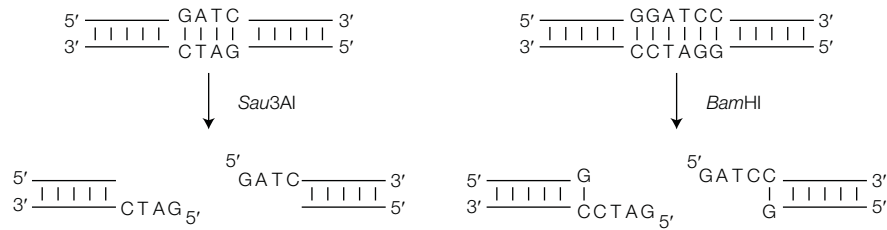
Las enzimas de restricción se aíslan de bacterias, donde desempeñan un papel en la protección de la célula hospedadora contra la infección viral. Han sido aisladas más de 2 500 enzimas de restricción de tipo II hasta el presente y han sido nombradas de acuerdo con las especies bacterianas de las cuales provienen. Las primeras tres letras del nombre de la enzima son la primera letra del nombre genérico y las primeras dos letras del nombre de la especie. Como cada bacteria puede contener diferentes enzimas de restricción, también se usa un numeral romano para identificar cada enzima.

La *EcoRI*, por ejemplo, fue la primera enzima aislada de *Escherichia coli*.

De manera esencial, una enzima de tipo II puede cortar el DNA de tres formas diferentes: corte escalonado para dejar un **5' sobresaliente** (es decir, se deja que una región corta de una cadena del DNA tenga un extremo 5' que sobresalga del extremo de la doble cadena del DNA), un corte escalonado para dejar un **3' sobresaliente**, un corte en el mismo sitio en ambas cadenas para dejar un **extremo romo** (figura I2-1). En enzimas que cortan de la manera escalonada, las colas de una cadena se denominan **extremos adhesivos** o **pegajosos** debido a que permiten que cualquiera de los dos fragmentos de DNA producidos por la misma enzima de restricción forme pares de bases complementarios (figura I2-2). Una enzima que se denomina **ligasa de DNA** puede unir los extremos cortados (**ligarlos**). La nueva molécula de DNA que se elabora al unir los fragmentos del DNA se denomina **molécula de DNA recombinante** (figura I2-2). Las moléculas de DNA que terminan en forma roma



**Figura I2-2.** Uso de la enzima de restricción *EcoRI* para crear DNA recombinante.



**Figura I2-3.** Ejemplo de dos enzimas de restricción con diferentes secuencias de reconocimiento que producen los mismos extremos adherentes después de su división; *Sau3AI* (sitio de reconocimiento 5'-GATC-3') y *BamHI* (sitio de reconocimiento 5'-GGATCC-3').

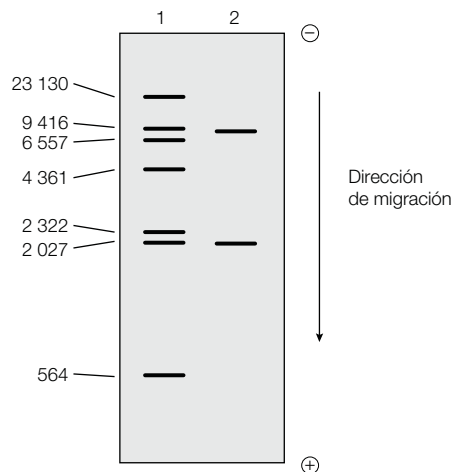
también pueden juntarse mediante una ligasa de DNA, pero la reacción es menos favorable.

Una característica muy útil es que algunas enzimas de restricción tienen diferentes secuencias de reconocimiento, pero generan los mismos extremos adhesivos, lo que permite que los fragmentos de DNA que originan estas dos enzimas diferentes se puedan unir. Por ejemplo, *Sau3AI* tiene una secuencia de reconocimiento de cuatro pares de bases de 5'-GATC-3', mientras que *BamHI* identifica la secuencia de reconocimiento de seis pares de bases 5'-GGATCC-3', pero cada una genera

un extremo pegajoso 5'-GATC-3' (figura I2-3) que puede enlazarse con el otro para formar una molécula de DNA recombinante.

### Electroforesis en gel

Cuando una enzima de restricción corta una molécula de DNA, los fragmentos de DNA (llamados **fragmentos de restricción**) procedentes de esa **digestión restringida** pueden separarse por **electroforesis en gel** (figura I2-4). La electroforesis en un gel de poliacrilamida separa fragmentos pequeños de DNA de menos de 500 bp de tamaño,



**Figura I2-4.** Electroforesis en gel de agarosa de fragmentos de DNA. Los fragmentos de DNA de tamaño conocido se sometieron a electroforesis en el carril 1 (los tamaños en bp se proporcionan a la izquierda). Un digerido de restricción de la muestra de DNA se sometió a electroforesis en el carril 2. Por comparación con las posiciones de migración de los fragmentos del carril 1, se puede advertir que los dos fragmentos de la muestra de DNA tienen tamaños cercanos a los 9 000 y 2 000 bp. Los tamaños pueden determinarse con más exactitud si los datos del carril 1 se grafican como una curva estándar del log del tamaño del DNA contra la distancia de migración y se usa el resultado para estimar el tamaño de los fragmentos de la muestra de DNA si se toman como base las medidas de sus distancias de migración.



en tanto que los geles de agarosa (que tienen poros más grandes) son necesarios para separar fragmentos de DNA más grandes. En cada caso, el tamaño de los poros del gel disminuye en la medida que se incrementa la concentración del gel, de manera que la concentración usada del gel determina el espectro del tamaño de los fragmentos de DNA que puede separar cada concentración del gel.

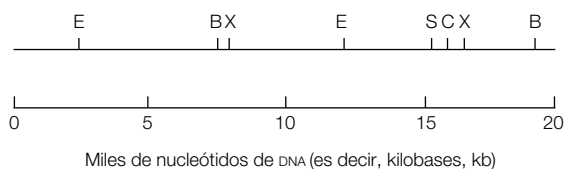
Durante la electroforesis del DNA que ha sido digerido por una enzima de restricción, los diversos fragmentos de restricción se separan en una serie de bandas en el gel. Como los fragmentos pequeños se trasladan más en el gel que los fragmentos más grandes, el tamaño de cada fragmento puede determinarse al medir la distancia de migración con respecto a la de los fragmentos estándar de DNA de tamaño conocido (figura I2-4).

Después de la electroforesis, el DNA puede localizarse en el gel mediante su tinción con bromuro de etidio, que se une al DNA y lo hace fluorescer bajo la luz UV. De manera alternativa, si el DNA se marca con un radioisótopo como el  $^{32}\text{P}$ , la bandas pueden detectarse después de la electroforesis al colocar el gel contra una película de rayos X, en la que la radiactividad determina que se formen granos de plata en la emulsión de la película, lo que produce imágenes negras que corresponden a las bandas radiactivas (**autorradiografía**).

## Mapas de restricción

Cualquier DNA bicatenario será cortado por una diversidad de enzimas de restricción que identifican diferentes secuencias de reconocimiento. Tras separar los fragmentos de restricción y medir sus tamaños en la electroforesis en gel, es posible deducir dónde produjo el corte cada enzima de restricción en la molécula de DNA. Se puede dibujar un **mapa de restricción** de la molécula de DNA en el que se muestre la localización de tales sitios de corte (**sitios de restricción**) (figura I2-5).

Los mapas de restricción son útiles en el contexto experimental durante el trabajo con DNA recombinante, por ejemplo, para identificar moléculas específicas de DNA por su mapa distintivo, para planear dónde sería mejor cortar determinadas moléculas de DNA para valorar el progreso del experimento.



**Figura I2-5.** Mapa de restricción típico de una molécula de DNA. Se muestran los sitios de corte, indicados por letras, de diferentes enzimas de restricción. Por ejemplo, E denota los sitios donde corta *EcoRI*.

## Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción

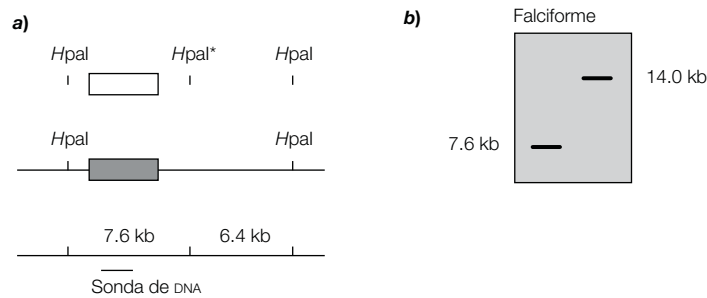
El análisis del DNA genómico humano ha revelado que hay muchas diferencias en la secuencia del DNA entre individuos que no tienen efecto obvio, con frecuencia debido a los cambios que se encuentran en intrones o entre genes. Algunos de estos cambios son muy comunes en individuos de una población y se denominan **polimorfismos**. Algunos polimorfismos afectan el tamaño de los fragmentos generados por una enzima de restricción particular, por ejemplo al cambiar un nucleótido en la secuencia de reconocimiento y de esa manera eliminar un sitio de corte. En lugar de que esa región genere dos fragmentos de restricción, ahora se forma un solo fragmento de restricción grande (figura I2-6). De forma alternativa, el polimorfismo puede resultar de la inserción o deleción de secuencias entre dos sitios de corte, y de esa manera incrementar o disminuir el tamaño de los fragmentos de restricción producidos. Un polimorfismo que afecta los tamaños de los fragmentos de restricción se llama **polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)**. Con la condición de que exista una sonda de DNA (sección I3) para una secuencia de DNA de una región afectada, de manera que esta secuencia pueda detectarse por hibridación, los RFLP pueden detectarse por Southern blotting (sección I3).

El valor de los RFLP ha descansado en la capacidad de usarlos como marcadores de enfermedades genéticas humanas específicas. Debe tomarse en cuenta un polimorfismo que está muy cerca del sitio de un cambio en un gen clave que resulta en una enfermedad genética humana (figura I2-6). Debido a que estos dos cambios, el polimorfismo y el defecto genético, están muy cerca en el mismo cromosoma, tienden a ser cohereditarios. La identificación de tales RFLP **enlazados de forma muy cercana** tiene dos ventajas principales. Primero, los experimentos pueden dirigirse a la clonación del DNA cerca del RFLP en espera de identificar el gen en sí mismo, el cual puede por lo tanto secuenciarse y estudiarse. Segundo, incluso en ausencia del gen, el RFLP actúa como un marcador de detección de la enfermedad; los individuos que portan el RFLP tienen una probabilidad más alta de tener el defecto génico asociado. Por supuesto,

otros RFLP que se localizan a una gran distancia del gen, o incluso en un cromosoma diferente, estarán esencialmente **desligados** (es decir, debido a la alta probabilidad de eventos cruzados durante la meiosis para producir células de línea germinal, el gen y el RFLP tendrían sólo una probabilidad de 50:50 de ser cohereditarios). Por lo tanto, debe llevarse a cabo una gran cantidad de trabajo muy minucioso para identificar un RFLP útil para una enfermedad genética humana particular. Necesitan tamizarse grandes números de individuos de grupos familiares, algunos de los cuales sufren la enfermedad, para acceder a un espectro de posibles RFLP que puedan

servir para localizar un RFLP que de manera rutinaria se coherede con el defecto génico.

A medida que los genes son identificados y secuenciados, la necesidad de marcadores RFLP declina debido a que pueden emplearse sondas de DNA específicas (sección I3) para los tipos más comunes de defectos génicos. Además, en la detección de la enfermedad genética humana, el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; sección I6) se está convirtiendo en el método de elección en lugar de los análisis del RFLP ya que es mucho más rápida de realizar y requiere mucho menos material clínico para el análisis.



**Figura 12-6.** Análisis de una enfermedad genética humana por medio de los RFLP. El análisis se refiere a dos individuos de una familia, uno de los cuales presenta una globina  $\beta$  normal y el otro tiene el gen de la globina  $\beta$  anormal, por lo que produce anemia de células falciformes.  
 a) La globina  $\beta$  falciforme se relaciona con un cambio de nucleótido que provoca la pérdida del sitio  $HpaI^*$ , marcado con un asterisco. La presencia o ausencia de este sitio  $HpaI^*$  se detecta por hibridación y Southern blotting (sección I3) con el concurso de una sonda de DNA para el fragmento de 7.6 bp; b) el DNA normal con tres sitios  $HpaI$  produce un fragmento de 7.6 bp que se detecta con la sonda de DNA, pero el DNA falciforme produce un fragmento de 14.0 bp debido a la pérdida del sitio  $HpaI^*$ .

# 13 Hibridación de ácidos nucleicos

## Notas clave

### La reacción de hibridación

El DNA de doble cadena se desnaturaliza en cadenas simples a medida que la temperatura aumenta, pero se renaturaliza en una estructura de doble cadena a medida que la temperatura desciende. Cualquier molécula de ácido nucleico de dos cadenas simples puede formar estructuras de doble cadena (hibridar) con la condición de que tenga suficientes secuencias de nucleótidos complementarios para lograr que el híbrido resultante sea estable bajo condiciones de reacción.

### Determinación de secuencias de ácidos nucleicos específicas

La concentración de una secuencia específica de ácidos nucleicos en una muestra puede medirse por hibridación con una sonda apropiada de DNA marcado. Después de la hibridación, se usa una nucleasa para destruir la sonda sin hibridar y la sonda restante es una medida de la concentración de la secuencia objetivo. Las condiciones de hibridación pueden alterarse para asegurar que sólo las secuencias idénticas (condiciones de alta rigurosidad) o las secuencias idénticas más las secuencias relacionadas (condiciones de baja rigurosidad) serán hibridadas con la sonda y por lo tanto detectadas.

### Southern blotting

La prueba de Southern blotting incluye la electroforesis de las moléculas de DNA en un gel de agarosa y luego el manchado de las bandas de DNA separadas en un filtro de nitrocelulosa. A continuación el filtro se incuba con una sonda de DNA marcado para detectar las bandas de DNA separadas que contienen las secuencias complementarias de la sonda.

### Northern blotting

La prueba de Northern blotting es análoga de la Southern blotting, excepto que la muestra de ácido nucleico que se separa por electroforesis en gel es RNA, en lugar de DNA.

### Hibridación *in situ*

Para la hibridación *in situ*, se incuba una muestra de tejido con una sonda de ácido nucleico marcado, el exceso de la sonda se lava y se examina la localización de la sonda hibridada. La técnica permite la localización espacial de la expresión génica a determinar, así como la localización de genes individuales en los cromosomas.

### Microordenamientos de DNA (chips de DNA)

Un microordenamiento de DNA es un número grande de fragmentos de DNA o de oligonucleótidos dispuestos en posiciones conocidas en una lámina de vidrio o silicona. Después de la hibridación con DNA complementario objetivo marcado con fluorescencia (cDNA), el examen mediante el uso de microscopía automatizada con láser de exploración indica cuáles secuencias de DNA se expresan.

### Temas relacionados

(F1) Introducción al DNA  
(I2) Enzimas de restricción

## La reacción de hibridación

A medida que el DNA de doble cadena se calienta, se alcanza una temperatura a la cual las dos cadenas de reacción se separan. Este proceso se denomina **desnaturalización**. La temperatura a la cual la mitad de las moléculas del DNA se desnaturaliza se llama la **temperatura de fusión** o  $T_m$  de ese DNA. Si a continuación la

temperatura se disminuye y cae por debajo de la  $T_m$ , las dos cadenas complementarias formarán enlaces de hidrógeno entre ellas una vez más para reconstituir una molécula de doble cadena. Este proceso se llama **renaturalización** (o **reasociación**).

De hecho, pueden formarse estructuras de doble cadena entre cualquiera de las moléculas de ácidos nucleicos de

dos cadenas simples (DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-RNA), siempre que tengan suficientes secuencias de nucleótidos complementarios para producir una molécula de doble cadena estable bajo las condiciones usadas. El nombre general que se le da a este proceso es **hibridación** y el producto de ácidos nucleicos de doble cadena se llama **híbrido**.

### Determinación de secuencias de ácidos nucleicos específicas

La tasa de formación de híbridos de doble cadena depende de la concentración de las especies de dos cadenas simples. Esto puede usarse para medir la concentración de secuencias de DNA o RNA específicas en una mezcla compleja. La primera tarea es preparar una **sonda de DNA** de cadena simple (es decir, un fragmento de DNA que sea complementario del ácido nucleico que se está ensayando). Ésta puede ser una cadena de un fragmento de restricción de DNA, DNA clonado o un oligonucleótido sintético. Éste debe ser marcado con el fin de que sea capaz de detectar la formación de híbridos entre él y el ácido nucleico objetivo. En tanto que la mayoría de las marcaciones usadas consiste en la incorporación de un radioisótopo, puede usarse en su lugar un marcador químico no radiactivo. Por ejemplo, una sonda de DNA puede marcarse con digoxigenina, un esteroide, por medio de dUTP marcado con digoxigenina durante la síntesis del DNA. Por lo tanto, los híbridos que contienen la sonda de DNA marcado con digoxigenina pueden detectarse mediante un anticuerpo antidigoxigenina ligado a un colorante fluorescente.

De manera independiente del método de marcación de la sonda, la sonda de DNA se incuba con la muestra del ácido nucleico (el DNA o RNA "**objetivo**") y luego se añade nucleasa para degradar cualquier fracción de la sonda de una cadena sin hibridar. La cantidad de sonda marcada que permanece indica la concentración del ácido nucleico objetivo en la muestra.

Las condiciones de hibridación (es decir, temperatura, concentración de sales) pueden variarse con el propósito de gobernar el tipo de híbridos que se forman. Las condiciones pueden establecerse de manera que sólo los híbridos perfectamente pareados sean estables y en consecuencia puedan ensayarse (condiciones conocidas como de **alta rigurosidad**). De manera alternativa, las condiciones pueden ser tales que incluso los híbridos de baja complementariedad sean estables y puedan detectarse (**rigurosidad baja**). En consecuencia, mediante la variación de las condiciones de la reacción es posible detectar y cuantificar sólo aquellas secuencias objetivo que sean idénticas a las de la sonda de DNA o, en forma alternativa, detectar y cuantificar secuencias relacionadas. La hibridación de las sondas de ácido nucleico con DNA genómico, por ejemplo, puede usarse para medir el número de copias de secuencias de DNA particulares en el genoma. La hibridación de una sonda de DNA con RNA

celular como el objetivo indicará la concentración del correspondiente transcrito de RNA y por lo tanto brindará información acerca del nivel de expresión del gen.

### Southern blotting

La electroforesis en gel se usa en forma amplia para separar y establecer el tamaño de las moléculas de DNA durante los experimentos con DNA recombinante. Después de la electroforesis en gel, hay una necesidad frecuente de detectar uno o más fragmentos de DNA que contengan una secuencia de nucleótidos específica. El Southern blotting —una técnica así llamada en honor al nombre de su inventor, Edwin Southern— resuelve esta necesidad con facilidad.

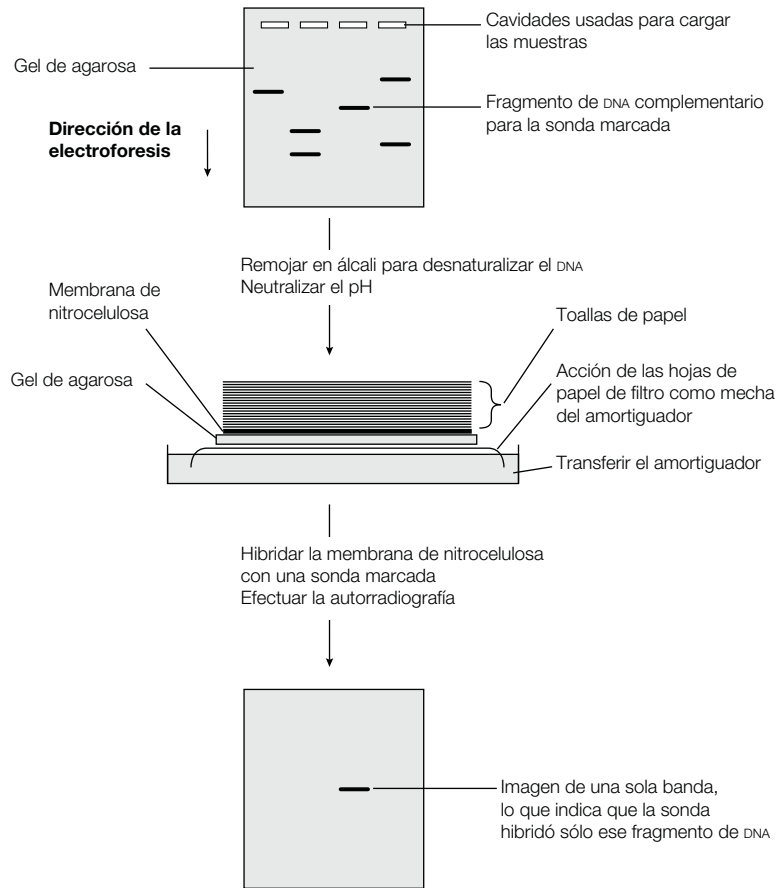
En el método de manchado capilar original, después de la electroforesis de los fragmentos de restricción a través de un gel de agarosa, el gel es pasado por un álcali para desnaturalizar el DNA en cadenas simples y entonces se neutraliza el pH. El gel se pone en contacto con un filtro de una membrana de nitrocelulosa o nylon dispuesta de manera tal que el amortiguador fluya a través del gel y transporte los fragmentos del DNA hacia la membrana (figura I3-1). La membrana se une al DNA de cadena simple y de esta manera el patrón de bandas del gel es transferido a ella. El filtro de membrana es separado del gel, horneado a una temperatura alta para fijar el DNA que contiene, y luego incubado con una sonda de DNA radiomarcada. Después de la hibridación, la sonda estará unida sólo a los fragmentos de DNA que tengan las secuencias complementarias. Esto puede visualizarse mediante el lavado del exceso de la sonda y la colocación posterior del filtro contra una película de rayos X para realizarle una autorradiografía. Las imágenes que se producen en la autorradiografía indican las bandas que contienen la secuencia de la sonda (figura I3-1).

El Southern blotting todavía se utiliza en forma amplia, aunque en muchos laboratorios el DNA puede transferirse desde el gel a la membrana de nitrocelulosa o nylon por transferencia electroforética más que por manchado capilar.

### Northern blotting

El Northern blotting sigue en su mayor parte los mismos procedimientos que el Southern blotting, excepto que la muestra se analiza por electroforesis en gel y luego lo que se une al filtro es RNA y no DNA. En consecuencia, el Northern blotting detecta moléculas de RNA complementarias con la sonda de DNA. Si el RNA celular se somete a electroforesis, por ejemplo, podría utilizarse una sonda de DNA para un mRNA específico para detectar si dicho mRNA estuvo presente en la muestra. La distancia de migración del RNA en el gel podría también permitir la estimación de su tamaño.

Nótese que no existe un inventor denominado "Northern"; este nombre se acuñó debido simplemente a que



**Figura I3-1.** Southern blotting. El procedimiento que se ilustra es el método original de Southern, que utiliza la acción capilar para manchar las bandas de DNA desde el gel a la membrana de nitrocelulosa. En el presente se usa la transferencia electrolítica en su lugar.

la técnica original para el DNA se denominó Southern, de manera que se recurrió a un juego de palabras relacionado con ambos puntos geográficos.

### Hibridación *in situ*

También es posible incubar sondas de ácidos nucleicos radiactivos o fluorescentes con secciones de tejidos o incluso cromosomas, lavar el exceso de la sonda y luego detectar dónde se hibridó la sonda. Esta técnica (**hibridación *in situ***) ha demostrado ser muy poderosa en la determinación de cuáles células en un tejido complejo como el cerebro de los mamíferos expresa un gen particular y para localizar genes específicos en cromosomas individuales.

### Microordenamientos de DNA (chips de DNA)

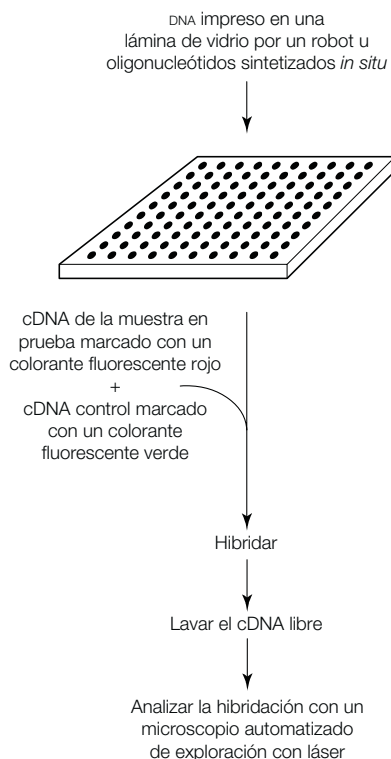
Las técnicas que acaban de describirse tienen la limitación de que sólo puede analizarse un pequeño número

relativo de muestras al mismo tiempo. En contraste, los **microordenamientos de DNA** (chips de DNA, chips génicos) pueden analizar la expresión de decenas de miles de genes de manera simultánea. Un microordenamiento de DNA es un gran número de secuencias de DNA que se mancha sobre una lámina de vidrio o silicona en un patrón de rejilla predeterminado; dado el alto número de secuencias de DNA que interviene, se hace mediante un sistema robótico. En otros casos, en lugar del manchado de los fragmentos de DNA, el microordenamiento de DNA puede producirse al sintetizar miles de oligonucleótidos sobre la lámina de vidrio *in situ*, tantos como 300 000 oligonucleótidos por centímetro cuadrado (ordenamientos de alta densidad). El microordenamiento, que contiene fragmentos de DNA u oligonucleótidos, puede entonces ser usado para explorar la expresión de cada una de las secuencias de DNA del tejido o la muestra de interés por hibridación. En la terminología de la hibridación (véase antes), los DNA u oligonucleótidos del microordenamiento son la "sonda" y el RNA del tejido o la muestra es el "objetivo".

Para comprender cómo se usan los microordenamientos de DNA, considérese la siguiente aplicación típica (figura I3-2). Imagínesse que el objetivo es determinar qué genes están regulados por una hormona que acaba de descubrirse. Las células se exponen a la hormona (muestra de la prueba) o se dejan sin tratar (muestra control), el RNA se aísla de cada muestra y se usa para sintetizar el DNA complementario (cDNA) mediante la transcriptasa inversa. Cuando se sintetiza cDNA a partir del RNA de la muestra de la prueba, uno de los nucleótidos precursores es marcado con, por ejemplo, un colorante fosforescente rojo, de manera que el cDNA resultante es también etiquetado con esta marca. El cDNA de la muestra control se marca de manera similar, pero con, por ejemplo, un colorante fosforescente verde. Los dos cDNA se mezclan juntos y se les permite que hibriden con el microordenamiento de DNA. Se lava y elimina cualquier cDNA que no haya hibridado y el microordenamiento de DNA se examina con un microscopio automatizado de exploración con láser. La excitación con láser del microordenamiento con luz de la longitud de onda apropiada excita el fluoróforo relevante y mide la intensidad de la

fluorescencia resultante de cada DNA o mancha de oligonucleótido, lo que permite determinar la extensión de la hibridación con el cDNA de prueba (rojo) y de control (verde). Como se conoce la localización exacta de cada DNA u oligonucleótido en el microordenamiento, estos datos indican de inmediato cuáles genes son activados por la hormona (manchas rojas), cuáles genes se expresan sólo en ausencia de la hormona (manchas verdes) y cuáles genes permanecen sin afectarse y se expresan tanto en ausencia como en presencia de la hormona (manchas amarillas = rojo + verde).

Los microordenamientos de DNA se usan ahora de manera extensa para examinar cambios en la expresión génica en plantas y animales. Por ejemplo, en seres humanos, pueden usarse para determinar qué enfermedades particulares afectan el patrón de la expresión génica (el **perfil de expresión**) en diversos tejidos, o la identidad (a partir del perfil de expresión) del organismo infectante. Por lo tanto, sólo en la medicina clínica, los microordenamientos de DNA encierran un alto potencial para el diagnóstico.



**Figura I3-2.** Un uso típico de un microordenamiento de DNA para determinar la expresión de miles de genes en forma simultánea (véase el texto para mayores detalles).

# 14 Clonación del DNA

## Notas clave

### El principio de la clonación del DNA

La mayoría de los fragmentos de DNA no puede autorreplicarse en una célula y por consiguiente deben unirse (ligarse) a un vector (DNA de virus o plásmido) que pueda replicarse en forma autónoma. De manera típica, cada vector se une con un fragmento de ese DNA. Si se usa una mezcla compleja de fragmentos de DNA, se produce una población de moléculas de DNA recombinante. Éstas se introducen en las células hospedadoras, cada una de las cuales contiene de manera típica sólo un tipo de DNA recombinante. La identificación de las células que contienen el fragmento de DNA de interés permite la purificación de una gran cantidad de ese DNA recombinante solo y por lo tanto del fragmento de DNA extraño.

### Conceptos básicos de la clonación del DNA

Para clonar en un vector plásmido, tanto el plásmido como el DNA a clonar deben cortarse con la misma enzima de restricción y mezclarse. Los extremos adherentes de cada DNA se asocian y enlazan juntos. Las moléculas resultantes de DNA recombinante se introducen dentro de células hospedadoras bacterianas. Si el vector contiene un gen(es) de resistencia a antibióticos y las células hospedadoras son sensibles a dicho antibiótico(s), la colocación en una placa de agar nutriente que contenga el antibiótico relevante sólo les permitirá crecer a las células que fueron transfectadas y que contienen el DNA del plásmido.

### Bibliotecas de DNA

Las bibliotecas de DNA genómico están hechas a partir del DNA genómico de un organismo. Una biblioteca completa de DNA genómico contiene todas las secuencias del DNA nuclear de ese organismo. Una biblioteca de cDNA se hace mediante DNA complementario (cDNA), el que se sintetiza a partir de mRNA mediante la transcriptasa inversa. Éste contiene sólo aquellas secuencias que se expresan como mRNA en el tejido u organismo de origen.

### Detección de bibliotecas de DNA

Las bibliotecas genómicas y las bibliotecas de cDNA pueden detectarse por hibridación si se usa una sonda marcada de DNA complementario en parte del gen deseado. La sonda puede ser un fragmento de DNA aislado (es decir, un fragmento de restricción) o un oligonucleótido sintético diseñado para codificar parte del gen de acuerdo con lo deducido a partir del conocimiento de la secuencia de aminoácidos de parte de la proteína codificada. De manera adicional, la expresión de las bibliotecas de cDNA puede detectarse por medio de un anticuerpo marcado contra la proteína codificada por el gen deseado o mediante cualquier otro ligando que se una a esa proteína.

### Temas relacionados

- (F1) Introducción al DNA
- (I2) Enzimas de restricción
- (I3) Hibridación de ácidos nucleicos

## El principio de la clonación del DNA

Considérese el objetivo experimental de hacer grandes cantidades de un fragmento particular de DNA en forma pura a partir de una mezcla de fragmentos de DNA de un ratón. Aunque los fragmentos de DNA pueden introducirse dentro de células bacterianas, la mayoría o todos ellos perderán la capacidad de autorreplicación y se perderán pronto. Sin embargo, se conocen dos tipos

de moléculas de DNA que pueden replicarse en forma autónoma en las células bacterianas: los bacteriófagos y los plásmidos. Éstos son pequeñas moléculas de DNA de doble cadena circular que existen libres dentro de las células bacterianas, y con frecuencia son portadores de genes particulares que les confieren resistencia a los fármacos además de ser autorreplicantes. Si una molécula de DNA recombinante se hace por la unión de

un fragmento de DNA de ratón al DNA de un plásmido (o bacteriófago), el DNA del ratón se replica cuando el DNA del plásmido o fago se replica. En este papel, el DNA del plásmido o fago se conoce como un **vector**.

Puede elaborarse una población de moléculas de DNA recombinante, cada una conteniendo una molécula recombinante de los fragmentos de DNA de ratón de la mezcla original. Éstas pueden introducirse en una población de bacterias tal que cada célula bacteriana contenga, en general, un tipo diferente de molécula de DNA recombinante. Si se puede identificar la célula bacteriana que contiene el DNA recombinante portador del fragmento de DNA de ratón que se desea, la célula puede multiplicarse en cultivo y aislarse grandes cantidades del DNA recombinante. El DNA del ratón de interés puede, en ese caso, recuperarse en forma pura; por eso se dice que ha sido **clonado**.

El vector que se usa para conseguir esta clonación se llama **vector de clonación**. Los vectores no están limitados a las células bacterianas; los virus de animales y plantas también pueden actuar como vectores.

## Conceptos básicos de la clonación del DNA

Existe una amplia variedad de procedimientos diferentes para la clonación del DNA en vectores plásmidos o virales y se refiere al lector al libro *BIOS Notas instantáneas de biología molecular* para mayores detalles. No obstante, el esquema básico de los hechos suele ser el mismo. Para clonar dentro de un vector plásmido, el DNA circular del plásmido es cortado con una enzima de restricción (sección I2) que sólo tiene un sitio de reconocimiento en el plásmido. Esto crea una molécula lineal del plásmido con extremos adherentes (figura I4-1). En estos momentos, la estrategia de clonación más simple consiste en cortar el DNA que será clonado (en el ejemplo anterior, el DNA de ratón) con la misma enzima de restricción. De manera alternativa, pueden utilizarse diferentes enzimas de restricción, con la condición de que creen los mismos extremos adherentes (sección I2). El DNA de ratón restringido y el DNA lineal del plásmido se mezclan. Los extremos adherentes del DNA de ratón se asocian con los extremos del DNA del plásmido y se unen en forma covalente por medio de la ligasa de DNA. El **DNA del plásmido recombinante** que resulta se introduce dentro de células hospedadoras bacterianas que recibieron un tratamiento que las vuelve permeables al DNA. Esta captación del DNA por las células bacterianas se llama **transfección**; se dice que las células bacterianas han sido **transfectadas** por el plásmido recombinante. En este punto, se permite el crecimiento y división de las células bacterianas, durante el cual los plásmidos recombinantes se replican muchas veces dentro de tales células.

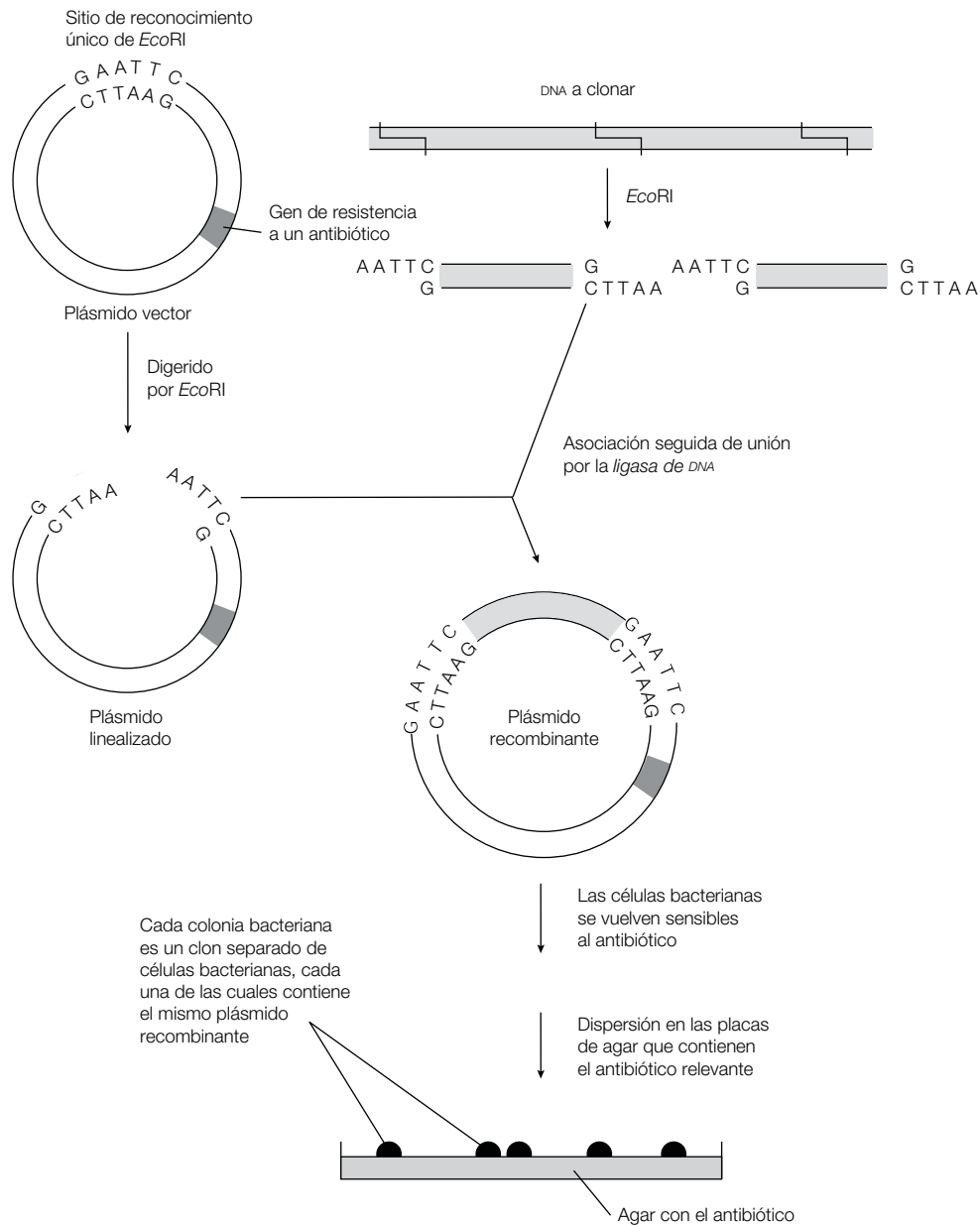
Un procedimiento útil es seleccionar como vector de clonación un plásmido que sea portador de uno o más genes resistentes al(los) antibiótico(s) más un hospedador que sea sensible a tales antibióticos (figura I4-1). Acto seguido, después de la transfección, las células crecen en presencia del antibiótico. Sólo las células que contienen el DNA del plásmido serán resistentes al(los) antibiótico(s) y podrán crecer. Si las células se diseminan en una placa de agar, cada célula se multiplicará para formar una colonia bacteriana donde todas las células de la colonia contienen el mismo DNA del plásmido recombinante y serán portadoras del mismo fragmento de DNA extraño. Por consiguiente, todo lo que ahora se necesita es identificar la colonia de bacterias particular que contiene la secuencia del DNA de ratón de interés.

## Bibliotecas de DNA

Una biblioteca de DNA es una colección de fragmentos de DNA clonados en un vector de clonación que un DNA de interés puede buscar. Si el objetivo es aislar secuencias de genes particulares, existen dos tipos de bibliotecas útiles:

- **Bibliotecas de DNA genómico.** Una biblioteca de DNA genómico se elabora a partir del DNA genómico de un organismo. Por ejemplo, una biblioteca genómica de ratón podría elaborarse por digestión del DNA nuclear del ratón con una nucleasa de restricción para producir un gran número de fragmentos de DNA diferentes, pero todos con extremos adherentes idénticos. Después, los fragmentos de DNA deberían ligarse dentro de moléculas lineales de vectores plásmidos o dentro de un vector viral adecuado. Esta biblioteca debería contener todas las secuencias del DNA nuclear del ratón y sería útil para buscar cualquier gen de ratón de interés. Cada clon de la biblioteca se llama **clon de DNA genómico**. No es forzoso que cada clon de DNA genómico contenga un gen completo, ya que en muchos casos la enzima de restricción cortará cuando menos dentro de un gen. Por eso, algunos clones sólo contienen una parte del gen.
- **Bibliotecas de cDNA.** Una biblioteca de cDNA se elabora mediante el uso de la transcriptasa inversa de un retrovirus para sintetizar copias de DNA complementario (cDNA) del mRNA total de una célula (o tal vez de una fracción de éste). El cDNA de una cadena se convierte en un DNA de doble cadena y se inserta dentro del vector. Cada clon de la biblioteca se llama **clon de cDNA**. A diferencia de una biblioteca genómica completa que contiene todas las secuencias del DNA nuclear de un organismo, una biblioteca de cDNA sólo contiene las secuencias que se expresan como mRNA. Diferentes tejidos de un animal, que expresan algunos genes en común pero también muchos genes





**Figura I4-1.** Método simple de clonación del DNA por intermedio de un vector plásmido. En el texto se asume como un ejemplo que el DNA a clonar es de ratón.

diferentes, producen por lo tanto diferentes bibliotecas de cDNA.

### Detección de bibliotecas de DNA

Las bibliotecas genómicas se detectan por hibridación (sección I3) con una sonda de DNA que es complementaria de parte de la secuencia de nucleótidos del gen deseado. La sonda puede ser un fragmento de restricción de DNA o tal vez parte de un clon de cDNA. Otro método es posible si se conoce parte de la secuencia de la proteína del gen deseado. Si se usa el código genético, se puede deducir la secuencia de DNA de esa parte del

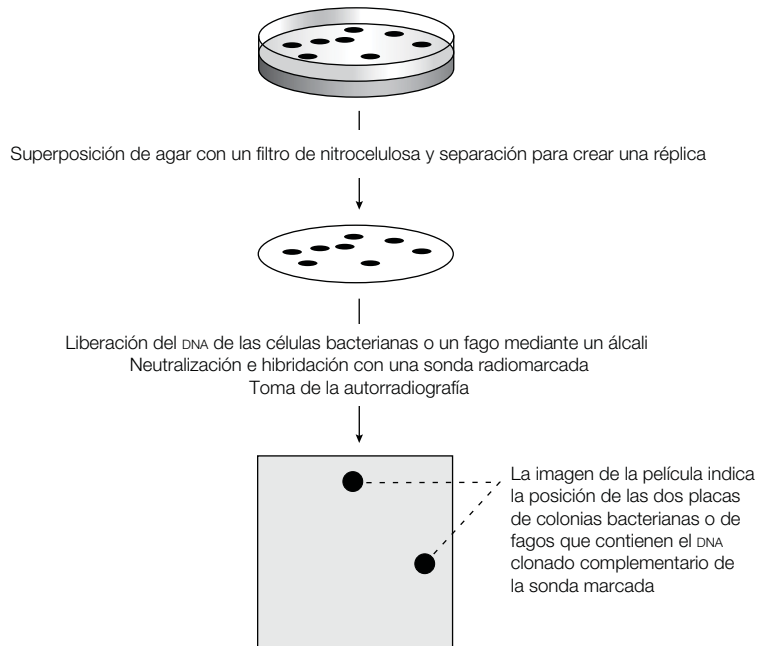
gen y sintetizarse un oligonucleótido con tal secuencia para que actúe como la sonda de DNA.

Cuando se usa un vector plásmido, un procedimiento simple de detección consiste en tomar placas de agar portadoras de colonias de bacterias que elaboren la biblioteca genómica y superponer cada placa con una membrana de nitrocelulosa (figura I4-2). Ésta se separa de aquélla y es una **réplica** de la placa, en que parte de las células bacterianas de cada colonia se han adherido a ella y en el mismo patrón que las colonias de la placa. Con frecuencia, este filtro se llama "**levantamiento de colonia**". Se trata con álcali para lisar las

células bacterianas y desnaturalizar el DNA y entonces se lo hibrida con una sonda de DNA radiomarcada. Después de lavar la parte de la sonda que no reaccionó, la autorradiografía del filtro muestra qué colonias se han hibridado con la sonda y por lo tanto contienen las secuencias deseadas. En ese momento, tales colonias se recuperan de la placa de agar.

Cuando se usa un bacteriófago como el vector de clonación, la biblioteca génica se detecta como una disposición de placas en un prado bacteriano. Se usa un método de detección de la hibridación similar al descrito para la detección de plásmidos (figura I4-2); en este caso, el filtro de replicación se llama “**levantamiento de placa**”.

Para las bibliotecas de cDNA, la detección puede llevarse a cabo por hibridación, de manera similar. Además, es posible elaborar la biblioteca de cDNA mediante un vector que en realidad transcribe el cDNA insertado y luego traduce el mRNA resultante para formar la proteína correspondiente al gen clonado. Una biblioteca elaborada con un **vector de expresión** es una **biblioteca de expresión de cDNA**. Ésta puede detectarse con un anticuerpo marcado que reconoce la proteína específica y por lo tanto identificar a aquellas bacterias que contienen el gen deseado y que son las que sintetizan la proteína. No sólo anticuerpos, sino que puede utilizarse como sonda cualquier ligando que se una a la proteína objetivo. Por ejemplo, una hormona marcada puede usarse para identificar clones que sintetizan proteínas receptoras de la hormona.



**Figura I4-2.** Detección de una biblioteca génica por hibridación.

# 15 Secuenciación del DNA

## Notas clave

### Hay numerosos métodos para la secuenciación del DNA

El DNA puede ser secuenciado por varios métodos, pero el método que se usa de manera usual es el procedimiento de terminación de la cadena. El DNA (de cadena simple) a secuenciar sirve como la plantilla para la síntesis de una cadena complementaria cuando se le aportan un cebador específico y una polimerasa de DNA adecuada.

### Elección de la polimerasa de DNA

La polimerasa de DNA usada para la secuenciación de terminación de la cadena debe tener alta capacidad de procesamiento y actividad de exonucleasa mínima (de manera ideal, ninguna). La polimerasa Klenow fue la enzima que se usó de manera original, pero ya fue sustituida por otras enzimas como la Sequenase.

### Método de terminación de la cadena

Se configuran cuatro mezclas para incubación, cada una con la plantilla de DNA, un cebador específico del DNA, la polimerasa I de DNA de *E. coli* y los cuatro dNTP. De manera adicional, cada mezcla contiene un análogo de didesoxinucleósido trifosfato diferente, ddATP, ddCTP, ddGTP o ddTTP. La incorporación de un análogo de didesoxi evita la elongación adicional y de esta manera produce la terminación de la cadena del producto en extensión. Estos productos se someten a electroforesis en un gel de poliacrilamida y la secuencia de DNA se lee desde el patrón de bandas que produce.

### Secuenciación automatizada del DNA

La secuenciación automatizada del DNA usa el método de terminación de la cadena, pero con un oligonucleótido cebador marcado con un colorante fluorescente. Cada una de las cuatro reacciones recibe un cebador marcado con un colorante diferente. Después de la incubación, las mezclas de la reacción se reúnen y someten a electroforesis en un carril de un gel de poliacrilamida. El orden en el cual los diferentes productos de terminación marcados con fluorescencia eluye del gel proporciona la secuencia del DNA. Sistemas más avanzados utilizan equipos con capilaridad múltiple en los cuales la preparación, la carga y el análisis de datos de la muestra están automatizados para un máximo aprovechamiento.

### Temas relacionados

(F1) Introducción al DNA  
(F3) Replicación del DNA en bacterias  
(I3) Hibridación de ácidos nucleicos

## Hay numerosos métodos para la secuenciación del DNA

Se han ideado numerosos métodos para secuenciar el DNA, como el **método de degradación química** (también llamado *método de Maxam-Gilbert* en honor a sus inventores), el **método de terminación de la cadena** (también conocido como el *método didesoxi de Sanger* en honor a su inventor) y desde hace poco la **pirosecuenciación**.

El método de terminación de la cadena es en estos momentos el método que más se usa debido a su velocidad y simplicidad. El método de la degradación química es útil para algunos segmentos del DNA que forman pares de bases intracatenarios, los cuales pueden

ofrecer dificultad para secuenciarlos por el método de terminación de la cadena. La pirosecuenciación no necesita electroforesis o separación de los fragmentos y de esta manera es más rápida que los otros dos métodos, pero puede generar sólo unas pocas decenas de pares de bases de la secuencia por experimentar. Es útil en situaciones donde un gran número de secuencias cortas se requiere con prontitud. Estos métodos adicionales se describen en todas partes; aquí se pondrá el acento sólo en el principal método de secuenciación, el método de terminación de la cadena.

El DNA a secuenciar mediante el método de terminación de la cadena se prepara con una molécula de cadena simple de manera que pueda actuar como una plantilla

para la síntesis de DNA (sección F3) en la reacción de secuenciación. Se usa una polimerasa de DNA adecuada (véase más adelante) para copiar la plantilla de DNA, pero se necesita un cebador para iniciar la síntesis (sección F3). El cebador usado puede ser un fragmento de restricción de DNA complementario del de la plantilla uncatenaria o puede ser una secuencia corta de DNA complementario que se sintetizó por medios químicos (un **oligonucleótido sintético**).

### Elección de la polimerasa de DNA

La polimerasa de DNA que se usa en la secuenciación de la terminación de la cadena necesita sintetizar DNA complementario de la plantilla del DNA por extensión del cebador. La enzima debe tener alta capacidad de **procesamiento** (es decir, sintetizar tramos largos del DNA sin detenerse). Pese a ello, la mayor parte de las polimerasas de DNA también tiene actividad de exonucleasa, lo que significa que puede degradar el DNA a medida que lo sintetiza. La polimerasa de DNA ideal para secuenciación del DNA debe tener, por lo tanto, niveles de actividad de exonucleasa 5' a 3' mínimos o de valor cero y asimismo niveles mínimos o de valor cero de actividad de exonucleasa 3' a 5'.

La primera enzima desarrollada para la secuenciación del DNA fue la **polimerasa de Klenow**, la cual es una polimerasa I de DNA de *E. coli* de la que se eliminó la actividad de exonucleasa 5' a 3' mediante ingeniería genética, es decir, mediante técnicas de DNA recombinante. Desafortunadamente, la polimerasa de Klenow tiene una capacidad de procesamiento relativamente baja, de manera que ha sido reemplazada en gran medida por otras enzimas, en especial por la polimerasa de DNA T7 de bacteriófagos, la cual presenta una capacidad de procesamiento alta y a la que también se le eliminó la actividad de exonucleasa por ingeniería genética (en el mercado está disponible como Sequenase™).

### Método de terminación de la cadena

Se coloca una mezcla en incubación que contenga la plantilla del DNA de una cadena, el cebador, la polimerasa I de DNA y los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), uno de los cuales está marcado con radiactividad, más un análogo de 2'3' didesoxirribonucleósido trifosfato, es decir ddGTP. En esta incubación, la polimerasa de DNA comienza a copiar las moléculas plantilla mediante extensión del cebador unido. A medida que se sintetiza la nueva cadena de DNA, en cada momento que el dGTP debe ser incorporado, hay una posibilidad de que el ddGTP se incorpore en su lugar. Si esto sucede, no puede producirse la elongación

adicional de la cadena debido a que los análogos didesoxi 3'-OH carecen del grupo oxhidrilo 3' necesario para producir el siguiente enlace 3'5' fosfodiéster. En consecuencia, esa cadena particular se detiene en este punto. En esta primera mezcla en incubación se copia una gran población de plantillas y cada nueva cadena se detiene al azar en posiciones donde debe añadirse un G a la nueva cadena que acaba de sintetizarse. Por consiguiente, por cada G en la secuencia complementaria, debe haber algunas cadenas de DNA nuevas que han terminado en ese punto (figura I5-1).

De hecho, se colocan cuatro mezclas en incubación, cada una de las cuales contiene los mismos componentes, excepto que cada una contiene un diferente análogo didesoxi; uno de ddATP, ddCTP, ddTTP o ddGTP (figura I5-1). Esto produce cuatro conjuntos de fragmentos de cadena terminada correspondientes a las posiciones A, C, T y G de la secuencia. Después de la incubación, las cuatro mezclas reactivas se someten a electroforesis en carriles paralelos de un gel de poli(acrilamida) y luego a autorradiografía. La secuencia de DNA se determina simplemente por lectura del patrón de banda del autorradiograma desde abajo del gel hacia arriba (es decir, se lee la secuencia del DNA como fue sintetizada desde el cebador; figura I5-1). La secuencia leída fuera del gel es la secuencia de la cadena de DNA sintetizada y por lo tanto es la secuencia complementaria de la cadena plantilla del DNA original.

### Secuenciación automatizada del DNA

La secuenciación automatizada del DNA es ahora un lugar común, basada en el método de terminación de la cadena, pero en la que se usa un colorante fluorescente fijo a un oligonucleótido cebador en lugar de usar una marcación radiactiva. Un colorante fluorescente distinto se fija al cebador de cada una de las cuatro reacciones de secuenciación pero, después de la incubación, las cuatro mezclas se combinan y someten a electroforesis en un carril del gel. Los sistemas de detección por láser distinguen entonces la identidad de cada producto terminado a medida que eluye del gel. La secuencia a la cual los diferentes productos fluorescentes eluyen del gel proporciona la secuencia del DNA.

Los modernos sistemas de secuenciación del DNA automatizados, diseñados para generar casi un millón de secuencias de bases por día, usan geles de secuenciación contenidos en múltiples tubos capilares (en lugar de hacerlo en un formato de gel en placa). La preparación y carga de las muestras en los geles capilares las llevan a cabo robots, que proveen 24 horas de operación, y el análisis de los datos también está automatizado.

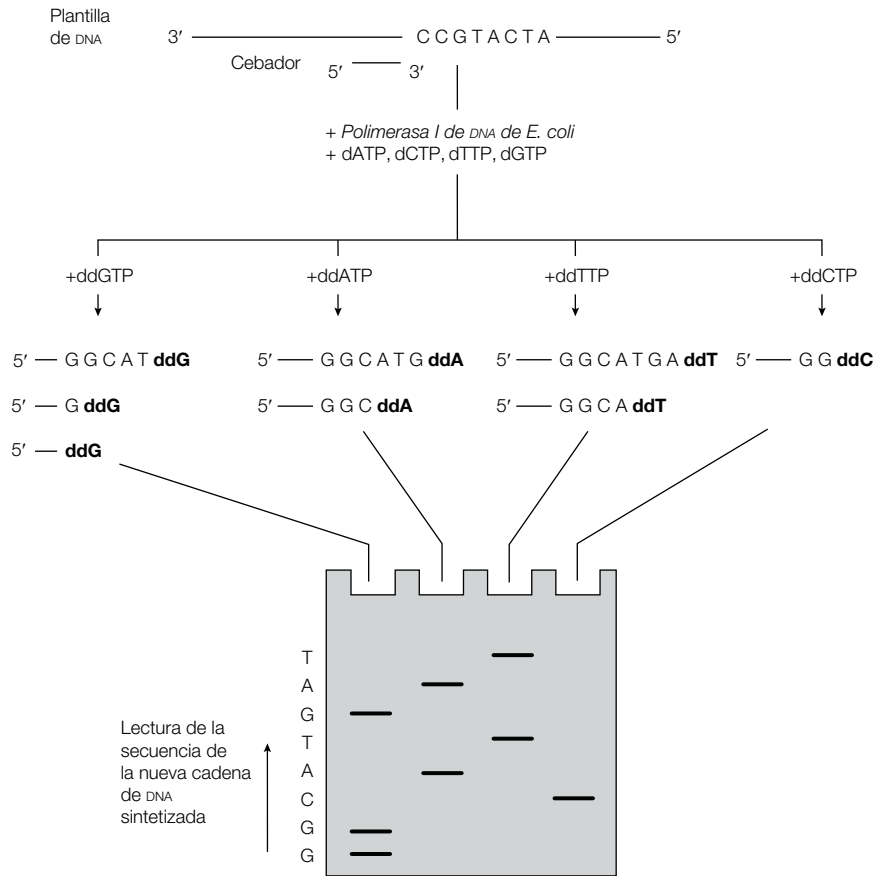


Figura I5-1. Secuenciación del DNA por el método de terminación de la cadena (Sanger).

# 16 Reacción en cadena de la polimerasa

## Notas clave

### Principios de la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite un número extremadamente grande de copias a sintetizar de cualquier secuencia de DNA, siempre que estén disponibles dos oligonucleótidos cebadores para hibridar las secuencias acompañantes de las cadenas de DNA complementario. La reacción requiere el DNA objetivo, los dos cebadores, los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato y una polimerasa de DNA termoestable como la polimerasa de DNA *Taq*. Un ciclo de la PCR consta de tres etapas: desnaturalización, hibridación del cebador y elongación. Este ciclo se repite el número de veces seleccionado según el grado de amplificación que se requiera.

### Aplicaciones de la PCR

La PCR ha producido un notable impacto en la biología molecular, con aplicaciones en muchas áreas entre las que se incluyen el diagnóstico médico, la medicina forense y la creación de mutaciones específicas. La detección por PCR de enfermedades genéticas humanas se basa en el análisis de los microsatélites (también denominados STR), los cuales son repeticiones de secuencias de nucleótidos cortas en el genoma humano. Las variaciones en el número de repeticiones entre los genomas individuales permiten usar los STR como marcadores de detección.

### PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real permite la cuantificación de las moléculas objetivo de DNA (o RNA) en muestras biológicas por medio de la medición de la tasa de amplificación durante la reacción de la PCR. Un método es incluir un colorante en la mezcla de la reacción de la PCR que se une a un DNA de doble cadena y fluoresce en el estado unido. Un método más específico es usar cebadores que tengan un reportero fluorescente unido de manera covalente a un extremo del cebador y un agente de extinción en el otro extremo. A medida que se usa el cebador en la reacción de la PCR, la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa *Taq* elimina un extremo del cebador y permite que el reportero fluorescente module la fluorescencia dado que ya no está en estrecha proximidad con la molécula extinguidora. El incremento en la fluorescencia exhibe por lo tanto la tasa de la reacción de amplificación. La PCR en tiempo real puede usarse para medir la cantidad de una molécula objetivo en la muestra de prueba ya sea en relación con otras muestras o en términos absolutos.

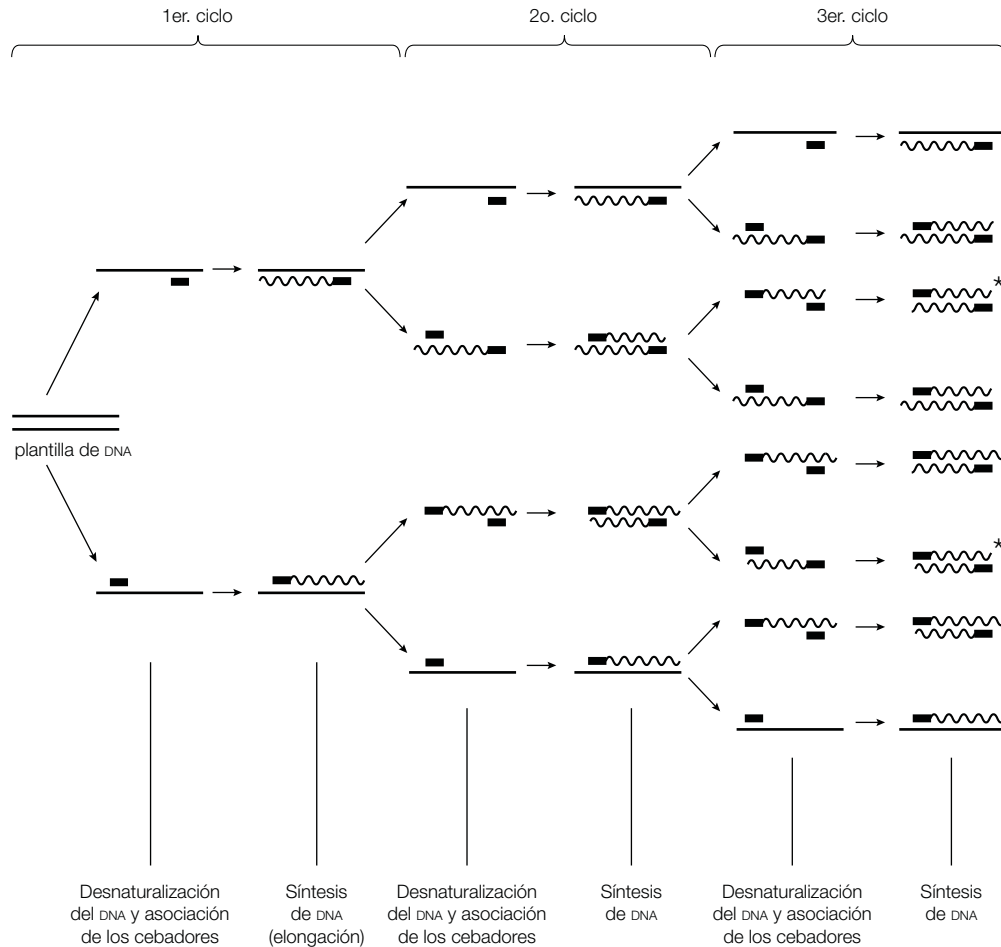
### Temas relacionados

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| (F1) Introducción al DNA                  | (I3) Hibridación de ácidos nucleicos |
| (F3) Replicación del DNA en las bacterias | (I4) Clonación del DNA               |
| (I2) Enzimas de restricción               | (I5) Secuenciación del DNA           |

## Principios de la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica en extremo simple, pero de un poder inmenso. Permite la amplificación enorme de una secuencia específica de DNA, siempre que las secuencias cortas a ambos lados de la misma se conozcan. Esta técnica se muestra en la figura I6-1. Una reacción de la PCR contiene el DNA de doble cadena objetivo, dos cebadores que hibridan las secuencias acompañantes de las cadenas opuestas a la cadena objetivo, cuatro desoxirribonucleósidos tri-

fosfato y una polimerasa de DNA. Debido a que, como ya fue visto, la reacción se calienta a altas temperaturas en forma periódica, la PCR depende de usar una polimerasa de DNA estable al calor. Muchas de tales enzimas estables al calor procedentes de bacterias termófilas (bacterias que viven en ámbitos de altas temperaturas) están disponibles en la actualidad en forma comercial. La primera de éstas en ser usada fue la polimerasa *Taq*, proveniente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*.



**Figura I6-1.** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los asteriscos (\*) indican los primeros productos que origina la PCR (en el tercer ciclo), los cuales constan de la secuencia de DNA encerrada entre los sitios de los dos cebadores.

- 1. Desnaturalización.** La mezcla de la reacción se calienta a 94 °C por un corto lapso (alrededor de 15 a 30 segundos) para desnaturalizar el DNA objetivo en cadenas simples que puedan actuar como plantillas para la síntesis del DNA.
- 2. Hibridación del cebador.** La mezcla se enfría con rapidez a una temperatura definida (50 a 60 °C), la cual permite que los dos cebadores se unan a las secuencias que flanquean al DNA objetivo en cada una de las dos cadenas. Esta **temperatura de hibridación** se calcula con cuidado para asegurar que los cebadores se unan sólo a las secuencias deseadas del DNA. Un cebador se une a cada cadena (figura I6-1). Las dos cadenas parentales no se reasocian entre sí debido a que los cebadores exceden en longitud a los DNA parentales.

- 3. Elongación.** La temperatura de la mezcla se eleva a 72 °C (la temperatura óptima de la polimerasa *Taq*) y se mantiene a esta temperatura por un periodo pre-seleccionado que permite a la polimerasa *Taq* elongar cada cebador mediante la copia de las plantillas de cadena simple. Al final de esta incubación, ambas cadenas plantilla de cadena simple se han convertido de manera parcial en cadena doble. La nueva cadena de cada DNA de cadena doble se extiende por una distancia variable corriente abajo.

Los tres pasos del ciclo de la PCR se repiten. Por lo tanto, en el segundo ciclo, las cuatro cadenas se desnaturalizan, los cebadores se unen y se extienden. No se necesita añadir ningún otro reactante. Los tres pasos se repiten una vez más en un tercer ciclo (figura I6-1) y de la misma manera por el número seleccionado de ciclos.

adicionales. En el tercer ciclo, parte de los productos de la PCR (indicada por asteriscos en la figura I6-1) representa a las secuencias del DNA que se hallan sólo entre los dos sitios cebados y la secuencia no se extiende más allá de estos sitios. A medida que se producen más ciclos de reacción, este tipo de moléculas de DNA de doble cadena se convierte en la mayor de las especies presentes. Después de 20 ciclos, el DNA original ha sido amplificado un millón de veces y aumenta a mil millones de veces después de 30 ciclos. En este punto, la vasta mayoría de los productos es idéntica al DNA amplificado y sólo los que se ubican entre los dos sitios cebados.

En la actualidad se usan de rutina los **termocicladores** automatizados para reciclar la reacción sin interferencia manual, y de esta manera la amplificación de la secuencia del DNA entre los dos sitios cebados de mil millones de veces (30 ciclos) puede efectuarse en ¡menos de una hora!

### Aplicaciones de la PCR

La PCR tiene ya muchas aplicaciones extendidas y se están diseñando nuevos usos en una base regular. Algunas (y por cierto, no todas) de las aplicaciones son las siguientes:

- La PCR puede amplificar una molécula de DNA sola a partir de una mezcla compleja, lo que evita en gran medida la necesidad de usar la clonación del DNA para preparar dicha molécula. Sin embargo, esto requiere algunos datos de las secuencias que flanquean al gen con el fin de amplificarlas y por consiguiente no se puede usar para amplificar genes de manera específica si esta información se desconoce.
- Variantes de la técnica pueden amplificar una molécula de RNA sola específica a partir de una mezcla compleja. Como la polimerasa *Taq* no puede copiar RNA, el primer paso consiste en usar la transcriptasa inversa para producir un DNA que sea copia del RNA, el cual entonces puede amplificarse de la manera usual por la polimerasa *Taq*. Por lo tanto, esta variante se denomina **PCR con transcriptasa inversa** o RT-PCR.
- La PCR es sensible en extremo y puede amplificar de manera infinita cantidades pequeñas de DNA o RNA. Con el recurso de cebadores apropiados pueden detectarse cantidades muy pequeñas de bacterias y virus específicos en los tejidos, lo que convierte a la PCR en una herramienta invaluable para el diagnóstico médico. De manera importante, dada la sensibilidad del análisis por PCR, este diagnóstico puede generarse muy temprano en el curso de la enfermedad. Por ejemplo, el diagnóstico temprano de un cáncer inducido por virus ofrece el potencial de una tasa de éxito mucho más alta de tratamiento.
- La PCR también resulta invaluable para la detección de enfermedades genéticas humanas y está reemplazando con rapidez el uso de los RFLP (sección I2). La detección de la PCR se basa en el análisis de los

**microsatélites** (también llamados **repeticiones en tándem cortas** o STR), los cuales son repeticiones de secuencias de nucleótidos cortas; usados como marcadores del DNA por la PCR, los STR son típicamente de 6 bp o menos de tamaño y se repiten de 10 a más de 30 veces. Dispersas a lo largo del genoma humano, se producen alrededor de  $5 \times 10^5$  STR, con repeticiones de 6 bp o menos, y de esta manera la mayoría de las regiones del genoma cuenta con STR adecuados para usar como marcadores en la PCR. Los STR pueden usarse de la misma forma que se usaron los RFLP en el pasado (sección I2); los diferentes tamaños de STR dan diferentes tamaños de fragmentos de DNA amplificados, que entonces pueden usarse como marcadores de detección. De manera habitual, los STR suelen analizarse mediante una marca fluorescente unida a uno o ambos cebadores de la PCR, seguido de la electroforesis capilar en gel de poliacrilamida. Los productos fluorescentes de la PCR migran a través del gel más allá de un detector de fluorescencia; el tiempo que toman en reaccionar con el detector comparado con el tiempo que toman los marcadores de tamaño conocido permite a una computadora enlazada calcular el tamaño de cada producto de la PCR. El método es muy rápido, confiable y usa muy pequeñas cantidades de material clínico.

- Debido a su extrema sensibilidad, la PCR también es ahora de importancia fundamental en la medicina forense. La variación en el número de repeticiones en STR específicas de persona a persona, acoplada a un gran número de STR disponibles para usar como marcadores, permiten la identificación individual. Por ejemplo, es posible usar la PCR para amplificar el DNA de un simple cabello humano, o del material biológico dejado en un cigarrillo o en una estampilla, o de una gota de sangre microscópica. Cualquiera de estos materiales que permanece en la escena de un crimen puede generar suficiente DNA para usar la PCR en la caracterización e identificación de los individuos relevantes.
- Mediante el uso de cebadores adecuados, es posible usar la PCR para crear mutaciones puntuales en el DNA objetivo, lo cual facilita en gran medida el análisis de la expresión y función del gen (sección I7).

### PCR en tiempo real

La PCR tradicional no es útil para cuantificar la cantidad de plantilla de RNA o DNA original, ya que la cantidad de producto de la PCR sintetizado se determina más por la cantidad de los cebadores y de otros reactivos en la mezcla de la reacción que por la cantidad de la plantilla. Sin embargo, la cuantificación es posible si se usa la **PCR en tiempo real**.

Nótese que la abreviatura RT-PCR suele reservarse para la PCR con transcriptasa inversa (véase antes) y no para la PCR en tiempo real (del inglés *Real-time*), pero esto no



siempre se acepta de manera universal y puede confundir. La PCR en tiempo real se llama de esta manera debido a que el DNA amplificado se detecta a medida que la reacción progresa en tiempo real, en oposición a la PCR tradicional, donde el producto de la PCR se analizaba al final de la amplificación.

Existen dos métodos principales para llevar a cabo la PCR en tiempo real:

- El primero de ellos consiste en incluir un colorante en la mezcla de la reacción de la PCR que se una exclusivamente al DNA de doble cadena y que emita fluorescencia con fuerza cuando se une, por ejemplo, al verde I de SYBR. A medida que la PCR avanza, el colorante se une al DNA amplificado de cadena doble y emite fluorescencia. De esta manera, la tasa de la reacción puede medirse por el incremento en la fluorescencia conforme transcurre el tiempo (para lo cual se usa un termociclador de la PCR en tiempo real), tasa que resulta proporcional a la cantidad de la plantilla original. No obstante, debido a que el colorante se une a cualquier DNA de cadena doble con independencia de su secuencia, no es un método de cuantificación específico.
- El segundo método es para los cebadores usados en la mezcla de reacción de la PCR para ser marcados en un extremo con una molécula que reporta fluorescencia y en el otro extremo con una molécula extinguidora de la fluorescencia. Debido a que la molécula extinguidora se localiza cerca de la que reporta fluorescencia, se evita que el cebador intacto emita fluorescencia. Pese a ello, como en la reacción de la PCR el cebador se usa durante la amplificación, la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa *Taq* remueve un extremo del cebador. De esta manera, la molécula que reporta fluorescencia no queda tan cerca de la extinguidora y por lo tanto emite fluorescencia. Pueden usarse múltiples sondas con diferentes marcadores de fluorescencia coloreados para la detección de numerosas secuencias diferentes de DNA en la misma reacción (PCR **multiplex**).

La PCR en tiempo real puede usarse para cuantificar ácidos nucleicos en forma relativa o absoluta. La cuantificación relativa mide la diferencia de veces (es decir 2x, 3x) en la molécula objetivo por PCR entre dos o más muestras. La cuantificación absoluta mide la cantidad exacta de la molécula objetivo en la muestra al comparar la tasa de amplificación con la de los estándares conocidos.

# 17 Mutagénesis dirigida al sitio

## Notas clave

### ¿Por qué se usa la mutagénesis dirigida al sitio?

La mutagénesis dirigida al sitio usa técnicas de DNA recombinante para crear mutaciones definidas en el gen objetivo.

### Mutagénesis dirigida por oligonucleótidos

Se sintetiza un oligonucleótido que contiene la mutación puntual deseada —esto es, un cambio de un solo nucleótido—. Luego éste se hibrida con una plantilla de DNA de una cadena de fago M13 recombinante que contiene la secuencia del gen objetivo. La polimerasa de DNA usa el oligonucleótido como cebador para sintetizar una copia completa de la plantilla del DNA, pero que ahora contiene la mutación puntual requerida. Después de la transformación en la *E. coli* y la replicación, 50% de las moléculas de DNA de recombinación contiene la secuencia génica original, pero el otro 50% de las copias contiene la secuencia del gen mutado. Así como las mutaciones puntuales, la mutagénesis dirigida por un nucleótido también puede usarse para crear deleciones o inserciones pequeñas en la secuencia objetivo.

### Mutagénesis de casete

En la mutagénesis de casete, una región apropiada del gen objetivo es eliminada de una molécula de DNA recombinante mediante la digestión de una enzima de restricción y es reemplazada por un oligonucleótido de cadena doble que ha sido sintetizado para incluir la(s) mutación(es) deseada(s).

### Mutagénesis dirigida al sitio con la PCR

Se llevan a cabo dos reacciones con la PCR, cada una de las cuales utiliza un cebador oligonucleótido portador de la mutación deseada y un cebador que hibrida a una secuencia que flanquea la secuencia del gen de interés. Los dos productos de estas reacciones con la PCR corresponden cada uno a alrededor de 50% de la secuencia del DNA objetivo original. Éstos son luego desnaturalizados, mezclados juntos y sometidos a otra reacción con la PCR, la cual conduce a la síntesis de moléculas de longitud total que contienen la fijación.

### Síntesis de novo

Las secuencias génicas portadoras de mutaciones definidas pueden sintetizarse por superposición de oligonucleótidos sintéticos mediante una polimerasa de DNA que llene las brechas.

### Ingeniería de proteínas

La ingeniería de proteínas usa técnicas de DNA recombinante para crear proteínas nuevas. El método de diseño racional usa el conocimiento de las interrelaciones entre estructura y función de la proteína objetivo para decidir qué aminoácidos deberán mutarse mediante tecnología de DNA recombinante para obtener el cambio fenotípico deseado. La evolución dirigida funciona mediante la creación de grandes números de mutaciones a través de la secuencia del gen objetivo y luego la selección de aquellas que muestren las mejorías en la(s) característica(s) deseada(s). El proceso se repite hasta la culminación exitosa en la selección de una proteína que satisfaga los resultados deseados. Las proteínas nuevas también pueden producirse mediante la fusión de regiones de los genes que codifican los dominios específicos de las proteínas.

### Temas relacionados

- |                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| (H1) El código genético              | (14) Clonación del DNA                   |
| (12) Enzimas de restricción          | (15) Secuenciación del DNA               |
| (13) Hibridación de ácidos nucleicos | (16) Reacción en cadena de la polimerasa |

## ¿Por qué se usa la mutagénesis dirigida al sitio?

De manera clásica se ha aprendido muchísimo acerca de la función génica mediante el análisis de las mutaciones. De manera típica, el organismo en estudio se expone a un mutágeno que genera mutaciones aleatorias y aquellas mutantes que muestran un fenotipo particular se seleccionan para estudios adicionales. Una diversidad de métodos, entre los que se incluye la secuenciación del DNA, se usan para identificar el gen (o genes) que ha sido mutado y la naturaleza de los cambios. Esto proporciona información valiosa sobre el gen y la función de la proteína. Sin embargo, este enfoque clásico es en extremo laborioso e incluye la detección de grandes números de mutaciones aleatorias en espera de encontrar mutaciones útiles en el gen de interés. En contraste, las técnicas con DNA recombinante permiten realizar cambios definidos en la secuencia del gen y generar las mutaciones deseadas con certeza. En conjunto, estas técnicas se denominan **mutagénesis dirigida al sitio** o **mutagénesis *in vitro***.

Hay muchos métodos en uso para la mutagénesis dirigida al sitio, algunos de los cuales son complejos, y de esta manera no todos pueden cubrirse en este momento. No obstante, la descripción siguiente explica los principales tipos de procedimientos usados.

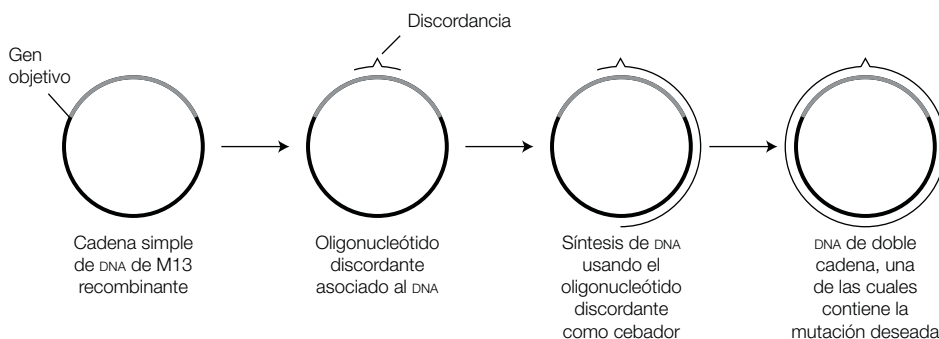
### Mutagénesis dirigida por oligonucleótidos

Se asume que el objetivo es reemplazar un residuo de cisteína particular por glicina en una proteína objetivo, y que el codón TGC del gen codifica el residuo de cisteína en cuestión. A partir del código genético (sección H1) se sabe que uno de los codones de la glicina es GGC, de manera que la mutación requerida consiste en reemplazar la T del codón TGC específico del gen con G para convertirlo en el codón TGC.

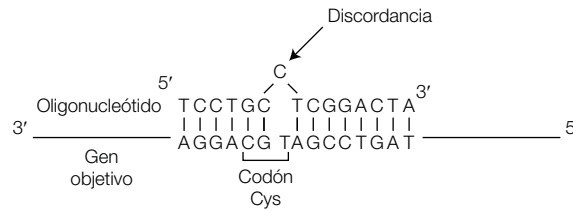
El primer paso es clonar el gen objetivo en el fago M13 como el vector, el cual tiene la característica útil de producir una plantilla de DNA de una cadena (figura I7-1). A continuación se sintetiza un oligonucleótido que contiene la mutación requerida y que es hibridado con el DNA de una cadena del fago M13 recombinante. Como se muestra en la figura I7-1, y con mayor detalle en la figura I7-2, todos los nucleótidos del oligonucleótido forman pares de bases con sus nucleótidos complementarios en el gen excepto en la mutación porque ésta no tiene correspondencia. A continuación, el oligonucleótido se usa como cebador de la polimerasa de DNA, la cual copia la plantilla completa del DNA M13 recombinante para producir una molécula de DNA de cadena doble, una cadena de las cuales contiene la mutación deseada (figura I7-1). Ésta se introduce dentro de *E. coli*, la que produce múltiples copias, la mitad de las cuales contiene la secuencia del gen objetivo original y la otra mitad es portadora del gen mutado. El fago recombinante resultante puede colocarse en una placa de agar para producir placas y las placas del fago mutante pueden identificarse por hibridación si el oligonucleótido portador de la mutación se usa como una sonda radiactiva (sección I4).

Hay una diversidad de variaciones de este protocolo básico entre las que se incluyen el uso de plásmidos de DNA de cadena doble en lugar del fago M13, pero en cada variante del protocolo el principio de usar un oligonucleótido discordante para generar el gen mutado deseado permanece como tal.

La mutagénesis dirigida por un oligonucleótido usada como se describe aquí genera **mutaciones puntuales**, que implican la sustitución de un nucleótido por otro. A pesar de ello, también puede usarse para generar pequeñas **inserciones** o **delecciones** como la inserción de tres nucleótidos adicionales que codifican un aminoácido adicional o la delección de tres nucleótidos para remover un aminoácido específico de la proteína codificada por el gen objetivo.



**Figura I7-1.** Mutagénesis dirigida por oligonucleótidos. El gen objetivo que contiene un fago M13 recombinante es hibridado con un oligonucleótido que contiene el cambio de nucleótido requerido para producir la mutación buscada. La síntesis de DNA que utiliza el oligonucleótido como cebador crea una molécula de DNA de doble cadena, una de las cuales es de tipo natural mientras la otra es portadora de la mutación puntual.



**Figura 17-2.** Un oligonucleótido que contiene un cambio de un nucleótido con respecto a los pares de bases de la secuencia del DNA original con el gen objetivo, excepto en la posición del nucleótido sustituido, ya que éste es discordante.

### Mutagénesis de casete

En la mutagénesis de casete, un plásmido recombinante que contiene el gen objetivo es cortado con enzimas de restricción que escinden un fragmento portador de la secuencia del gen que será mutada (figura 17-3). A continuación se prepara un oligonucleótido de doble cadena que es sintetizado de manera que incluya la(s) mutación(es) deseada(s), cuyos extremos adherentes son complementarios con los extremos del plásmido recombinante cortado. El oligonucleótido hibrida al plásmido cortado y ambos se unen por medio de una ligasa de DNA T4, la cual produce un plásmido recombinante que contiene la mutación deseada en el gen (figura 17-3).

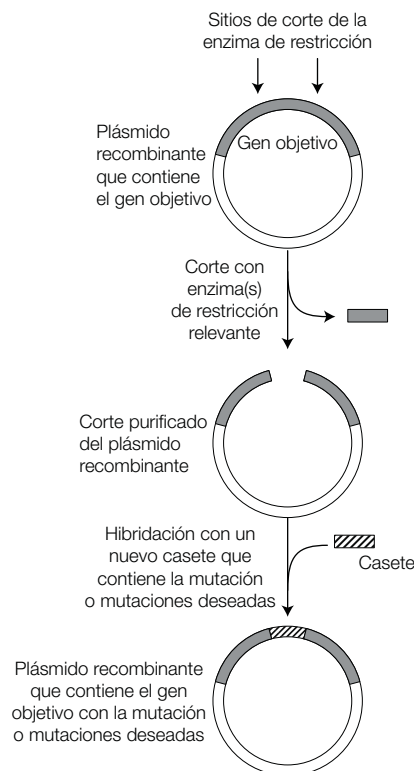
Como en la introducción de mutaciones puntuales, la mutagénesis de casete también puede introducir deleciones o inserciones y éstas pueden ser más grandes que

las que se pueden hacer mediante la mutagénesis dirigida por oligonucleótidos.

### Mutagénesis dirigida al sitio con la PCR

Está disponible una diversidad de métodos para realizar mutagénesis dirigida al sitio con la PCR. El método que se muestra en la figura 17-4 usa dos cebadores que se sitúan en los límites de la secuencia del gen objetivo de interés (cebadores 1 y 4) y dos cebadores que se superponen en forma parcial, los cuales contienen cada uno la mutación deseada (cebadores 2 y 3).

Se llevan a cabo dos reacciones con la PCR, una usa los cebadores 1 y 2 y la otra, los cebadores 3 y 4. En el ejemplo que se muestra en la figura 17-4, donde la

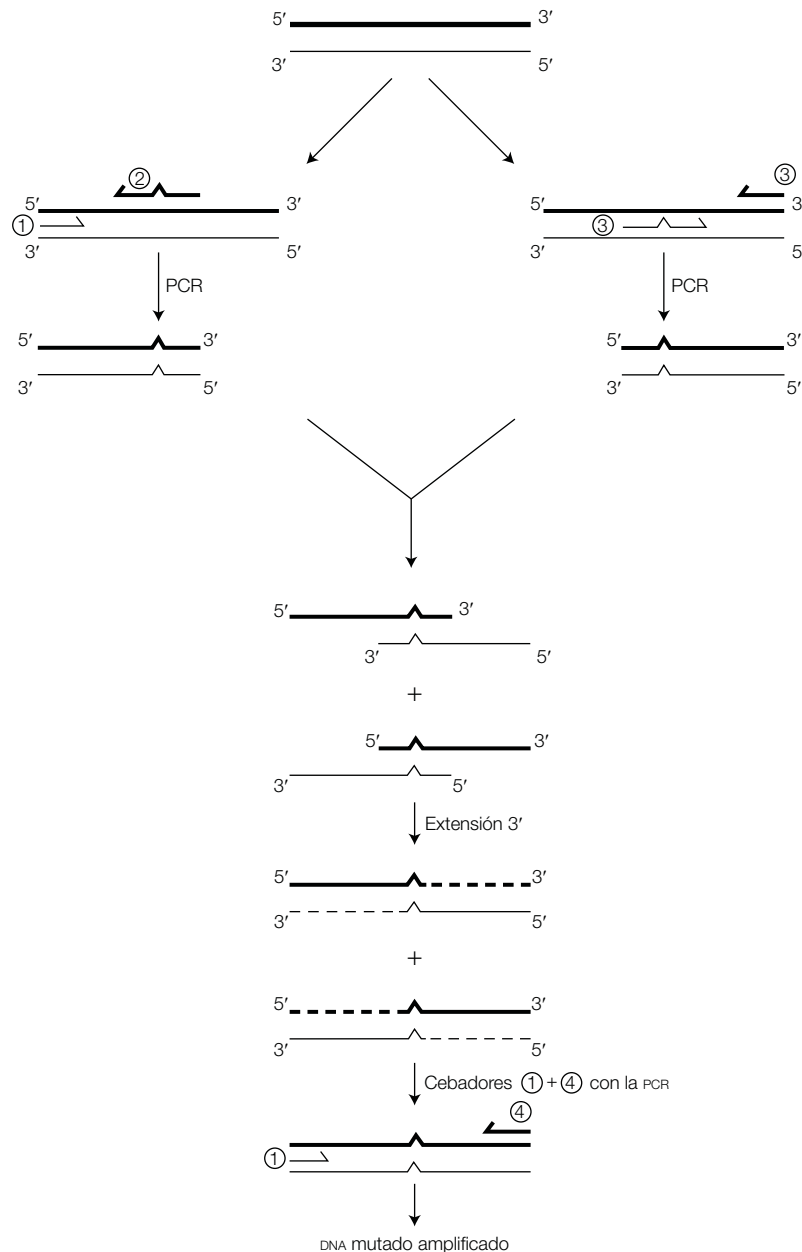


**Figura 17-3.** Mutagénesis de casete.

mutación deseada se encuentra cerca del punto medio de la secuencia del gen objetivo, cada una de las dos reacciones de la PCR amplifica alrededor de la mitad de la secuencia objetivo. Luego, los dos productos de la PCR son desnaturalizados y mezclados, tras lo cual se hibridan debido a la secuencia superpuesta de los cebadores incorporados 2 y 3. Acto seguido, el DNA hibridado sufre extensión y amplificación 3' en la reacción final de la PCR en la que usan los cebadores 1 y 4, con la que produce el DNA amplificado de longitud total que contiene la mutación deseada.

**Síntesis de novo**

Otro método para introducir una mutación sigue siendo sintetizar el gen *de novo* mediante la preparación de una serie de oligonucleótidos superpuestos —cada uno de alrededor de 150 nucleótidos de largo o más—, hibridarlos juntos y llenar las brechas con la polimerasa de DNA. Por último, el gen sintético con las mutaciones deseadas se inserta en un vector para su amplificación y luego se realizan las pruebas necesarias en un organismo hospedador adecuado.



**Figura I7-4.** Mutagénesis dirigida al sitio con la PCR. Los diversos pasos se describen en el texto. Adaptado de Strachan T. y Read A. (2011). *Human Molecular Genetics*, 4a. ed., Garland Science.

## Ingeniería de proteínas

El poder de la tecnología del DNA recombinante para modificar la secuencia de un gen a voluntad abre el potencial para crear proteínas novedosas que son más adecuadas para investigaciones específicas, uso clínico o industrial. Por ejemplo, sería posible aumentar la estabilidad de una enzima específica o modificar su especificidad por un sustrato. Este nuevo campo se llama **ingeniería de proteínas**. En la ingeniería de proteínas se utilizan dos métodos generales, el **diseño racional** y la **evolución dirigida**.

El diseño racional se basa en el conocimiento de la proteína nativa para identificar los cambios que se le podrían hacer para conseguir el resultado deseado, y a continuación dichos cambios se implementan por ingeniería mediante la mutagénesis dirigida al sitio. El problema con este método radica en que todavía no se sabe lo suficiente acerca de las interrelaciones estructura-función de la mayor parte de las proteínas, para de ese modo ser capaces de predecir qué mutaciones requieren hacerse para alcanzar el objetivo buscado. Sin embargo, como el conocimiento acerca de la estructura de las proteínas continuará en expansión en los años por venir, este método encierra un gran potencial.

En la evolución dirigida se crean grandes números de variantes del gen de interés, para lo cual se recurre a la generación de mutaciones en las que se usan las técnicas del DNA recombinante. Los genes se expresan y luego se usa un proceso de selección para escoger los genes

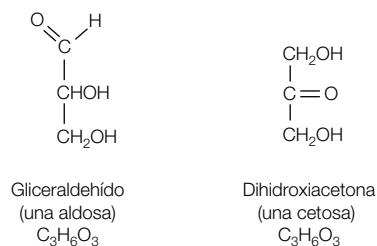
mutados que producen las proteínas cuyas características se acercan más a las pretendidas. A continuación, los genes mutados seleccionados se someten a nuevas rondas de mutación y selección, con la esperanza de que produzcan variantes de proteínas que incluso estén mejor dotadas de las propiedades deseadas. Este proceso se denomina evolución dirigida porque muestra paralelismo con la evolución natural de las mutaciones benéficas. La mayor desventaja de la evolución dirigida es el descomunal esfuerzo que se requiere para producir y detectar grandes números de variantes de proteínas, de manera que se trata de un método de alto rendimiento. Pese a ello, encierra la gran ventaja de que no se necesita conocer qué aspectos de la estructura proteínica conducirán a la funcionalidad deseada.

Por último, pueden crearse nuevas proteínas mediante la fusión de partes de genes que codifican dominios específicos de proteínas de diferentes proteínas. Por ejemplo, las inmunotoxinas son nuevas proteínas que se crearon mediante la fusión de un segmento de un gen que produce una toxina bacteriana o de una planta con un gen de un anticuerpo o un factor de crecimiento. El objetivo es que el anticuerpo o factor de crecimiento se una a células específicas del cuerpo y sean internalizados por éstas, para que luego el fragmento enzimático de la toxina pueda matar la célula. Esta técnica se encuentra en la búsqueda de una proteína de fusión que luce muy prometedora entre la interleucina humana 2 y la proteína de la difteria truncada, que ya está en uso para tratar un cáncer específico denominado linfoma cutáneo de célula T.

# J1 Monosacáridos y disacáridos

## Notas clave

|                              |   |
|------------------------------|---|
| <b>Aldosas y cetosas</b>     | Un monosacárido tiene la fórmula general $(\text{CH}_2\text{O})_n$ y contiene ya sea un grupo aldehído (una aldosa) o un grupo cetona (una cetosa). El grupo aldehído o cetona libre puede reducir los iones cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a iones cuprosos ( $\text{Cu}^+$ ) y por consiguiente tal monosacárido se conoce como un azúcar reductor.  |
| <b>Estereoisómeros</b>       | Los estereoisómeros <b>D</b> y <b>L</b> de los azúcares se refieren a la configuración del átomo de carbono asimétrico más alejado del grupo aldehído o cetona. Se dice que el azúcar es un isómero <b>D</b> si la configuración de los átomos unidos a este átomo de carbono es la misma que la del carbono asimétrico en el <b>D</b> -gliceraldehído.   |
| <b>Estructuras en anillo</b> | Las tetrasas y los azúcares más grandes pueden ciclarse mediante la reacción del grupo aldehído o cetona con un grupo hidroxilo de otro átomo de carbono del azúcar. La glucosa se cicla principalmente para formar un anillo de piranosa de seis miembros, mientras que otros azúcares forman anillos de furanosa de cinco miembros. Existen dos formas (anómeros) de <b>D</b> -glucopiranososa en función de si el grupo hidroxilo unido al átomo de carbono anomérico (C-1) se encuentra por debajo del plano del anillo (la forma $\alpha$ ) o por encima de este plano (forma $\beta$ ). En solución, las formas $\alpha$ y $\beta$ se interconvierten a través de la forma de cadena abierta (mutarrotación). El anillo de piranosa puede existir en cualquiera de las conformaciones de tipo bote o silla, pero la forma de silla predomina ya que los grupos laterales, que son por lo general grupos OH, tienen menos limitaciones estéricas en esta conformación. |
| <b>Disacáridos</b>           | Un disacárido se forma cuando dos monosacáridos se unen por un enlace glucosídico. El enlace puede ser $\alpha$ o $\beta$ según la configuración del átomo de carbono anomérico implicado en el enlace. Por lo general, está implicado el átomo de carbono anomérico de sólo uno de los dos monosacáridos del enlace, de manera que el disacárido todavía presenta un grupo aldehído o cetona libre y es reductor. Sin embargo, en la sacarosa ambos átomos de carbono anomérico se unen entre sí, de manera que la sacarosa es un disacárido no reductor.  |
| <b>Derivados del azúcar</b>  | Los grupos hidroxilo de los azúcares se pueden sustituir por otros grupos para formar una amplia gama de moléculas de importancia biológica, entre las que se incluyen azúcares fosforilados, aminoazúcares y nucleótidos.  |
| <b>Nomenclatura</b>          | Todos los nombres de los azúcares simples y derivados del azúcar pueden abreviarse. Esto también permite una descripción abreviada de los azúcares componentes presentes en los disacáridos, por ejemplo.   |
| <b>Temas relacionados</b>    | (H5) Glucosilación de proteínas<br>(J2) Polisacáridos y oligosacáridos<br>(J3) Glucólisis<br>(J4) Gluconeogénesis<br>(J5) Vía de la pentosa fosfato   |



**Figura J1-1.** Estructuras del gliceraldehído y la dihidroxiacetona.

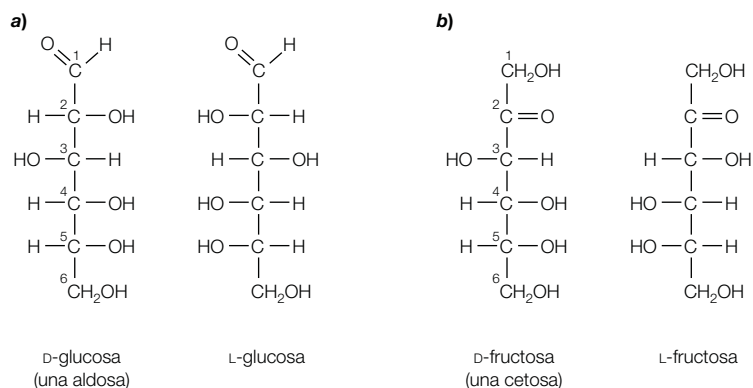
## Aldosas y cetosas

Un hidrato de carbono (o *carbohidrato*) se compone de carbono (*carbo-*) e hidrógeno y oxígeno (*-hidrato*). Los carbohidratos más simples son los **monosacáridos**, que tienen la fórmula general  $(\text{CH}_2\text{O})_n$  donde  $n$  es 3 o más. Un monosacárido o **azúcar** simple consta de una cadena de carbonos con varios grupos hidroxilo (OH) y un **grupo aldehído** ( $-\text{C} \begin{array}{l} \text{H} \\ \diagup \\ \text{O} \end{array}$  escrito a menudo como  $-\text{CHO}$ )

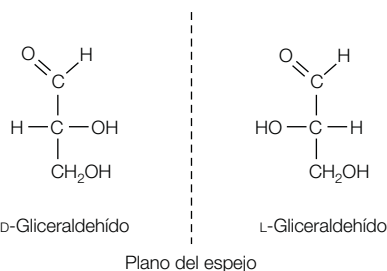
o un **grupo cetona** ( $>\text{C}=\text{O}$ ). Un azúcar que tiene un grupo aldehído se denomina una **aldosa**, mientras que un azúcar con un grupo cetona es una **cetosa**. Los hidratos de carbono más pequeños para los que  $n = 3$  se denominan **triosas**.

Los términos anteriores se pueden combinar. Por lo tanto, el gliceraldehído (figura J1-1) es una triosa que tiene un grupo aldehído y así es una aldosa. En consecuencia, también puede considerarse una **aldotriosa**. Del mismo modo, la dihidroxiacetona (figura J1-1) es una **cetotriosa**.

Los azúcares que contienen un grupo aldehído o cetona libre en la configuración de cadena abierta son capaces de reducir los iones cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a iones cuprosos ( $\text{Cu}^+$ ) y por eso se denominan **azúcares reductores**. Ésta es la base de las pruebas de Fehling y de Benedict para azúcares reductores. Por lo tanto, el **extremo reductor** de una cadena de tales azúcares es el extremo que lleva el grupo aldehído o cetona.



**Figura J1-3.** a) D-glucosa y L-glucosa; b) D-fructosa y L-fructosa.



**Figura J1-2.** El D-gliceraldehído y el L-gliceraldehído son imágenes en espejo entre sí (estereoisómeros o isómeros ópticos).

Nótese que el gliceraldehído y la dihidroxiacetona tienen la misma composición química,  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ , pero difieren en la estructura (es decir, son **isómeros estructurales**).

## Estereoisómeros

El gliceraldehído tiene un solo átomo de carbono asimétrico (el central), por lo que son posibles dos **estereoisómeros** (también llamados **isómeros ópticos**), esto es, dos formas de gliceraldehído, denotadas como **D-gliceraldehído** y **L-gliceraldehído**, que son imágenes en espejo entre sí (figura J1-2). También existen estereoisómeros de aminoácidos (sección B1).

Los azúcares con cuatro, cinco, seis o siete átomos de carbono se denominan **tetrosas**, **pentosas**, **hexosas** y **heptosas**, respectivamente. En estos casos, los azúcares pueden tener más de un átomo de carbono asimétrico. La convención para numerar los átomos de carbono y nombrar las configuraciones es la siguiente:

- Los átomos de carbono se numeran desde el extremo de la cadena de carbonos que se inicia con el grupo aldehído (que es el carbono 1, C-1) o el grupo cetona (que suele ser C-2).
- Los símbolos **D** y **L** se refieren a la configuración del átomo de carbono asimétrico más alejado del grupo aldehído o cetona.

Así, por ejemplo, la glucosa, una aldohexosa, existe en las formas **D** y **L** (figura J1-3a). El carbono asimétrico más



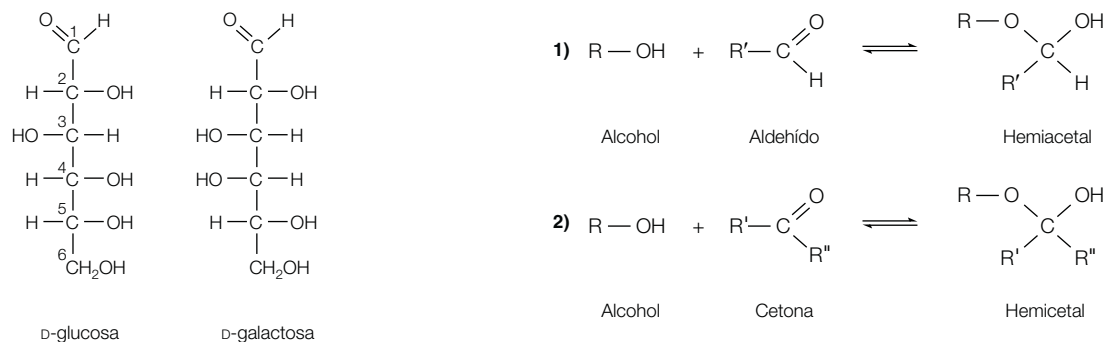


Figura J1-4. Epímeros D-glucosa y D-galactosa.

alejado del grupo aldehído es C-5. La D-glucosa (figura J1-3a) se denomina D debido a que la configuración de los átomos unidos al C-5 es la misma que la del D-gliceraldehído (figura J1-2). Del mismo modo, la D-fructosa (una cetohehexosa; figura J1-3b) se designa D debido a que la configuración en C-5 coincide con la del D-gliceraldehído. Los azúcares D que difieren en la configuración en un solo átomo de carbono asimétrico se denominan **epímeros**. Por lo tanto, la D-glucosa y la D-galactosa son epímeros, que sólo difieren en la configuración en C-4 (figura J1-4).

### Estructuras en anillo

El grupo aldehído o cetona puede reaccionar con un grupo hidroxilo para formar un enlace covalente. De manera formal, la reacción entre un aldehído y el grupo hidroxilo de un azúcar (un alcohol) crea un **hemiacetal** (ecuación 1), mientras que una cetona reacciona con un grupo hidroxilo (alcohol) para formar un **hemiacetal** (ecuación 2).

Para las tetrasas y azúcares más grandes, la reacción puede tener lugar dentro de la misma molécula, de modo que la forma de cadena lineal del azúcar se cicliza. Por ejemplo, si el grupo hidroxilo de C-5 de la glucosa reacciona con el grupo aldehído, se forma un anillo de seis miembros, mientras que si el hidroxilo de C-4 reacciona con el grupo aldehído, se forma un anillo de cinco miembros. La figura J1-5 muestra la ciclización de la D-glucosa para formar un anillo de seis carbonos. Debido a su similitud con el compuesto cíclico llamado pirano (figura J1-5b), las estructuras cíclicas de seis miembros se denominan **piranosas**.

La figura J1-6 muestra la ciclización de la cetohehexosa fructosa para formar un anillo de cinco miembros. Debido a su similitud con el compuesto cíclico llamado furano (figura J1-6b), las estructuras en anillo de cinco miembros se denominan **furanosas**. En general, las aldosas y cetosas con cinco o más átomos de carbono pueden formar anillos de piranosa o furanosa de modo que, en solución, existe una mezcla de éstos. Cuál es la forma de anillo más estable y por lo tanto predominante depende de la estructura química del monosacárido, incluida la naturaleza de los grupos sustituyentes. Por lo

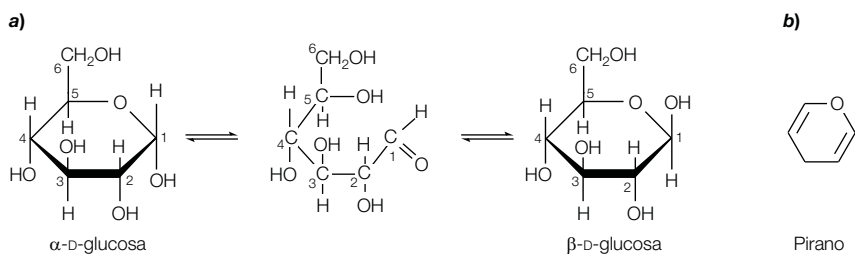


Figura J1-5. a) Ciclización de la forma de cadena abierta de la D-glucosa; b) estructura del pirano.

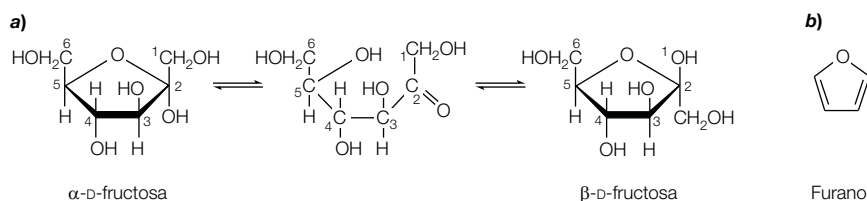
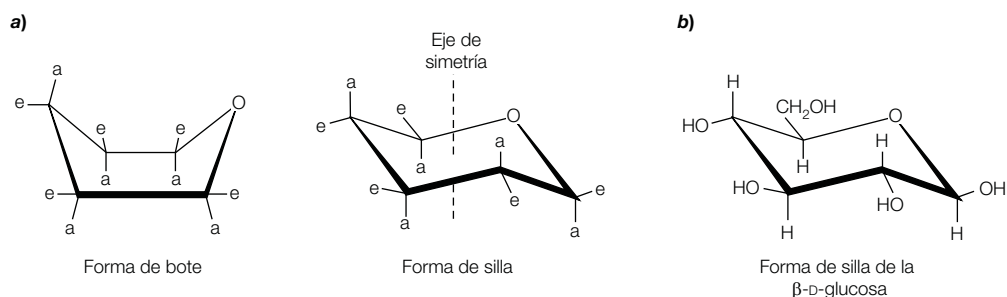


Figura J1-6. a) Ciclización de la forma de cadena abierta de la D-fructosa; b) estructura del furano.



**Figura J1-7.** a) Conformaciones en silla y en bote de los anillos de piranosa; b) forma de silla estable de la  $\beta$ -D-glucosa.

general, la forma cíclica predominante de aldohexosas como la glucosa es la piranosa.

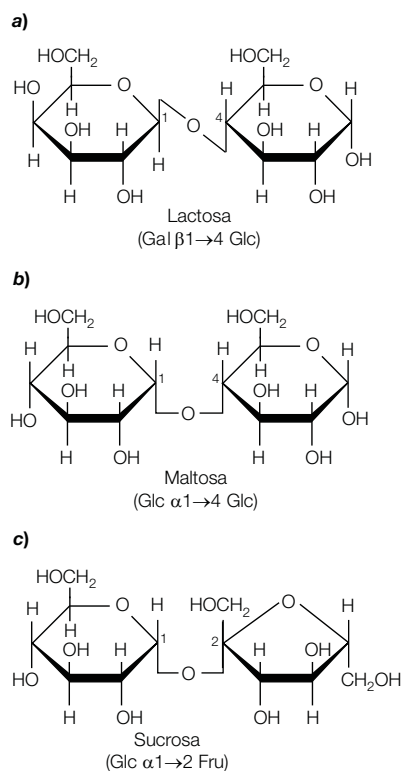
Las estructuras cíclicas que se muestran en las figuras J1-5 y J1-6 se denominan **proyecciones de Haworth**, en las que el plano del anillo puede imaginarse como aproximadamente perpendicular al plano del papel, con las líneas gruesas del anillo del diagrama dirigidas hacia el lector. Nótese que durante la ciclización de la glucosa (una aldosa) se forma un nuevo centro asimétrico, en C-1, el carbono que enlaza al residuo carbonilo. Por lo tanto, existen **dos isómeros** de D-glucosa (figura J1-5a), la  $\alpha$ -D-glucosa (en la que el grupo OH de C-1 se encuentra por debajo del plano del anillo) y la  $\beta$ -D-glucosa (en la que el grupo OH de C-1 encuentra por encima del plano del anillo). La estructura de anillo de piranosa de la  $\beta$ -D-glucosa puede escribirse como  $\beta$ -D-glucopiranosas. El carbono del carbonilo (C-1 en este caso) se denomina el **átomo de carbono anomérico**, y por ello a las formas  $\alpha$  y  $\beta$  se les llama **anómeros**. En solución acuosa, las formas  $\alpha$  y  $\beta$  se interconvierten de forma rápida a través de la estructura de cadena abierta para dar una mezcla en equilibrio (figura J1-5a). Este proceso se denomina **mutarrotación**.

En el caso de la cetosa fructosa, el átomo de carbono anomérico (que lleva el residuo carbonilo) es C-2 y por lo tanto existen dos isómeros (anómeros) que difieren en su configuración sobre ese átomo de carbono (figura J1-6a), es decir, la denominación  $\alpha/\beta$  se refiere a la configuración en C-2, no en C-1.

El anillo de piranosa de un azúcar de seis carbonos puede existir en una configuración de **silla** o **bote** (figura J1-7). Los sustituyentes unidos a los carbonos del anillo que se extienden paralelos al eje de simetría se dice que son axiales (a), mientras que aquellos que se extienden hacia el exterior de este eje se dice que son ecuatoriales (e) (figura J1-7). En la forma de bote, existe un considerable impedimento estérico entre los diversos grupos unidos a los átomos de carbono del anillo y, por lo tanto, esta forma es menos favorable desde una perspectiva energética. De ahí que predomina la forma de silla, como se muestra para la  $\beta$ -D-glucosa en la figura J1-7, donde los átomos de hidrógeno ocupan todas las posiciones axiales.

## Disacáridos

El grupo aldehído o cetona del átomo de carbono anomérico de un monosacárido puede reaccionar con el grupo hidroxilo (u oxhidrilo) de un segundo monosacárido para formar un **disacárido**. El enlace covalente formado se llama **enlace glucosídico**. La lactosa (figura J1-8a) es un disacárido formado entre el carbono anomérico (C-1) de la D-galactosa y el C-4 de la D-glucosa. Como el carbono anomérico de la molécula de galactosa interviene en el enlace y está en la configuración  $\beta$ , se llama **unión  $\beta(1 \rightarrow 4)$** , que puede abreviarse como  $\beta 1-4$ . La maltosa (figura J1-8b) es un disacárido formado entre las posiciones C-1 y C-4 de dos unidades de glucosa. Sin embargo, aquí la configuración del átomo de carbono anomérico participante está en la forma  $\alpha$  y en consecuencia el enlace se llama **unión  $\alpha(1 \rightarrow 4)$**  y se abrevia  $\alpha 1-4$ . Para



**Figura J1-8.** Estructura de los disacáridos comunes.

la lactosa y la maltosa, uno de los carbonos anoméricos se usa para formar el enlace, lo que deja al segundo carbono anomérico libre. Por consiguiente, la lactosa y la maltosa tienen un **extremo reductor**. En contraste, la sucrosa (figura J1-8c) es un disacárido constituido por la formación de un enlace entre el C-1 anomérico de la glucosa y el C-2 anomérico de la fructosa, de manera que la sucrosa carece de un grupo reductor libre.

## Derivados del azúcar

Los grupos hidroxilo de los monosacáridos simples pueden ser reemplazados por otros grupos para formar una gama de derivados del azúcar. Por ejemplo, los **azúcares fosforilados** como la glucosa 6-fosfato (figura J1-9) son metabolitos importantes de la glucólisis (sección J3). En los **aminoazúcares**, un grupo amino (el cual con frecuencia está acetilado) reemplaza a uno o más grupos hidroxilos, por ejemplo la acetil- $\beta$ -D-*N*-acetilglucosamina (figura J1-9). Éste y otros derivados de azúcares son componentes usuales de muchas glicoproteínas. Los nucleótidos (sección F1), como el ATP, consisten en un azúcar cuyo átomo de carbono anomérico forma un enlace covalente con una base nitrogenada (figura J1-9). Dado que el enlace se establece entre el carbono anomérico del azúcar y el átomo de nitrógeno de la base, se llama **enlace N-glucosídico**. Otras

modificaciones incluyen la oxidación de uno de los carbonos para formar un grupo carboxilato, y de esta manera generar un **ácido urónico**. Por ejemplo, la oxidación del carbono 6 (C-6) de la D-glucosa es la forma que produce ácido glucurónico (figura J1-9). Los ácidos urónicos son componentes importantes de muchos polisacáridos. Las aldosas y cetosas también pueden reducirse para generar alcoholes polihidroxilados, llamados **alditoles** (figura J1-9), como el sorbitol (D-glucitol), D-manitol y D-xilitol, los cuales son de sabor dulce y se usan como edulcorantes libres de azúcar tanto en gomas de mascar como en tabletas de menta, y el glicerol, el cual es un importante componente de los lípidos. Los alditoles son moléculas lineales que no pueden ciclizarse.

## Nomenclatura

Los azúcares simples tienen abreviaturas de tres letras [p. ej., Glc (glucosa), Gal (galactosa), Man (manosa), Fuc (fucosa)]. Los derivados de los azúcares también pueden abreviarse, como GlcNAc (*N*-acetilglucosamina) y GalNAc (*N*-acetilgalactosamina). Éstos también permiten una forma abreviada de descripción de los azúcares que están enlazados juntos y la naturaleza del enlace covalente. Por lo tanto, por ejemplo, la lactosa (figura J1-8a) puede representarse como Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc.

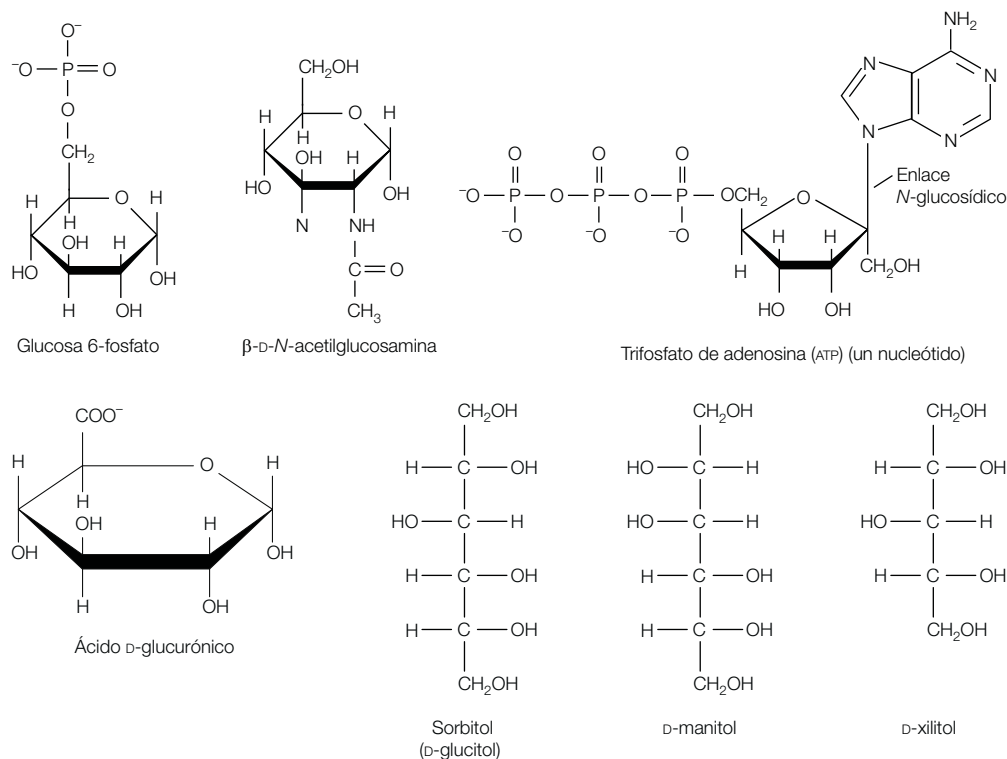


Figura J1-9. Ejemplos de derivados azucarados.

# J2 Polisacáridos y oligosacáridos

## Notas clave

### Polisacáridos

Cadenas largas de monosacáridos unidos se denominan de manera grupal polisacáridos. Los principales polisacáridos de almacenamiento son el glucógeno (en animales), el almidón (plantas) y el dextrano (en levaduras y bacterias). La celulosa es un polisacárido estructural que se encuentra en las paredes de las células vegetales.

### Glucógeno

El glucógeno es un polisacárido de cadena ramificada que contiene residuos de glucosa ligados por enlaces  $\alpha$ 1-4, con puntos de ramificación  $\alpha$ 1-6. La naturaleza ramificada del glucógeno lo vuelve más accesible a la fosforilasa de glucógeno durante su degradación, ya que esta enzima degrada la molécula mediante la remoción secuencial de los residuos de glucosa del extremo no reductor.

### Almidón

El almidón es una mezcla de amilosa sin ramificar (residuos de glucosa unidos por enlaces  $\alpha$ 1-4) y amilopectina ramificada (residuos de glucosa unidos por enlaces  $\alpha$ 1-4, pero con algunos puntos de ramificación  $\alpha$ 1-6).

### Dextrano

El dextrano consiste en residuos de glucosa unidos de manera preponderante por enlaces  $\alpha$ 1-6, pero con puntos de ramificación ocasionales que pueden formarse por enlaces  $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3 o  $\alpha$ 1-4.

### Celulosa

La celulosa es un polímero de cadena lineal de unidades de glucosa ligadas por enlaces  $\beta$ 1-4. Las cadenas de polisacáridos se alinean para formar fibrillas que tienen una gran fuerza tensil. Las celulasas, las enzimas que degradan la celulosa, están ausentes en los mamíferos, pero algunas bacterias, hongos y protozoarios las producen.

### Oligosacáridos

Las cadenas cortas de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos se llaman oligosacáridos. Los oligosacáridos que se encuentran en las glucoproteínas están unidos a un residuo de serina o treonina (oligosacárido unido a O) o a un residuo de asparagina (oligosacárido unido a un N). Todos los oligosacáridos unidos a un N tienen un centro de pentasacárido común. Los oligosacáridos unidos a N altos en manosa tienen residuos de manosa adicionales unidos al centro, mientras que los oligosacáridos unidos a N de tipo complejo tienen ramas que comprenden combinaciones de GlcNAc, Gal, ácido siálico y L-fucosa.

### Temas relacionados

(H5) Glucosilación de proteínas  
(J1) Monosacáridos y disacáridos  
(J6) Metabolismo del glucógeno

## Polisacáridos

Los polisacáridos son cadenas largas de unidades de azúcar enlazadas. Según el polisacárido, las cadenas pueden ser lineales o ramificadas. En los animales, el exceso de glucosa es almacenado como un gran polisacárido ramificado que se denomina **glucógeno**, mientras que

en la mayoría de las plantas la forma de almacenamiento de la glucosa es el polisacárido llamado **almidón**. Las bacterias y levaduras almacenan glucosa bajo la forma de otro tipo de disacárido llamado **dextrano**. En cada caso, éstas son reservas nutricionales; cuando se requieren, son degradadas y los monosacáridos liberados se

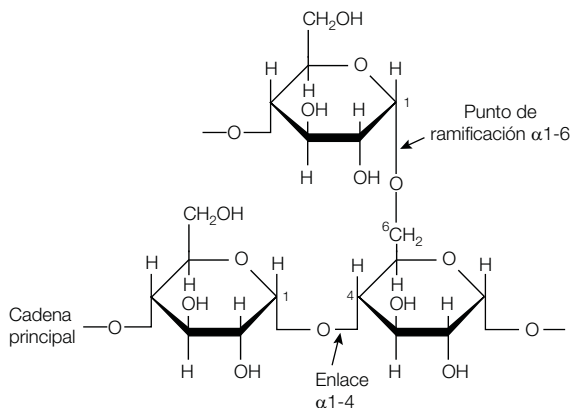
metabolizan para producir energía (sección J3). En contraste, la **celulosa** es un polisacárido estructural usado para elaborar las paredes celulares de las plantas.

## Glucógeno

Una molécula de glucógeno consiste por completo en unidades de glucosa, la mayoría de las cuales está unida en largas cadenas por enlaces  $\alpha$ 1-4. Sin embargo, cada 10 unidades o más, la cadena se ramifica por la formación de un enlace glucosídico  $\alpha$ 1-6 (figura J2-1). Cada segmento de cadena lineal de glucógeno adquiere una conformación de hélice abierta, la que incrementa su accesibilidad a las enzimas del metabolismo del glucógeno. Cada cadena termina en un extremo no reductor, que es un extremo con un grupo 4'-OH libre. Como la enzima que degrada al glucógeno (**fosforilasa de glucógeno**; sección J6) cataliza la remoción secuencial de unidades glucosilo del extremo no reductor de la cadena de glucógeno, las ramificaciones numerosas, cada una con un extremo no reductor, incrementan en gran medida la accesibilidad del polisacárido a la degradación. Esto permite la rápida movilización del glucógeno almacenado en momentos de necesidad. Las mismas ramas  $\alpha$ 1-6 son removidas por la **enzima desramificante** (sección J6).

## Almidón

El almidón existe en las plantas como gránulos de almidón insolubles en los cloroplastos. Cada gránulo de almidón contiene una mezcla de dos formas de polisacáridos, **amilosa** y **amilopectina**. La amilosa es un polímero sin ramificaciones de residuos de glucosa unidos por enlaces  $\alpha$ 1-4. La amilopectina es la forma ramificada; la mayoría de los residuos de glucosa constituyentes están unidos por enlaces  $\alpha$ 1-4, pero se producen enlaces adicionales  $\alpha$ 1-6 cada 25-30 residuos, lo que crea puntos de ramificación.



**Figura J2-1.** Los enlaces  $\alpha$ 1-4 en la cadena lineal y los enlaces  $\alpha$ 1-6 en los puntos de ramificación en el glucógeno.

## Dextrano

El dextrano es un polímero de glucosa donde los residuos de glucosa están unidos sobre todo por enlaces  $\alpha$ 1-6. No obstante, pueden producirse algunas ramificaciones. Éstas se establecen de manera típica por enlaces  $\alpha$ 1-2,  $\alpha$ 1-3 o  $\alpha$ 1-4, según las especies bacterianas o de levaduras que sean la fuente del dextrano.

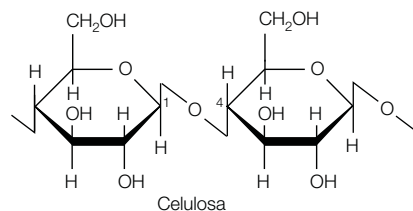
## Celulosa

La celulosa es un polisacárido sin ramificaciones de unidades de glucosa unidas por enlaces  $\beta$ 1-4 (figura J2-2). A diferencia del glucógeno, donde los enlaces  $\alpha$ 1-4 conducen a una conformación helicoidal del polisacárido, el enlace  $\beta$  entre los residuos de glucosa de la celulosa crea cadenas lineales muy largas que se ordenan juntas en fibrillas. En las paredes de las células vegetales, las fibrillas de celulosa están embebidas en (y entrecruzadas con) una matriz de otros polisacáridos. En la madera, esta matriz también contiene **lignina**, un polímero complejo de residuos fenólicos (sección A2). Este compuesto tiene una gran fuerza tensil. Los mamíferos, incluidos los seres humanos, carecen de enzimas capaces de digerir los enlaces  $\beta$ 1-4 de la celulosa y de esta manera son incapaces de digerir las paredes de las células vegetales. Sin embargo, algunas bacterias producen **celulasas**, las enzimas que degradan la celulosa. Los animales rumiantes como las vacas tienen bacterias productoras de celulasa en sus tractos digestivos y de esa manera pueden digerir la celulosa. Además, algunos hongos y protozoarios producen y secretan celulasa.

## Oligosacáridos

Los **oligosacáridos** son cadenas cortas de monosacáridos enlazados por enlaces glucosídicos. En el caso de los oligosacáridos enlazados a proteínas (glucoproteínas) o lípidos (glucolípidos), el oligosacárido no es una unidad de repetición sino que consta de un espectro de diferentes monosacáridos unidos por tipos de enlaces diversos. En las glucoproteínas existen dos tipos principales de enlaces de oligosacáridos:

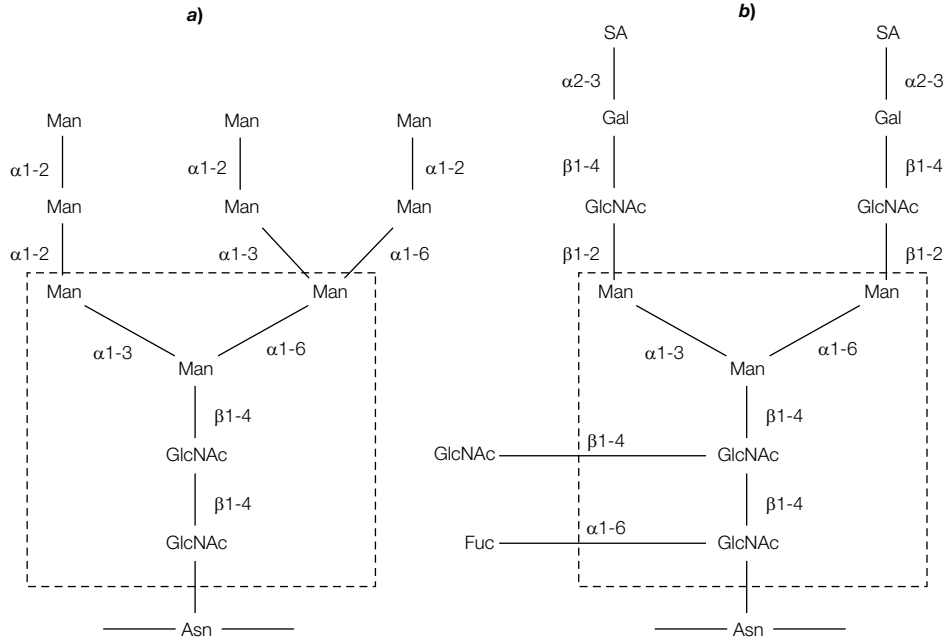
- **Oligosacáridos enlazados al O** unidos a la proteína a través de **enlaces glucosídicos O** con los grupos OH de la serina o treonina de las cadenas laterales (sección H5, figura H5-1).



**Figura J2-2.** La unidad de repetición de la celulosa muestra el enlace  $\beta$ 1-4.

- **Oligosacáridos enlazados al N** unidos a la proteína a través de **enlaces glucosídicos N** con los grupos  $\text{NH}_2$  de la arginina de las cadenas laterales (sección H5, figura H5-1). Todos los oligosacáridos enlazados al N tienen un centro común de pentasacárido de dos GlcNAc y tres residuos Man, pero la naturaleza de las cadenas laterales difiere (figura J2-3). En el tipo de oligosacárido enlazado al N de **alto contenido en manosa**, de manera típica dos a seis residuos

de Man adicionales están unidos al centro de pentasacárido (p. ej., la figura J2-3a). El **tipo complejo** de oligosacárido enlazado al N contiene dos a cinco ramificaciones externas unidas al Man del centro de polisacáridos; estas ramificaciones contienen combinaciones diferentes de GlcNAc, Gal, ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico), manosa y *L*-fucosa. La figura 3b muestra un oligosacárido complejo con dos ramificaciones externas.



**Figura J2-3.** Ejemplos de a) oligosacáridos de tipo alto en manosa, y b) de tipo complejo. En cada caso, los azúcares que incluye el centro de pentasacárido se muestran encerrados con la línea de guiones. SA, ácido siálico.

# J3 Glucólisis

## Notas clave

### Descripción

La glucólisis es un conjunto de reacciones que tienen lugar en el citoplasma de procariotas y eucariotas. La función de la glucólisis consiste en producir energía (ya sea de manera directa y mediante el aporte de sustratos al ciclo del ácido cítrico y a la fosforilación oxidativa) y producir intermediarios de las vías biosintéticas.

### La vía metabólica

La glucosa es fosforilada a glucosa 6-fosfato (por la hexocinasa), la cual es convertida en fructosa 6-fosfato (por la isomerasa de fosfoglucosa) y luego en fructosa 1,6-bisfosfato (por la fosfofructocinasa, PFK). La fructosa 1,6-bisfosfato es dividida en gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato (por la aldolasa) y estas dos triosas son interconvertidas por la isomerasa de triosafosfato. El gliceraldehído 3-fosfato es convertido en 1,3-bisfosfoglicerato (por la deshidrogenasa de gliceraldehído 3-fosfato), la cual reacciona con el  $\text{ADP}$  para dar 3-fosfoglicerato y  $\text{ATP}$  (catalizada por la cinasa de fosfoglicerato). El 3-fosfoglicerato es convertido en 2-fosfoglicerato (por una mutasa de fosfoglicerato) y luego en fosfoenolpiruvato (PEP) por la enolasa. Por último, el PEP y el  $\text{AMP}$  reaccionan para formar piruvato y  $\text{ATP}$  (catalizada por la cinasa de piruvato).

### Destinos del piruvato

Bajo condiciones aerobias, la deshidrogenasa de piruvato puede convertir el piruvato en acetilcoenzima A (acetil-CoA), la cual de este modo puede ingresar en el ciclo del ácido cítrico. Bajo condiciones anaerobias, la deshidrogenasa de lactato (LDH) convierte el piruvato en lactato. El  $\text{NAD}^+$  regenerado por esta reacción permite que la glucólisis continúe, a pesar de la carencia de oxígeno. Cuando el oxígeno está disponible, el lactato se convierte en piruvato. En condiciones anaerobias, levaduras y otros organismos llevan a cabo la fermentación alcohólica, que convierte el piruvato en acetaldehído y luego en etanol, durante la cual se regenera el  $\text{NAD}^+$  para permitir que la glucólisis continúe.

### Producción de energía

En la glucólisis se usan dos  $\text{ATP}$ , y se sintetizan cuatro  $\text{ATP}$  por cada molécula de glucosa, de manera que la producción neta es de dos  $\text{ATP}$  por glucosa. Bajo condiciones aerobias, las dos moléculas de  $\text{NADH}$  que se originan durante la glucólisis también producen energía a través de la fosforilación oxidativa. La formación de lactato bajo condiciones aerobias o la fermentación alcohólica producen cada una dos moléculas de  $\text{ATP}$  por cada molécula de glucosa.

### Metabolismo de la fructosa

La fructosa puede ser metabolizada por dos rutas. En el tejido adiposo y el músculo, la hexocinasa puede fosforilar la fructosa a fructosa 6-fosfato, que entonces ingresa en la glucólisis. En el hígado, la mayoría de las enzimas presentes es glucocinasa y no hexocinasa y ésta no fosforila la fructosa. En este tejido, la fructosa es metabolizada en lugar de seguir la vía de la fructosa 1-fosfato.

### Metabolismo de la galactosa

La galactosa ingresa a la glucólisis a través de la vía de interconversión de galactosa-glucosa, una reacción con una secuencia de cuatro pasos. La falta de la segunda enzima de esta vía, la uridiltransferasa de galactosa 1-fosfato, conduce a la galactosemia, un estado de enfermedad, a través de la acumulación de productos tóxicos, incluido el galactitol formado por la reducción de la galactosa. La intolerancia a la lactosa (hipolactasia) es una incapacidad para metabolizar lactosa debido a la falta de la enzima lactasa.

**Regulación de la glucólisis**

El paso de control principal es el que cataliza la PFK, pero la hexocinasa y la cinasa de piruvato son sitios de control adicionales. El ATP inhibe de forma alostérica la PFK, pero esta inhibición es liberada por el AMP. El citrato también inhibe la PFK. La elaboración de fructosa 6-fosfato estimula la formación de fructosa 2,6-bisfosfato, que a su vez estimula la PFK. La enzima que sintetiza fructosa 2,6-bisfosfato (fosfofructocinasa 2; PFK-2) y la enzima que la hidroliza a fructosa 6-fosfato (bisfosfatasa de fructosa 2; FBP-asa 2) también son reguladas vía hormonal por el glucagon, que determina que la glucólisis se lentifique cuando los niveles de glucosa en sangre caen. Los iones H<sup>+</sup> también inhiben la PFK y por lo tanto evitan la formación excesiva de lactato bajo condiciones anaerobias. La hexocinasa es inhibida por la glucosa 6-fosfato, la cual se elabora después que la PFK es inhibida. La fructosa 1,6-bisfosfato activa a la cinasa de piruvato, pero el ATP y la alanina la inhiben por medios alostéricos. Como la PFK, también es regulada por medios hormonales a través del glucagon.

**Temas relacionados**

- (J1) Monosacáridos y disacáridos
- (J2) Polisacáridos y oligosacáridos
- (J4) Gluconeogénesis
- (J5) Vía de la pentosa fosfato
- (J6) Metabolismos del glucógeno
- (L1) Ciclo del ácido cítrico

**Descripción**

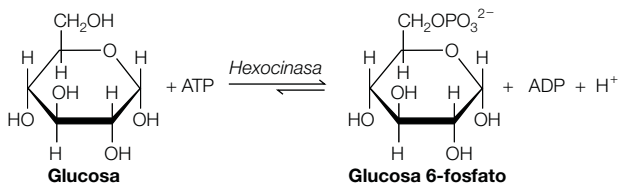
La glucólisis es una serie de reacciones (figura J3-1) que tienen lugar en el citoplasma de todos los procariotas y eucariotas. La glucólisis convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato [las cuales son convertidas en acetilcoenzima A (acetil-CoA), la sustancia que ingresa en el ciclo del ácido cítrico]. Se necesitan dos moléculas de ATP para las reacciones iniciales en la vía glucolítica, pero más tarde se generan cuatro ATP, lo que da una producción neta de dos ATP por molécula de glucosa degradada.

En general, la glucólisis desempeña dos funciones. La primera es producir ATP. Aunque sólo se producen dos ATP por glucosa de manera directa a partir de las reacciones de la vía glucolítica, también alimenta con sustratos el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa, donde se elabora la mayor parte del ATP. El segundo papel es producir intermediarios que actúan como precursores de varias vías biosintéticas. Entre ellos, la acetil-CoA, por ejemplo, es el precursor de la síntesis de los ácidos grasos (sección K3).

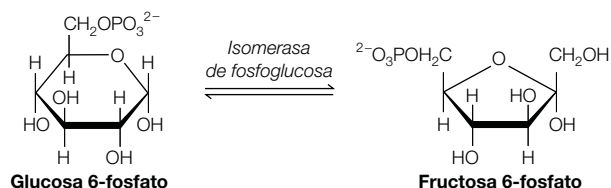
**La vía metabólica**

A continuación se describen los pasos de la glucólisis.

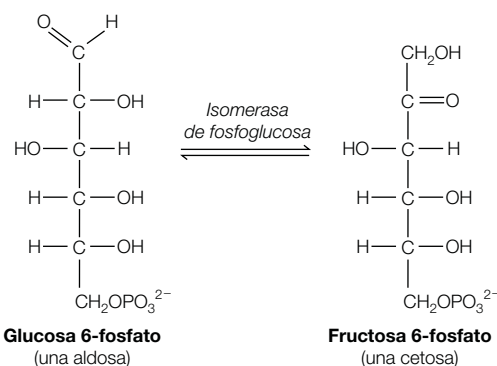
1. La glucosa es fosforilada por el ATP para formar glucosa 6-fosfato y ADP. La **hexocinasa** es la enzima que cataliza la reacción.



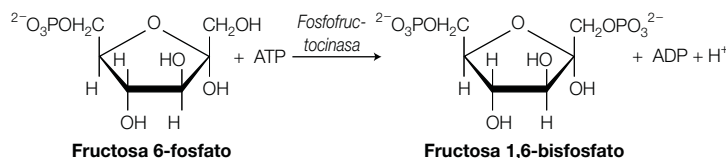
2. La **isomerasa de fosfoglucosa** convierte a la glucosa 6-fosfato en fructosa 6-fosfato.



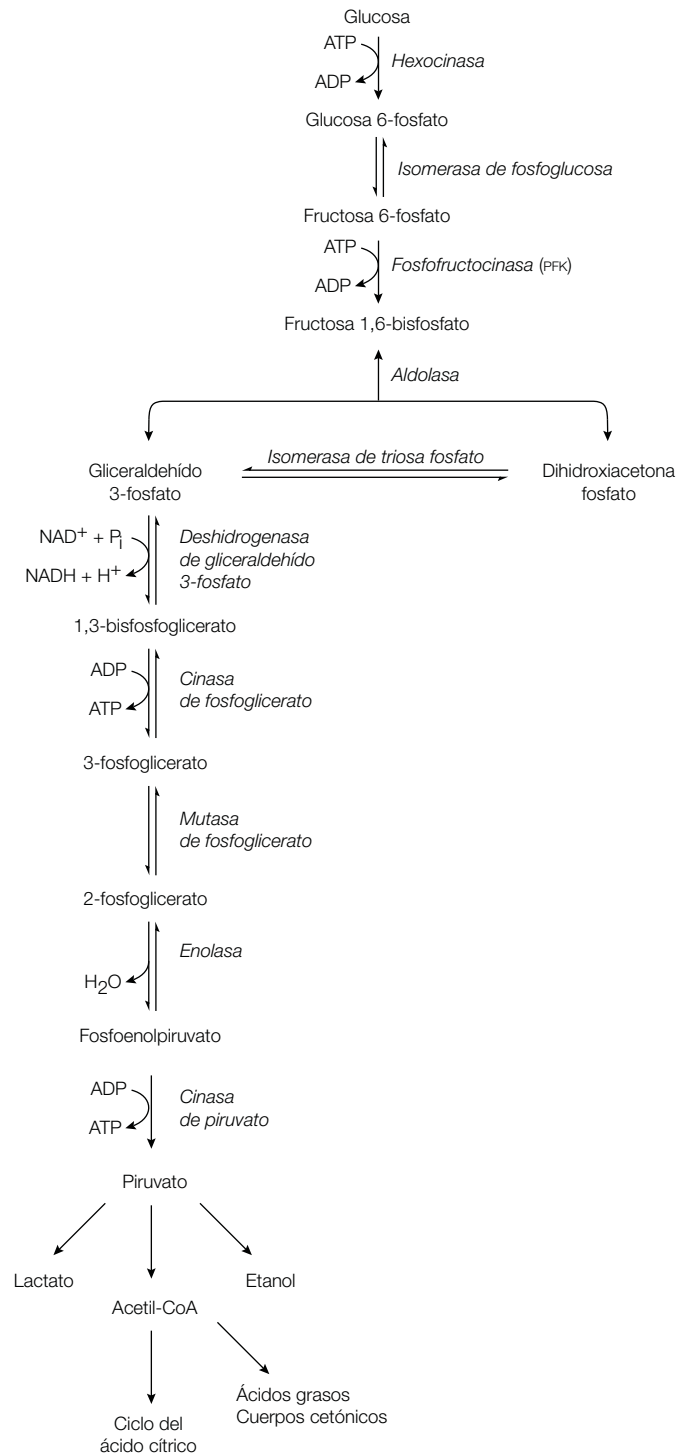
Esta isomerización incluye la conversión de una aldosa en cetosa, una conversión que se entiende mejor a través de las representaciones en cadena abierta de tales moléculas.



3. La fructosa 6-fosfato es fosforilada por el ATP para formar fructosa 1,6-bisfosfato y ADP. La enzima que cataliza este paso es la **fosfofructocinasa (PFK)**.

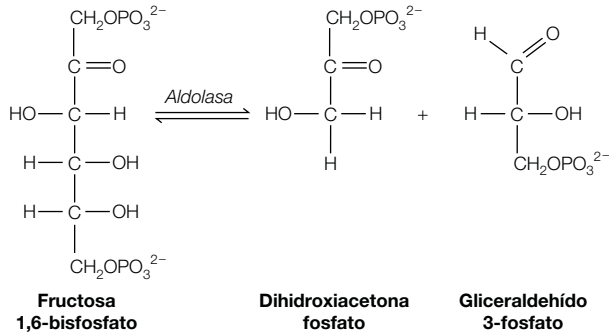






**Figura J3-1.** Las reacciones de la glucólisis (de glucosa a piruvato) más los destinos del piruvato.

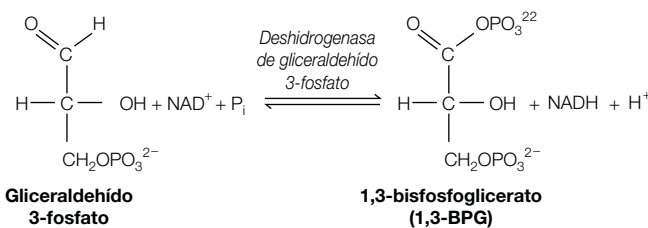
4. La **aldolasa** divide a la fructosa 1,6-bisfosfato (una molécula de seis carbonos) en dos moléculas de tres carbonos, el gliceraldehído 3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato.



5. El gliceraldehído 3-fosfato es la única molécula que puede utilizarse para el resto de la glucólisis. Sin embargo, la **isomerasa de triosa fosfato** puede convertir con celeridad la dihidroxiacetona fosfato formada en el paso previo en aldehído 3-fosfato. Ésta es una reacción de equilibrio; como el gliceraldehído 3-fosfato se usa en el resto de la glucólisis, se convierte más dihidroxiacetona fosfato en gliceraldehído 3-fosfato en su reemplazo. Por lo tanto, de manera efectiva, por cada molécula de fructosa 1,6-bisfosfato que se divide en el paso 4, continúan avanzando en la vía dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato.

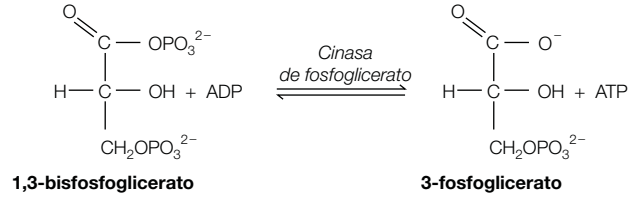


6. El gliceraldehído 3-fosfato se convierte en 1,3-bisfosfoglicerato. La **deshidrogenasa de gliceraldehído 3-fosfato** cataliza esta reacción, en la que utiliza fosfato inorgánico y  $\text{NAD}^+$ . El otro producto es  $\text{NADH}$ . La energía para la creación de este nuevo enlace fosfato de alta energía procede de la oxidación del grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato.

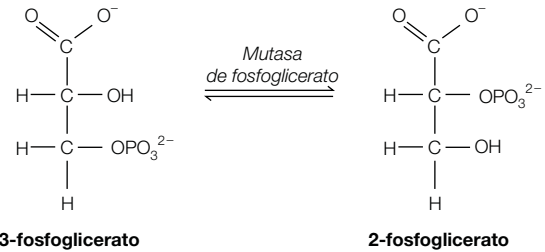


7. El reciente enlace de fosfato de alta energía creado del 1,3-bisfosfoglicerato se usa a continuación para sintetizar  $\text{ATP}$ . La **cinasa de fosfoglicerato** cataliza la

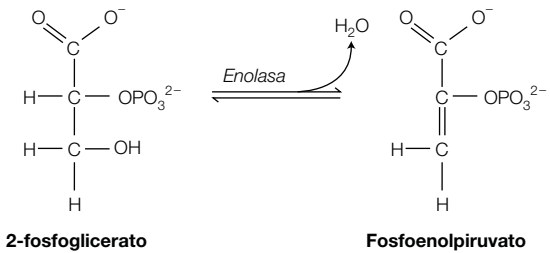
transferencia del grupo fosforilo desde el 1,3-bisfosfoglicerato al  $\text{ADP}$ , lo que genera  $\text{ATP}$  y 3-fosfoglicerato.



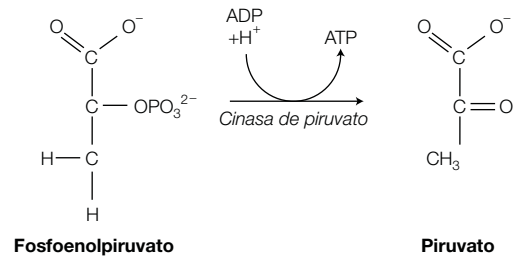
8. La **mutasa de fosfoglicerato** convierte el 3-fosfoglicerato en 2-difosfoglicerato. Por consiguiente, la reacción es un movimiento del grupo fosfato a un átomo de carbono diferente de la misma molécula.



9. La **enolasa** cataliza la deshidratación del 2-fosfoglicerato para formar fosfoenolpiruvato (PEP). Esta reacción convierte el enlace éster del fosfato de baja energía del 2-fosfoglicerato en el enlace fosfato de alta energía del PEP.



10. En la última reacción, la **cinasa de piruvato** cataliza la transferencia irreversible desde el punto de vista fisiológico del grupo fosforilo del PEP al  $\text{ADP}$  para formar  $\text{ATP}$  y piruvato.



### Fosforilación a nivel de sustrato

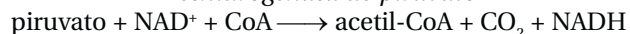
Hay dos métodos diferentes por los cuales las células sintetizan  $\text{ATP}$ . En la **fosforilación oxidativa**, que incluye la cadena de transporte de electrones, la generación del

ATP va de la mano de la oxidación del  $\text{NADH}$  y el  $\text{FAD}_2$  al  $\text{NAD}^+$  y el  $\text{FAD}$ , respectivamente (sección L2), y se produce a través de la generación de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. En contraste, las dos reacciones sintéticas del ATP de la glucólisis (catalizada por la cinasa de fosfoglicerato y la cinasa de piruvato) incluyen la transferencia directa de un fosfato desde un intermediario de azúcar-fosfato al ADP; estas reacciones son ejemplos de **fosforilación a nivel de sustrato**. Un tercer ejemplo de lo mismo es la síntesis de GTP por la deshidrogenasa de succinato en el ciclo del ácido cítrico (sección L1). El GTP puede ser usado para fosforilar ADP y formar ATP.

## Destinos del piruvato

1. Entrar en el ciclo del ácido cítrico. La glucólisis libera relativamente poca energía de la presente en una molécula de glucosa (véase **Producción de energía**, más adelante); se libera mucha más energía por el metabolismo del piruvato a través de la vía del ciclo del ácido cítrico y de la fosforilación oxidativa. Al seguir esta ruta (bajo condiciones aerobias), la enzima **deshidrogenasa de piruvato** convierte al piruvato en acetil-CoA, que ingresa entonces en el ciclo del ácido cítrico. La reacción de la deshidrogenasa de piruvato es una **descarboxilación oxidativa** (consúltese la sección L1 para mayores detalles):

### *Deshidrogenasa de piruvato*



2. Conversión en ácidos grasos o cuerpos cetónicos. Cuando el nivel de energía celular es alto (es decir, hay GTP en exceso), la velocidad del ciclo del ácido cítrico (sección L1) disminuye y la acetil-CoA comienza a acumularse. Bajo estas condiciones, la acetil-CoA formada a partir del piruvato puede usarse para sintetizar ácidos grasos o cuerpos cetónicos (secciones K2 y K3).
3. Conversión en lactato. El  $\text{NAD}^+$  usado durante la glucólisis (en la formación de 1,3-bisfosfoglicerato por la deshidrogenasa de gliceraldehído 3-fosfato; figura J3-1) debe ser regenerado si la glucólisis continúa. En condiciones aerobias, el  $\text{NAD}^+$  se regenera por la reoxidación del  $\text{NADH}$  reducido a través de la cadena de transporte de electrones (sección L2). Cuando el oxígeno está limitado, como en el músculo durante la contracción vigorosa, la reoxidación del  $\text{NADH}$  a  $\text{NAD}^+$  por la cadena de transporte de electrones se vuelve insuficiente para mantener la glucólisis. En estas condiciones, el  $\text{NAD}^+$  es regenerado porque la **deshidrogenasa de lactato** convierte el piruvato en lactato:

### *Deshidrogenasa de lactato*



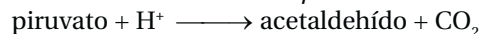
Cuando vuelve a haber suficiente oxígeno disponible, los niveles de  $\text{NAD}^+$  aumentan a través de la

operación de la cadena de transporte de electrones. La reacción de la deshidrogenasa de lactato se invierte entonces para regenerar piruvato, que la deshidrogenasa de piruvato convierte en acetil-CoA, la cual puede ingresar en el ciclo del ácido cítrico (véase antes). En consecuencia, la operación de la deshidrogenasa de lactato en mamíferos es un mecanismo para la reoxidación del  $\text{NADH}$  a  $\text{NAD}^+$  y por lo tanto permite que la glucólisis continúe y se elabore ATP bajo condiciones anaerobias. El proceso es incluso más complejo en el caso de una contracción vigorosa del músculo esquelético. En esta situación, el lactato producido es llevado por la corriente sanguínea hacia el hígado, donde se convierte en glucosa y puede regresar otra vez, a través de la corriente sanguínea, hacia el músculo esquelético para que sea metabolizada y produzca energía.

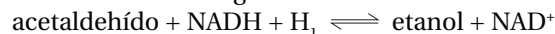
Éste es el ciclo de Cori que se describe en la sección J4. Por último, en algunos microorganismos, el lactato es el producto normal del piruvato.

4. Conversión en etanol. En las levaduras y algunos otros microorganismos, bajo condiciones anaerobias, el  $\text{NAD}^+$  que se requiere para continuar la glucólisis se regenera por un proceso llamado **fermentación alcohólica**. El piruvato se convierte en acetaldehído (por la **descarboxilasa de piruvato**) y luego en etanol (por la **deshidrogenasa alcohólica**), reacción esta última en la que el  $\text{NADH}$  se reoxida a  $\text{NAD}^+$ :

### *Descarboxilasa de piruvato*



### *Deshidrogenasa de alcohol*



## Producción de energía

### 1. Glucólisis en condiciones aerobias

En la parte inicial de la glucólisis se requieren dos ATP para que la hexocinasa convierta la glucosa en glucosa 6-fosfato y para que la PFK convierta la fructosa 6-fosfato en fructosa 1,6-bisfosfato. Pese a ello, la fructosa 1,6-bisfosfato da origen a dos unidades de tres carbonos, cada una de las cuales genera dos ATP en pasos subsecuentes (catalizados por las cinasas de fosfoglicerato y de piruvato), lo que arroja una producción neta de dos ATP por molécula de glucosa original (figura J3-1).

La reacción general es:

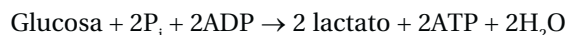


Nótese que, bajo condiciones aerobias, las dos moléculas de  $\text{NADH}$  que se sintetizan son también reoxidadas a través de la cadena de transporte de electrones que genera ATP. Dada la localización citoplásmica de estas moléculas de  $\text{NADH}$ , cada una se reoxida a través de la

lanzadera de glicerol 3-fosfato (sección L2) y produce alrededor de 1.5 ATP durante la fosforilación oxidativa o a través de la lanzadera de malato-aspartato (sección L2) y alrededor de 2.5 ATP durante la fosforilación oxidativa.

## 2. Formación de lactato bajo condiciones anaerobias

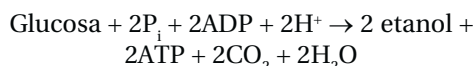
La reacción general es:



Nótese que el  $\text{NAD}^+$  y el  $\text{NADH}$  no se muestran en la reacción anterior debido a que el  $\text{NADH}$  que se genera en la glucólisis a partir del  $\text{NAD}^+$  es vuelto a oxidar y a convertir en  $\text{NAD}^+$  durante la conversión del piruvato en lactato. De esta manera, no hay un cambio neto en los niveles de  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADH}$  durante la glucólisis y por lo tanto en la conversión del piruvato en lactato. En este caso, sólo se producen dos ATP por la conversión de la glucosa en lactato.

## 3. Fermentación alcohólica

La reacción general es:



En la reacción anterior no se muestran el  $\text{NAD}^+$  y el  $\text{NADH}$  debido a que el  $\text{NADH}$  que se genera en la glucólisis a partir del  $\text{NAD}^+$  es vuelto a oxidar a  $\text{NAD}^+$  positivo durante la conversión del piruvato en etanol, de manera que no hay un cambio neto en los niveles de  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADH}$ , y la energía neta producida es de dos moléculas de ATP por molécula de glucosa.

## Metabolismo de la fructosa

La fructosa es un azúcar abundante en la dieta humana; la sucrosa (azúcar de mesa) es un disacárido que cuando es hidrolizado produce fructosa y glucosa (sección J1). La fructosa es también el azúcar principal en las frutas y la miel. Hay dos vías para el metabolismo de la fructosa; una se produce en el músculo y el tejido adiposo y la otra en el hígado.

1. En el músculo y en el tejido adiposo, la fructosa puede ser fosforilada por la hexocinasa (la cual es capaz de fosforilar la glucosa y la fructosa) para formar fructosa 6-fosfato, la que entra en la glucólisis.
2. En el hígado, las células contienen sobre todo glucocinasa en reemplazo de la hexocinasa y esta enzima fosforila sólo la glucosa. Por consiguiente, en el hígado, la fructosa es metabolizada por la **vía de la fructosa 1-fosfato** (figura J3-2).

- La **fructocinasa** convierte a la fructosa en fructosa 1-fosfato.
- La **aldolasa de fructosa 1-fosfato** divide a la fructosa 1-fosfato en gliceraldehído y dihidroxiacetona

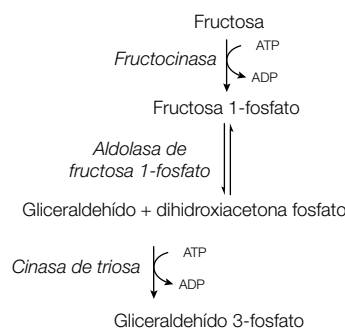


Figura J3-2. Vía de la fructosa 1-fosfato.

fosfato. La dihidroxiacetona alimenta la glucólisis en el paso de la isomerasa de triosa fosfato (figura J3-1).

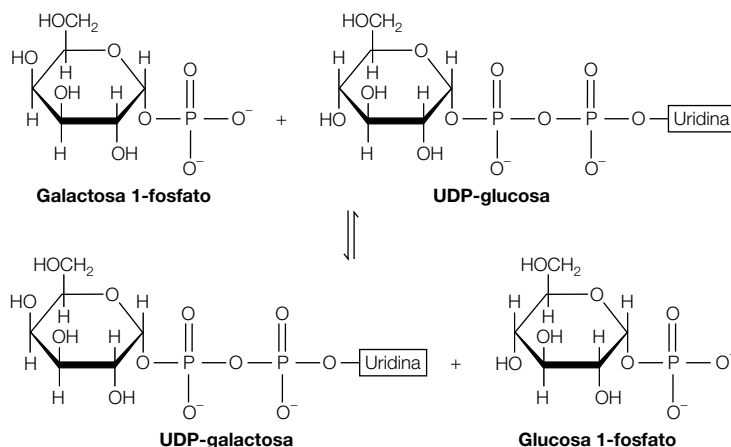
- La **cinasa de triosa** fosforila el gliceraldehído a gliceraldehído 3-fosfato y de esta manera ingresa en la glucólisis.

## Metabolismo de la galactosa

La hidrólisis del disacárido lactosa (en la leche) produce galactosa y glucosa. En consecuencia, la galactosa es también un azúcar dietético importante para los humanos. La galactosa y la glucosa son epímeros que difieren en su configuración en el C-4 (sección J1, figura J1-4), de manera que el ingreso de la galactosa en la glucólisis requiere una reacción de epimerización. Ésta tiene lugar a través de una vía de cuatro pasos llamada **vía de la interconversión de galactosa-glucosa** (figura J3-3):

1. La **galactocinasa** fosforila la galactosa y produce galactosa 1-fosfato. (Vease la reacción en la siguiente página)
2. La **uridiltransferasa de galactosa 1-fosfato** cataliza la transferencia de un grupo uridilo desde la uridina difosfato (UDP)-glucosa a la galactosa 1-fosfato para formar UDP-galactosa y glucosa 1-fosfato.
3. La **4-epimerasa de UDP-galactosa** convierte a la UDP-galactosa en UDP-glucosa. Por lo tanto, en general, la UDP-glucosa no se consume en la vía reactiva.
4. Como hecho final, la glucosa 1-fosfato es convertida en glucosa 6-fosfato por la **fosfoglucomutasa**. Entonces, la glucosa 6-fosfato ingresa en la glucólisis.

La **intolerancia a la lactosa** o **hipolactasia** es una enfermedad genética que se produce debido a una incapacidad para metabolizar la lactosa y así los pacientes que sufren esta enfermedad no toleran la leche en su dieta. Por lo regular, la hipolactasia se debe a una falta de la enzima **lactasa**, que divide a la lactosa en glucosa y galactosa. Cualquier lactosa en la leche consumida es metabolizada por las bacterias en el colon, que convierten el azúcar en lactato y generan los gases metano e hidrógeno.



El gas excesivo causa una sensación de incomodidad y plenitud a medida que el intestino se distiende y también produce una flatulencia indeseable. El lactato y cualquier cantidad de lactosa que permanezca sin digerirse determinan asimismo que el agua ingresa en el intestino por ósmosis, lo cual produce diarrea. La enfermedad suele tratarse tan sólo mediante la prescindencia de los alimentos que contienen cantidades sustanciales de lactosa.

La **galactosemia** es otra enfermedad genética causada por la incapacidad para convertir la galactosa en glucosa. Se acumulan sustancias tóxicas como el **galactitol**, formado por la reducción de la galactosa, y lleva a graves consecuencias para el individuo. Los niños que tienen la enfermedad no crecen, pueden vomitar o tener diarrea después de tomar la leche y con frecuencia presentan un hígado agrandado de tamaño acompañado de ictericia. La formación de cataratas en los ojos, el retardo mental y una muerte temprana a causa del hígado dañado también son posibles. La mayoría de los casos de galactosemia se debe a la deficiencia de la enzima uridiltransferasa de galactosa 1-fosfato y en consecuencia tales individuos no pueden metabolizar la galactosa. La enfermedad se trata por medio de la prescripción de

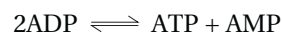
una dieta libre de galactosa (y libre de lactosa), la cual previene las cataratas y el daño hepático, pero no el retardo mental, que puede ser irreversible. Como tales pacientes presentan niveles normales de 4-epimerasa de UDP-galactosa, todavía pueden sintetizar UDP-galactosa a partir de la UDP-glucosa y de esta manera pueden todavía sintetizar, por ejemplo, oligosacáridos en las glucoproteínas que incluyen residuos Gal.

### Regulación de la glucólisis

#### Fosfofructocinasa

El paso de control más importante de la glucólisis es la reacción irreversible que cataliza la fosfofructocinasa (PFK). La enzima es regulada de diversas maneras.

1. Relación ATP/AMP. Cuando los niveles de ATP caen, pueden regenerarse a partir del ADP por la **cinasa de adenilato** en la siguiente reacción:



Así, un aumento en la concentración de AMP señala un estado de baja energía.

El ATP inhibe por medios alostéricos a la PFK, pero esta inhibición es revertida por el AMP. Lo anterior

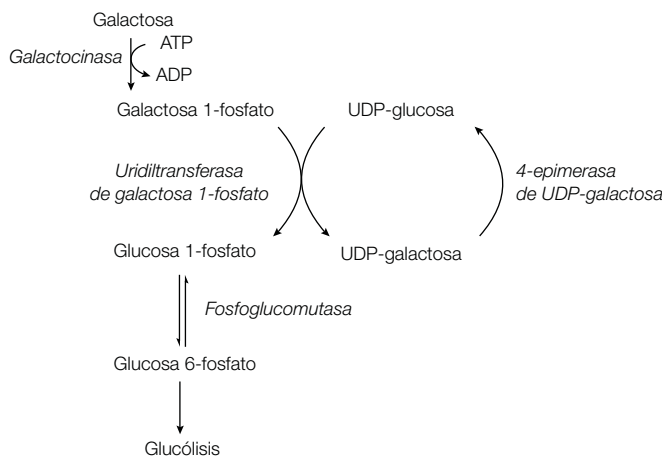


Figura J3-3. Vía de interconversión galactosa-glucosa.

permite que la glucólisis sea muy sensible a las necesidades energéticas de la célula, y que aumente de velocidad cuando el aporte de ATP sea deficiente (y el nivel de AMP alto), de manera que pueda elaborarse más ATP y reducir la velocidad cuando exista suficiente ATP disponible.

2. Citrato. La PFK también es inhibida por el citrato, el primer producto del ciclo del ácido cítrico propiamente dicho (sección L1). Un nivel alto de citrato señala que hay un aporte abundante de intermediarios del ciclo del ácido cítrico disponibles y por lo tanto que no se necesita una degradación adicional de la glucosa a través de la glucólisis.
3. Fructosa 2,6-bisfosfato. La fructosa 2,6-bisfosfato (F2,6-BP) se sintetiza (figura J3-4) a partir de la fructosa 6-fosfato con la participación de una enzima que se denomina **fosfofructocinasa 2 (PFH2)**, una enzima diferente a la PFK. La F-2,6-BP es hidrolizada a fructosa 6-fosfato (figura J3-4) por la **fructosa 1,6-bisfosfatasa 2 (FBP-asa 2)**. De manera increíble, la PFK-2 y la FBP-asa 2 son catalizadas de manera activa por el mismo polipéptido; esto es, ésta es una **enzima bifuncional**. La fructosa 6-fosfato estimula la síntesis de F-2,6-BP e inhibe su hidrólisis (figura J3-4). A la vez, la F-2,6-BP activa con potencia a la PFK y por lo tanto estimula la glucólisis. El efecto total es que cuando los niveles de fructosa 6-fosfato son altos, la PFK (y en consecuencia la glucólisis) resulta estimulada. La PFK-2 y la FBP-asa 2 también son controladas por una modificación covalente (sección D5). Cuando los niveles de glucosa en sangre caen, se libera la hormona glucagon hacia la circulación y desencadena una cascada de cAMP (sección J7) que conduce a la fosforilación del polipéptido PFK-2/FBP-asa 2 en un residuo de serina. Esto activa a la FBP-asa 2 e inhibe a la PFK-2, lo que reduce el nivel de F2,6-BP y así reduce la velocidad de la glucólisis. Lo contrario es cierto cuando los niveles de glucosa aumentan; el grupo fosfato es removido del polipéptido PFK-2/FBP-asa 2 por una fosfatasa, y así inhibe a la FBP-asa 2 y activa a la PFK-2, lo que eleva el nivel de F-2,6-BP y de esta manera incrementa la velocidad de la glucólisis.

La F-2,6-BP también es importante en la prevención de la glucólisis (degradación de la glucosa) y en la gluconeogénesis (síntesis de glucosa), en las cuales actúa de manera simultánea. Esto se llama **regulación recíproca** y se describe en la sección J4.

4. Iones  $H^+$ . Los iones  $H^+$  inhiben la PFK y así la velocidad de la glucólisis se reduce cuando el pH cae de manera significativa. Esto evita la formación excesiva de lactato (es decir, ácido láctico) bajo condiciones anaerobias (véase antes) y también impide

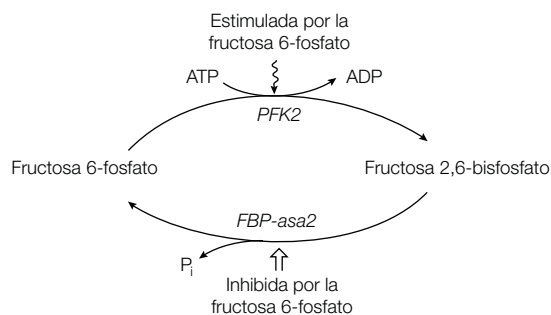
la condición médica conocida como **acidosis** (un descenso deletéreo en el pH sanguíneo).

## Hexocinasa

La hexocinasa, la enzima que cataliza el primer paso irreversible de la glucólisis, es inhibida por la glucosa 6-fosfato. Por lo tanto, cuando la PFK es inhibida, se elabora fructosa 6-fosfato y de esta manera la glucosa 6-fosfato, ya que estos metabolitos están en equilibrio a través de la isomerasa de fosfoglucosa (figura J3-1). Por consiguiente, la inhibición de la hexocinasa refuerza la inhibición a nivel del paso PFK. A primera vista, esto impresiona como algo inusual ya que por lo general el primer paso es el irreversible de una vía (el paso obligado), que por ello es el principal paso de control. Sobre esta base, puede parecer que la hexocinasa debería ser la principal enzima de control, no la PFK. Pese a ello, la glucosa 6-fosfato, el producto de la reacción de la hexocinasa, también puede alimentar la síntesis de glucógeno (sección J6) o la vía de la pentosa fosfato (sección J5). Por consiguiente, el primer paso irreversible que es exclusivo de la glucólisis es el catalizado por la PFK y por lo tanto es el principal paso de control.

## Cinasa de piruvato

La cinasa de piruvato cataliza el tercer paso irreversible de la glucólisis. Es activada por la fructosa 1,6-bisfosfato. El ATP y el aminoácido alanina inhiben por medios alostéricos la enzima, de manera que la glucólisis se lentifica cuando el abastecimiento de ATP y de los precursores biosintéticos (indicado por los niveles de Ala) se encuentra suficientemente alto. Además, en un control similar al de la PFK (véase antes), cuando la concentración de la glucosa en sangre es baja, se libera glucagon, que estimula la fosforilación de la enzima a través de la cascada del cAMP (sección J7). Esta modificación covalente inhibe la enzima, de modo que la glucólisis se lentifica en tiempos de niveles de glucosa en sangre bajos.



**Figura J3-4.** Síntesis y degradación de la fructosa 2,6-bisfosfato.

# J4 Gluconeogénesis

## Notas clave

### Descripción

La gluconeogénesis sintetiza glucosa a partir de precursores que no son carbohidratos y es importante para el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre durante la inanición o durante el ejercicio vigoroso. El cerebro y los eritrocitos dependen casi por completo de la glucosa en sangre como fuente de energía. La gluconeogénesis sucede sobre todo en el hígado y en una menor extensión en el riñón. La mayoría de las enzimas de la gluconeogénesis son citosólicas, pero la carboxilasa de piruvato y la glucosa 6-fosfatasa se localizan en la matriz mitocondrial y están unidas al retículo endoplásmico liso, respectivamente.

### La vía metabólica

El piruvato se convierte en oxalacetato (por la carboxilasa de piruvato). El oxalacetato es descarboxilado y fosforilado a fosfoenolpiruvato (PEP) por la carboxicinas de fosfoenolpiruvato (carboxicinas PEP). El PEP se convierte en fructosa 1,6-bisfosfato por la inversión directa de varias reacciones de la glucólisis. A continuación, la fructosa 1,6-bisfosfato es desfosforilada a fructosa 6-fosfato (por la fructosa 1,6-bisfosfatasa) y ésta es convertida en glucosa 6-fosfato (por la isomerasa de fosfoglucosa). Finalmente, la glucosa 6-fosfato es desfosforilada (por la glucosa 6-fosfatasa) para producir glucosa.

### Energía usada

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

### Transporte de oxalacetato

El oxalacetato, el producto del primer paso de la gluconeogénesis, debe abandonar la mitocondria e ingresar en el citosol, donde tienen lugar los siguientes pasos enzimáticos. Como la membrana mitocondrial interna es impermeable al oxalacetato, la deshidrogenasa de malato mitocondrial lo convierte en malato. Éste deja la mitocondria e ingresa en el citosol, donde la deshidrogenasa de malato citosólica lo convierte en oxalacetato.

### Activación de la carboxilasa de piruvato

El oxalacetato, el producto de la reacción de la carboxilasa de piruvato, funciona como un importante intermediario del ciclo del ácido cítrico en la oxidación de la acetil-CoA y como un precursor de la gluconeogénesis. La actividad de la carboxilasa de piruvato depende de la presencia de acetil-CoA, de manera que se elabora más oxalacetato cuando los niveles de acetil-CoA se elevan.

### Regulación recíproca de la glucólisis y la gluconeogénesis

Si la glucólisis y la gluconeogénesis operan de manera simultánea, el efecto neto debería ser la hidrólisis de dos moléculas de ATP y dos moléculas de GTP. Esto se evita gracias a la regulación recíproca en los pasos enzimáticos que son diferentes en cada vía. El AMP activa la fosfofructocinasa (PFK) (ATP), pero inhibe a la fructosa 1,6-bisfosfatasa (gluconeogénesis). El ATP y el citrato inhiben a la PFK, pero el citrato estimula a la fructosa 1,6-bisfosfatasa. La glucólisis y la gluconeogénesis también son sensibles a las condiciones de la inanición a través de la concentración de la fructosa 2,6-bisfosfato (F-2,6-BP). Durante la inanición se libera glucagon en la corriente sanguínea e inhibe la síntesis de F-2,6-BP. En el estado de alimentación se libera insulina en la sangre y determina la acumulación de F-2,6-BP. Como la F-2,6-BP activa a la PFK e inhibe a la fructosa 1,6-bisfosfatasa, en el animal alimentado la glucólisis es estimulada y la gluconeogénesis es inhibida y viceversa durante la inanición. En el hígado, el ATP y la alanina inhiben a la cinasa de piruvato (glucólisis), mientras que el ADP inhibe a la carboxilasa de piruvato y a la carboxicinas de PEP (gluconeogénesis). Por consiguiente, la glucólisis es inhibida en periodos en los que el ATP y los intermediarios biosintéticos están en exceso, mientras que la gluconeogénesis es inhibida en tiempos en que el nivel de ATP es bajo (y el de ADP es alto). La cinasa de piruvato también es

|                           |   |   |
|---------------------------|---|---|
| <b>Ciclo de Cori</b>      | <p>estimulada por la fructosa 1,6-bisfosfato, de manera que sus tasas se incrementan cuando la glucólisis está activa. Durante la inanición, la secreción de glucógeno en la sangre activa una cascada de cAMP que conduce a la fosforilación e inhibición de la cinasa de piruvato (glucólisis).</p> <p>Durante un ejercicio vigoroso, el piruvato producido por la glucólisis en el músculo se convierte en lactato por la acción de la deshidrogenasa de lactato. El lactato se difunde en la corriente sanguínea y es transportado al hígado. Aquí, es convertido en glucosa a través de la gluconeogénesis. La glucosa se libera a la sangre y queda disponible para ser captada por el músculo (así como por otros tejidos, entre los que se incluye el cerebro). Este ciclo de reacciones se denomina ciclo de Cori.</p> |   |
| <b>Temas relacionados</b> | <p>(H5) Glucosilación de la proteína<br/>(J1) Monosacáridos y disacáridos<br/>(J2) Polisacáridos y oligosacáridos<br/>(J3) Glucólisis</p>   | <p>(J5) Vía de la pentosa fosfato<br/>(J6) Metabolismo del glucógeno<br/>(L1) Ciclo del ácido cítrico</p> |

## Descripción

La gluconeogénesis sintetiza glucosa a partir de precursores que no son carbohidratos, entre los que se incluyen el lactato y el piruvato, intermediarios del ciclo del ácido cítrico, los esqueletos carbonados de la mayoría de los aminoácidos y el glicerol. Es de extrema importancia dado que el cerebro y los eritrocitos dependen casi exclusivamente de la glucosa como su fuente de energía en condiciones normales. El almacenamiento hepático de glucógeno es suficiente para proveer al cerebro con glucosa por sólo alrededor de medio día en condiciones de ayuno. Por consiguiente, la gluconeogénesis es de especial importancia en periodos de inanición o de ejercicio vigoroso. Durante la inanición, la formación de glucosa a través de la gluconeogénesis utiliza en particular aminoácidos procedentes de la degradación de las proteínas y glicerol de la descomposición de las grasas.

Durante el ejercicio, los niveles de glucosa en sangre requeridos por la función cerebral y del músculo esquelético se mantienen por medio de la gluconeogénesis en el hígado, órgano que utiliza el lactato producido por el músculo.

El sitio principal de gluconeogénesis es el hígado, aunque también se produce en una extensión bastante menor en los riñones. Tiene lugar una gluconeogénesis mucho menor en el cerebro o el músculo. Dentro de las células hepáticas, la primera enzima de la gluconeogénesis, la carboxilasa de piruvato, se localiza en la matriz mitocondrial. La última enzima, la glucosa 6-fosfatasa, está unida al retículo endoplásmico liso. Las otras enzimas de la vía se localizan en el citosol.

## La vía metabólica

En la glucólisis (sección J3), la glucosa es metabolizada a piruvato. En la gluconeogénesis, el piruvato es meta-

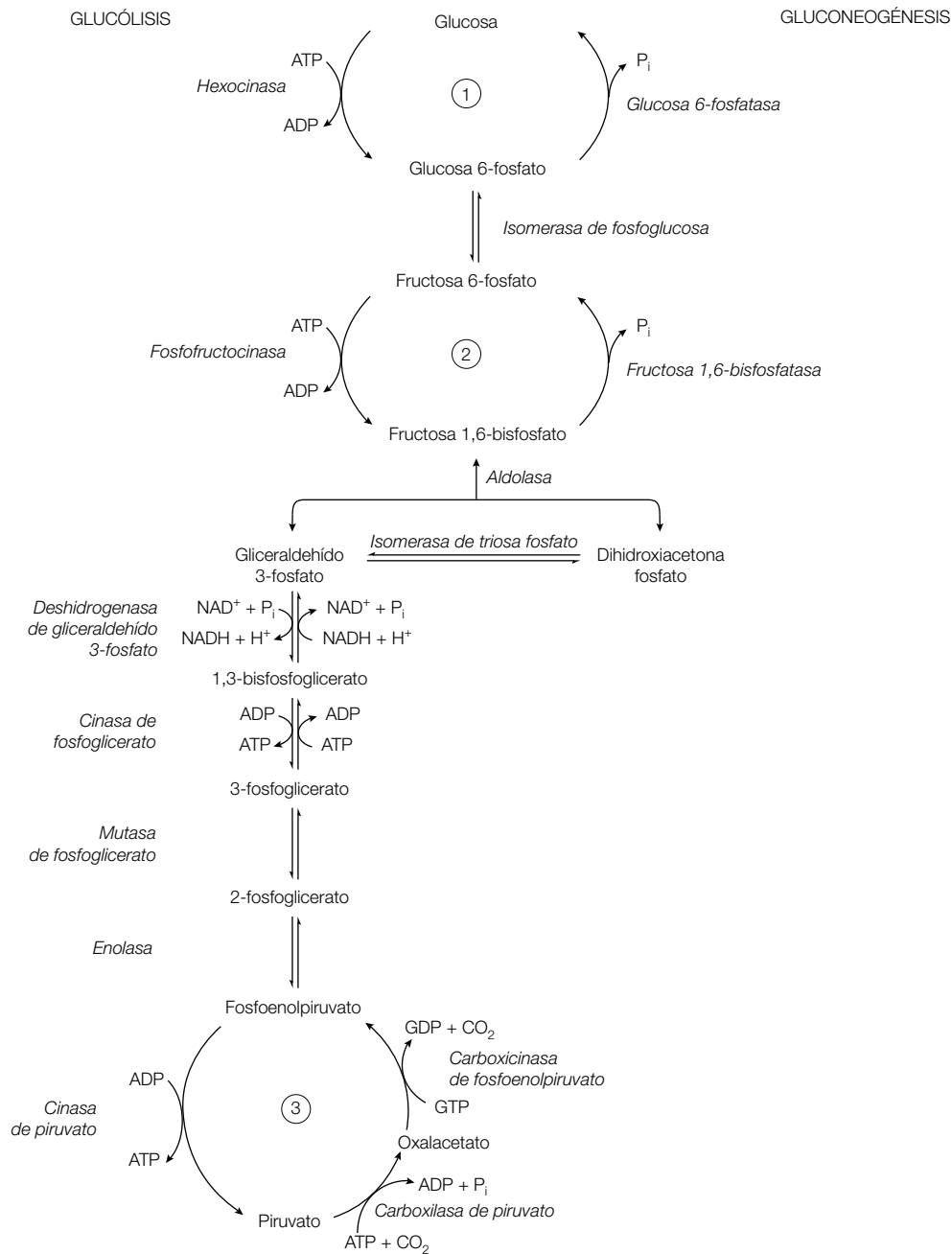
bolizado a glucosa. En principio, la gluconeogénesis es la inversa de la glucólisis. En efecto, algunas de las reacciones de la glucólisis son reversibles y las dos vías tienen estos pasos en común. Pese a ello, tres pasos de la glucólisis son esencialmente irreversibles: aquellos catalizados por las enzimas hexocinasa, fosfofructocinasa (PFK) y cinasa de piruvato (sección J3). En efecto, hay un gran cambio en la energía libre negativa en estas reacciones que de manera habitual dirigen la glucólisis hacia la formación de piruvato. Por lo tanto, en la gluconeogénesis, estos tres pasos deben reservarse para usar otras reacciones, como se muestra en la figura J4-1; la gluconeogénesis *no* es la simple inversa de la glucólisis.

## Precusores de la gluconeogénesis

El glicerol puede actuar como un sustrato para la síntesis de glucosa mediante la conversión en dihidroxiacetona fosfato, un intermediario de la gluconeogénesis (figura J4-1). Con el fin de que el **lactato, piruvato, intermediarios del ciclo del ácido cítrico** y los esqueletos de carbono de la mayoría de los **aminoácidos** actúen como precursores de la gluconeogénesis, estos compuestos primero deben convertirse en oxalacetato. Algunos de los esqueletos de carbono de los aminoácidos dan origen al oxalacetato en forma directa. Otros alimentan el ciclo del ácido cítrico como intermediarios (secciones L1 y M2) y el ciclo entonces convierte tales moléculas en oxalacetato. El lactato es convertido en piruvato por la reacción de la deshidrogenasa de lactato (sección J3) y algunos aminoácidos también dan origen al piruvato (sección M2). En consecuencia, en el caso de estos precursores, el primer paso de la vía gluconeogénica es la conversión del piruvato en oxalacetato.

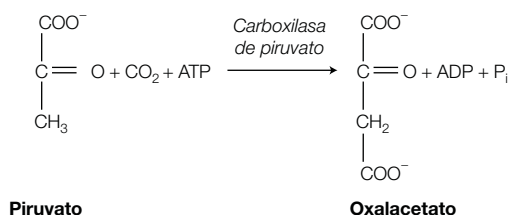
Los **pasos de la gluconeogénesis** (figura J4-1) son los siguientes:



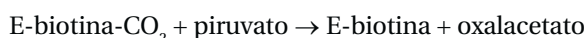
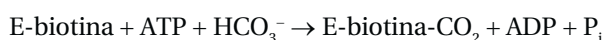


**Figura J4-1.** Comparación entre gluconeogénesis y glucólisis. Los tres pasos de la glucólisis que son irreversibles y están numerados: 1) la hexocinasa en la glucólisis es revertida por la glucosa 6-fosfatasa en la gluconeogénesis; 2) la PFK de la glucólisis es revertida por la fructosa 1,6-bisfosfatasa de la gluconeogénesis; 3) la cinasa de piruvato de la glucólisis es revertida por dos reacciones secuenciales de la gluconeogénesis catalizadas por la carboxilasa de piruvato y la carboxicinasa PEP.

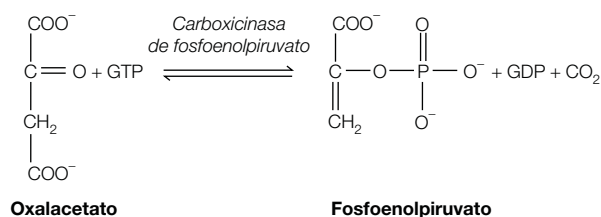
1. El piruvato se convierte en oxalacetato mediante una carboxilación que realiza la enzima **carboxilasa de piruvato**, que se localiza en la matriz mitocondrial.



Esta enzima utiliza **biotina** como **transportador activado de CO<sub>2</sub>**; la reacción ocurre en dos etapas:

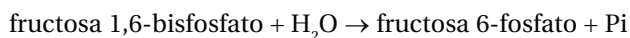


2. Luego, el oxalacetato es atacado por la **carboxicinasa de fosfoenolpiruvato (carboxicinasa PEP)**, la cual descarboxila y fosforila de manera simultánea la molécula para formar PEP, en una reacción durante la cual se libera CO<sub>2</sub> y se usa GTP:



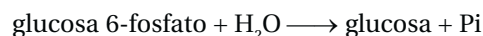
De esta manera, la inversión del paso glucolítico desde PEP a piruvato requiere dos reacciones en la gluconeogénesis, de piruvato a oxalacetato mediante la carboxilasa de piruvato y de oxalacetato a PEP mediante la carboxicinasa de PEP. Dado que, durante la glucólisis, la conversión de PEP en piruvato sintetiza ATP, no es de sorprenderse que la inversión total de este paso necesite el aporte de cantidades sustanciales de energía, un ATP para el paso de la carboxilasa de piruvato y un GTP para el paso de la carboxicinasa de PEP.

3. El PEP se convierte en fructosa 1,6-bisfosfato en una serie de pasos que son la inversa de los de la glucólisis (sección J3) a través de la intervención de las enzimas enolasa, mutasa de fosfoglicerato, cinasa de fosfoglicerato, deshidrogenasa de gliceraldehído 3-fosfato, isomerasa de triosa fosfato y aldolasa (figura J4-1). Esta secuencia de reacciones usa un ATP y un NADH por cada molécula de PEP metabolizada.
4. La fructosa 1,6-bisfosfato es desfosforilada para formar fructosa 6-fosfato a través de la enzima **fructosa 1,6-bisfosfatasa**, en la reacción:



5. La enzima glucolítica isomerasa de fosfoglucosa convierte a la fructosa 6-fosfato en glucosa 6-fosfato.

6. La enzima **glucosa 6-fosfatasa** convierte a la glucosa 6-fosfato en glucosa. Esta enzima está unida al retículo endoplásmico liso y cataliza la reacción:



### Energía usada

Como podría esperarse, la síntesis de glucosa a través de la gluconeogénesis necesita aporte de energía. Se requieren dos moléculas de piruvato para sintetizar una molécula de glucosa. La energía se requiere en los siguientes pasos:



$$\text{Total} = 6 \text{ ATP}$$

Esto se compara con sólo dos ATP como la producción neta de ATP por la glucólisis. Por lo tanto, se requiere un aporte extra de cuatro ATP por glucosa para invertir la glucólisis.

En los hechos, la reacción de la deshidrogenasa de gliceraldehído 3-fosfato también consume NADH, equivalente a dos moléculas de NADH por cada molécula de glucosa sintetizada. Como cada NADH citosólico debería usarse de manera usual para generar alrededor de dos moléculas de ATP por medio de la lanzadera de glicerol 3-fosfato y la fosforilación oxidativa (sección L2), esto equivale al suministro de otros cuatro ATP por glucosa sintetizada.

### Transporte de oxalacetato

La carboxilasa de piruvato es una enzima de la matriz mitocondrial, mientras que las otras enzimas de la gluconeogénesis se localizan fuera de la mitocondria. Por consiguiente, el oxalacetato, producido por la carboxilasa de piruvato, necesita salir de la mitocondria. Sin embargo, la membrana mitocondrial interna es impermeable a este compuesto. En consecuencia, la **deshidrogenasa de malato mitocondrial** convierte al oxalacetato en malato en el interior de la mitocondria, tras lo cual el malato es transportado a través de la membrana mitocondrial por una proteína de transporte especial y luego es reconvertido en oxalacetato en el citoplasma por una **deshidrogenasa de malato citosólica** (figura J4-2).

### Activación de la carboxilasa de piruvato

El oxalacetato desempeña dos funciones principales. Es un intermediario que se consume en la gluconeogénesis y es también un intermediario clave en el ciclo del ácido cítrico ya que se fusiona con la acetil-CoA para formar

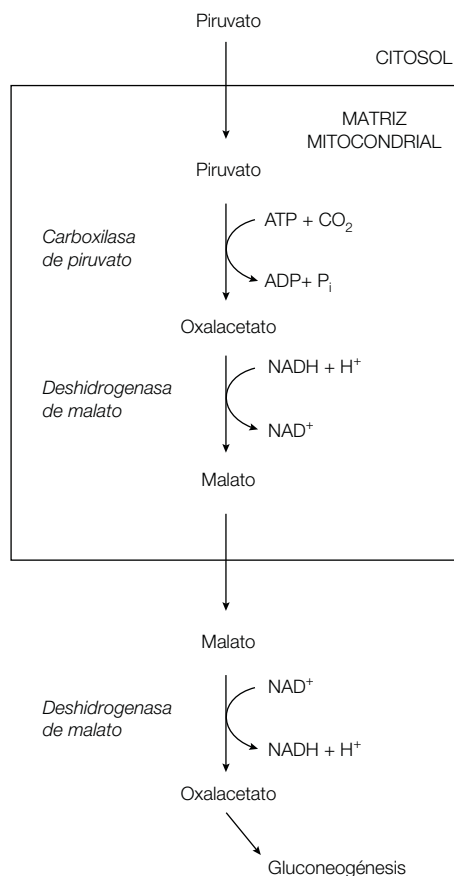


Figura J4-2. Transporte del oxalacetato fuera de la mitocondria.

citrato, y termina por ser regenerado por el ciclo. De esta manera, la carboxilasa de piruvato genera oxalacetato para la gluconeogénesis, pero también debe mantener niveles de oxalacetato para el funcionamiento del ciclo del ácido cítrico. A raíz de esta última causa, la actividad de la carboxilasa de piruvato depende en absoluto de la presencia de acetil-CoA; el grupo prostético biotina de la enzima no puede ser carboxilado a menos que la acetil-CoA esté unida a la enzima. Esta activación alostérica por la acetil-CoA asegura que se elabore más oxalacetato cuando haya un exceso de acetil-CoA. En este papel del mantenimiento del nivel de intermediarios del ciclo del ácido cítrico, se dice que la reacción de la carboxilasa de piruvato es **anapleurótica**.

### Regulación recíproca de la glucólisis y la gluconeogénesis

La conversión de la fructosa 6-fosfato en fructosa 1,6-bisfosfato por la PFK y la reacción inversa catalizada por la fructosa 1,6-bisfosfatasa es un ejemplo de un **ciclo de sustrato** (figura J4-3). Si ambas reacciones se producen en forma simultánea, la reacción neta es la hidrólisis del ATP. Por esta razón, tales reacciones han sido denominadas **ciclos fútiles**.

Si se observa la vía completa, la glucólisis genera dos ATP netos por glucosa, mientras que la gluconeogénesis utiliza cuatro ATP y dos GTP por glucosa. Por lo tanto, si la glucólisis y la gluconeogénesis pudieran operar en

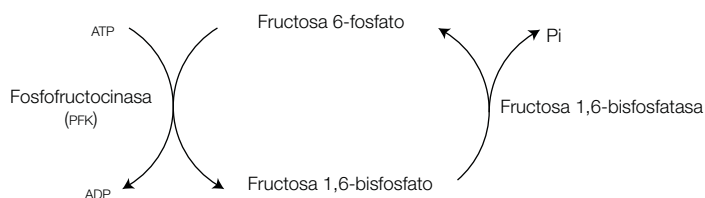


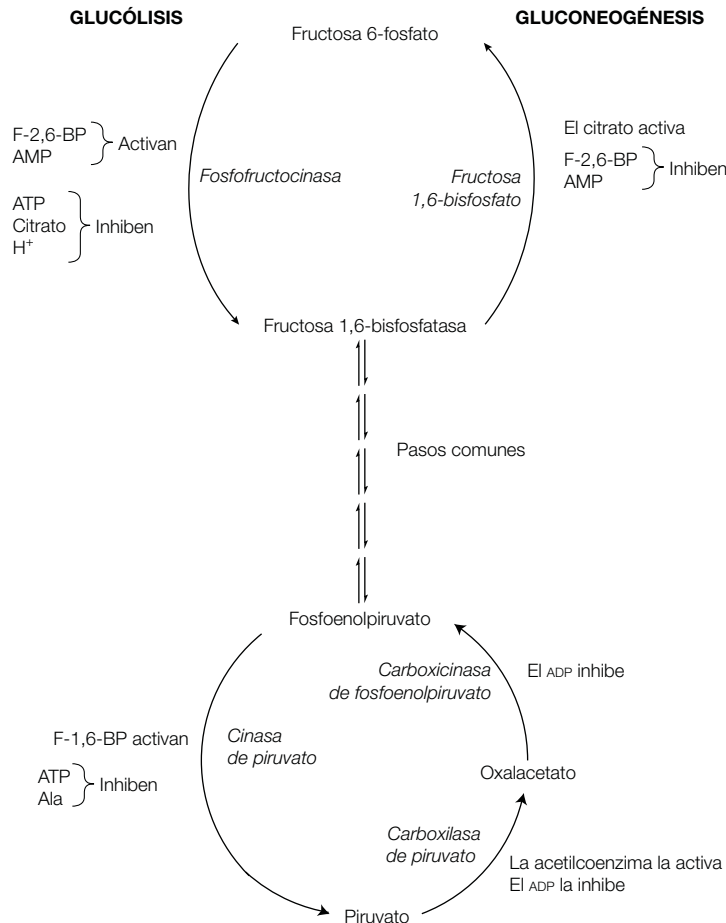
Figura J4-3. Ciclo del sustrato fructosa 6-fosfato-fructosa 1,6-bisfosfato.

forma simultánea y convirtieran la glucosa en piruvato y a la recíproca otra vez, el único resultado neto sería la utilización de dos ATP y dos GTP. Esto se evita por la regulación coordinada estrecha de la glucólisis y la gluconeogénesis. Como la mayoría de los pasos de las dos vías son comunes, los pasos que son diferentes en cada vía son los sitios de esta regulación, en particular las interconversiones entre fructosa 6-fosfato y fructosa 1,6-bisfosfato y entre PEP y piruvato. La situación se resume en la figura J4-4 y se describe con detalle después.

**Regulación de la PFK y de la fructosa 1,6-bisfosfatasa**

Cuando el nivel de AMP es alto, indica la necesidad de una síntesis mayor de ATP. El AMP estimula a la PFK, lo que incrementa la tasa de glucólisis, e inhibe a la fructosa 1,6-bisfosfatasa, lo que detiene la gluconeogénesis. Por el contrario, cuando los niveles de ATP y citrato son altos, señalan que no necesita producirse más ATP. El ATP y el citrato inhiben a la PFK, lo que disminuye la tasa de la glucólisis, en tanto que el citrato estimula a la fructosa 1,6-bisfosfatasa, lo que incrementa la tasa de gluconeogénesis.

La glucólisis y la gluconeogénesis son sensibles a la inanición por el nivel de la molécula reguladora **fructosa 2-6-bisfosfato (F-2,6-BP)**. La F-2,6-BP es sintetizada a partir de la fructosa 6-fosfato y es hidrolizada a fructosa 6-fosfato otra vez por un solo polipéptido con dos actividades enzimáticas (PFK-2 y FBP-asa 2; sección J3). El nivel de F-2,6-BP se encuentra bajo control hormonal. Durante la inanición, cuando el nivel de glucosa en sangre es bajo, se libera la hormona glucagon hacia la sangre, la cual desencadena una cascada de cAMP (sección J7) que termina por causar la fosforilación del polipéptido PFK-2/FBP-asa 2. Este nucleótido activa a la FBP-asa 2 e inhibe a la PFK-2, con lo cual disminuye el nivel de F-2,6-BP (sección J3). En el estado de alimentación, cuando la glucosa en sangre se halla en un nivel alto, se libera la hormona insulina, que provoca el efecto opuesto, dado que causa una elevación en el nivel de F-2,6-BP. Como la F-2,6-BP estimula con fuerza a la PFK e inhibe a la fructosa 1,6-bisfosfatasa (figura J4-4), la glucólisis resulta estimulada y la gluconeogénesis inhibida en el animal alimentado. Por el contrario, durante la inanición, el bajo nivel de F-2,6-BP permite que predomine la gluconeogénesis.



**Figura J4-4.** Regulación recíproca de la glucólisis y la gluconeogénesis.

### Regulación de la cinasa de piruvato, carboxilasa de piruvato y carboxicinasas de PEP

- En el hígado, los altos niveles de ATP y alanina inhiben a la cinasa de piruvato, de manera que cuando el ATP y los intermediarios biosintéticos se encuentran en abundancia se inhibe la glucólisis (sección J3). La acetil-CoA también es abundante bajo estas condiciones y activa a la carboxilasa de piruvato, lo que favorece la gluconeogénesis. Al revés, cuando el estado de energía de las células es bajo, la concentración de ADP es alta y esto inhibe a la carboxilasa de piruvato y a la carboxicinasas de PEP, lo que detiene la gluconeogénesis. Al mismo tiempo, el nivel de ATP estará bajo, de manera que la cinasa de piruvato no será inhibida y la glucólisis se activará.
- La fructosa 1,6-bisfosfatasa estimula asimismo a la cinasa de piruvato (sección J3; activación por ante-alimentación), de manera que su actividad aumenta cuando se necesita, a medida que la glucólisis se acelera.
- Durante la inanición, la prioridad es conservar la glucosa en sangre para el cerebro y el músculo, de manera que bajo estas condiciones la cinasa de piruvato en el hígado es inactivada. Esto sucede debido a

que la hormona glucagon es secretada hacia la sangre y activa la cascada de cAMP (sección J7), que lleva a la fosforilación e inhibición de esta enzima.

### Ciclo de Cori

Bajo las condiciones de oxígeno escaso que se experimentan durante el ejercicio vigoroso, la formación de NADH por la glucólisis excede a la capacidad de la cadena respiratoria para oxidarlo y convertirlo en  $\text{NAD}^+$ . La deshidrogenasa de lactato convierte entonces el piruvato producido por la glucólisis muscular en lactato, una reacción que regenera  $\text{NAD}^+$  y que permite que la glucólisis continúe para producir ATP (sección J3).

No obstante, el lactato es un producto metabólico “sin salida” en la medida que resulta imposible metabolizarlo más en tanto no se lo reconvierta en piruvato. El lactato se difunde afuera del músculo y es transportado en la sangre hacia el hígado. Aquí se difunde dentro de las células hepáticas donde la deshidrogenasa de lactato lo convierte en piruvato. Luego, el piruvato es convertido en glucosa a través de la gluconeogénesis y la glucosa es liberada hacia la corriente sanguínea lista para ser tomada por el músculo esquelético (y el cerebro). Este ciclo de reacciones (figura J4-5) se llama **ciclo de Cori**.

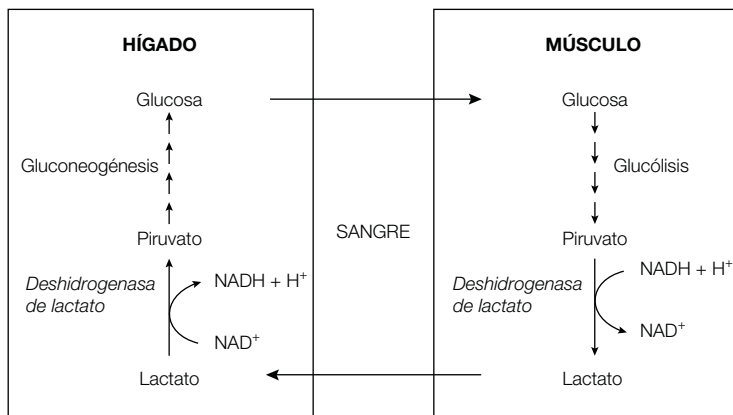


Figura J4-5. Ciclo de Cori.

# J5 Vía de la pentosa fosfato

## Notas clave

### Descripción

Los dos principales productos de la vía son el dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (forma reducida; NADPH) y ribosa 5-fosfato. La ribosa 5-fosfato y sus derivados son componentes de importantes moléculas celulares como el RNA, DNA, NAD<sup>+</sup>, FAD, ATP y de la CoA. El NADPH se requiere en muchas vías biosintéticas y en particular para la síntesis de ácidos grasos y esteroides. Por lo tanto, la vía es muy activa en tejidos como el tejido adiposo, la glándula mamaria y la corteza suprarrenal.

### Principales reacciones de la vía

Las reacciones de la vía metabólica pueden agruparse en tres etapas. En la primera etapa, las reacciones oxidativas convierten la glucosa 6-fosfato en ribulosa 5-fosfato, lo que genera dos moléculas de NADPH. En la segunda etapa, la ribulosa 5-fosfato se convierte en ribosa 5-fosfato por isomerización. La tercera etapa de reacciones, catalizada por la transcetolasa y la transaldolasa, convierte a la ribosa 5-fosfato en fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato y por consiguiente enlaza a la vía de la pentosa fosfato con la glucólisis.

### Control de la vía

Las reacciones de la transcetolasa y la transaldolasa son reversibles y por lo tanto permiten la conversión de la ribosa 5-fosfato en intermediarios glucolíticos cuando no se necesita para otras reacciones celulares, o para la generación de ribosa 5-fosfato a partir de intermediarios glucolíticos cuando se requiere más. La velocidad de la vía de la pentosa fosfato es controlada por la regulación del NADP<sup>+</sup> del primer paso, catalizada por la deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato.

### Temas relacionados

(J1) Monosacáridos y disacáridos  
(J3) Glucólisis  
(K3) Síntesis de ácidos grasos

## Descripción

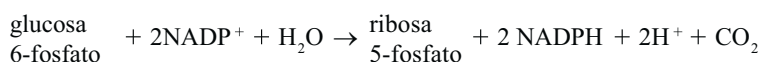
En las células, el poder de reducción está disponible como NADH y NADPH, pero éstos cumplen funciones muy diferentes. El NADH es oxidado por la cadena respiratoria para generar ATP a través de la fosforilación oxidativa (sección L2). El NADPH se usa en reacciones biosintéticas que requieren poder reductor. A pesar de sus estructuras similares (sección D1), el NADH y el NADPH no son intercambiables desde el punto de vista metabólico y por eso la célula debe realizar un conjunto de reacciones para crear de manera específica NADPH. Este conjunto de reacciones es la vía de la pentosa fosfato (también conocida como **desviación de la hexosa monofosfato** o como **vía del fosfogluconato**). Ésta tiene lugar en el citosol y es de particular importancia en tejidos como el tejido adiposo, la glándula mamaria y la corteza suprarrenal, que sintetizan ácidos grasos y esteroides a

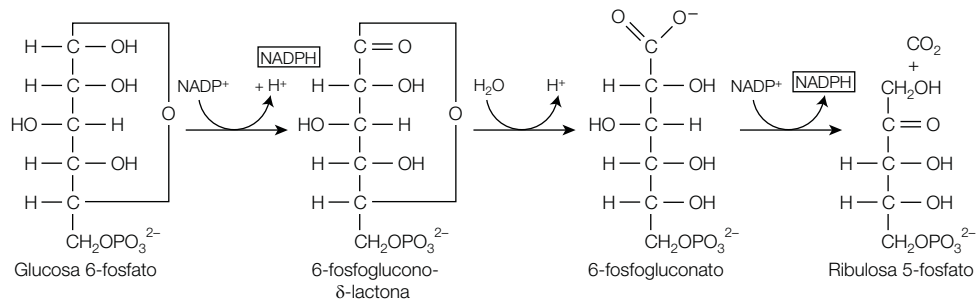
partir de la acetil-CoA (sección K3). La actividad de esta vía es muy baja en el músculo esquelético, por ejemplo, el cual no sintetiza ácidos grasos ni esteroides.

El conjunto central de reacciones de la vía oxida la glucosa 6-fosfato a ribosa 5-fosfato y genera NADPH. Por consiguiente, así como genera NADPH, la vía desempeña una segunda función importante en la conversión de hexosas en pentosas, en particular la ribosa 5-fosfato. La ribosa 5-fosfato o sus derivados se requieren en la síntesis de RNA, DNA, NAD<sup>+</sup>, FAD, ATP, CoA y otras moléculas importantes. En consecuencia, los dos principales productos de la vía son NADPH y ribosa 5-fosfato.

## Principales reacciones de la vía

Las reacciones centrales de la vía pueden resumirse como:





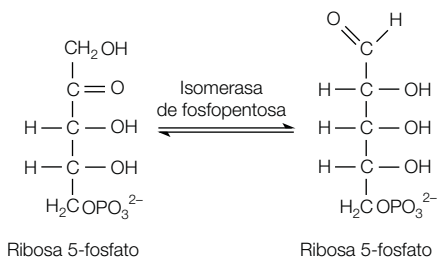
La vía tiene tres etapas:

**Etapla 1: reacciones oxidativas que convierten la glucosa 6-fosfato en ribulosa 5-monofosfato, lo que genera dos moléculas de NADPH**

La **deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato** oxida a la glucosa 6-fosfato a 6-fosfoglucono-δ-lactona (lo que produce NADPH) y ésta es hidrolizada por la **lactonasa** a 6-fosfogluconato. En el paso ulterior, la **deshidrogenasa de 6-fosfogluconato** convierte a este sustrato en ribulosa 5-fosfato. Ésta es una **descarboxilación oxidativa** (es decir, el 6-fosfogluconato es oxidado y un carbono es removido como CO<sub>2</sub>). Estas reacciones se muestran en la parte superior:

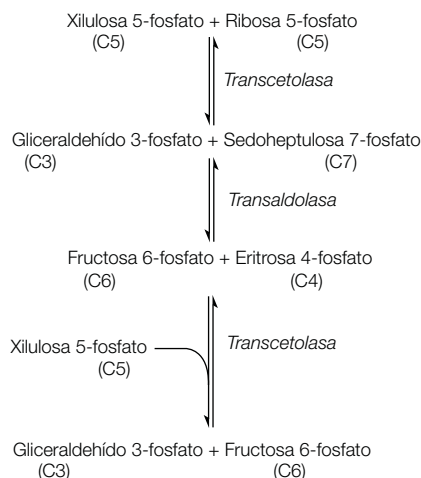
**Etapla 2: isomerización de la ribulosa 5-fosfato en ribosa 5-fosfato**

La ribulosa 5-fosfato se convierte luego en ribosa 5-fosfato por isomerización, una reacción que cataliza la **isomerasa de fosfopentosa**:

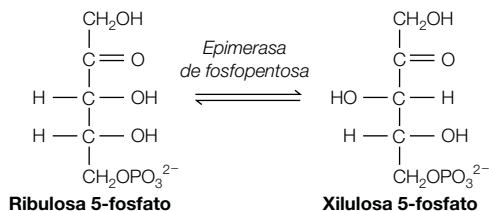


**Etapla 3: enlazamiento de la vía de la pentosa fosfato a la vía de la glucólisis a través de la transcetolasa y la transaldolasa**

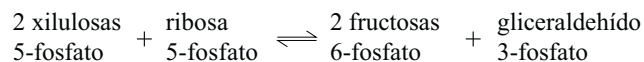
Si en un momento se requiere sólo una pequeña cantidad de pentosa 5-fosfato para la síntesis de ácidos nucleicos y otras reacciones sintéticas, tendería a acumularse y entonces las enzimas **transcetolasa** y **transaldolasa** la convierten en fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato. Estos dos productos son intermediarios de la glucólisis. Por lo tanto, estas reacciones proveen un enlace entre la vía de la pentosa fosfato y la glucólisis. El resumen de las reacciones se muestra a continuación:



En la figura J5-1 se muestran detalles de estas reacciones, donde se pueden observar las estructuras de las moléculas intervinientes. Estas reacciones requieren xilulosa 5-fosfato, así como ribosa 5-fosfato. La xilulosa 5-fosfato es un epímero (sección J1) de la ribulosa 5-fosfato y es un producto de la **epimerasa de fosfopentosa**:



En general, las reacciones de esta etapa pueden resumirse como:



**Control de la vía**

Las reacciones de la transcetolasa y la transaldolasa son reversibles, de manera que los productos finales de la vía de la pentosafosfato pueden cambiar según las necesidades metabólicas de la célula. Por consiguiente,

cuando las células necesitan NADPH pero no ribosa 5-fosfato, esta última se convierte en intermediarios glucolíticos que ingresan en la glucólisis. En el otro extremo, cuando la necesidad de ribosa 5-fosfato excede a la de NADPH, la fructosa 6-fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato pueden ser tomados de la glucólisis y convertidos en ribosa 5-fosfato por las reacciones invertidas de la transcetolasa y la transaldolasa.

La primera reacción de la vía, la oxidación de la glucosa 6-fosfato por la deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato, es limitante de la velocidad e irreversible. La enzima es regulada por el NADP<sup>+</sup>. A medida que la célula usa el NADPH, la concentración de NADP<sup>+</sup> aumenta y estimula a la deshidrogenasa de glucosa 6-fosfato, lo que provoca un aumento de la velocidad de la vía y de la regeneración de NADPH.

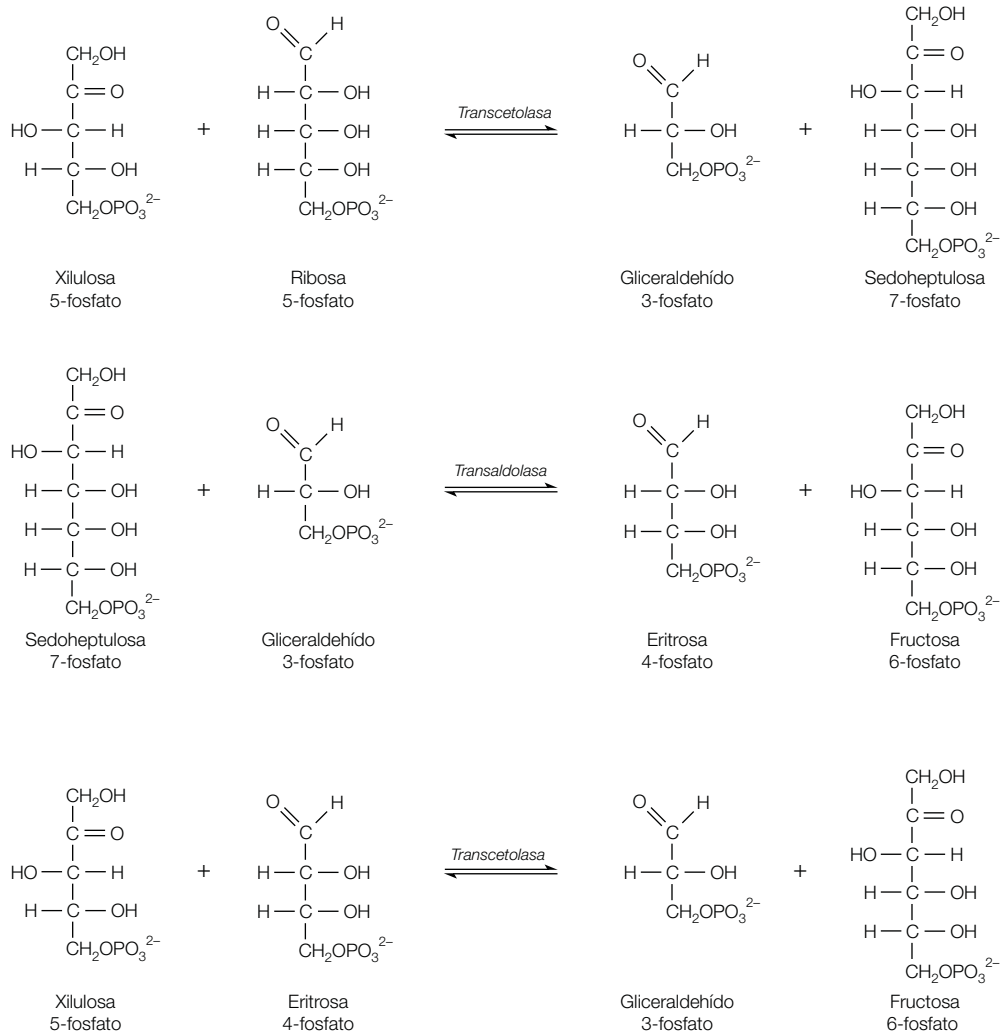


Figura J5-1. Detalles de las reacciones de la transaldolasa y la transcetolasa.



# J6 Metabolismo del glucógeno

## Notas clave

### Funciones del metabolismo del glucógeno

En primer lugar, el glucógeno se almacena en el hígado y en el músculo esquelético como una reserva de energía. El papel del glucógeno almacenado en el músculo es proveer una fuente de energía en las situaciones de contracción muscular prolongada. En contraste, el glucógeno almacenado en el hígado se usa para mantener los niveles de glucosa en sangre.

### Degradación del glucógeno

La fosforilasa de glucógeno y la enzima desramificante de glucógeno son las enzimas encargadas de la degradación del glucógeno. La fosforilasa remueve unidades de glucosa en forma secuencial desde los extremos no reductores de una molécula de glucógeno, lo que produce glucosa 1-fosfato. Esta enzima sólo ataca los enlaces glucosídicos  $\alpha$ 1-4 y no puede hacerlo con los puntos de ramificación  $\alpha$ 1-6. La fosfoglucomutasa convierte a la glucosa 1-fosfato en glucosa 6-fosfato. En el hígado, la glucosa 6-fosfatasa acaba por liberar la glucosa, que ingresa en la corriente sanguínea. Los músculos carecen de glucosa 6-fosfatasa. En su lugar, la glucosa 6-fosfato ingresa en la glucólisis y es oxidada para producir energía destinada a la contracción muscular.

### Síntesis de glucógeno

La fosforilasa de UDP-glucosa sintetiza UDP-glucosa a partir de ATP y de glucosa 1-fosfato. Entonces, la sintasa de glucógeno usa la UDP-glucosa como un sustrato para sintetizar glucógeno, al que añade un residuo por vez en el extremo no reductor de la molécula de glucógeno, y forma enlaces  $\alpha$ 1-4 entre los residuos de glucosilo colindantes. La enzima sólo puede extender las cadenas y por lo tanto requiere un cebador, llamado glucogenina, con el fin de comenzar la síntesis. La glucogenina es una proteína con ocho unidades de glucosa unidas mediante enlaces  $\alpha$ 1-4. La enzima ramificante se encarga de crear las ramas del glucógeno al romper un enlace  $\alpha$ 1-4 de la cadena de glucógeno y moverlo hacia una localización más interna de alrededor de siete residuos, donde lo une a la cadena principal por medio de un enlace  $\alpha$ 1-6.

### Temas relacionados

(J1) Monosacáridos y disacáridos      (J4) Gluconeogénesis  
(J3) Glucólisis      (J7) Control del metabolismo del glucógeno

## Funciones del metabolismo del glucógeno

El glucógeno es un gran polímero de residuos de glucosa unidos por enlaces glucosídicos  $\alpha$ 1-4, con ramificaciones cada 10 residuos o más a través de enlaces glucosídicos  $\alpha$ 1-6 (sección J2 para la estructura). El glucógeno proporciona una reserva de energía importante para el cuerpo. Los dos principales sitios de almacenamiento son el hígado y el músculo esquelético, donde el glucógeno se almacena en gránulos en el citosol. Los gránulos no sólo contienen glucógeno sino también las enzimas y proteínas reguladoras que se requieren para su degradación y síntesis. El metabolismo del glucógeno es importante debido a que permite mantener el nivel de la glucosa en sangre entre las comidas (a través del almacenamiento de glucógeno en el hígado), así como proveer una reserva de energía para la actividad muscular. El mantenimiento de la glucosa en sangre es esencial

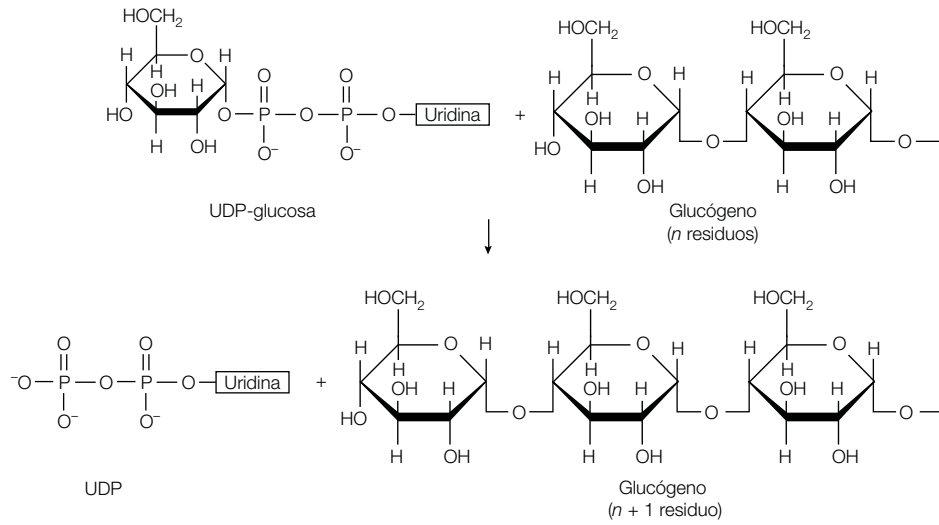
para proveer a los tejidos con una fuente de energía de fácil metabolismo, en particular el cerebro, que utiliza sólo glucosa excepto después de un largo periodo de inanición.

## Degradación del glucógeno

La degradación del glucógeno requiere dos enzimas: la **fosforilasa de glucógeno** y la enzima **desramificante de glucógeno**.

La fosforilasa de glucógeno (denominada con frecuencia tan sólo **fosforilasa**) degrada el glucógeno al deshacer los enlaces glucosídicos  $\alpha$ 1-4 para liberar una unidad de glucosa cada vez desde el extremo no reductor de la molécula de glucógeno (el extremo con un grupo 4'-OH libre; sección J2) como glucosa 1-fosfato. El otro sustrato requerido es el fosfato inorgánico ( $P_i$ ). La reacción es un





**Figura J6-2.** Síntesis de glucógeno por la sintasa de glucógeno.

# J7 Control del metabolismo del glucógeno

## Notas clave

### Descripción

La degradación y síntesis de glucógeno están controladas por regulación alostérica y hormonal.

### Control alostérico y modificación covalente

La fosforilasa existe en una forma activa, la forma *a*, y en una forma desfosforilada, que de manera usual es inactiva, la forma *b*. La fosforilasa cinasa y la fosfatasa de proteína I interconvierten ambas formas. En el músculo, la fosforilasa *b* es activada por las altas concentraciones de AMP generado por un ejercicio extenuante y por lo tanto degrada glucógeno, pero la estimulación por el AMP recibe la oposición de las altas concentraciones de ATP y glucosa 6-fosfato y de esta manera la enzima permanece inactiva en el músculo en reposo. En el hígado, la fosforilasa *b* no responde al AMP, pero la fosforilasa *a* es desactivada por la glucosa, de modo que la degradación del glucógeno para producir glucosa sucede sólo cuando los niveles de ésta son bajos. De manera habitual, la sintasa de glucógeno existe en una forma inactiva *b* fosforilada y en una forma *a* activa desfosforilada. Una alta concentración de glucosa 6-fosfato puede activar a la sintasa *b* en el músculo en reposo y estimular así la síntesis de glucógeno, pero la enzima es inactiva cuando el músculo se contrae, donde la concentración de glucosa 6-fosfato es baja.

### Control hormonal por la adrenalina y el glucagon

La adrenalina estimula la degradación del glucógeno en el músculo esquelético. La adrenalina y el glucagon estimulan la degradación del glucógeno en el hígado. La hormona se une a un receptor de la membrana plasmática y activa a la ciclasa de adenilato a través de una proteína G. La ciclasa de adenilato sintetiza cAMP a partir de ATP, el cual a su vez activa la proteincinasa A. Esta enzima fosforila a la fosforilasa cinasa, lo cual la activa. La fosforilasa cinasa convierte entonces a la fosforilasa inactiva *b* en fosforilasa activa *a* mediante fosforilación. La misma proteincinasa A inactiva a la sintasa de glucógeno mediante fosforilación, lo que convierte a la sintasa de glucógeno *a* en sintasa de glucógeno *b*. Cuando los niveles de esta hormona descienden, la estimulación de la degradación del glucógeno es detenida por la degradación del cAMP a 5'-AMP, acción que realiza la fosfodiesterasa, y por medio de la desfosforilación de las formas fosforiladas de la fosforilasa y la sintasa, acciones que realiza la fosfatasa de proteína I.

### Control hormonal por la insulina

La insulina es liberada a la corriente sanguínea cuando la concentración de la glucosa en sangre es alta y estimula la síntesis de glucógeno. Se une y activa a la proteincinasa receptora de la membrana plasmática de las células destino. Esto lleva a la activación de una proteincinasa que responde a la insulina que activa a su vez a la fosfatasa de proteína I por fosforilación. La fosfatasa de proteína I activada asegura que la fosforilasa y la sintasa de glucógeno se desfosforilen, y por lo tanto inhibe la degradación del glucógeno y activa la síntesis del mismo.

### Control del metabolismo del glucógeno dependiente del calcio

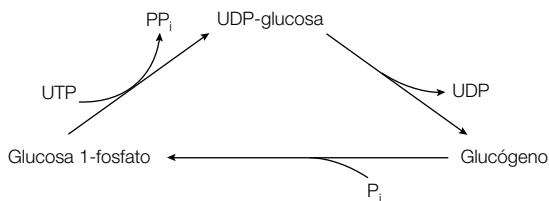
Durante la contracción muscular, los iones  $\text{Ca}^{2+}$  liberados desde el retículo sarcoplásmico activan de manera parcial a la fosforilasa cinasa desfosforilada y así inhiben la degradación del glucógeno y activan la síntesis del mismo.

### Temas relacionados

|                                  |                                |
|----------------------------------|--------------------------------|
| (A2) Células eucariotas          | (J3) Glucólisis                |
| (E5) Transducción de señales     | (J4) Gluconeogénesis           |
| (J1) Monosacáridos y disacáridos | (J6) Metabolismo del glucógeno |

## Descripción

Si la síntesis y degradación simultáneas del glucógeno fueran posibles (figura J7-1), el efecto neto sería la hidrólisis del UTP a través de un ciclo del sustrato (también llamado un ciclo fútil; sección J4). No obstante, ambas vías están controladas de manera muy cercana y ese control evita la hidrólisis innecesaria del UTP. Este control se lleva a cabo mediante regulación alostérica y modificación covalente de la sintasa de glucógeno y de la fosforilasa de glucógeno. Además, la modificación covalente se halla bajo control hormonal estrecho.



**Figura J7-1.** La operación simultánea de síntesis y degradación del glucógeno podría resultar en la hidrólisis neta de UTP.

## Control alostérico y modificación covalente

La fosforilasa existe en dos formas intercambiables; la **fosforilasa activa a** y la **fosforilasa b**, que *por lo regular* está inactiva. La fosforilasa b es un dímero y es convertida en fosforilasa a por fosforilación de un residuo de serina de cada subunidad a través de la enzima **fosforilasa cinasa**. El proceso puede revertirse y la fosforilasa inactivarse por la remoción del grupo fosfato que realiza la **fosfatasa de proteína I** (figura J7-2a).

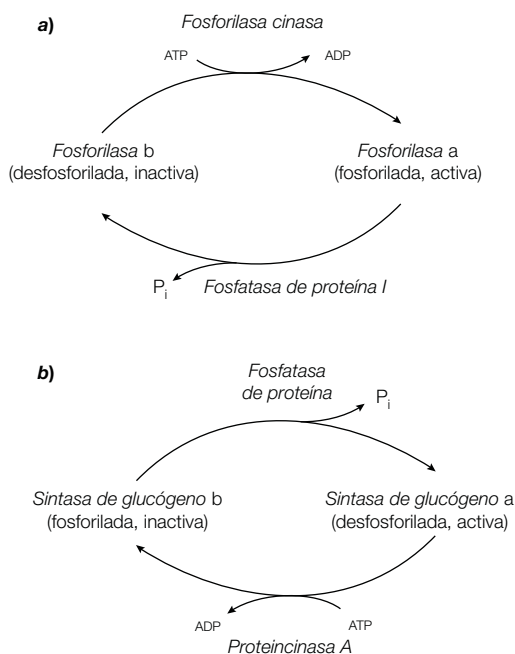
En el músculo esquelético, las altas concentraciones de AMP pueden activar a la fosforilasa b (al actuar en un **sitio alostérico**), a lo que se oponen las altas concentraciones de ATP y glucosa 6-fosfato que se encuentran en el músculo en reposo, de manera que en esta condición la fosforilasa b se halla por consiguiente inactiva. Como la forma predominante de la fosforilasa en el músculo en reposo corresponde a la fosforilasa b, no se produce una degradación significativa del glucógeno en estas condiciones. Pese a ello, durante el ejercicio, las concentraciones de ATP y glucosa 6-fosfato caen y la concentración de AMP aumenta. Por consiguiente, la fosforilasa b es activada y esto conduce a la rápida degradación del glucógeno para producir tanta energía como se necesite. El ATP, AMP o la glucosa 6-fosfato no ejercen ningún efecto sobre la fosforilasa a y de esa manera permanece activa bajo cualquier condición.

En el hígado, el AMP no activa a la fosforilasa b y por lo tanto permanece inactiva. A diferencia del músculo, por lo tanto, la degradación del glucógeno en el hígado no es sensible al estado energético de la célula. En su lugar, la fosforilasa a es desactivada por la glucosa. Esto

se corresponde con los diferentes papeles del almacenamiento de glucógeno en el hígado, en primer lugar con el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre. Por consiguiente, a medida que los niveles de glucosa se elevan, la degradación del glucógeno por la fosforilasa a hepática es desactivada y sólo se repone cuando los niveles de glucosa vuelven a descender.

La sintasa de glucógeno también se regula por modificación covalente e interacciones alostéricas. La enzima existe bajo una forma de sintasa de glucógeno activa a y una forma de sintasa de glucógeno *habitualmente* inactiva b. Empero, a diferencia de la fosforilasa, la forma activa de la sintasa de glucógeno (sintasa a) es la desfosforilada, en tanto que la forma inactiva (sintasa b) es la que contiene fósforo (figura J7-2b).

Una alta concentración de glucosa 6-fosfato puede activar a la sintasa de glucógeno b. Durante la contracción muscular, los niveles de glucosa 6-fosfato son bajos y por lo tanto la sintasa de glucógeno b está inhibida. Éste es el momento en que la fosforilasa b se encuentra más activa (véase antes). Por lo tanto, cuando se produce la degradación del glucógeno, se inhibe su síntesis, lo que evita la entrada en acción de un ciclo fútil. Cuando el músculo recupera el estado de reposo y el ATP y los niveles de glucosa 6-fosfato aumentan, la fosforilasa b es inhibida (véase antes), lo que detiene la degradación del glucógeno, mientras que la sintasa de glucógeno es activada para restituir las reservas de glucógeno. La forma



**Figura J7-2.** Regulación de a) la actividad de la fosforilasa de glucógeno, y b) actividad de la sintasa de glucógeno por fosforilación (modificación covalente).

$\alpha$  de la sintasa es activa de manera independiente de la concentración de glucosa 6-fosfato.

### Control hormonal por la adrenalina y el glucagon

El metabolismo del glucógeno es controlado por hormonas en forma estrecha. Cuando los niveles de glucosa en sangre descienden, el glucagon es secretado por las células  $\alpha$  del páncreas y actúa sobre el hígado para estimular la degradación del glucógeno en glucosa, la cual en ese momento se libera hacia la corriente sanguínea para elevar los niveles de glucosa en sangre otra vez. La contracción muscular o la estimulación nerviosa (la respuesta de “lucha o huida”) determina la liberación de adrenalina desde la médula suprarrenal y ésta actúa sobre el músculo para incrementar la pronta degradación del glucógeno y así tener glucosa disponible para satisfacer las necesidades energéticas de las células.

Se considera en primer lugar la activación de la degradación del glucógeno por la adrenalina en el hígado. La hormona se une a un receptor, llamado **receptor adrenérgico  $\beta$** , en la membrana plasmática de la célula objetivo (figura J7-3). La unión de la hormona al receptor determina un cambio conformacional de la proteína,

el cual a su vez activa una enzima llamada **ciclase de adenilato**. El receptor no activa a la ciclase de adenilato de manera directa sino que lo hace mediante la activación de una **proteína G** como un intermediario del proceso de señalización (véase la sección E5 para mayores detalles). La ciclase de adenilato activada convierte al ATP en 3',5'-AMP cíclico (cAMP). El cAMP se une a la **proteincinasa A (PKA)**, también conocida como **proteincinasa dependiente de cAMP**. Esta enzima consiste en dos subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C) que producen un complejo  $R_2C_2$ , que de manera habitual es inactivo (figura J7-3). La unión de dos moléculas de cAMP a cada una de las subunidades reguladoras conduce a la disociación del complejo en un complejo  $R_2$  y dos subunidades C libres que ahora son activas desde el punto de vista catalítico. La proteincinasa A activa fosforila a la fosforilasa cinasa, la cual puede existir en una forma desfosforilada inactiva y en una forma fosforilada activa. Por lo tanto, la fosforilasa cinasa pasa a estar activada y a su vez fosforila a la fosforilasa *b*, lo que la convierte en la fosforilasa activa *a*, que a su vez desarrolla la degradación rápida del glucógeno.

Este conjunto de reacciones se denomina **cascada** y está organizado para amplificar la señal original de un

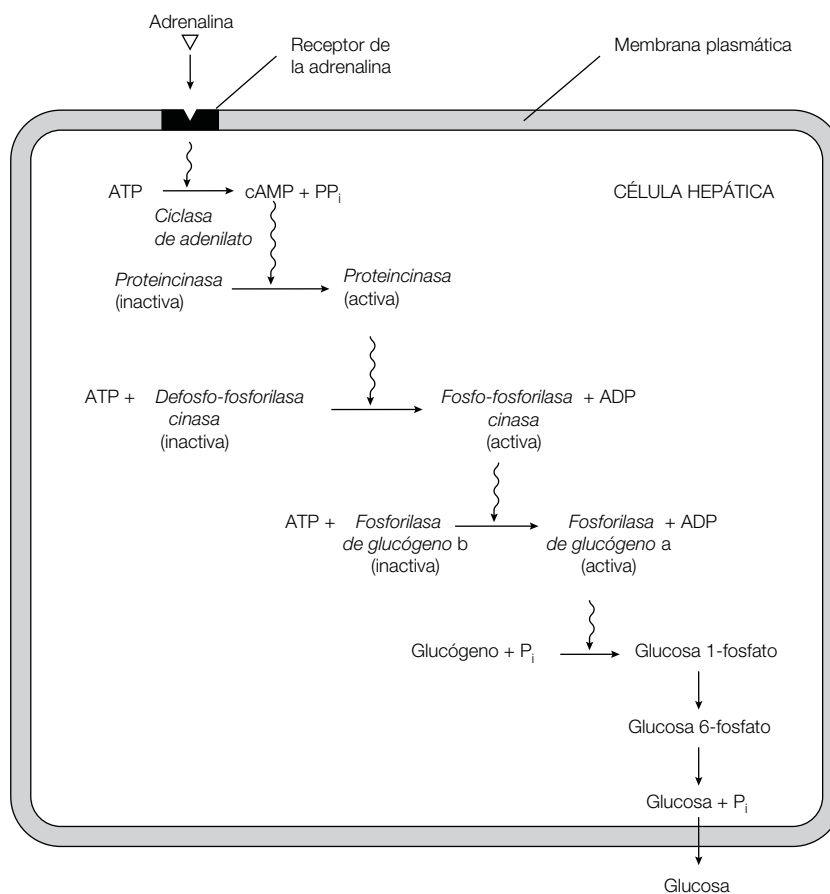


Figura J7-3. Mecanismos de acción de la adrenalina.

pequeño número de moléculas de hormona. Por ejemplo, cada molécula de hormona unida causa la producción de muchas moléculas de cAMP dentro de las células; la proteincinasa A activada a su vez activa muchas moléculas de fosforilasa cinasa, y cada fosforilasa cinasa activada a su vez activa muchas moléculas de fosforilasa. Por consiguiente, una pequeña señal hormonal puede causar un cambio importante del metabolismo celular.

Para evitar la existencia de un ciclo improductivo (fútil), la síntesis de glucógeno es detenida durante la estimulación de la degradación del glucógeno por parte de la adrenalina y el glucagon. Esto se alcanza mediante la proteincinasa A activada que, así como fosforila a la fosforilasa cinasa, también fosforila a la sintasa de glucógeno *a*, lo que la convierte en la forma inactiva de sintasa *b* (figura J7-4). Por lo tanto, la proteincinasa A activa la degradación del glucógeno e inhibe la síntesis del mismo.

Cuando los niveles de adrenalina y glucagon caen otra vez en la corriente sanguínea, la hormona se disocia del receptor, no se produce más cAMP y la fosfodiesterasa de cAMP convierte el cAMP existente en 5'-AMP (es decir, AMP "normal" y no la forma cíclica), una enzima que permanece activa en las células. Esta declinación en los niveles de cAMP detiene la cascada de la activación. Las enzimas que han sido fosforiladas son ahora desfosforiladas por la fosfatasa de proteína I, lo que restaura la situación a su condición original.

### Control hormonal por la insulina

Las células  $\beta$  del páncreas liberan insulina en la corriente sanguínea, cuando los niveles de glucosa en sangre

están altos después de comer, y estimula la síntesis de glucógeno para almacenar el exceso de glucosa como glucógeno. Este control también se alcanza a través de sucesos de fosforilación. La insulina se une a su receptor en la membrana plasmática y la activa. Este receptor tiene actividad de cinasa de tirosina (es decir, fosforila los residuos de tirosina seleccionados en las proteínas objetivo; sección E5). Su activación conduce a la activación de una proteincinasa que responde a la insulina y que entonces fosforila a la fosfatasa de proteína I y al hacerlo la activa. Esta enzima asegura que la sintasa de glucógeno sea desfosforilada (y por lo tanto sea activada) y que la fosforilasa cinasa sea también desfosforilada (por lo tanto, inactivada). El efecto neto consiste en estimular la síntesis de glucógeno.

### Control del metabolismo del glucógeno dependiente del calcio

Como ya se explicó, durante el control hormonal de la adrenalina o el glucagon, la fosforilasa cinasa desfosforilada se activa a medida que es fosforilada por la proteincinasa. Ésta entonces activa a la fosforilasa y estimula la degradación del glucógeno. Sin embargo, hay también otra forma de activar a la fosforilasa cinasa desfosforilada, cuando menos en forma parcial, y ésta es mediante altas concentraciones de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Éste representa un mecanismo importante en la contracción muscular, la cual se desencadena cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  es liberado de los almacenes internos del retículo sarcoplásmico (sección B5). Por lo tanto, del mismo modo que el control alostérico y el control hormonal durante la contracción muscular, los cuales estimulan la degradación del glucógeno, hay también un control dependiente del calcio.

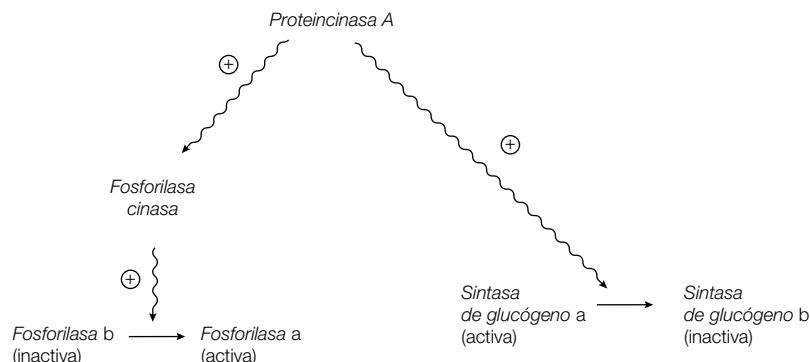


Figura J7-4. Control dual de la degradación y síntesis del glucógeno por parte de la proteína cinasa A.

# K1 Estructura y función de los ácidos grasos

## Notas clave

|                                 |   |  |
|---------------------------------|---|--|
| <b>Estructura y propiedades</b> | Los ácidos grasos consisten en una larga cadena hidrocarbonada con un ácido carboxílico terminal. La mayoría de los ácidos grasos tiene un número par de átomos de carbono en una cadena sin ramificaciones. Los ácidos grasos saturados no tienen dobles enlaces entre los átomos de carbono, mientras que los ácidos grasos monosaturados y poliinsaturados tienen uno o más enlaces dobles. Las propiedades de un ácido graso dependen de la longitud de la cadena y del número de enlaces dobles. |  |
| <b>Nomenclatura</b>             | Los ácidos grasos se nombran de acuerdo con el número de átomos de carbono de la cadena y del número y posición de cualquier doble enlace. Alguno de los ácidos grasos más comunes son palmitato (C16:0), estearato (C18:0), oleato (C18:1), linoleato (C18:2), linolenato (C18:3) y araquidonato (C20:4). En un ácido graso, los enlaces dobles suelen estar en la configuración <i>cis</i> .  |  |
| <b>Funciones</b>                | Los ácidos grasos tienen cuatro funciones biológicas principales: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Actúan como almacenes de energía (triacilglicérolos) y moléculas combustibles</li> <li>2. Son componentes de las membranas (glicérofósfolípidos y esfingolípidos)</li> <li>3. Diversas proteínas están modificadas de manera covalente por los ácidos grasos</li> <li>4. Los derivados de los ácidos grasos sirven como hormonas y como segundos mensajeros intracelulares</li> </ol>     |  |
| <b>Prostaglandinas</b>          | Las prostaglandinas y otros eicosanoides (prostaciclina, tromboxano y leucotrienos) derivan del araquidonato. Todos estos compuestos actúan como hormonas locales. La aspirina reduce la inflamación al inhibir a la sintasa de prostaglandina H2, la enzima que cataliza el primer paso en la síntesis de las prostaglandinas.   |  |
| <b>Temas relacionados</b>       | (E1) Lípidos de la membrana<br>(E2) Estructura de la membrana<br>(E5) Transducción de señales   | (K2) Descomposición de ácidos grasos<br>(K3) Síntesis de ácidos grasos<br>(K4) Triacilglicérolos |

## Estructura y propiedades

Un ácido graso consiste en una **cadena hidrocarbonada** y un **grupo de ácido carboxílico terminal** (figura K1-1). La mayoría de los ácidos grasos que se encuentran en biología tiene un **número par de átomos de carbono** ordenados en una **cadena sin ramificaciones**. La longitud de la cadena suele situarse entre 14 a 24 átomos de carbono y los ácidos grasos más comunes contienen 16 o 18 átomos de carbono. Un ácido graso saturado tiene todos los átomos de carbono de su cadena saturados

con átomos de hidrógeno (figura K1-1a). De allí se deriva la fórmula general  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ , donde  $n$  es un número par. Los **ácidos grasos monoinsaturados** tienen un doble enlace en su estructura (figuras K1-1b y K1-1c), mientras que los **ácidos grasos poliinsaturados** tienen dos o más dobles enlaces (figura K1-1d). En los ácidos grasos poliinsaturados, los dobles enlaces están separados por al menos un grupo metileno.

Las propiedades de los ácidos grasos dependen de la **longitud de su cadena** y del **número de dobles enlaces**.



Los ácidos grasos con longitud de cadena más corta tienen temperaturas de fusión más bajas que aquellos con cadenas más largas. Los ácidos grasos insaturados tienen temperaturas de fusión más bajas que los ácidos grasos saturados con la misma longitud de cadena, mientras que los correspondientes ácidos grasos poliinsaturados tienen temperaturas de fusión incluso más bajas (sección E1).

## Nomenclatura

Los ácidos grasos se nombran de acuerdo con el número total de átomos de carbono y con el número y posición de cualquier doble enlace. Los nombres sistemáticos de los ácidos grasos se estructuran al añadir “ácido -oico” al nombre del hidrocarburo parental. Sin embargo, a medida que los ácidos grasos se ionizan al pH fisiológico suelen escribirse como  $\text{RCOO}^-$  y tienen nombres que terminan en “-ato” en lugar de “ácido -oico”. Por consiguiente, un ácido graso saturado de C18 debería llamarse octadecanoato. No obstante, muchos nombres no sistemáticos todavía siguen en uso (cuadro K1-1).

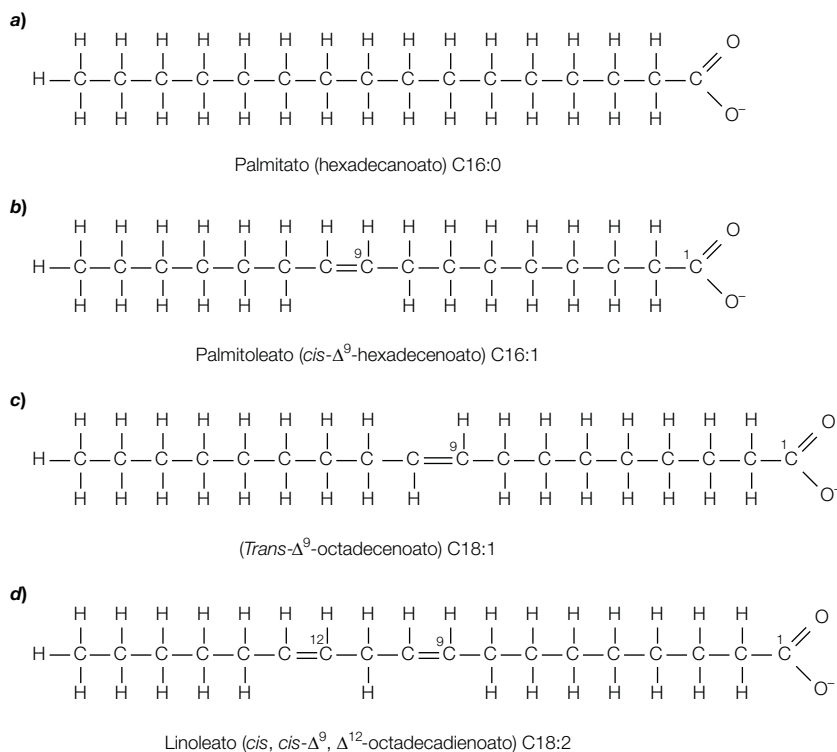
También hay notaciones más resumidas que muestran el número de átomos de carbono y el número de cualquier doble enlace en la estructura. Un ácido graso con 18 carbonos y ningún doble enlace se designa 18:0, mientras que uno con 18 carbonos y dos dobles enlaces

es 18:2. Los átomos de carbono de los ácidos grasos se enumeran desde el residuo del ácido carboxílico y de esta manera la posición de los dobles enlaces puede describirse mediante el número del primer carbono participante en el enlace (p. ej.,  $\Delta^9$  muestra un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 de la cadena del ácido graso; figura K1-1b). La configuración de los dobles enlaces en la mayoría de los ácidos grasos insaturados es *cis*, así llamada debido a que los dos hidrógenos en los átomos de carbono a cualquier lado del doble enlace están en el mismo lado de la molécula (figura K1-1b) (en latín, *cis* significa “en el mismo lado de”). En consecuencia, el nombre sistemático completo del linoleato (cuadro K1-1) es *cis, cis*- $\Delta^9, \Delta^{12}$ -octadecadienoato (figura K1-1d). Durante la degradación de los ácidos grasos (sección K2) se forman algunos isómeros *trans* (figura K1-1c), donde los hidrógenos en los átomos de carbono a cualquier lado del doble enlace están en lados opuestos de la molécula (en latín, *trans* significa atravesado).

## Funciones

Los ácidos grasos tienen cuatro funciones biológicas principales:

1. Los ácidos grasos actúan como **moléculas combustibles**, se almacenan como **triacilgliceroles** y se degradan para generar energía (secciones K2 y K4)



**Figura K1-1.** Estructuras de a) un ácido graso saturado (palmitato, C16:0); b) un ácido graso monoinsaturado con un doble enlace en configuración *cis* (palmitoleato, C16:1); c) un ácido graso monoinsaturado con el doble enlace en configuración *trans* (C18:1), y d) un ácido graso poliinsaturado (linoleato, C18:2).

**Cuadro K1-1. Nombres y fórmulas de algunos ácidos grasos comunes.**

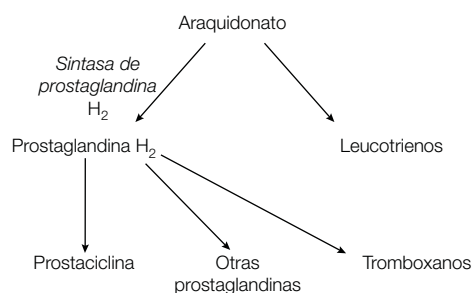
| Ácido graso  | Fórmula  | Núm. de dobles enlaces | Núm. de átomos de carbono |
|--------------|--|------------------------|---------------------------|
| Palmitato    | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}^-$  | Ninguno                | 16                        |
| Estearato    | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}^-$  | Ninguno                | 18                        |
| Oleato       | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$         | 1                      | 18                        |
| Linoleato    | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COO}^-$ | 2                      | 18                        |
| Linolenato   | $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COO}^-$     | 3                      | 18                        |
| Araquidonato | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COO}^-$ | 4                      | 20                        |

- Se usan para elaborar **glicerofosfolípidos** y **esfingolípidos**, que son componentes esenciales de las membranas biológicas (sección E1)
- Los ácidos grasos **modifican de manera covalente** a numerosas proteínas (sección E2). El miristato (C14:0) y el palmitato (C16:0) están fijos en forma directa a algunas proteínas, mientras que el fosfatidilinositol se enlaza en forma covalente al C terminal de otras proteínas a través de una compleja estructura glucosilada
- Los derivados de los ácidos grasos sirven como **hormonas** (como las prostaglandinas) y como **segundos mensajeros intracelulares** (como el DAG y el  $\text{IP}_3$ ) (sección E5)

## Prostaglandinas

Las **prostaglandinas** y las moléculas estructuralmente relacionadas **prostaciclina**, **tromboxanos** y **leucotrie-**

**nos** se llaman **eicosanoides** porque contienen 20 átomos de carbono (en griego, *eico* significa 20). Estas hormonas tienen vidas relativamente cortas y por lo tanto actúan cerca de sus sitios de síntesis en el cuerpo. Derivan del precursor común **araquidonato** (figura K1-2). Este ácido graso poliinsaturado es un derivado del linoleato (cuadro K1-1). Las prostaglandinas estimulan la inflamación, modulan la transmisión sináptica entre las células nerviosas e inducen el sueño. Aunque la **aspirina** (ácido acetilsalicílico) se ha usado durante siglos para reducir la inflamación, el dolor y la fiebre, no fue sino hasta 1974 que John Vane descubrió cómo actúa. La aspirina inhibe la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición irreversible de la **sintasa de prostaglandina H<sub>2</sub>**. Esta enzima cataliza el primer paso de la síntesis de las prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos (figura K1-2). Otros **fármacos antiinflamatorios no esteroideos** (NSAID), como el **ibuprofeno**, también inhiben a la sintasa de prostaglandina H<sub>2</sub>.



**Figura K1-2.** Interrelación biosintética de los eicosanoides.

# K2 Descomposición de los ácidos grasos

## Notas clave

|   |   |
|---|---|
| <b>Descripción</b>                                | La descomposición de ácidos grasos (también llamada oxidación $\beta$ ) consiste en la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga con producción de energía en la forma de ATP. Los ácidos grasos se convierten en sus derivados acil-CoA y luego se metabolizan por la remoción de las unidades de acetil-CoA de dos carbonos del extremo de la cadena acilo.  |
| <b>Activación</b>                                 | La degradación de los ácidos grasos se produce en el citosol de los procariotas y en la matriz mitocondrial de los eucariotas. El ácido graso se activa mediante la formación de un enlace tioéster con la coenzima A (CoA) antes de ingresar en las mitocondrias.  |
| <b>Transporte en las mitocondrias</b>             | La membrana mitocondrial interna es impermeable a los derivados acil-CoA de cadena larga y de esta manera éstos deben transportarse hacia el interior de las mitocondrias como derivados de la carnitina por la translocasa de carnitina/acilcarnitina.   |
| <b>Vía de la oxidación <math>\beta</math></b>     | <p>La degradación de los ácidos grasos incluye la repetición de una secuencia de cuatro reacciones:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. La oxidación del acil-CoA por el FAD para formar un <i>trans</i>-<math>\Delta^2</math>-enoil-CoA.</li> <li>2. La hidratación para formar 3-hidroxiacil-CoA.</li> <li>3. La oxidación por NAD<sup>+</sup> para formar 3-cetoacil-CoA.</li> <li>4. La tiólisis por una segunda molécula de CoA para formar acetil-CoA y un acil-CoA acortado en dos átomos de carbono.</li> </ol> <p>El FADH<sub>2</sub> y el NADH producidos alimentan directamente la fosforilación oxidativa, mientras que la acetil-CoA alimenta el ciclo del ácido cítrico, donde se producen FADH<sub>2</sub> y NADH adicionales.</p> |
| <b>Oxidación de ácidos grasos insaturados</b>     | Los ácidos grasos insaturados requieren la acción de enzimas adicionales con el fin de ser completamente degradados por la oxidación $\beta$ .  |
| <b>Oxidación de ácidos grasos de cadena impar</b> | Los ácidos grasos que tienen un número impar de átomos de carbono dan origen a la acetil-CoA y a la propionil-CoA (tres átomos de carbono) en la ronda final de la degradación de los ácidos grasos.  |
| <b>Regulación</b>                                 | La tasa de degradación de los ácidos grasos es controlada por la disponibilidad de ácidos grasos libres en la sangre, la cual se origina por la descomposición de los triacilglicerolos.  |
| <b>Combustible energético</b>                     | La degradación completa del palmitato (C16:0) en la oxidación $\beta$ genera 28 moléculas de ATP provenientes de la oxidación del NADH y el FADH <sub>2</sub> producidos directamente y 80 ATP provenientes de la degradación de las moléculas de acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico. Sin embargo, se requieren dos equivalentes de ATP para activar el palmitato a sus derivados acil-CoA antes de su oxidación. Por lo tanto, la producción neta es de 106 ATP.   |
| <b>Cuerpos cetónicos</b>                          | Cuando es excesiva, la acetil-CoA producida por la oxidación $\beta$ de los ácidos grasos se convierte en acetoacetato y en D-3-hidroxiacetil-CoA. Junto con la acetona, estos compuestos se denominan de manera colectiva cuerpos cetónicos.   |

**Temas relacionados**

(K1) Estructura y función de los ácidos grasos  
(K3) Síntesis de ácidos grasos  
(K4) Triacilglicérol

(K5) Colesterol  
(L1) Ciclo del ácido cítrico  
(L2) Transporte de electrones y fosforilación oxidativa

**Descripción**

La **descomposición de ácidos grasos** gira alrededor de la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga. Los ácidos grasos se convierten primero en sus **derivados acil-CoA (CoA)** y luego se degradan por la remoción sucesiva de unidades de dos carbonos del extremo del ácido graso como **acetil-CoA**. La vía produce  $\text{FADH}_2$  y  $\text{NADH}$  en forma directa. La acetil-CoA producida también puede ingresar en el ciclo del ácido cítrico y producir  $\text{FADH}_2$  y  $\text{NADH}$  adicionales (sección L1). El  $\text{FADH}_2$  y el  $\text{NADH}$  se oxidan entonces en la cadena respiratoria de transporte de electrones para producir energía en la forma de ATP (sección L2).

**Activación**

La degradación de los ácidos grasos tiene lugar en el citosol de los procariontes, en los peroxisomas de las plantas y en la matriz mitocondrial de todos los otros eucariotes. Antes de ingresar en la **matriz mitocondrial**, los ácidos grasos son **activados** para formar un **enlace tioéster** con la **CoA** (figura K2-1). La **sintetasa de acil-CoA** (también llamada **tiocinasa de ácidos grasos**) se encarga de catalizar esta reacción, que sucede en la membrana mitocondrial externa, donde radica la enzima, y usa una molécula de ATP. La reacción total es irreversible debido a la hidrólisis subsecuente del  $\text{PP}_i$  en dos moléculas de  $\text{P}_i$ .

**Transporte en la mitocondria**

Las moléculas de acil-CoA de cadena pequeña y media (hasta de 10 átomos de carbono) pueden cruzar con facilidad la **membrana mitocondrial interna** por difusión. Pese a eso, las acil-CoA de cadena más larga no cruzan con tanta facilidad la membrana mitocondrial interna y requieren un mecanismo de transporte específico. Para lograrlo, las acil-CoA de cadena larga se conjugan a la molécula polar de **carnitina**, la cual se encuentra en plantas y animales. Esta reacción, catalizada por una

enzima en la cara externa de la membrana mitocondrial interna (**aciltransferasa de carnitina I**), remueve el grupo CoA y lo sustituye por una molécula de carnitina (figura K2-2). A continuación, la acilcarnitina es transportada a través de la membrana mitocondrial interna por una **translocasa de carnitina/acilcarnitina**. Esta proteína integral de transporte de la membrana (sección E3) transporta moléculas de acilcarnitina hacia la matriz mitocondrial y moléculas de carnitina libre hacia fuera. Una vez dentro de la matriz mitocondrial, el grupo acilo es transferido de regreso hacia la CoA, lo que libera a la carnitina, por acción de la enzima **aciltransferasa de carnitina II**, que se localiza en el lado matricial de la membrana mitocondrial interna (figura K2-2).

**Vía de la oxidación  $\beta$** 

Las reacciones individuales que intervienen en la degradación de los ácidos grasos por oxidación  $\beta$  son las siguientes (figura K2-3):

1. La **oxidación** de la acil-CoA a enoil-CoA forma un enlace doble *trans*- $\Delta^2$  en la cadena acilo con producción de  $\text{FADH}_2$  (catalizada por la **deshidrogenasa de acil-CoA**).
2. La **hidratación** de la *trans*- $\Delta^2$ -enoil-CoA para formar 3-hidroxiacil-CoA (catalizada por la **hidratasa de enoil-CoA**).
3. La **oxidación** de la 3-hidroxiacil-CoA a 3-cetoacil-CoA con producción de  $\text{NADH}$  (catalizada por la **deshidrogenasa de hidroxiacil-CoA**).
4. La separación, o **tiólisis**, de la 3-cetoacil-CoA por una segunda molécula de CoA, lo que produce acetil-CoA y una acil-CoA acortada en dos átomos de carbono (catalizada por la **cetotiolasa  $\beta$** ).

Por lo tanto, la descomposición de ácidos grasos individuales sucede como una secuencia repetida de cuatro reacciones: **oxidación** (por FAD), **hidratación**, **oxidación**

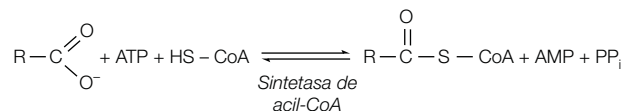
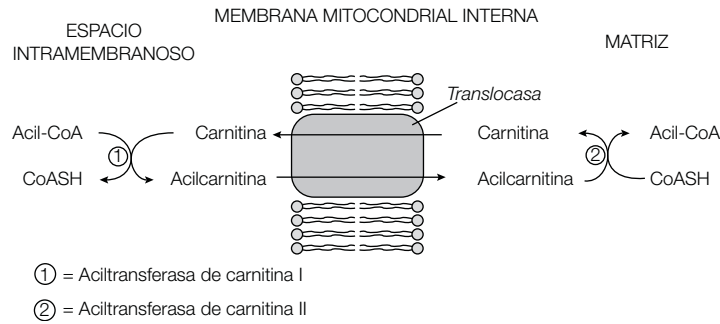


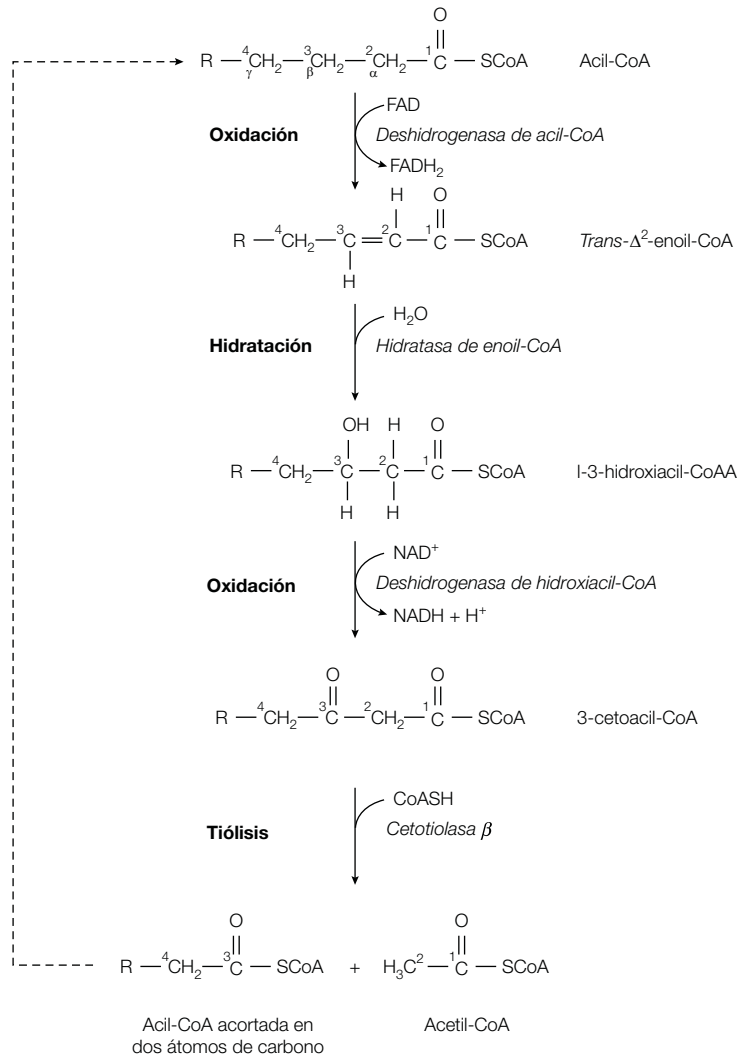
Figura K2-1. Activación de un ácido graso.



**Figura K2-2.** Transporte de ácidos grasos a través de la membrana mitocondrial interna.

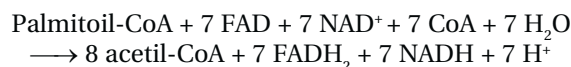
(por NAD<sup>+</sup>) y **tiólisis**. Estas cuatro reacciones integran una “ronda” de degradación de los ácidos grasos (figura K2-3) y su efecto total es remover unidades de dos carbonos en forma secuencial bajo la forma de acetil-CoA de la

cadena del ácido graso. La separación del enlace Δ<sup>2</sup> (o β) de la cadena acilo (véase la nomenclatura en la figura K2-3, estructura de arriba) da a la descomposición de los ácidos grasos su nombre alternativo, **oxidación β**. La



**Figura K2-3.** Resumen de las reacciones participantes en la degradación de ácidos grasos.

acil-CoA acortada sufre después ciclos adicionales de oxidación  $\beta$  hasta el último ciclo, cuando la acil-CoA de cuatro átomos de carbono es dividida en dos moléculas de acetyl-CoA. En consecuencia, una acil-CoA de 16 carbonos saturados, como el palmitoil-CoA, debería ser completamente degradada en ocho moléculas de acetyl-CoA a través de siete rondas de degradación, lo que lleva a la ecuación final:



Las mitocondrias contienen tres **deshidrogenasas de acil-CoA**, las cuales actúan sobre las acil-CoA de cadena corta, media y larga, respectivamente. En contraste, hay sólo una de cada una de las enzimas hidratasa de enoil-CoA, deshidrogenasa de hidroxiacil-CoA y cetotilasa  $\beta$ , las cuales tienen una especificidad amplia con respecto a la longitud de la cadena acilo.

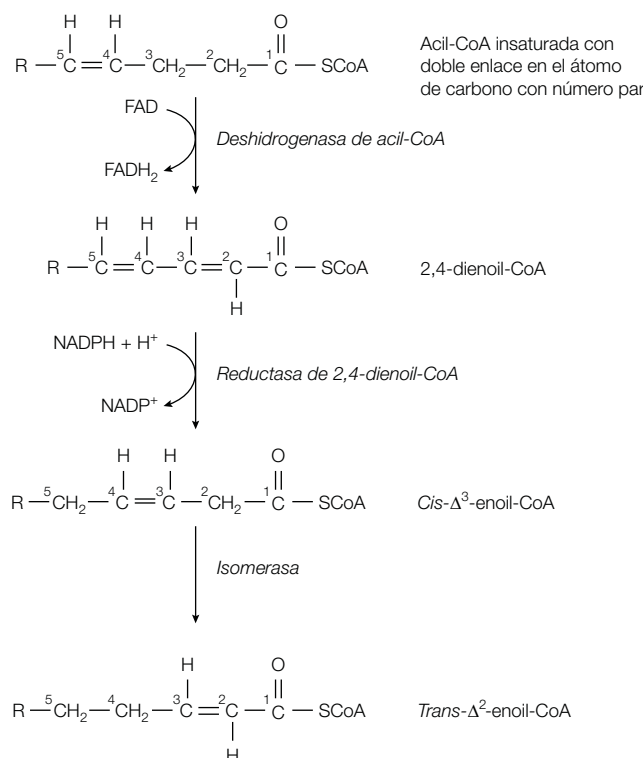
En animales, la acetyl-CoA producida por la degradación de los ácidos grasos no puede convertirse en piruvato u oxalacetato. Aunque los dos átomos de carbono de la acetyl-CoA ingresan en el ciclo del ácido cítrico, ambos resultan oxidados a  $\text{CO}_2$  en las reacciones que catalizan la deshidrogenasa de isocitrato y la deshidrogenasa de cetoglutarato  $\alpha$  (sección L1). Por consiguiente, **los animales no pueden convertir ácidos grasos en glucosa**. En contraste, las plantas tienen dos enzimas adicionales, la liasa de isocitrato y la sintasa de malato, que les

permite convertir los átomos de carbono de la acetyl-CoA en oxalacetato. Esto se logra a través de la **vía del glioxilato**, una ruta que incluye enzimas de la mitocondria y del glioxisoma, un organelo membranoso especializado de las plantas.

## Oxidación de los ácidos grasos insaturados

Los **ácidos grasos insaturados** requieren un procesamiento adicional antes de que puedan ser degradados por completo a través de la oxidación  $\beta$ . Las acil-CoA insaturadas con dobles enlaces en átomos de carbono impares (por ejemplo, entre el C-9 y el C-10, como en el palmitoleato; sección K1, figura K1-1b) participan en el mecanismo de degradación de la vía normal, hasta que la deshidrogenasa de acil-CoA encuentra la *cis*- $\Delta^3$ -enoil-CoA formada al final de la tercera ronda. La presencia del doble enlace entre C-3 y C-4 evita la formación de otro doble enlace entre C-2 y C-3. Para superar este problema, una **isomerasa** convierte el enlace *cis*- $\Delta^3$  en un doble enlace *trans*- $\Delta^2$  y la resultante *trans*- $\Delta^2$ -enoil-CoA puede continuar adelante en la vía de la oxidación  $\beta$  (figura K2-4).

Además de la isomerasa se requiere otra enzima para la oxidación de los **ácidos grasos poliinsaturados**, los cuales tienen un doble enlace en un átomo de carbono par. En este caso, el intermediario 2,4-dienoilo resultante de



**Figura K2-4.** Enzimas accesorias requeridas para el metabolismo de los ácidos grasos insaturados.

la acción de la deshidrogenasa de acil-CoA es atacado por la **reductasa de 2,4-dienoil-CoA** para formar *cis*- $\Delta^3$ -enoil-CoA (figura K2-4). La isomerasa convierte este producto en la forma *trans*, la cual continúa adelante en la vía. Estas reacciones son importantes ya que más de la mitad de los ácidos grasos de las plantas y los lípidos de los animales son insaturados (y con frecuencia poliinsaturados).

### Oxidación de ácidos grasos de cadena impar

Los ácidos grasos que tienen un número de átomos de carbono impar (los cuales son relativamente raros en la naturaleza) también son degradados en la vía de la oxidación  $\beta$  en la misma forma que los que tienen un número par de átomos de carbono. La única diferencia es que, en la ronda final, el intermediario acil-CoA de cinco carbonos es separado en una molécula de **propionil-CoA** de tres carbonos y en una molécula de acetil-CoA de dos carbonos. La propionil-CoA es convertida en succinil-Co, la cual ingresa en el ciclo del ácido cítrico (sección L1).

### Regulación

El punto principal de control de la oxidación  $\beta$  es la disponibilidad de ácidos grasos. La fuente principal de ácidos grasos libres en la sangre es la descomposición de los almacenes de **triacilglicerol** del tejido adiposo, lo cual es regulado por la acción de la lipasa de triacilglicerol sensible a la hormona (sección K4). La descomposición y la síntesis de ácidos grasos están controladas de manera coordinada para evitar un ciclo improductivo (sección K3).

### Producción de energía

Por cada ronda de degradación, se producen una molécula de  $\text{FADH}_2$ , una de  $\text{NADH}$  y una de acetil-CoA. Cada  $\text{NADH}$  genera dos moléculas y media de  $\text{ATP}$  y cada  $\text{FADH}_2$  genera una molécula y media de  $\text{ATP}$  durante la fosforilación oxidativa (sección L2). De manera adicional, cada acetil-CoA produce 10  $\text{ATP}$  en su oxidación en el ciclo del ácido cítrico (sección L1). La producción total por cada ronda de degradación del ácido graso es por lo tanto de 14 moléculas de  $\text{ATP}$ .

La degradación completa de la palmitoil-CoA (C16:0) requiere siete rondas de degradación y por lo tanto produce  $7 \times (2.5 + 1.5) = 28$  moléculas de  $\text{ATP}$ . Se produce un total de ocho moléculas de acetil-CoA y por lo tanto otros  $8 \times 10 = 80$   $\text{ATP}$ . Por consiguiente, los  $\text{ATP}$  totales producidos por cada molécula de palmitato degradada son  $28 + 80 = 108$   $\text{ATP}$ . No obstante, uno de los  $\text{ATP}$  es hidrolizado a  $\text{AMP}$  y  $\text{PP}_i$  durante la activación del palmitato a palmitoil-CoA, de donde resulta que se pierden dos enlaces de alta energía. En consecuencia, la producción neta es de **106**  $\text{ATP}$  (cuadro K2-1).

La producción de  $\text{ATP}$  se reduce un poco en los ácidos grasos insaturados por las reacciones metabólicas adicionales, las cuales les permiten ser degradados en la vía de la oxidación  $\beta$ , y que incluyen el uso de  $\text{NADH}$  o evitar una reacción productora de  $\text{FADH}_2$  (figura K2-4).

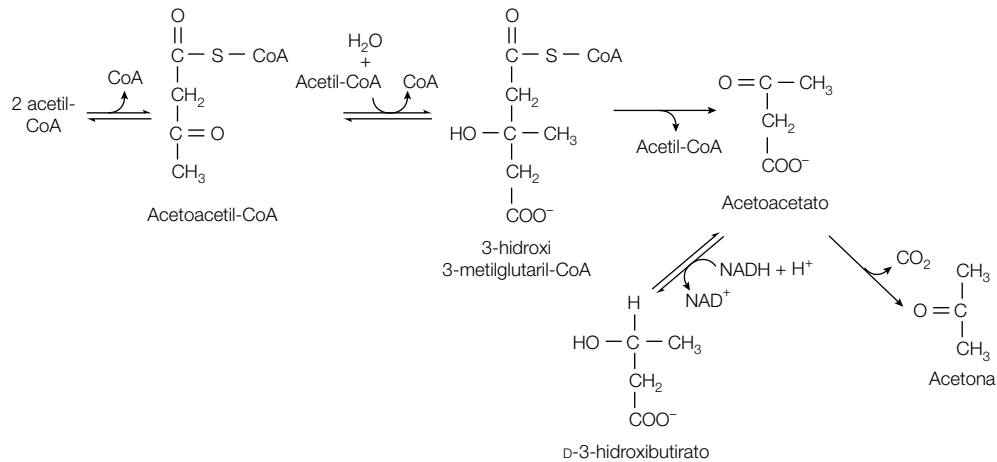
### Cuerpos cetónicos

Cuando el nivel de acetil-CoA proveniente de la oxidación  $\beta$  se incrementa en exceso y requiere que ingrese en el ciclo del ácido cítrico, la acetil-CoA se convierte en **acetoacetato** y en **D-3-hidroxiacetil-CoA** por un proceso conocido como **cetogénesis**. El D-3-hidroxiacetil-CoA, el acetoacetato y su producto de degradación no enzimática **acetona** se refieren de manera grupal como **cuerpos cetónicos** (figura K2-5).

De manera inicial, las moléculas de acetil-CoA se condensan para formar acetoacetil-CoA en una reacción, la cual es esencialmente la inversa de la tiólisis de la oxidación. La acetoacetil-CoA reacciona con otra molécula de acetil-CoA para formar **3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA)** (figura K2-5). Esta molécula es dividida para formar acetoacetato y acetil-CoA. (La HMG-CoA también es el punto de inicio para las biosíntesis de colesterol; sección K5.) Después, el acetoacetato es reducido a D-3-hidroxiacetil-CoA en la matriz mitocondrial o sufre una descarboxilación lenta y espontánea a acetona (figura K2-5). En la diabetes, el acetoacetato se produce con mayor rapidez que la que necesita para ser metabolizado. Por consiguiente, los diabéticos no tratados presentan niveles altos de cuerpos cetónicos en su sangre y el aroma de acetona puede detectarse con frecuencia en su respiración.

**Cuadro K2-1. Cálculo del ATP producido por la oxidación completa el palmitato**

| Paso degradativo  | ATP producido |
|---|---------------|
| $7 \times 4$ $\text{ATP}$ por la oxidación del $\text{NADH}$ y el $\text{FADH}_2$ producidos en cada ronda de degradación | 28            |
| $8 \times 10$ $\text{ATP}$ por la rotura de la acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico                                   | 80            |
| -2 equivalentes de $\text{ATP}$ por la activación del palmitato   | -2            |
| Total =   | 106           |



**Figura K2-5.** Conversión de la acetil-CoA en los cuerpos cetónicos acetoacetato, acetona y D-3-hidroxiacetato.

El hígado es el principal sitio de producción del acetoacetato y el D-3-hidroxiacetato y no son sólo productos de degradación de escaso valor fisiológico. Se usan de preferencia a la glucosa como una fuente de energía en ciertos tejidos como el músculo cardíaco y la corteza

renal. Aunque de manera habitual la glucosa es el principal combustible del cerebro, bajo condiciones de ayuno o diabetes, este órgano puede modificarse para usar acetoacetato de manera predominante.



# K3 Síntesis de ácidos grasos

## Notas clave

|                                    |  |  |
|------------------------------------|--|--|
| <b>Descripción</b>                 | La síntesis de ácidos grasos incluye la condensación de unidades de dos carbonos bajo la forma de acetil-CoA para formar largas cadenas hidrocarbonadas en una serie de reacciones. El complejo sintasa de ácidos grasos lleva a cabo estas reacciones, que requieren NADPH como reductor. Los ácidos grasos están unidos en forma covalente a la proteína transportadora de acilo (ACP) durante su síntesis.  |  |
| <b>Transporte en el citosol</b>    | Dado que la síntesis de ácidos grasos tiene lugar en el citosol, la acetil-CoA producida a partir de piruvato debe ser transportada fuera de las mitocondrias. Como la membrana mitocondrial interna es impermeable a la acetil-CoA, ésta se combina primero con oxalacetato para formar citrato, el cual cruza con facilidad la membrana. En el citosol, el citrato es dividido para regenerar la acetil-CoA.   |  |
| <b>La vía metabólica</b>           | El primer paso obligado en la biosíntesis de ácidos grasos es la carboxilación de la acetil-CoA para formar malonil-Co, la cual es catalizada por la carboxilasa de acetil-CoA, una enzima que contiene biotina. La acetil-CoA y la malonil-CoA se convierten en sus derivados ACP. El ciclo de elongación en la síntesis de ácidos grasos incluye cuatro reacciones: condensación de acetil-ACP y malonil-ACP para formar acetoacetil-ACP, que libera ACP libre y CO <sub>2</sub> , luego la reducción por la NADPH para formar D-3-hidroxiacetil-ACP, seguida por la deshidratación a crotonil-ACP y, como paso final, la reducción por la NADPH para formar butiril-ACP. Rondas sucesivas de elongación agregan más unidades de dos carbonos de la malonil-ACP a la cadena hidrocarbonada en crecimiento, hasta que se forma el palmitato de 16 carbonos. La elongación adicional de los ácidos grasos tiene lugar en la superficie citosólica del SER. |  |
| <b>Formación de dobles enlaces</b> | Las enzimas para la introducción de los dobles enlaces dentro de la cadena también están presentes en la superficie citosólica del SER. Los ácidos grasos poliinsaturados linoleato y linolenato no pueden ser sintetizados por los mamíferos y por lo tanto se denominan ácidos grasos esenciales ya que tienen que ser ingeridos en la dieta.  |  |
| <b>Regulación</b>                  | El punto de control clave de la síntesis de ácidos grasos es la carboxilasa de acetil-CoA. Esta enzima se inactiva por fosforilación a través de una proteincinasa activada con AMP. Por consiguiente, cuando la carga de energía de las células es baja (AMP alto, ATP bajo), la carboxilasa de acetil-CoA está inactiva. La enzima se reactiva por una desfosforilación que lleva a cabo la proteína fosfatasa 2A. El glucagon y la adrenalina inhiben la síntesis de ácidos grasos al inhibir a la proteína fosfatasa 2A, mientras que la insulina estimula la síntesis de ácidos grasos mediante la activación de la fosfatasa. La carboxilasa de acetil-CoA también es regulada por medios alostéricos: el citrato activa la enzima, en tanto que la palmitoil-CoA la inhibe.   |  |
| <b>Temas relacionados</b>          | (D5) Regulación de la actividad enzimática<br>(J5) Vía de la pentosa fosfato<br>(K1) Estructura y función de los ácidos grasos   | (K2) Descomposición de ácidos grasos<br>(K4) Triacilgliceroles<br>(L1) Ciclo del ácido cítrico |

## Descripción

Los ácidos grasos se sintetizan por la condensación de dos unidades de dos carbonos. Sin embargo, en términos de los pasos enzimáticos participantes, el proceso no es la inversa de la oxidación  $\beta$  (sección K2). La **síntesis de ácidos grasos** incluye una serie específica de reacciones para construir una larga cadena hidrocarbonada a partir de unidades de **acetil-CoA**. Las diferencias clave entre la síntesis de ácidos grasos y su degradación son:

- La síntesis de ácidos grasos tiene lugar en el **citósol** de procariontas y eucariotas, en tanto que su degradación sucede en las mitocondrias de los eucariotas.
- La síntesis de ácidos grasos utiliza **NADPH** como el reductor, mientras que la oxidación  $\beta$  produce **NADH**.
- Durante su síntesis, los ácidos grasos se enlazan en forma covalente a una **proteína transportadora de acilos (ACP)**, en contraposición a la CoA en su degradación.
- En los organismos superiores, las actividades enzimáticas propias de la síntesis de ácidos grasos están presentes en una cadena polipeptídica multifuncional (como un dímero) llamada **sintasa de ácidos grasos**, mientras que en la oxidación  $\beta$  cada actividad depende de enzimas diferentes.

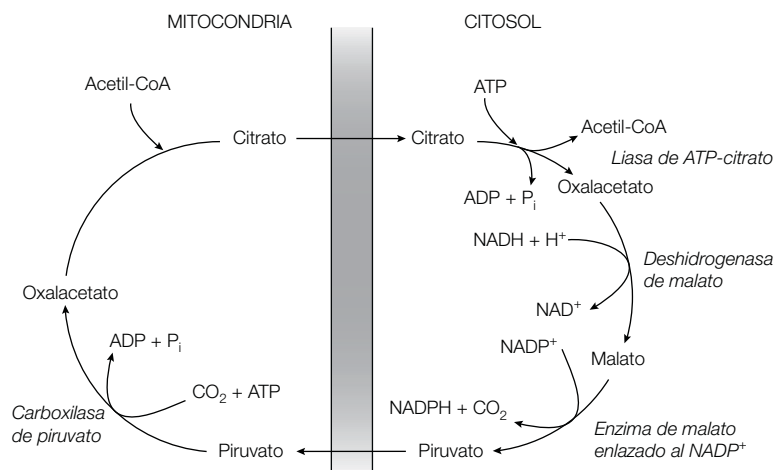
## Transporte en el citósol

Los ácidos grasos se sintetizan en el citósol, pero la acetil-CoA se produce a partir del piruvato en las mitocondrias (sección L1). Por consiguiente, la acetil-CoA debe transferirse de las mitocondrias al citósol para que tenga lugar la síntesis de ácidos grasos. No obstante, la **membrana mitocondrial interna** no es fácilmente permeable a esta molécula. Este problema se resuelve mediante la condensación de la acetil-CoA con oxalacetato para

formar **citrato** (figura K3-1). A continuación, éste se transporta hacia el citósol, donde la **liasa de ATP-citrato** lo divide para regenerar acetil-CoA y oxalacetato a través de un proceso que requiere energía. El oxalacetato, el cual tampoco puede cruzar la membrana mitocondrial interna, es devuelto a la matriz mitocondrial a través de su conversión, en primer lugar, en malato (catalizada por la **deshidrogenasa de malato**) y luego en piruvato (catalizada por la **enzima de malato unido a NADP<sup>+</sup>**) (figura K3-1). Esta última reacción de descarboxilación genera **NADPH**, el cual puede utilizarse en la síntesis de ácidos grasos. El **NADPH** restante que se requiere en la síntesis de los ácidos grasos es provisto por la vía de la pentosa fosfato (sección J5). Cuando regresa a la matriz de la mitocondria, la **carboxilasa de piruvato** carboxila el piruvato para formar oxalacetato con la hidrólisis de una molécula adicional de **ATP** (figura K3-1).

## La vía metabólica

El **primer paso forzoso** en la síntesis de los ácidos grasos es la carboxilación de la acetil-CoA para formar **malonil-CoA**, para lo cual se utiliza **CO<sub>2</sub>** en la forma de **HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** (figura K3-2). Esta reacción es catalizada por la enzima **carboxilasa de acetil-CoA**, la cual tiene **biotina** como el grupo prostético, una característica común en las enzimas que unen **CO<sub>2</sub>**. En la reacción, que es irreversible, se hidroliza una molécula de **ATP**. Todos los **pasos de elongación** de la síntesis de ácidos grasos incluyen intermediarios ligados al grupo sulfhidrilo terminal de la unidad reactiva **fosfopanteteína** de la ACP; la fosfopanteteína es también la unidad reactiva de la CoA. Por lo tanto, los siguientes pasos son la formación de acetil-ACP y malonil-ACP por las enzimas **acetiltransacilasa** y **maloniltransacilasa**, respectivamente (figura K3-2). (Para la síntesis de ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono, el punto de iniciación es la propionil-ACP de tres carbonos en lugar de la malonil-ACP.)



**Figura K3-1.** Transporte de la acetil-CoA desde la matriz mitocondrial al citósol.

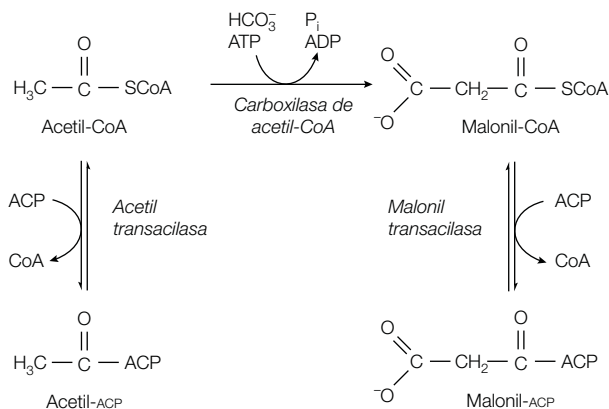


Figura K3-2. Formación de acetil-ACP y malonil-ACP.

El ciclo de elongación de la síntesis de ácidos grasos tiene cuatro etapas por cada ronda de síntesis (figura K3-3). Para la primera ronda de síntesis están:

1. **Condensación** de la acetil-ACP con la malonil-ACP para formar acetoacetil-ACP con liberación de ACP libre y CO<sub>2</sub> (catalizada por la enzima condensante de acil-malonil-ACP).

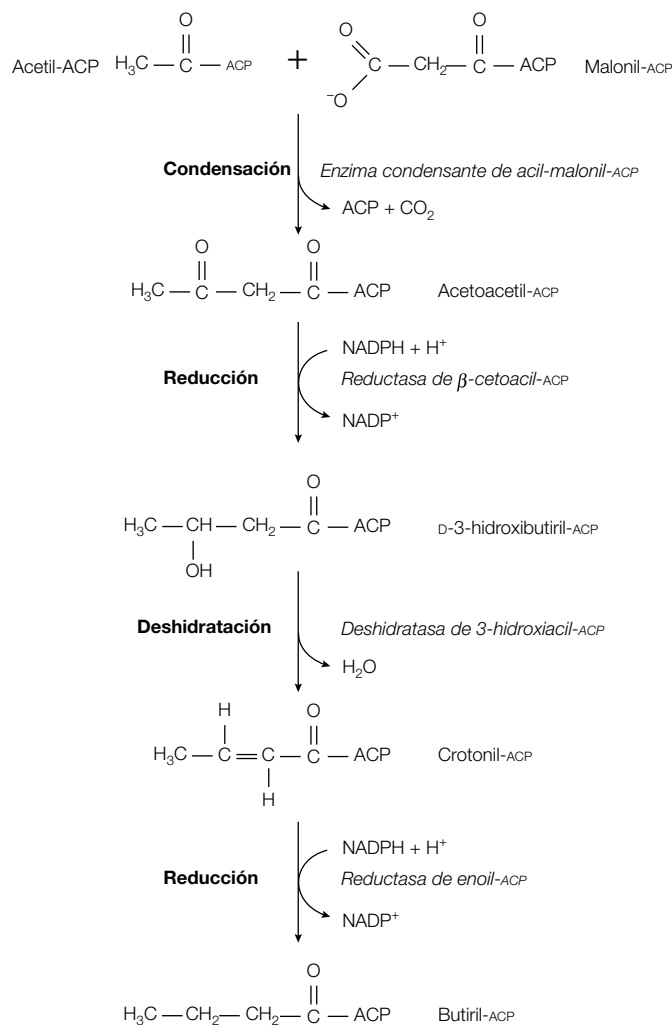
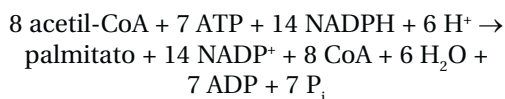


Figura K3-3. El ciclo de elongación de la síntesis de ácidos grasos.

2. La **reducción** de la acetoacetyl-ACP para formar D-3-hidroxiacetyl-ACP mediante NADPH como reductor (catalizada por la reductasa de  $\beta$ -cetoacetyl-ACP).
3. La **deshidratación** de D-3-hidroxiacetyl-ACP para producir crotonil-ACP (catalizada por la deshidratasa de 3-hidroxiacetyl-ACP).
4. La **reducción** de la crotonil-ACP por una segunda molécula de NADPH para dar butiril-ACP (catalizada por la reductasa de enoil-ACP).

La primera ronda de elongación produce la butiril-ACP de cuatro carbonos. El ciclo se repite a partir de la malonil-ACP, que aporta unidades de dos carbonos en cada ciclo para el alargamiento de la cadena de acil-ACP. Ésta continúa hasta que se forma la **palmitoil-ACP** de 16 carbonos. Esa molécula no es aceptada por la enzima condensante de acil-malonil-ACP, y por lo tanto no puede elongarse de manera adicional por este proceso. En su lugar, es hidrolizada por una tioesterasa para dar palmitato y ACP.

La estequiometría total para la síntesis del palmitato es:



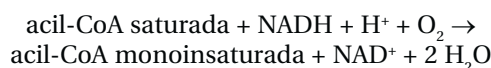
Por cada una de las siete rondas para la elongación del ácido graso, se usa un ATP en la síntesis de la malonil-CoA y dos NADPH en las reacciones de reducción.

En eucariotas, la elongación de los ácidos grasos más allá del palmitato de 16 carbono la realizan enzimas que se localizan en la superficie citosólica del SER. La malonil-CoA se usa como el donador de dos carbonos y los ácidos grasos se elongan como sus derivados CoA más que como sus derivados ACP.

En los procariontes, cada una de las reacciones de la síntesis del ácido graso es catalizada por una enzima diferente. En cambio, en eucariotas, las enzimas del ciclo de elongación en la síntesis de los ácidos grasos está presente en una sola cadena polipeptídica, un complejo enzimático multifuncional llamado **sintasa de ácido graso**. El complejo de la sintasa de ácido graso existe como un dímero, con idas y vueltas incesantes del residuo ACP por la cadena acilo entre los sucesivos sitios catalíticos y desde una subunidad del dímero a la otra. Ésta es, en efecto, una línea de producción de alta eficiencia para la biosíntesis de los ácidos grasos.

## Formación de los dobles enlaces

En los eucariotas, el SER tiene enzimas capaces de introducir **dobles enlaces** en las moléculas de acil-CoA en una reacción de oxidación que usa oxígeno molecular. Esta reacción es catalizada por un complejo de tres enzimas unido a la membrana: la reductasa de NADH-citocromo  $b_5$ , el citocromo  $b_5$  y una desaturasa. La reacción completa es:



La reacción puede repetirse para introducir más de un doble enlace en un ácido graso.

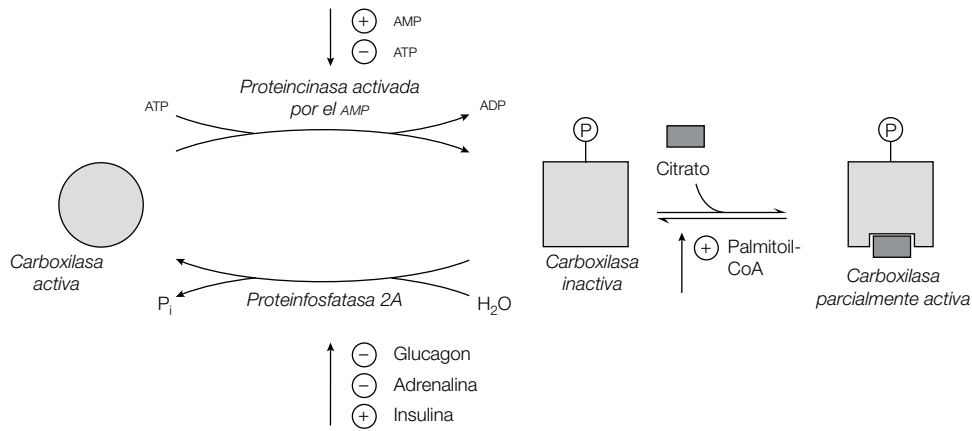
Los mamíferos carecen de las enzimas que insertan dobles enlaces en los átomos de carbono más allá del C-9 de la cadena del ácido graso. Por lo tanto, no pueden sintetizar **linoleato** ni **linolenato**, ambos con dobles enlaces más allá del C-9 de la cadena (el linoleato tiene dobles enlaces *cis*, *cis*- $\Delta^9$ ,  $\Delta^{12}$ , y el linolenato tiene todos los dobles enlaces *cis*- $\Delta^9$ ,  $\Delta^{12}$ ,  $\Delta^{15}$ ). Por lo tanto, en los mamíferos, el linoleato y el linolenato se llaman **ácidos grasos esenciales** porque tienen que ser aportados en la dieta. Estos dos ácidos grasos insaturados son también los puntos de iniciación para la síntesis de otros ácidos grasos insaturados como el **araquidonato**. Este ácido graso C20:4 es el precursor de diversas moléculas de importancia biológica, como las prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos (sección K1).

## Regulación

La síntesis de los ácidos grasos tiene lugar cuando carbohidratos y energía son abundantes y los ácidos grasos escasos. La enzima clave en la regulación de la síntesis de los ácidos grasos es la **carboxilasa de acetil-CoA**, la cual sintetiza malonil-CoA. Éste es un buen ejemplo de **control en el paso obligado** de la vía metabólica. Una **proteincinasa activada por el AMP** inactiva a la carboxilasa de acetil-CoA al fosforilarle un solo residuo de serina (figura K3-4) (sección D5). A diferencia de la proteincinasa dependiente de cAMP (proteincinasa A) (sección K4), el cAMP no afecta esta cinasa, y en su lugar es estimulada por el AMP e inhibida por el ATP. En consecuencia, cuando la carga de energía de las células descende (es decir, que hay una relación AMP:ATP alta), la síntesis de ácidos grasos se detiene. La **proteínfosfatasa 2A** remueve el grupo fosfato de la carboxilasa de acetil-CoA inactivada (figura K3-4) y por lo tanto la reactiva.

La carboxilasa de acetil-CoA también es sujeto de regulación hormonal. Cuando se requiere energía, el **glucagon** y la **adrenalina** inhiben a la proteínfosfatasa 2A, y por lo tanto mantienen a la carboxilasa de acetil-CoA en la forma inactiva (figura K3-4) y bloquean la síntesis de ácidos grasos. En el estado de buena alimentación, cuando los niveles de glucosa en sangre son altos, la **insulina** estimula a la carboxilasa de acetil-CoA, quizá a través de la activación de la proteínfosfatasa 2A (figura K3-4), y en consecuencia conduce a un incremento en la síntesis de ácidos grasos.

Así como en su control por fosforilación/desfosforilación, la carboxilasa de acetil-CoA también es **regulada por medios alostéricos** (para una descripción más completa de la regulación alostérica, véase la sección D5). El intermediario **citrato** del ciclo del ácido cítrico, cuyo nivel es alto cuando la acetil-CoA y el ATP son



**Figura K3-4.** Resumen del control de la carboxilasa de acetyl-CoA por fosforilación y regulación alostérica.

abundantes, estimula por medios alostéricos a la carboxilasa de acetyl-CoA. Esto resulta en la conversión de la forma fosforilada inactiva en una forma parcialmente activa que todavía persiste fosforilada (figura K3-4), y por lo tanto activa la síntesis de ácidos grasos de manera que el exceso de acetyl-CoA sea “almacenado” como residuos de ácidos grasos dentro del triacilglicerol en el

tejido adiposo. En contraste, los altos niveles de **palmitoil-CoA**, la cual es abundante cuando hay un exceso de ácidos grasos, antagoniza el efecto del citrato sobre la carboxilasa de acetyl-CoA, con lo cual reduce su actividad (figura K3-4) y detiene la síntesis adicional de ácidos grasos.

# K4 Triacilgliceroles

## Notas clave

### Estructura y función

Los triacilgliceroles (grasas o triglicéridos) consisten en tres cadenas de ácidos grasos esterificadas a una columna vertebral de glicerol. Los triacilgliceroles son el principal almacén de energía y los principales lípidos dietéticos de los seres humanos. Son insolubles en agua y se almacenan en células adiposas especializadas (células grasas).

### Síntesis

Los triacilgliceroles se sintetizan a partir de glicerol 3-fosfato, el cual es derivado del intermediario glucolítico dihidroxiacetona-fosfato, y de acil-CoA. Las moléculas de acil-Co se agregan al glicerol 3-fosfato para formar, primero, ácido lisofosfatídico y luego ácido fosfatídico. El grupo fosfato es removido entonces para formar DAG, el cual es acilado de manera adicional para formar triacilglicerol. La energía para la síntesis de los triacilgliceroles proviene de la hidrólisis de los enlaces tioéster de alta energía de la acil-CoA.

### Descomposición

Los ácidos grasos de los triacilgliceroles son liberados de la columna vertebral del glicerol por acción de las lipasas. Los ácidos grasos libres pueden entonces degradarse por oxidación  $\beta$  para producir energía. El glicerol se convierte en dihidroxiacetona-fosfato, la cual ingresa en la glucólisis.

### Regulación

La concentración de los ácidos grasos libres en la sangre está controlada por la tasa a la cual la lipasa de triacilglicerol sensible a la hormona hidroliza los triacilgliceroles almacenados en el tejido adiposo. El glucagon, la adrenalina y la noradrenalina causan un incremento en el nivel intracelular de cAMP, el cual activa de manera alostérica a la proteincinasa dependiente de cAMP. La cinasa a su vez fosforila a la lipasa sensible a la hormona, con lo cual la activa, y conduce a la liberación de ácidos grasos a la sangre. La insulina produce el efecto opuesto; disminuye el nivel de cAMP, lo cual lleva a la desfosforilación e inactivación de la lipasa sensible a la hormona.

### Temas relacionados

|                                      |                                |
|--------------------------------------|--------------------------------|
| (E1) Lípidos de la membrana          | (K3) Síntesis de ácidos grasos |
| (E5) Transducción de señales         | (K5) Colesterol                |
| (K2) Descomposición de ácidos grasos | (K6) Lipoproteínas             |

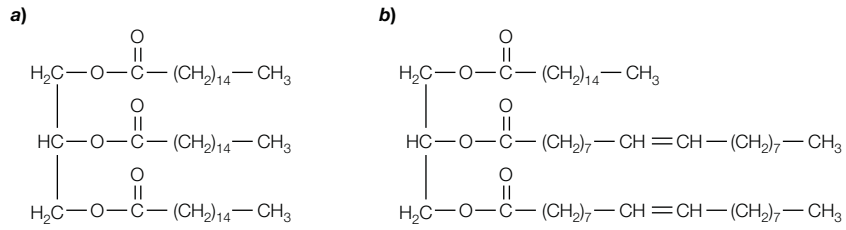
## Estructura y función

Los **triacilgliceroles** (también denominados **grasas** o **triglicéridos**) constan de tres cadenas de ácidos grasos esterificadas a una columna vertebral de glicerol. Los **triacilgliceroles simples** tienen tres ácidos grasos idénticos esterificados a la columna vertebral de glicerol, mientras que los **triacilgliceroles mixtos** tienen dos o tres cadenas de ácidos grasos diferentes (figura K4-1). Los triacilgliceroles constituyen el **principal almacén de combustibles** y el **principal lípido dietético** de los seres humanos. Los triacilgliceroles representan un **almacén de energía** muy concentrada. La energía producida por la oxidación completa de los ácidos grasos es de alrededor de  $38 \text{ kJ g}^{-1}$ , comparada con una producción de

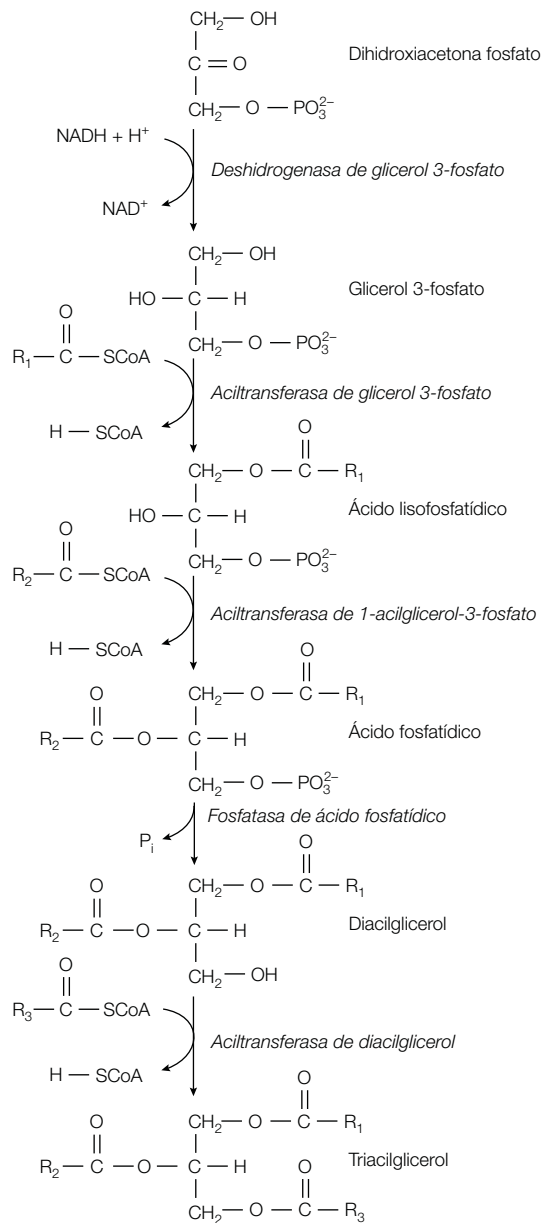
energía de  $17 \text{ kJ g}^{-1}$  de los carbohidratos o las proteínas. Las propiedades hidrófobas de las grasas las vuelve insolubles en agua y se almacenan en células especializadas que se llaman **células adiposas** (células grasas), las cuales consisten casi por entero en triacilglicerol. Estas células se especializan en la síntesis y almacenamiento de triacilgliceroles y en su movilización como moléculas combustibles. Los triacilgliceroles se transportan alrededor del cuerpo en partículas grandes de lípidos y proteínas llamadas **lipoproteínas** (sección K6).

## Síntesis

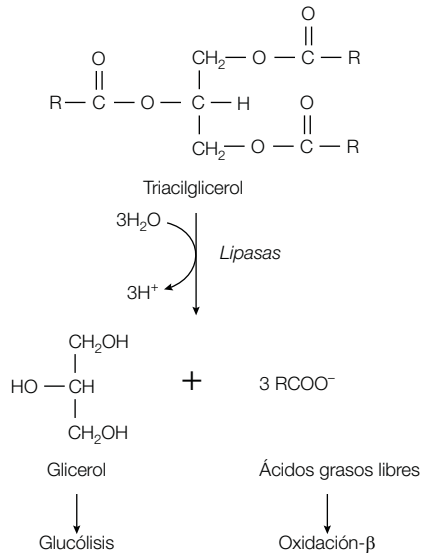
Los triacilgliceroles se sintetizan a partir de acil-CoA y glicerol 3-fosfato (figura K4-2). El intermediario glucolí-



**Figura K4-1.** Estructura de a) un triacilglicerol simple (1,2,3-tripalmitoil-glicerol) y b) un triacilglicerol mixto (1-palmitoil-2,3-dioleoil-glicerol).



**Figura K4-2.** Síntesis de triacilgliceroles.



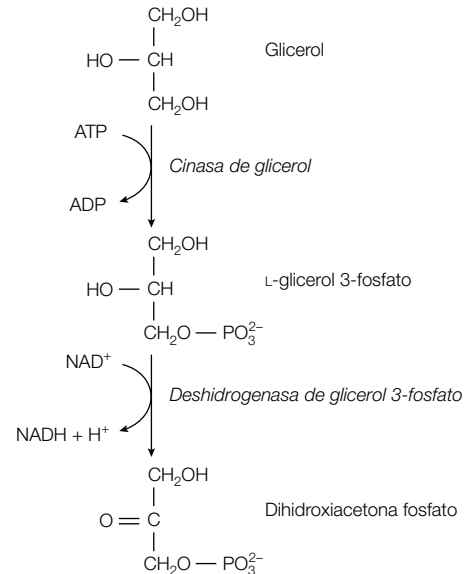
**Figura K4-3.** Descomposición de los triacilgliceroles.

El **dihidroxiacetona fosfato** primero se reduce a glicerol 3-fosfato, el cual, su vez, acilado por la aciltransferasa de glicerol 3-fosfato, forma **ácido lisofosfatídico**. Acto seguido, éste reacciona con una molécula adicional de acil-CoA para formar **ácido fosfatídico**. La remoción del grupo fosfato del ácido fosfatídico genera DAG, el cual es acilado de manera adicional con una tercer molécula de acil-CoA para formar **triacilglicerol** (figura K4-2). El ATP no interviene en la síntesis de los triacilgliceroles. En su lugar, las reacciones suceden por la rotura de los enlaces tioéster de alta energía entre el residuo acilo y la CoA. El ácido fosfatídico (fosfatidato) y el DAG también se usan en la síntesis de los fosfolípidos de la membrana (sección E1) y asimismo el DAG se utiliza como segundo mensajero en la señalización de las células (sección E5).

### Descomposición

El acontecimiento inicial en la utilización de la grasa almacenada y la grasa dietética como fuente de energía es la hidrólisis del triacilglicerol por las **lipasas**. Estas enzimas liberan las tres cadenas de ácidos grasos de la columna vertebral de glicerol (figura K4-3). A partir de su liberación, los ácidos grasos pueden ser degradados en la **oxidación β** para generar energía (sección K2). La columna vertebral de glicerol también se utiliza y para ello primero se transforma en dihidroxiacetona fosfato, un producto intermedio de la glucólisis (figura K4-4). Éste requiere dos enzimas, cinasa de glicerol, la cual usa ATP para fosforilar el glicerol, y produce L-glicerol 3-fosfato, y la deshidrogenasa de glicerol 3-fosfato, la cual produce dihidroxiacetona fosfato.

En el intestino, las grasas dietéticas son hidrolizadas por la **lipasa pancreática** y los ácidos grasos liberados



**Figura K4-4.** Conversión del glicerol en el intermediario glucolítico dihidroxiacetona fosfato.

ingresan en las **células intestinales**. Las propiedades semejantes a detergentes de las **sales biliares** facilitan los procesos de digestión y de captación (sección K5).

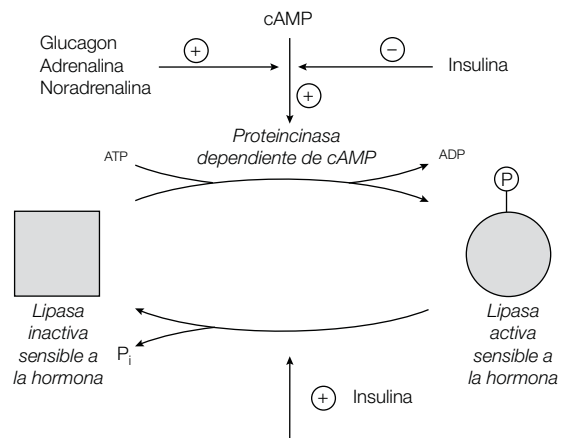
### Regulación

El principal control de la degradación de los ácidos grasos en la **oxidación β** (sección K2) radica en la concentración de los ácidos grasos libres en la sangre, la cual es, a su vez, controlada por la tasa de hidrólisis de triacilgliceroles en el tejido adiposo por la **lipasa de triacilglicerol sensible a la hormona**. Esta enzima es regulada por la **fosforilación** y **desfosforilación** (figura K4-5) en respuesta a los niveles controlados por hormonas del segundo mensajero intracelular **cAMP** (sección E5). Las hormonas catabólicas **glucagon**, **adrenalina** y **noradrenalina**, las cuales son liberadas en momentos de necesidad metabólica, se unen a las proteínas receptoras de la superficie celular e incrementan los niveles de cAMP en las células adiposas a través de la activación de la **ciclasa de adenilato** (véase sección E5 para mayores detalles sobre la vía de transducción de señales). El cAMP activa por medios alostéricos a la **proteincinasa dependiente de cAMP** (conocida por otro lado como **proteincinasa A**), la cual fosforila diversas enzimas intracelulares como la lipasa sensible a la hormona. La fosforilación de la lipasa sensible a la hormona la activa y por lo tanto estimula la hidrólisis de triacilgliceroles, lo que aumenta los niveles de ácidos grasos en la sangre, y de manera subsecuente activa la oxidación β en tejidos como el músculo estriado y el hígado. El glucagon y la adrenalina también evitan la desfosforilación, y por lo tanto la activación, de la **carboxilasa de acetil-CoA**, y de esta manera se inhibe la síntesis de los ácidos grasos (sección K3).



La hormona anabólica **insulina** tiene el efecto opuesto al del glucagon y la adrenalina. Estimula la formación de triacilglicerol a través de la disminución del nivel de cAMP, el cual promueve la desfosforilación e inactivación de la lipasa sensible a la hormona (figura K4-5). La

insulina también estimula la desfosforilación de la carboxilasa de acetil-CoA y por este medio activa la síntesis de ácidos grasos (sección K3). Por lo tanto, la síntesis y degradación de ácidos grasos es **controlada de manera coordinada** con el fin de evitar un ciclo improductivo.



**Figura K4-5.** Resumen del control de la lipasa de triacilglicerol sensible a la hormona.

# K5 Colesterol

## Notas clave

**Funciones del colesterol** El colesterol es un componente de las membranas celulares y es el precursor de las hormonas esteroideas y de las sales biliares.

**Biosíntesis del colesterol** Los 27 átomos de carbono del colesterol derivan de la acetil-CoA. Primero se combinan acetil-CoA y acetoacetil-CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG CoA), la cual, a su vez, es reducida a mevalonato por la reductasa de HMG CoA. El mevalonato es convertido en los componentes isopreno de cinco carbonos 3-isopentenilpirofosfato y su isómero dimetilalilpirofosfato. Estos dos compuestos se condensan para formar el geranilpirofosfato de 10 carbonos, el cual es elongado a farnesilpirofosfato de 15 carbonos a través de la adición de otra molécula de isopentenilpirofosfato. Las dos moléculas de farnesilpirofosfato se condensan para formar el escualeno de 30 carbonos, el cual entonces se cicliza y convierte en colesterol.

**Regulación de la biosíntesis de colesterol** El colesterol puede obtenerse en la dieta o sintetizarse en el hígado. Los niveles altos de colesterol y sus metabolitos disminuyen la cantidad e inhiben la actividad de la reductasa de HMG CoA, la enzima que cataliza el paso forzoso en la biosíntesis del colesterol. Esta enzima también puede ser inhibida por medios terapéuticos mediante compuestos de estatina.

**Sales biliares** Las sales biliares (o ácidos biliares) son la principal forma excretoria del colesterol. Estos compuestos polares son formados en el hígado por la conversión del colesterol en glicocolato o taurocolato. Las sales biliares, semejantes a detergentes, son secretadas en el intestino, donde ayudan a la digestión y captación de los lípidos dietéticos.

**Vitamina D** La vitamina D deriva del colesterol por una serie de reacciones, una de las cuales requiere la acción de la luz UV para romper el enlace entre los átomos de carbono. La deficiencia de vitamina D causa raquitismo en los niños y osteomalacia en los adultos.

**Hormonas esteroideas** Las hormonas esteroideas, como los progestágenos, andrógenos, estrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides, derivan del colesterol por una serie de reacciones que incluyen las enzimas que contienen hemo del citocromo P-450. Estas monooxigenasas requieren  $O_2$  y NADPH para funcionar e intervienen en el metabolismo de los fármacos.

**Temas relacionados**

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| (D5) Regulación de la actividad enzimática | (K3) Síntesis de ácidos grasos |
| (E1) Lípidos de la membrana                | (K4) Triacilgliceroles         |
| (K2) Descomposición de ácidos grasos       | (K6) Lipoproteínas             |
|  | (M4) Hemos y clorofilas        |

## Funciones del colesterol

El colesterol es un **esteroide**. Es un constituyente importante de las **membranas celulares**, donde, en los mamíferos, modula la fluidez (sección E1). El colesterol es también el precursor de **hormonas esteroideas** como la progesterona, testosterona y cortisol, y de las

**sales biliares** (véase más adelante). Por consiguiente, el colesterol es con toda claridad una molécula esencial, pese a que su depósito en las arterias puede dar origen a enfermedades cardiovasculares y accidentes cerebrovasculares, dos de las principales causas de muerte en los seres humanos.

**Biosíntesis del colesterol**

Los animales son capaces de sintetizar colesterol *de novo* mediante una serie elegante de reacciones en las cuales los 27 átomos de carbono del colesterol son derivados de la **acetil-CoA**. En primer lugar, las unidades de acetato se convierten en **unidades isopreno de cinco carbonos**, que luego se condensan para formar un precursor lineal del colesterol cíclico.

La primera etapa en la síntesis del colesterol es la formación de **isopentenilpirofosfato** (figura K5-1). La acetil-CoA y la acetoacetyl-CoA se combinan para formar **3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA** (HMG CoA). Este proceso tiene lugar en el hígado, donde la HMG CoA de las mitocondrias se usa para formar cuerpos cetónicos durante el ayuno (sección K2), mientras que en el citosol es usada para sintetizar colesterol en el estado de alimentación (bajo la influencia del colesterol). Luego, la HMG CoA es reducida a **mevalonato** por la **reductasa**

**de HMG CoA** (figura K5-1). Éste es el paso obligado en la biosíntesis del colesterol y es un punto de control clave. El mevalonato se convierte en **3-isopentenilpirofosfato** por tres reacciones consecutivas en las cuales interviene el ATP, y en las que se libera CO<sub>2</sub> en la última reacción (figura K5-1).

Las unidades de isopreno de cinco carbonos de isopentenilpirofosfato se condensan para formar escualeno, un compuesto de 30 carbonos (figura K5-2). Primero, el isopentenilpirofosfato se isomeriza a **dimetilalilpirofosfato** (figura K5-2a), el cual reacciona con otra molécula de isopentenilpirofosfato para formar el compuesto de 10 carbonos **geranilpirofosfato** (figura K5-2b). Entonces otra molécula de isopentenilpirofosfato reacciona con el geranilpirofosfato para formar el compuesto de 15 carbonos **farnesilpirofosfato**. A continuación, dos moléculas de farnesilpirofosfato se condensan para formar **escualeno** (figura K5-2b).

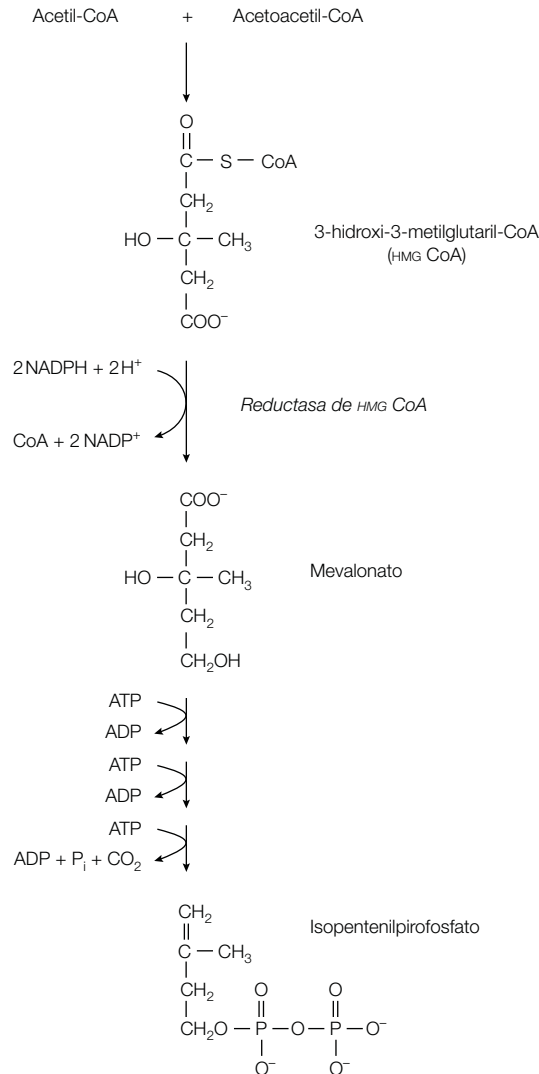
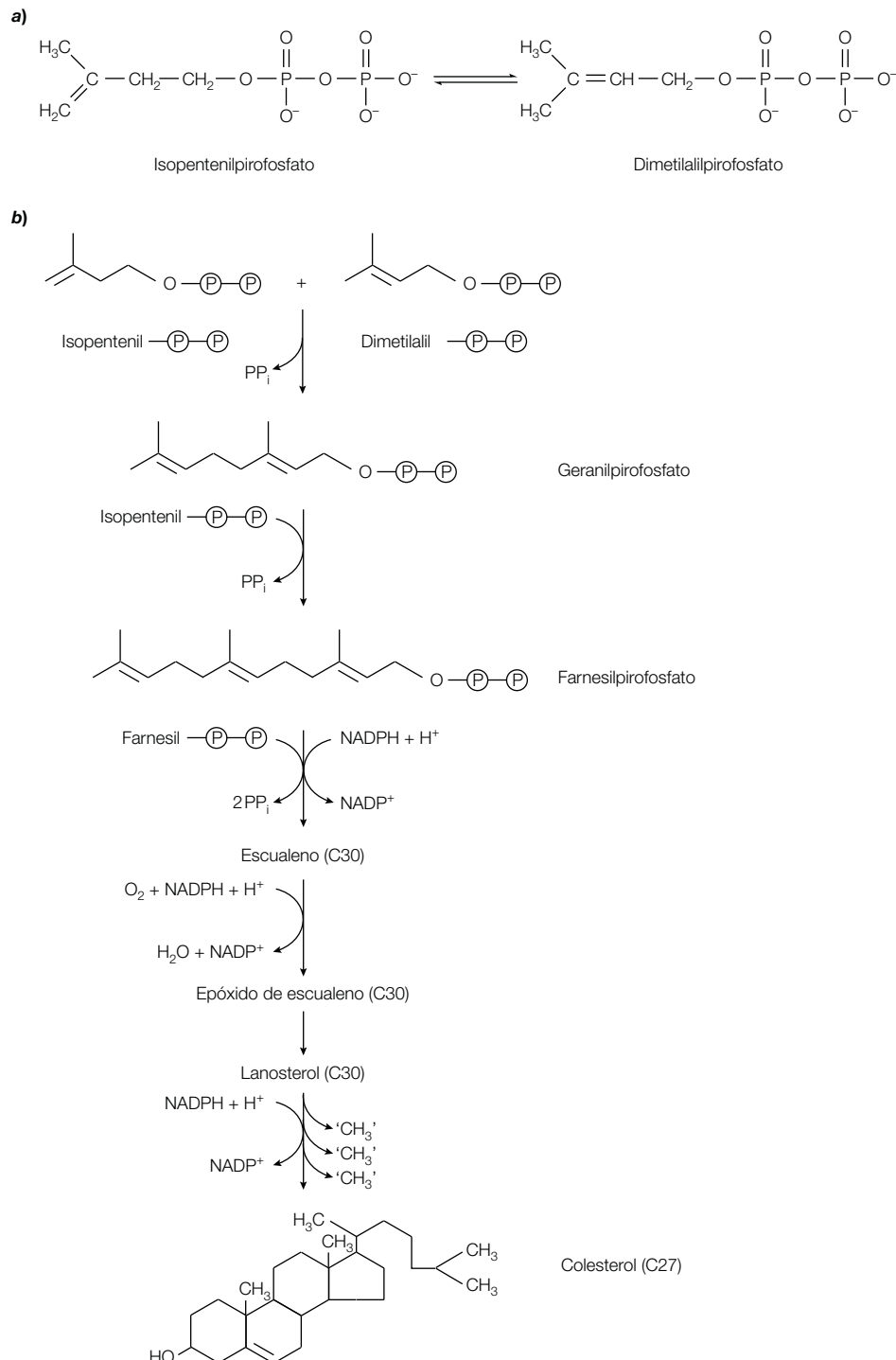


Figura K5-1. Síntesis de isopentenilpirofosfato.

Acto seguido, el escualeno se convierte en **epóxido de escualeno** en una reacción en la que interviene el  $O_2$  y el NADPH (figura K5-2b). El epóxido de escualeno se cicliza para formar **lanosterol** y al final colesterol, que se forma a partir del lanosterol en una serie de reacciones en las que se produce la remoción de tres grupos metilo, la

reducción de un doble enlace por parte del NADPH y la migración del otro doble enlace (figura K5-2b).

El FARNESILPIROFOSFATO y el compuesto de 20 carbonos GERANILGERANILPIROFOSFATO (el cual se forma por la condensación de otro isopentenilpirofosfato con farne-



**Figura K5-2.** Síntesis de escualeno y colesterol a partir de isopentenilpirofosfato: a) isomerización del isopentenilpirofosfato a dimetilalilpirofosfato; b) síntesis de colesterol.

silpirofosfato) se enlazan de manera covalente a residuos de cisteína en varias de las proteínas, dando origen a **proteínas preniladas**, y promueven su asociación con las membranas (sección E2). El dolicol, el cual contiene alrededor de 20 unidades de isopreno, se usa para transportar al precursor biosintético de los oligosacáridos ligados a N, que de manera subsecuente se fija a las proteínas (sección F5).

### Regulación de la biosíntesis de colesterol

El colesterol puede obtenerse de la dieta o sintetizarse *de novo*, sobre todo en el hígado. El colesterol se transporta alrededor del cuerpo en partículas de **lipoproteínas** (sección K6). La tasa de síntesis de colesterol depende del nivel celular del mismo. Los niveles altos de colesterol y sus metabolitos controlan la biosíntesis del colesterol a nivel de la **reductasa de HMG CoA**, la enzima que cataliza el paso forzoso en la biosíntesis del colesterol. Los controles de corto plazo de esta enzima se rompen por inhibición competitiva, efectos alostéricos y modificación covalente con base en la fosforilación reversible. Como la carboxilasa de acetyl-CoA en la síntesis de los ácidos grasos (sección K3), la reductasa de HMG CoA es inactivada por la fosforilación a la que es sometida por una cinasa de proteína activada por AMP, y se retiene en esta forma bajo la influencia del glucagón durante el ayuno. Sin embargo, el mecanismo regulador primario de la reductasa de HMG CoA es un control por retroalimentación a largo plazo de la cantidad de la enzima. La tasa de síntesis de su mRNA es controlada por la **proteína de unión del elemento regulador de esterol** (SREBP), el cual sensa la cantidad de colesterol en la célula.

La reductasa de HMG CoA puede ser inhibida con recursos terapéuticos mediante la administración de fármacos denominados **estatinas** (por ejemplo, **lovastatina** y **sinvastatina**), los cuales inhiben en forma competitiva a la enzima y por lo tanto reducen la tasa de biosíntesis de colesterol. En consecuencia, estos compuestos se usan de manera rutinaria para el tratamiento de la **hipercolesterolemia** (niveles altos de colesterol en sangre) (sección K6).

### Sales biliares

Las **sales biliares** (o ácidos biliares) son derivados polares del colesterol y constituyen la principal vía para la excreción del colesterol en los mamíferos. En el hígado, el colesterol se convierte en el intermediario activado **colil-CoA**, el cual reacciona con el grupo amino de la glicina para formar **glicocolato** (figura K5-3a) o con el grupo amino de la taurina ( $H_2N-CH_2-CH_2-SO_3^-$ , un derivado de la cisteína) para formar **taurocolato** (figura K5-3b). Después de la síntesis en el hígado, las sales biliares glicocolato y taurocolato se almacenan y concentran en la vesícula biliar, antes de ser liberadas en el intestino delgado. Como contienen regiones polares y apolares (esto es, son moléculas anfipáticas), las sales biliares son detergentes muy efectivos y actúan para solubilizar los lípidos dietéticos. El incremento resultante en el área superficial de los lípidos ayuda a su hidrólisis por las lipasas y a su captación por las células del intestino delgado (sección K4). La absorción intestinal de las **vitaminas liposolubles** A, D, E y K también requiere la acción de las sales biliares.

### Vitamina D

La **vitamina D** deriva del 7-dehidrocolesterol por la acción del componente *uv* de la luz solar sobre la piel. La luz *uv* provoca la fotólisis del 7-dehidrocolesterol entre los C-9 y C-10, lo que conduce al reordenamiento de los dobles enlaces de la molécula para formar **previtamina D<sub>3</sub>** (figura K5-4). Esta molécula se isomeriza de manera espontánea para formar **vitamina D<sub>3</sub>** (**colecalciferol**). En el hígado y los riñones tienen lugar reacciones de hidroxilación subsecuentes que producen 1,25-dihidroxicolecalciferol ( $1,25(OH)D_3$ ), la hormona activa (figura K5-4). El **raquitismo**, el cual es causado por una deficiencia de vitamina D, fue una enfermedad histórica común de la niñez de Bretaña debido al bajo contenido de vitamina D de la dieta nacional, y a falta de exposición a la luz solar. Incluso hoy en día, la gente cuya religión le exige mantener el cuerpo cubierto, de manera que su piel no se expone a la luz solar, tiene dificultades para mantener un nivel adecuado de vitamina

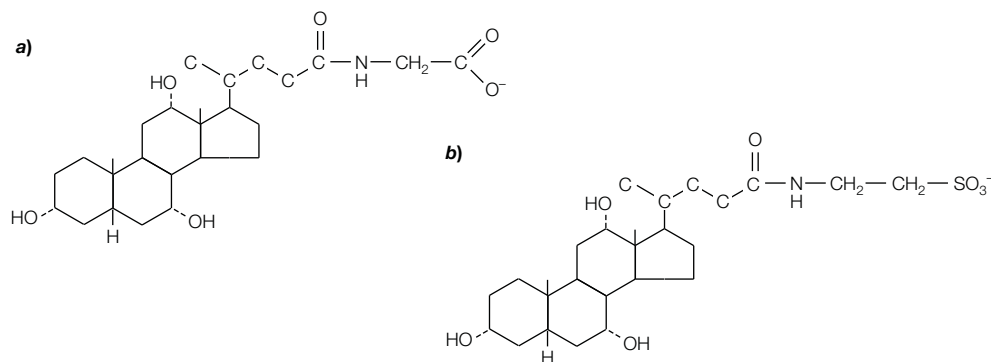


Figura K5-3. Estructuras de las sales biliares a) glicocolato y b) taurocolato.

D. En los adultos, esto toma la forma de la **osteomalacia** (el ablandamiento y debilitamiento de los huesos).

### Hormonas esteroideas

El colesterol es el precursor de las cinco principales clases de **hormonas esteroideas** (cuadro K5-1). La síntesis de las hormonas esteroideas se inicia por la remoción de una unidad de seis carbonos del carbono 20 de la cadena lateral del colesterol para formar **pregnenolona**, el precursor común de todas las hormonas esteroideas (figura K5-5). Una serie de reacciones catalizadas por el **citocromo P-450** modifica la pregnenolona para dar origen a las diferentes hormonas individuales (figura K5-5).

El citocromo P-450 es un grupo de **enzimas que contienen hemo** (sección M4), que debe su nombre a la longitud de onda máxima de su espectro de absorción cuando está unido al monóxido de carbono. Éste se localiza en las mitocondrias y en el SER de muchas células, y consiste en una familia de enzimas estructuralmente relacionadas con diferentes especificidades de sustratos. En

los seres humanos, el citocromo P-450 participa en el **metabolismo de los fármacos**, por ejemplo, mediante la metabolización oxidativa de fármacos como la cafeína y el ibuprofeno. Aunque su acción es benéfica en general, desempeña un papel protector en la remoción de sustancias químicas extrañas, algunos de los carcinógenos más poderosos se generan por la acción del citocromo P-450 sobre compuestos dañinos. Todas las enzimas catalizan las llamadas reacciones de la **monooxigenasa**, en la cual un átomo de oxígeno del oxígeno molecular se inserta dentro de la molécula del sustrato y los otros átomos de oxígeno forman agua. Los electrones requeridos para llevar a cabo la reducción del oxígeno y formar agua son aportados por cadenas de transporte de electrones especializadas, las cuales guardan una relación funcional con las enzimas P-450. Estas cadenas de transporte de electrones suelen tener al NADPH como el último donador de electrones, de manera que una reacción catalizada por el citocromo P-450 se caracteriza en general por la participación del O<sub>2</sub> y el NADPH.

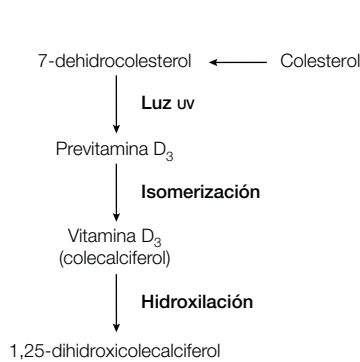


Figura K5-4. Formación de la vitamina D.

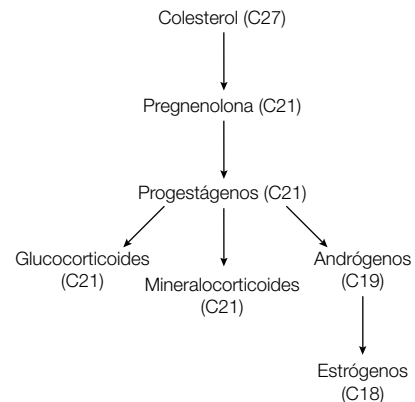


Figura K5-5. Vía biosintética para la síntesis de las hormonas esteroideas.

Cuadro K5-1. Clases de hormonas esteroideas

| Clase               | Sitio de síntesis   | Hormona      | Acción   |
|---------------------|---------------------|--------------|--|
| Progestágenos       | Cuerpo lúteo        | Progesterona | Prepara el revestimiento uterino para la implantación del huevo; mantiene el embarazo                                |
| Andrógenos          | Testículos          | Testosterona | Desarrollo de características sexuales secundarias masculinas  |
| Estrógenos          | Ovario              | Estrona      | Desarrollo de características sexuales secundarias femeninas   |
| Glucocorticoides    | Corteza suprarrenal | Cortisol     | Promueven la gluconeogénesis y la formación de glucógeno; incrementan la degradación de grasas y proteínas           |
| Mineralocorticoides | Corteza suprarrenal | Aldosterona  | Aumentan la reabsorción de Na <sup>+</sup> y la excreción de K <sup>+</sup> e H <sup>+</sup> por los túbulos renales |

# K6 Lipoproteínas

## Notas clave

### Estructura y función

Las lipoproteínas son partículas globulares que consisten en un centro hidrófobo de triacilgliceroles y ésteres de colesterol rodeados por una cubierta de proteínas, fosfolípidos y colesterol. Las apoproteínas de la superficie contribuyen a solubilizar los lípidos y a dirigir a las lipoproteínas hacia los tejidos correctos. Hay cinco tipos diferentes de lipoproteínas, que se clasifican de acuerdo con sus propiedades funcionales y físicas: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). La principal función de las lipoproteínas es transportar triacilgliceroles, colesterol y fosfolípidos alrededor del cuerpo.

### Quilomicrones

El intestino sintetiza los quilomicrones, que se encargan de transportar los triacilgliceroles dietéticos al músculo esquelético y al tejido adiposo, y al colesterol dietético hacia el hígado. En estos tejidos finales, los triacilgliceroles son hidrolizados por la lipasa de lipoproteína de la superficie de las células. Los quilomicrones remanentes ricos en colesterol se transportan en la sangre hacia el hígado, donde son captados mediante endocitosis mediada por el receptor.

### VLDL, IDL y LDL

Las VLDL son sintetizadas en el hígado y transportan triacilgliceroles, colesterol y fosfolípidos hacia otros tejidos, donde la lipasa de lipoproteína hidroliza los triacilgliceroles y libera los ácidos grasos para su captación. Los remanentes de las VLDL se transforman primero en IDL y luego en LDL a medida que todas sus apoproteínas que no son apoB-100 son removidas y su colesterol esterificado. Las LDL se unen a la proteína receptora de las LDL situada en la superficie de las células destino, donde son internalizadas mediante endocitosis mediada por el receptor. El colesterol, que es liberado de las lipoproteínas por la acción de las lipasas lisosómicas, se incorpora en la membrana celular o es reesterificado para su almacenamiento.

### HDL

Las HDL se sintetizan en la sangre y extraen el colesterol de las membranas celulares para convertirlo en ésteres de colesterol. La mayoría de las HDL es tomada por las células hepáticas mediante endocitosis mediada por el receptor y el colesterol se elimina en la forma de sales biliares.

### Aterosclerosis

La aterosclerosis se caracteriza por el engrosamiento arterial rico en colesterol (ateromas) que estrecha las arterias y determina que se formen coágulos de sangre. Si estos coágulos de sangre bloquean las arterias coronarias que irrigan el corazón, el resultado es un infarto del miocardio, o ataque al corazón.

### Hipercolesterolemia familiar

Es un trastorno hereditario en el cual los individuos carecen de receptores funcionales de las LDL, lo que evita que el colesterol de éstas sea captado por los tejidos. Los niveles muy elevados de colesterol resultantes conducen a un incremento en la formación de ateromas y pueden causar la muerte por un infarto miocárdico durante la infancia.

### Temas relacionados

(E1) Lípidos de la membrana  
(E4) Transporte de membrana: macromoléculas

(K4) Triacilgliceroles  
(K5) Colesterol

## Estructura y función

Los triacilgliceroles (sección K4), fosfolípidos (sección E1) y colesterol (sección K5) son relativamente insolubles en solución acuosa. Por consiguiente, son transportados por la sangre alrededor del cuerpo como componentes de las **lipoproteínas**. Estas partículas globulares, semejantes a micelas, consisten en un centro hidrófobo de triacilgliceroles y ésteres de colesterol rodeados por una cubierta anfipática de proteínas, fosfolípidos y colesterol. Los componentes proteínicos de las lipoproteínas se llaman **apolipoproteínas** (o **apoproteínas**). Cuando menos hay 10 diferentes apoproteínas en las distintas lipoproteínas humanas. Sus funciones son ayudar a solubilizar los lípidos hidrófobos y a actuar como señales del direccionamiento celular. Las lipoproteínas se clasifican en cinco grupos sobre la base de sus propiedades físicas y funcionales (cuadro K6-1).

- Los **quilomicrones** son las lipoproteínas más grandes y menos densas. Transportan triacilgliceroles y colesterol dietéticos (exógenos) desde el intestino a los tejidos del cuerpo.
- Las **lipoproteínas de muy baja densidad** (VLDL), las **lipoproteínas de densidad intermedia** (IDL) y las **lipoproteínas de baja densidad** (LDL) son un grupo de lipoproteínas relacionadas que transporta triacilgliceroles y colesterol de producción interna (endógenos) desde el hígado a los tejidos.
- Las **lipoproteínas de alta densidad** (HDL) transportan el colesterol endógeno de los tejidos al hígado.

## Quilomicrones

Los quilomicrones, la mayor de las lipoproteínas, se sintetizan en el intestino. Transportan los triacilgliceroles ingeridos hacia los tejidos, en particular hacia el músculo esquelético y el tejido adiposo, y transportan el colesterol ingerido al hígado (figura K6-1). En los tejidos destino, los triacilgliceroles son hidrolizados por la acción de la **lipasa de lipoproteína**, una enzima que se localiza en el lado externo de las células y que es activada por la **apoC-II**, una de las apoproteínas de la superficie de los quilomicrones. Los tejidos toman y usan los ácidos grasos y monoacilgliceroles en la producción de energía o reesterifican triacilglicerol para su almacenamiento. A medida

que el contenido de triacilglicerol se agota, los quilomicrones se contraen y forman **remanentes de quilomicrones** ricos en colesterol, los cuales son transportados en la sangre hacia el hígado (figura K6-1). Aquí, se unen a receptores específicos de los remanentes de la superficie celular y son tomados por los hepatocitos mediante **endocitosis mediada por el receptor** (sección E4).

## VLDL, IDL y LDL

El hígado es el encargado de sintetizar las VLDL, que transportan una diversidad de lípidos (cuadro K6-1) a otros tejidos, sobre todo al tejido adiposo y el músculo esquelético. Como en el caso de los quilomicrones, los triacilgliceroles de las VLDL son atacados por la **lipasa de lipoproteína** y los ácidos grasos que se liberan son tomados por los tejidos (figura K6-1). Los remanentes de las VLDL permanecen en la sangre, primero como IDL y luego como LDL. En la transformación en LDL, gran parte del colesterol es esterificado en su grupo hidroxilo del C-3 mediante la adición de una cadena de ácidos grasos procedente de la fosfatidilcolina (lecitina); la enzima **aciltransferasa de lecitina-colesterol** (LCAT) lleva a cabo esta anexión. Además, se remueven todas las apoproteínas diferentes de **apoB-100**.

Más tarde, las LDL son tomadas por las células destino a través de **endocitosis mediada por el receptor** (sección E4). El **receptor de LDL**, una glucoproteína transmembrana de la superficie de las células destino, se une de manera específica a la apoB-100 del revestimiento de la LDL. Los receptores entonces se agrupan dentro de cavidades revestidas de clatrina y se internalizan (sección E4, figura E4-3). Una vez que están en los lisosomas, las LDL son digeridas por las enzimas lisosómicas y los ésteres de colesterol son hidrolizados por una lipasa lisosómica que deja al colesterol libre (figura K6-1). Éste luego es incorporado dentro de la membrana celular y cualquier exceso es reesterificado para su almacenamiento por acción de la **aciltransferasa de acil-CoA colesterol** (ACAT).

Para evitar la elaboración de colesterol y sus ésteres derivados en la célula, los valores altos de colesterol:

- Reducen la síntesis del receptor de LDL, cuyo gen regula la SREBP, y de esta manera disminuyen la captación de colesterol por endocitosis mediada por el receptor.

**Cuadro K6-1. Características de las cinco clases de lipoproteínas**

| Lipoproteína  | Masa molecular (kDa) | Densidad (g ml <sup>-1</sup> ) | % proteínas | Lípidos principales | Apoproteínas  |
|---------------|----------------------|--------------------------------|-------------|---------------------|---------------|
| Quilomicrones | >400000              | <0.95                          | 1.5-2.5     | TG                  | A, B-48, C, E |
| VLDL          | 10000-80000          | <1.006                         | 5-10        | TG, PL, CE          | B-100, C, E   |
| IDL           | 5000-10000           | 1.006-1.019                    | 15-20       | CE, TG, PL          | B-100, C, E   |
| LDL           | 2300                 | 1.019-1.063                    | 20-25       | CE, PL              | B-100         |
| HDL           | 175-360              | 1.063-1.210                    | 40-55       | PL, CE              | A, C, D, E    |

C, colesterol; CE, éster de colesterol; TG, triacilglicerol; PL, fosfolípido.



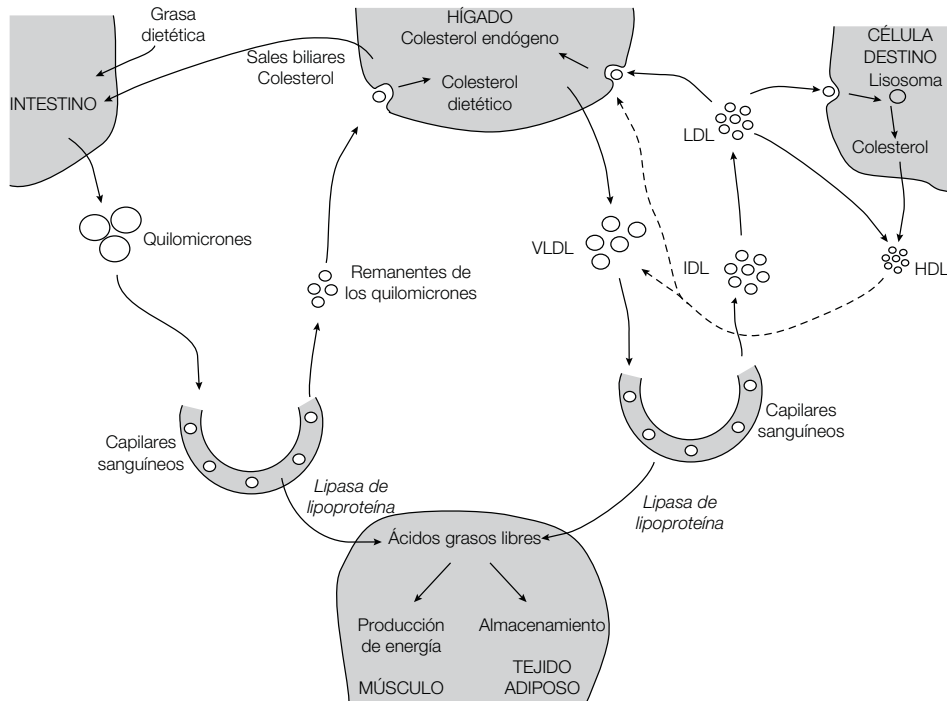


Figura K6-1. El transporte de triacilglicerol y colesterol por lipoproteínas.

- Inhiben la biosíntesis celular de colesterol al inhibir a la reductasa de HMG CoA (sección K5)

**HDL**

Las HDL tienen la función opuesta a la de las LDL en el sentido de que remueven el colesterol de los tejidos. Las HDL se sintetizan en la sangre, sobre todo a partir de componentes derivados de la degradación de otras lipoproteínas. Las HDL adquieren su colesterol por extracción del mismo de las membranas celulares y su conversión en ésteres de colesterol por la acción de la LCAT (figura K6-1). Luego, las HDL son tomadas directamente por el hígado o transfieren sus ésteres de colesterol a las VLDL, de las cuales alrededor de la mitad es tomada por el hígado mediante endocitosis mediada por el receptor (figura K6-1). El hígado es el único órgano que puede eliminar cantidades significativas de colesterol, en primer lugar en la forma de **sales biliares** (sección K5).

**Aterosclerosis**

La **aterosclerosis**, el tipo más común de **endurecimiento de las arterias**, se caracteriza por la presencia de engrosamientos arteriales ricos en colesterol (**ateromas**). Esta enfermedad progresiva comienza con el depósito intracelular de lípidos, en primer lugar de ésteres de colesterol, en las células de músculo liso de la pared arterial. Estas lesiones se fibrosan y convierten en placas calcificadas que estrechan y pueden bloquear las arterias. También es más probable que se originen coágulos sanguíneos, los cuales pueden detener el flujo

sanguíneo y privar a los tejidos del oxígeno. Si estos bloqueos se producen en las arterias coronarias, las arterias que irrigan el corazón, el resultado es un **infarto del miocardio** o **ataque cardíaco**, el cual es la causa más común de muerte en los países industrializados occidentales. En las arterias cerebrales, los coágulos sanguíneos causan **accidentes vasculares cerebrales**, mientras que los que aparecen en los vasos sanguíneos periféricos de las extremidades pueden conducir a una posible gangrena y su correspondiente amputación.

**Hipercolesterolemia familiar**

La hipercolesterolemia familiar es un trastorno hereditario en el cual los homocigotos tienen un nivel muy elevado de colesterol en sangre, mientras que en los heterocigotos dicho nivel duplica el de los individuos normales. Esto no sólo resulta en el depósito del colesterol en la piel como nódulos amarillos que se conocen como **xantomas**, sino también en la formación de **ateromas** que pueden causar la muerte al provocar un **infarto del miocardio** durante la infancia. En la mayoría de los casos de hipercolesterolemia familiar, el defecto molecular es la falta de **receptores funcionales de las LDL**. Por lo tanto, el colesterol LDL no puede ser tomado por los tejidos y produce una alta concentración en la sangre. Los cigotos pueden tratarse mediante trasplante hepático, mientras que los heterocigotos pueden tratarse mediante inhibición de la reductasa de HMG CoA con estatinas (sección K5) y por medio de la reducción de la reabsorción intestinal de sales biliares, lo que reduce el nivel de colesterol sanguíneo.

# L1 Ciclo del ácido cítrico

## Notas clave

### Función

El ciclo oxida el piruvato (que se forma durante la degradación glucolítica de la glucosa) a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , con la producción concomitante de energía. También es oxidada la acetil-CoA procedente de la descomposición de los ácidos grasos y de los productos de degradación de los aminoácidos. Además, el ciclo produce precursores para las vías biosintéticas.

### Localización

El ciclo del ácido cítrico tiene lugar dentro de las mitocondrias de los eucariotas y en el citosol de los procariotas.

### El ciclo

El ciclo del ácido cítrico tiene ocho etapas:

1. Producción de citrato a partir del oxalacetato y de la acetil-CoA (catalizada por la citrato sintasa).
2. Isomerización del citrato a isocitrato (catalizada por la aconitasa).
3. Oxidación del isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato (catalizada por la isocitrato deshidrogenasa; la reacción requiere  $\text{NAD}^+$ ).
4. Oxidación del  $\alpha$ -cetoglutarato a succinil-CoA (catalizada por el complejo de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa; la reacción requiere  $\text{NAD}^+$ ).
5. Conversión de la succinil-CoA en succinato [catalizada por la succinil-CoA sintetasa; la reacción requiere fosfato inorgánico y  $\text{GDP}$  (o  $\text{ADP}$ )].
6. Oxidación del succinato a fumarato (catalizada por la succinato deshidrogenasa; la reacción utiliza  $\text{FAD}$ ).
7. Hidratación del fumarato a malato (catalizada por la fumarasa).
8. Oxidación del malato a oxalacetato (catalizada por la malato deshidrogenasa; la reacción requiere  $\text{NAD}^+$ ).

### Producción de energía

Por cada vuelta del ciclo se producen alrededor de 10 moléculas de  $\text{ATP}$ , una directamente en el ciclo y alrededor de nueve a partir de la reoxidación de tres moléculas de  $\text{NADH}$  y de un  $\text{FADH}_2$  producidas por el ciclo y que pasaron por la fosforilación oxidativa.

### Regulación

El ciclo del ácido cítrico es regulado en los pasos que catalizan la citrato sintasa, la isocitrato deshidrogenasa y la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa a través de la inhibición por retroalimentación por  $\text{ATP}$ , citrato,  $\text{NADH}$  y succinil-CoA, y la estimulación de la isocitrato deshidrogenasa por  $\text{ADP}$ . El complejo de la piruvato deshidrogenasa, del cual convierte el piruvato en acetil-CoA para que ingrese en el ciclo, es inhibido por la acetil-CoA y el  $\text{NADH}$ . De manera adicional, esta enzima es inactivada por fosforilación, una reacción que cataliza la cinasa de la piruvato deshidrogenasa. Un alto índice de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , acetil-CoA/CoA o de  $\text{ATP}/\text{ADP}$  estimula la fosforilación de la piruvato deshidrogenasa y así inactiva esta enzima. El piruvato inhibe a la cinasa. La remoción del grupo fosfato (desfosforilación) por una fosfatasa reactiva a la piruvato deshidrogenasa.

### Vías biosintéticas

Aminoácidos, purinas y pirimidinas, porfirinas, ácidos grasos y glucosa son sintetizados a través de vías que utilizan intermediarios del ácido cítrico como precursores.

**Temas relacionados**

(J3) Glucólisis

(J4) Gluconeogénesis

(K2) Catabolismo de ácidos grasos

(K3) Síntesis de ácidos grasos

(L2) Transporte de electrones y fosforilación oxidativa

(M2) Metabolismo de aminoácidos

**Función**

El ciclo del ácido cítrico, también conocido como el **ciclo TCA (ácido tricarboxílico)** o **ciclo de Krebs** (en honor a su descubridor, en 1937), se usa para oxidar el piruvato que se forma durante la degradación glucolítica de la glucosa en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . También oxida a la acetil-CoA que se origina por la degradación de los ácidos grasos (sección K2), y a los productos de la degradación de los aminoácidos (sección M2). De manera adicional, el ciclo suministra precursores para muchas vías biosintéticas.

**Localización**

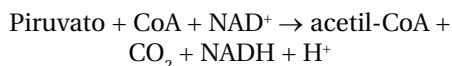
El ciclo del ácido cítrico opera en las mitocondrias de los eucariotas y en el citosol de los procariotas. La succinato deshidrogenasa, única enzima del ciclo del ácido cítrico unida a la membrana, está embebida en la membrana mitocondrial interna de los eucariotas y en la membrana plasmática de los procariotas.

**El ciclo**

El ciclo del ácido cítrico forma la parte central de un proceso en tres pasos, los cuales oxidan moléculas combustibles orgánicas en  $\text{CO}_2$  con la producción concomitante de ATP.

**Paso 1: oxidación de las moléculas combustibles a acetil-CoA**

Una fuente importante de energía es la glucosa, la cual se convierte en piruvato durante la glucólisis (sección J3). La **piruvato deshidrogenasa** es un complejo de tres enzimas y cinco coenzimas localizado en la matriz mitocondrial, es el enlace entre la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico. Esta enzima oxida el piruvato para formar acetil-CoA y  $\text{CO}_2$ .



Esta reacción irreversible incluye una oxidación y la pérdida de  $\text{CO}_2$  y por esta razón el proceso se llama **descarboxilación oxidativa**.

**Paso 2: ciclo del ácido cítrico**

El ciclo lleva a cabo la oxidación de grupos acetilo procedentes de la acetil-CoA a  $\text{CO}_2$  con la producción de cuatro pares de electrones, que de manera inicial se almacenan en los transportadores de electrones reducidos

NADH y  $\text{FADH}_2$ . Las estructuras moleculares de los intermediarios metabólicos se presentan en la figura L1-1.

El ciclo tiene ocho etapas:

1. Se produce el citrato (6C) a partir de la condensación irreversible de acetil-CoA (2C) y oxalacetato (4C)-catalizada por la **citrato sintasa**.



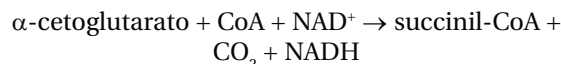
2. La **aconitasa** cataliza una isomerización que convierte al citrato en isocitrato (6C). En realidad, ésta es una reacción en dos pasos durante los cuales se forma *cis*-aconitato como un intermediario. Es el *cis*-aconitato el que le da su nombre a la enzima.



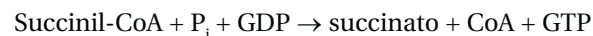
3. El isocitrato es oxidado a  $\alpha$ -cetoglutarato (5C) y  $\text{CO}_2$  por la **isocitrato deshidrogenasa**. Esta enzima mitocondrial requiere  $\text{NAD}^+$ , el cual es reducido a NADH.



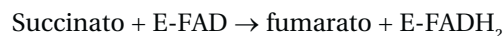
4. El **complejo de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa** oxida el  $\alpha$ -cetoglutarato a succinil-CoA (4C) y  $\text{CO}_2$ . Similar a la piruvato deshidrogenasa, éste es un complejo de tres enzimas y utiliza  $\text{NAD}^+$  como un cofactor.



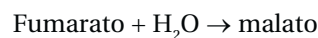
5. La **succinil-CoA sintetasa** convierte la succinil-CoA en succinato (4C). La reacción usa la energía que se libera por la ruptura del enlace del succinil-CoA para sintetizar GTP (en especial en animales) o ATP (exclusivamente en plantas) a partir de  $\text{P}_i$  y, respectivamente, GDP o ADP, por ejemplo:



6. La **succinato deshidrogenasa** oxida el succinato a fumarato (4C). El FAD está unido estrechamente a la enzima (indicado en la ecuación siguiente como E-FAD) y es reducido para producir  $\text{FADH}_2$ .



7. La **fumarasa** convierte el fumarato en malato (4C); ésta es una reacción de hidratación, requiere la adición de una molécula de agua.



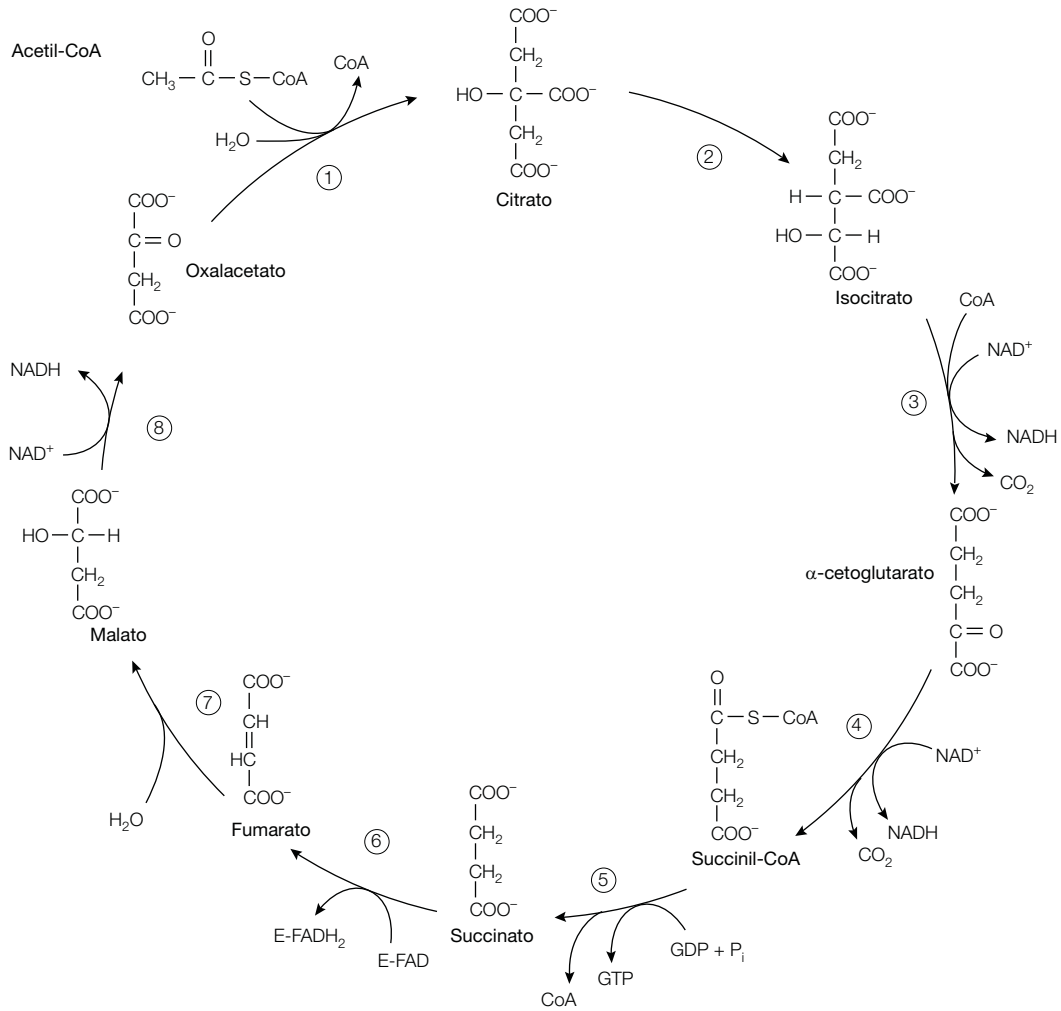
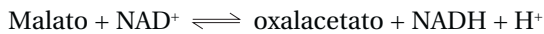


Figura L1-1. Ciclo del ácido cítrico (las reacciones 1-8 se describen en el texto).

8. La **malato deshidrogenasa** oxida el malato a oxalacetato (4C). Otra vez la enzima requiere NAD<sup>+</sup> como un cofactor que acepte el par de electrones libres y produce NADH.



### Paso 3: oxidación del NADH y el FADH<sub>2</sub> producidos por el ciclo del ácido cítrico

El NADH y el FADH<sub>2</sub> producidos por el ciclo del ácido cítrico son reoxidados y la energía liberada se usa para sintetizar ATP por medio de la **fosforilación oxidativa** (sección L2).

### Producción de energía

La reacción general del ciclo del ácido cítrico es como sigue:



Cada una de las tres moléculas de NADH producidas por vuelta en el ciclo genera alrededor de 2.5 ATP y el único E-FADH<sub>2</sub> produce alrededor de 1.5 ATP en la fosforilación oxidativa (sección L2). Un GTP (o ATP) se sintetiza de manera directa durante la conversión del succinil-CoA en succinato. Por ello, la oxidación de una molécula de piruvato en la vía del ciclo del ácido cítrico produce alrededor de 10 moléculas de ATP.

### Regulación

La regulación del ciclo está regida por la disponibilidad de sustratos, la inhibición por los productos que se acumulan, y la inhibición por retroalimentación alostérica que llevan a cabo los intermediarios subsecuentes del ciclo. Son tres las enzimas reguladas en el ciclo (citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa y α-cetoglutarato deshidrogenasa) y también la enzima que convierte al piruvato en acetil-CoA para ingresar en el ciclo, llamada piruvato deshidrogenasa (figura L1-2):

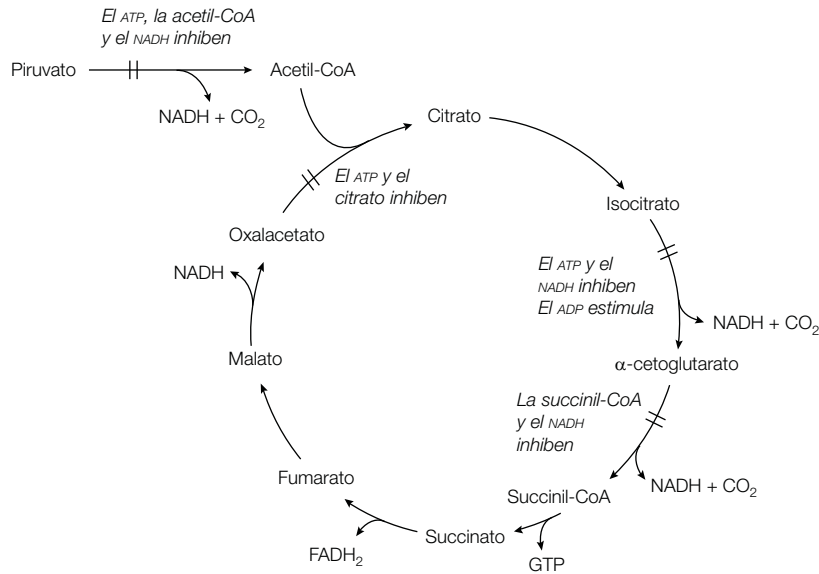


Figura L1-2. Puntos de regulación del ciclo del ácido cítrico.

- El citrato y también el ATP inhiben a la citrato sintasa (la  $K_m$  por la acetil-CoA se eleva conforme el nivel de ATP aumenta).
- El NADH y el ATP inhiben a la isocitrato deshidrogenasa, en tanto que el ADP la activa.
- El NADH y la succinil-CoA inhiben a la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa.
- El NADH y la acetil-CoA inhiben a la piruvato deshidrogenasa (inhibición por producto). Sin embargo, en eucariotas la enzima también es controlada por fosforilación/desfosforilación a través de la **cinasa** y de una **fosfatasa de la piruvato deshidrogenasa**. La cinasa cataliza la fosforilación de un residuo de serina específico en la piruvato deshidrogenasa y utiliza ATP como el donador de fosfato, lo que inactiva a la enzima. La remoción del grupo fosfato por la fosfatasa reactiva a la enzima. Con frecuencia, la actividad de la piruvato deshidrogenasa depende del balance relativo entre las reacciones de la cinasa y la fosfatasa. El incremento de las proporciones  $NADH/NAD^+$ , acetil-CoA/CoA o  $ATP/ADP$  estimula la fosforilación lo que inactiva a la piruvato deshidrogenasa. Conforme se produce piruvato se inhibe a la cinasa y por lo tanto permite que la fosfatasa reactiva a la

piruvato deshidrogenasa estimulando así la conversión del piruvato en acetil-CoA.

En general, el ciclo se acelera cuando los niveles de energía celular son bajos (alta concentración de ADP, bajas concentraciones de ATP y NADH) y decae o disminuye conforme se acumula ATP (y también el NADH, la succinil-CoA y el citrato).

### Vías biosintéticas

Los intermediarios del ciclo proveen precursores para muchas vías biosintéticas. Por ejemplo:

- La síntesis de ácidos grasos a partir de citrato (sección K3).
- La síntesis de aminoácidos por transaminación del  $\alpha$ -cetoglutarato (sección M2).
- La síntesis de nucleótidos de purina y pirimidina a partir del  $\alpha$ -cetoglutarato y el oxalacetato.
- El oxalacetato puede convertirse en glucosa mediante gluconeogénesis (sección J4).
- La succinil-CoA es un intermediario central en la síntesis del anillo de porfirina de los grupos hemo (sección M4).

# L2 Transporte de electrones y fosforilación oxidativa

## Notas clave

### Descripción

El transporte de electrones y la fosforilación oxidativa reoxidan el  $\text{NADH}$  y el  $\text{FADH}_2$  y atrapan la energía liberada como  $\text{ATP}$ . En los eucariotas, el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa tienen lugar en la membrana interna de las mitocondrias, en tanto que en los procariontes el proceso sucede en la membrana plasmática.

### Potencial redox

El potencial de oxidación-reducción,  $E$  (o potencial redox), de una sustancia es una medida de su afinidad por los electrones. El potencial redox estándar ( $E_0'$ ) se mide bajo condiciones estándar, a un pH de 7, y se expresa en voltios. El cambio en la energía libre estándar de una reacción a un pH de 7,  $\Delta G^0'$ , puede calcularse a partir del cambio en el potencial redox  $\Delta E_0'$  de los sustratos y los productos. Una reacción con un  $\Delta E_0'$  positivo tiene un  $\Delta G^0'$  negativo (es decir, es exergónica).

### Transporte de electrones desde el $\text{NADH}$

Los electrones se transfieren desde el  $\text{NADH}$  al oxígeno a lo largo de la cadena de transporte de electrones (también llamada cadena respiratoria). El  $\text{NADH}$  transporta los electrones a la  $\text{NADH-Q}$  oxidoreductasa (Complejo I), un gran complejo de proteínas que contiene  $\text{FMN}$  y dos tipos de centros de hierro-azufre ( $\text{FeS}$ ) unidos a las proteínas azufre. Los electrones son aceptados por el  $\text{FMN}$  para producir  $\text{FMNH}_2$  y luego se transfieren a los átomos de hierro del centro  $\text{FeS}$ , los cuales aceptan y donan los electrones alternando entre los estados de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ . Los electrones de la oxidoreductasa de  $\text{NADH-Q}$  se transfieren a la ubiquinona (coenzima Q, Q), y la convierte en ubiquinol (o  $\text{QH}_2$ ), luego se transportan los electrones a la Q-citocromo  $c$  oxidoreductasa (Complejo III). Este complejo contiene citocromo  $b$  y citocromo  $c_1$ , así como una proteína  $\text{FeS}$ . Un citocromo contiene un grupo hemo con un átomo de hierro central, el cual cambia del estado  $\text{Fe}^{3+}$  al estado  $\text{Fe}^{2+}$  al aceptar un electrón. Cuando el electrón es donado a otro componente, el átomo de hierro recupera el estado  $\text{Fe}^{3+}$  inicial. La Q-citocromo  $c$  oxidoreductasa transporta los electrones al citocromo  $c$ , el cual a su vez los transfiere a la citocromo  $c$  oxidasa (Complejo IV), un complejo que contiene dos citocromos (citocromo  $a$  y citocromo  $a_3$ ), ambos contienen átomos de cobre (dos  $\text{Cu}_A$  y un  $\text{Cu}_B$ , respectivamente). Durante la transferencia de electrones, los átomos de cobre ciclan entre los estados  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$ . Al final, la citocromo  $c$  oxidasa transporta cuatro electrones al oxígeno molecular para formar dos moléculas de agua.

### Formación de un gradiente de protones

El cambio en el potencial redox a lo largo de la cadena es una medida del cambio en la energía libre en cada paso. En los pasos que incluyen a la  $\text{NADH-Q}$  oxidoreductasa, la Q-citocromo  $c$  oxidoreductasa y la citocromo  $c$  oxidasa, el cambio en la energía libre es suficientemente grande como para bombear protones a través de la membrana mitocondrial interna, desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, para crear un gradiente de protones. Por tanto, cada uno de estos complejos es una bomba de  $\text{H}^+$  impulsada por el transporte de electrones.

### Transporte de electrones desde el $\text{FADH}_2$

El  $\text{FADH}_2$  es reoxidado a  $\text{FAD}$  al donar dos electrones a la succinato-Q reductasa (Complejo II), un complejo proteico que contiene centros  $\text{FeS}$ . Éste trans-

fiere los electrones a la ubiquinona, en la vía principal de la cadena de transporte de electrones, donde su transporte posterior lleva a la formación de un gradiente de protones y a la síntesis de ATP. No obstante, la succinato-Q reductasa no bombea por sí misma los  $H^+$ .

#### Inhibidores del transporte de electrones

La rotenona y el amital inhiben el transporte de electrones a nivel de la NADH-Q oxidoreductasa, la antimicina A inhibe a la Q-citocromo *c* oxidoreductasa, y el cianuro a ( $CN^-$ ), la azida ( $N_3^-$ ) y el monóxido de carbono (CO) inhiben a la citocromo *c* oxidasa.

#### Fosforilación oxidativa

La fosforilación oxidativa es el proceso de síntesis de ATP acoplado a la oxidación del NADH y el  $FADH_2$  oxidación que ocurre durante el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria. Esto tiene lugar por un mecanismo extraordinario conocido como la hipótesis quimiosmótica. La energía liberada por el transporte de electrones se usa para bombear iones  $H^+$  fuera de la mitocondria y crear así un gradiente electroquímico de protones ( $H^+$ ). Los protones fluyen de regreso hacia la mitocondria a través de la ATP sintasa localizada en la membrana mitocondrial interna, movimiento que impulsa la síntesis de ATP.

#### ATP sintasa como un motor rotatorio

La ATP sintasa se localiza en la membrana mitocondrial interna. Consiste en dos componentes mayores, la  $F_1$  ATPasa unida al componente  $F_0$  (factor de acoplamiento 0). Por lo que la ATP sintasa también se conoce como la  $F_0F_1$  ATPasa. En las mitocondrias, este complejo usa la energía liberada por el transporte de electrones para dirigir la síntesis de ATP. La porción  $F_1$  tiene una estructura de subunidades  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ , mientras que  $F_0$  consiste en un anillo de 10 a 14 subunidades *c*. Durante la síntesis de ATP, los protones fluyen a través de un canal situado entre las subunidades  $\alpha$  y el anillo *c*, lo que provoca que el anillo *c* rote. La rotación del anillo *c* hace girar la subunidad  $\gamma$  de la  $F_1$  dentro de un anillo formado por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Los cambios conformacionales en las subunidades  $\beta$  llevan a la síntesis de ATP.

#### Flujo de ATP y ADP a través de la membrana mitocondrial interna

El ATP abandona la matriz mitocondrial y el ADP ingresa a través de una proteína el translocador de ATP-ADP o también llamado de adenín nucleótidos que se localiza en la membrana mitocondrial interna; por donde sale un ATP por cada ADP que ingresa. Del mismo modo, el  $P_i$  ingresa en intercambio por un  $OH^-$  que sale a través de la proteína transportadora de fosfato que también se localiza en la membrana mitocondrial interna. Estas dos proteínas de transporte se asocian con la ATP sintasa para formar el sintasoma de ATP.

#### Producción de ATP

Se sintetizan alrededor de 2.5 moléculas de ATP por cada NADH oxidado, y se sintetiza casi 1.5 ATP por cada  $FADH_2$  oxidado.

#### Acoplamiento y control respiratorio

De manera habitual, el transporte de electrones se acopla en forma estrecha a la síntesis de ATP; los electrones no fluyen a través de la cadena de transporte de electrones hacia el oxígeno a menos que el ADP sea fosforilado de manera simultánea a ATP. Si hay ADP disponible, se produce el transporte de electrones y se sintetiza ATP; a medida que la concentración de ADP disminuye, el transporte de electrones decae. Este proceso, llamado control respiratorio, asegura que los electrones fluyan sólo cuando se requiera la síntesis de ATP.

#### Desacoplantes

Algunas sustancias químicas (p. ej., 2,4-dinitrofenol; DNP) son agentes que desacoplan; éstos permiten que el transporte de electrones avance sin que haya síntesis de ATP. Estas sustancias desacoplan a las mitocondrias al transportar iones  $H^+$  a través de la membrana mitocondrial interna y así disipan el gradiente de protones. La energía derivada del transporte de electrones desacoplado se libera como calor. El desacoplamiento también se produce de forma natural en algunos tejidos (p. ej., las mitocondrias del tejido adiposo pardo se desacoplan a través de una proteína llamada termogenina). La producción

resultante de calor (termogénesis) por el tejido adiposo sirve para proteger a los tejidos sensibles del cuerpo en los animales recién nacidos y para mantener la temperatura corporal durante la hibernación.

### Reoxidación del $\text{NADH}$ citosólico

El  $\text{NADH}$  citosólico no puede cruzar la membrana mitocondrial interna e ingresar en las mitocondrias para ser reoxidado. Sin embargo, puede reoxidarse a través de la lanzadera del glicerol 3-fosfato. La glicerol 3-fosfato deshidrogenasa citosólica oxida el  $\text{NADH}$  y reduce a la dihidroxiacetona fosfato a glicerol 3-fosfato. El glicerol 3-fosfato ingresa en la mitocondria, donde es convertido en dihidroxiacetona fosfato por la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (una enzima que une  $\text{FAD}$ ). La dihidroxiacetona fosfato se difunde de regreso otra vez hacia el citosol. El  $\text{FADH}_2$  producido por la enzima es reoxidado por transferencia de sus electrones a la cadena de transporte de electrones. Como los demás electrones que ingresan en la cadena de transporte de electrones desde  $\text{FADH}_2$ , sólo se sintetizan alrededor de dos  $\text{ATP}$  por molécula de  $\text{NADH}$  citosólico. En el corazón y el hígado, el  $\text{NADH}$  citosólico puede ser reoxidado a través de la lanzadera de malato-aspartato. En el citosol, el oxalacetato es reducido a malato por el  $\text{NADH}$  e ingresa en la mitocondria a través del transportador de malato- $\alpha$ -cetoglutarato. En la matriz, el malato es reoxidado a oxalacetato a expensas del  $\text{NAD}^+$  el que se convierte en  $\text{NADH}$ , lo que resulta en una transferencia neta de electrones desde el  $\text{NADH}$  citosólico al  $\text{NADH}$  de la matriz. El oxalacetato se convierte en aspartato por transaminación, abandona la mitocondria y es reconvertido en oxalacetato en el citosol, otra vez por transaminación.

### Temas relacionados

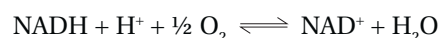
(J3) Glucólisis  
(L1) Ciclo del ácido cítrico  
(L3) Fotosíntesis

## Descripción

En eucariotas, el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa ocurren en la membrana interna de la mitocondria. Estos procesos reoxidan el  $\text{NADH}$  y el  $\text{FADH}_2$  que se originan en el ciclo del ácido cítrico (localizado en la matriz mitocondrial; sección L1), la glucólisis (localizada en el citoplasma; sección J3) y en la oxidación de los ácidos grasos (localizada en la matriz mitocondrial; sección K2) y atrapan la energía liberada como  $\text{ATP}$ . En procariotas, los componentes del transporte de electrones y la fosforilación oxidativa se localizan en la membrana plasmática (sección A1). La fosforilación oxidativa es la fuente principal de  $\text{ATP}$  de las células.

## Potencial redox

La oxidación de una molécula incluye la pérdida de electrones. La reducción de una molécula incluye la ganancia de electrones. Como los electrones no se crean ni destruyen en una reacción química, si una molécula se oxida, otra debe reducirse (es decir, es una **reacción de oxidación-reducción**). Por lo tanto, por definición, las reacciones de oxidación-reducción incluyen la transferencia de electrones. En la reacción de oxidación-reducción:



Cuando el  $\text{NADH}$  se oxida a  $\text{NAD}^+$ , pierde electrones. Cuando el oxígeno molecular es reducido a  $\text{H}_2\text{O}$ , gana electrones.

El **potencial de oxidación-reducción**,  $E$  (o **potencial redox**), es una medida de la afinidad de una sustancia por los electrones y se mide en relación con el hidrógeno. Un potencial redox positivo significa que la sustancia tiene una afinidad más alta por los electrones que el hidrógeno y de esta manera aceptará electrones de éste. Una sustancia con un potencial redox negativo tiene una afinidad por los electrones más baja que el hidrógeno y donará electrones al  $\text{H}^+$  para formar hidrógeno. En el ejemplo anterior, el  $\text{NADH}$  es un potente agente reductor con un potencial redox negativo y tiene tendencia a donar electrones. El oxígeno es un agente de oxidación poderoso con un potencial redox positivo y tiene tendencia a aceptar electrones.

En los sistemas biológicos, el **potencial redox estándar** de una sustancia ( $E_0'$ ) se mide bajo condiciones estándar, a un pH de 7, y se expresa en voltios. En una reacción de oxidación-reducción, donde se produce la transferencia de electrones, el cambio en el voltaje total de la reacción

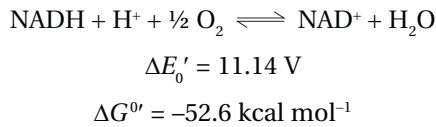


(cambio en el potencial eléctrico,  $\Delta E$ ) es la suma de los cambios de voltaje de los pasos de oxidación-reducción individuales. El cambio en la energía libre estándar de una reacción a un pH de 7,  $\Delta G^{0'}$ , puede calcularse con facilidad a partir del cambio en el potencial redox  $\Delta E_0'$  de los sustratos y los productos:

$$\Delta G^{0'} = -nF \Delta E_0'$$

donde  $n$  es el número de electrones transferidos,  $\Delta E_0'$  está en voltios (V),  $\Delta G^{0'}$  está en calorías por mol ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) y  $F$  es una constante llamada Faraday ( $23.06 \text{ kcal V}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ). Nótese que una reacción con una  $\Delta E_0'$  **positiva** tiene una  $\Delta G^{0'}$  **negativa** (es decir, es exergónica).

Como en la siguiente reacción:

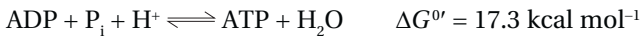


### Transporte de electrones desde el NADH

Si se compara la energética de la oxidación de NADH:



y la síntesis de ATP:



queda claro que la oxidación del NADH libera suficiente energía para producir la síntesis de numerosas moléculas de ATP. Sin embargo, la oxidación de NADH y la síntesis de ATP no ocurren en un solo paso. Los electrones no se transfieren desde el NADH al oxígeno de manera directa. En su lugar, los electrones se transfieren desde el NADH al oxígeno a lo largo de una cadena de acarreadores de electrones, que de manera grupal se denomina **cadena de transporte de electrones** (también llamada **cadena respiratoria**).

La mayoría de los componentes proteicos de la cadena de transporte de electrones existen como cuatro grandes complejos proteicos embebidos en la membrana mitocondrial interna y que se denominan:

- NADH-Q oxidoreductasa (Complejo I)
- Succinato-Q reductasa (Complejo II)

- Q-citocromo *c* oxidoreductasa (Complejo III)
- Citocromo *c* oxidasa (Complejo IV)

Los electrones fluyen desde NADH al oxígeno a través de tres de estos complejos, como se muestra en la figura L2-1. Cada complejo contiene varios transportadores de electrones (véase más adelante) que trabajan en forma secuencial para transportar los electrones a lo largo de la cadena. Dos transportadores de electrones pequeños también son necesarios para enlazarse a estos grandes complejos: la **ubiquinona**, la cual también se denomina **coenzima Q** (y se abrevia **Q**), y el **citocromo *c*** (figura L2-1).

El flujo de electrones desde el NADH a lo largo de la cadena respiratoria puede resumirse como sigue:

### 1. NADH-Q oxidoreductasa (Complejo I)

La **NADH-Q oxidoreductasa (Complejo I)** es un complejo masivo de cuando menos 46 proteínas. Se une al NADH y lo reoxida a NAD<sup>+</sup>, acción durante la cual los dos electrones se transfieren desde el NADH al grupo prostético llamado FMN (figura L2-2) para producir FMNH<sub>2</sub> (véase la sección D1 para revisar la estructura del FMN). Cada electrón es aceptado junto con un ion hidrógeno, H<sup>+</sup>, de manera que en total se aceptan dos electrones y dos H<sup>+</sup>. Luego los electrones se transfieren, dentro del Complejo I, a un **centro de hierro-azufre** (FeS) que se encuentra en las **proteínas hierro-azufre** (también denominadas **proteínas de hierro no hemo**). Existen varios centros FeS, pero en cada caso los átomos de hierro están coordinados con átomos de azufre inorgánico. Dentro de un centro FeS, un electrón es transportado por el átomo de hierro, el cual, al aceptar el electrón, cambia del estado Fe<sup>3+</sup> (férrico) al Fe<sup>2+</sup> (ferroso) (figura L2-2). A medida que el electrón se pasa a otro transportador de electrones, el átomo de hierro del centro FeS cambia otra vez al estado Fe<sup>3+</sup>.

### 2. Ubiquinona

Los electrones de los centros FeS del Complejo I se pasan a la ubiquinona (Q), una pequeña molécula liposoluble de la membrana mitocondrial interna. Esta molécula puede actuar como un transportador de electrones al aceptar hasta dos electrones y dos iones H<sup>+</sup>. Al hacerlo así, la ubiquinona (Q) se convierte en **ubiquinol** (QH<sub>2</sub>).

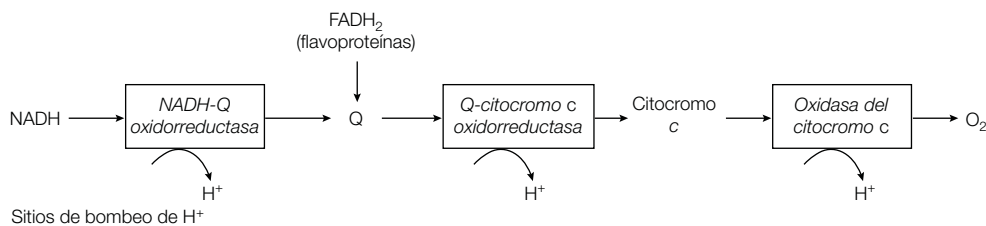


Figura L2-1. Descripción de la cadena de transporte de electrones (cadena respiratoria).

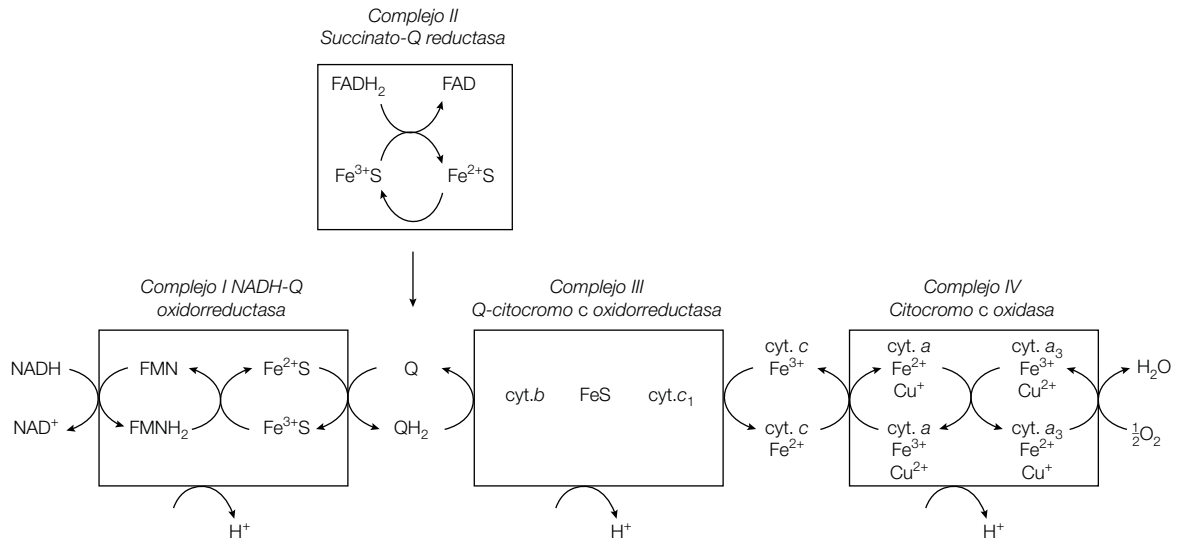


Figura L2-2. Detalles del transporte de electrones.

### 3. Q-citocromo c oxidorreductasa (Complejo III)

Cuando el ubiquinol ( $\text{QH}_2$ ) dona sus dos electrones al siguiente transportador de la cadena, la **Q-citocromo c oxidorreductasa (Complejo III)**, también se liberan los iones  $\text{H}^+$ . Este complejo (figura L2-2) contiene dos tipos de citocromos (**citocromo b** y **citocromo  $c_1$** ), así como una proteína con  $\text{FeS}$ .

Un citocromo es una proteína con un **grupo hemo** unido que contiene un átomo de hierro (sección M4, figura M4-1). Diferentes citocromos tienen grupos hemo distintos, pero todos los citocromos poseen la capacidad para actuar como transportadores de electrones. Cuando el electrón es aceptado, el átomo de hierro del grupo hemo cambia del estado  $\text{Fe}^{3+}$  (férrico) al estado  $\text{Fe}^{2+}$  (ferroso). El citocromo *b* tiene dos hemos llamados hemo  $b_L$  (L por baja afinidad) y hemo  $b_H$  (H por alta afinidad). El citocromo  $c_1$  tiene un solo hemo.

La proteína con fierro-azufre tiene dos iones hierro y dos átomos de azufre inorgánico en un **centro de Rieske**

**$2\text{Fe}2\text{S}$**  (así nombrado en honor a John Rieske, su descubridor) con un átomo de hierro coordinado con dos residuos de cisteína y un átomo de hierro coordinado con dos residuos de histidina (figura L2-3).

La figura L2-2 muestra el paso de electrones desde el ubiquinol ( $\text{QH}_2$ ) a través del citocromo *b*, y los componentes  $\text{FeS}$  y citocromo  $c_1$  del complejo de la Q-citocromo c oxidorreductasa al siguiente transportador de electrones, el **citocromo c**.

Como el ubiquinol es un transportador de dos electrones, en tanto que los citocromos son transportadores de un electrón, la vía de la transferencia de electrones dentro del complejo de la Q-citocromo c oxidorreductasa es complicada. El proceso involucrado, para el acoplamiento de la transferencia de electrones desde Q al citocromo *c* y el transporte de protones a través de la membrana, se llama **ciclo Q** (figura L2-4):

- Dos moléculas de  $\text{QH}_2$  unidas una después de la otra al complejo de la Q-citocromo c oxidorreductasa.

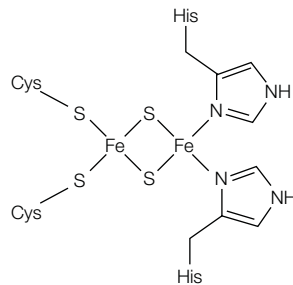


Figura L2-3. Centro de fierro-azufre de Rieske en el que se muestran dos átomos de hierro, uno coordinado con dos residuos de cisteína y uno coordinado con dos residuos de histidina.

- La primera  $\text{QH}_2$  se une a un sitio del Complejo III llamado sitio  $\text{Q}_0$  (figura L2-4a). Éste cede dos electrones y dos iones  $\text{H}^+$  (los cuales son liberados hacia el espacio intermembranal, es decir, hacia aquel situado entre las dos membranas de la mitocondria). Se dona un electrón hacia el centro de Rieske  $2\text{FeS}$  y luego hacia el citocromo  $c_1$  para hacerlo finalmente al citocromo  $c$  (el cual se reduce). El otro electrón fluye a través de los dos grupos hemo del citocromo  $b$  (primero  $b_L$  y luego  $b_H$ ) y más tarde a la otra  $Q$  unida al Complejo III en un segundo sitio llamado sitio  $\text{Q}_i$  (figura L2-4a). Cuando recibe el electrón, esta molécula  $Q$  se convierte en un radical anión de semiquinona ( $\text{Q}^{\bullet-}$ ).
- El segundo  $\text{QH}_2$  también se une al sitio  $\text{Q}_0$  y cede dos electrones y dos iones  $\text{H}^+$  (los cuales se liberan hacia el espacio intermembranal). Un electrón fluye a través del centro de Rieske y el citocromo  $c_1$  hacia otra molécula de citocromo  $c$ , a la que reduce (figura L2-4b). El segundo electrón fluye a través del citocromo  $b$  (primero  $b_L$  y luego  $b_H$ ) y luego hacia  $\text{Q}^{\bullet-}$  en el sitio  $\text{Q}_i$ , el cual acepta dos protones (desde la matriz mitocondrial) para formar  $\text{QH}_2$ .

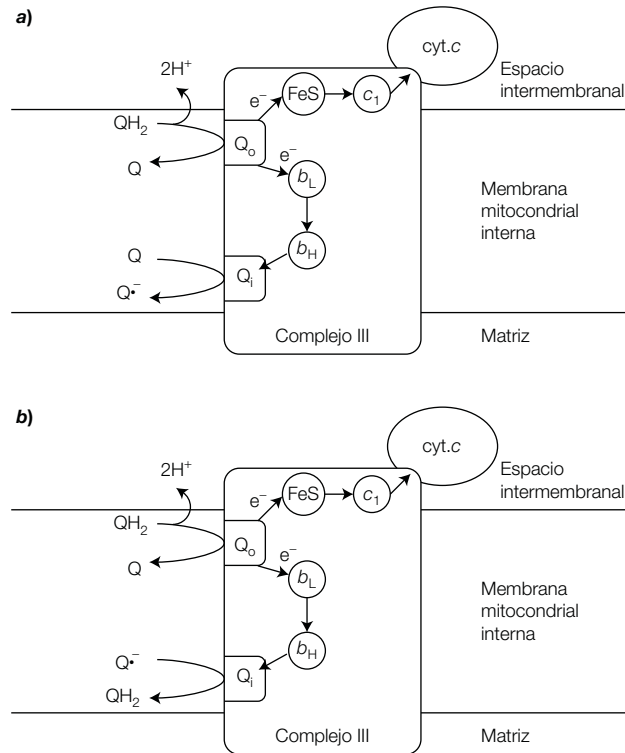
- Por lo tanto, en general, dos moléculas de  $\text{QH}_2$  son oxidadas a dos moléculas de  $Q$  y una molécula de  $Q$  es reducida a  $\text{QH}_2$ . Así, el resultado neto es que un  $\text{QH}_2$  es convertido en  $Q$ . De manera adicional, dos moléculas de citocromo  $c$  reciben cada una un electrón y son reducidas, cuatro protones se liberan por el lado citoplásmico de la membrana y dos protones son tomados desde la matriz mitocondrial.

**4. Citocromo c**

El citocromo  $c$  es una proteína periférica de la membrana que se halla débilmente unida a la superficie externa de la membrana mitocondrial interna. Se une al complejo de la  $Q$ -citocromo  $c$  oxidorreductasa y acepta un electrón a través de una transición de  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ . Luego se une al complejo de la citocromo  $c$  oxidasa (Complejo IV) y dona el electrón, con el átomo de hierro del hemo del citocromo  $c$  que se revierte al estado  $\text{Fe}^{+3}$  (figura L2-2).

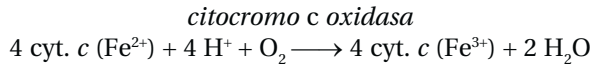
**5. Oxidasa de citocromo c (Complejo IV)**

La oxidasa del citocromo  $c$  (Complejo IV) contiene dos citocromos (citocromo  $a$  y  $a_3$ ). El citocromo  $a$  contiene



**Figura L2-4.** El ciclo Q. a) En la primera fase, dos electrones de un  $\text{QH}_2$  unido en el sitio  $\text{Q}_0$  son transferidos, uno al citocromo  $c$  y el otro a una molécula de  $Q$  unida al sitio  $\text{Q}_i$  para formar la semiquinona  $\text{Q}^{\bullet-}$ . La recientemente formada  $Q$  se disocia del sitio  $\text{Q}_0$ . b) Un segundo  $\text{QH}_2$  se une al sitio  $\text{Q}_0$  y dona dos electrones, uno a una segunda molécula de citocromo  $c$  y el otro para reducir la semiquinona  $\text{Q}^{\bullet-}$  a  $\text{QH}_2$ , aceptando dos protones de la matriz en el proceso.

dos átomos de cobre,  $\text{Cu}_A$ , y el citocromo  $a_3$  está unido con un átomo de cobre diferente,  $\text{Cu}_B$ . Durante la transferencia de electrones, los átomos de hierro de los citocromos ciclan entre los estados  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ , mientras los átomos de cobre ciclan entre los estados  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$ . La reacción de la citocromo  $c$  oxidasa es compleja; transfiere cuatro electrones desde cuatro moléculas de citocromo  $c$  y cuatro iones  $\text{H}^+$  hacia el oxígeno molecular para formar dos moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ :



### Formación de un gradiente de $\text{H}^+$

Todos los transportadores de electrones de la cadena de transporte de electrones interactúan de acuerdo con sus potenciales redox. Cada vez que se produce la transferencia de un electrón, el transportador que lo acepta tiene una afinidad más alta por los electrones que el transportador donante. Por eso, hay un flujo neto de electrones desde el  $\text{NADH}$  (potencial redox más negativo, menos afinidad por los electrones) al oxígeno (potencial redox más positivo, afinidad más alta por los electrones). Esto asegura un flujo unidireccional de los electrones. Sin embargo, nótese que cada citocromo, cada centro  $\text{FeS}$  y cada átomo de cobre pueden transportar sólo un electrón por cada dos electrones donados por el  $\text{NADH}$ . Así también, cada molécula de oxígeno ( $\text{O}_2$ ) necesita aceptar cuatro electrones para reducirse en una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$ . Los diversos componentes se ordenan de tal manera que permiten que sus diferentes propiedades para aceptar los electrones trabajen de manera coordinada.

El cambio en el potencial redox a lo largo de la cadena es una medida del cambio en la energía libre que ocurre (véase antes). Los potenciales caen (es decir, se hacen

más positivos) a través de la cadena, pero sobre todo en los tres pasos más largos que corresponden a los de los tres complejos principales de proteínas: Complejos I, III y IV. El gran cambio de energía libre en cada uno de estos tres pasos, y sólo en estos tres pasos, alcanza la magnitud suficiente para bombear los iones  $\text{H}^+$  desde la matriz mitocondrial a través de la membrana mitocondrial interna y hacia el espacio intermembrana (figura L2-5).

Por ello, cada uno de estos tres complejos (Complejo I, III y IV) es una **bomba de  $\text{H}^+$**  dirigida por el transporte de electrones (figuras L2-1 y L2-2). Por lo tanto, el transporte de electrones a lo largo de la cadena desde el  $\text{NADH}$  libera energía que se usa para crear un **gradiente de  $\text{H}^+$** .

### Transporte de electrones desde el $\text{FADH}_2$

La succinato deshidrogenasa cataliza la oxidación del succinato a fumarato en el ciclo del ácido cítrico (sección L1). La succinato deshidrogenasa contiene  $\text{FAD}$  unido y es reducido a  $\text{FADH}_2$  durante la reacción. La reoxidación del  $\text{FADH}_2$  ocurre a través de la **succinato-Q reductasa (Complejo II)**, una proteína integral de la membrana mitocondrial interna. La succinato deshidrogenasa es parte de este complejo, pero también contiene centros  $\text{FeS}$ . Durante la reoxidación del  $\text{FADH}_2$ , los dos electrones pasan desde el  $\text{FADH}_2$  a los centros  $\text{FeS}$  y luego son pasados a la ubiquinona ( $\text{Q}$ ; figura L2-2). Éstos luego ingresan a la cadena de transporte de electrones principal y provocan que los iones  $\text{H}^+$  se bombeen fuera de la mitocondria para la oxidación del  $\text{NADH}$ . No obstante, la succinato-Q reductasa por sí misma *no* es una bomba de  $\text{H}^+$  debido a que el cambio en la energía libre de la reacción general es demasiado pequeño. El  $\text{FADH}_2$  de otras **flavoproteínas**, como el de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial en la lanzadera de glicerol

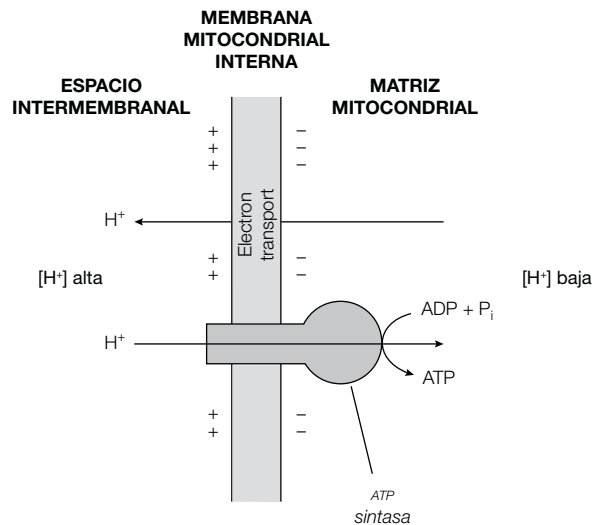


Figura L2-5. Mecanismo de la fosforilación oxidativa.

3-fosfato (véase más adelante) y la acil-CoA deshidrogenasa en la oxidación de los ácidos grasos (sección K2), también ceden sus electrones dentro de la cadena de transporte de electrones a la ubiquinona.

### Inhibidores del transporte de electrones

Se conocen varios inhibidores específicos de cada uno de los transportadores de electrones, se usaron en los primeros estudios para determinar el orden de los componentes de la cadena respiratoria. Por ejemplo:

- La **rotenona** y el **amital** inhiben el transporte de electrones en la NADH-Q oxidorreductasa y así evitan la oxidación del NADH, pero en cambio la oxidación del FADH<sub>2</sub> todavía puede producirse ya que éste alimenta la cadena con electrones a nivel de Q (figura L2-1) (es decir, después del punto de inhibición).
- La **antimicina A** inhibe el transporte de electrones a nivel del complejo de la Q-citocromo *c* oxidorreductasa.
- El **cianuro** (CN<sup>-</sup>), la **azida**(N<sub>3</sub><sup>-</sup>) y el **monóxido de carbono** (CO) inhiben a la citocromo *c* oxidasa.

### Fosforilación oxidativa

**Fosforilación oxidativa** es el nombre que se le da a la síntesis de ATP (*fosforilación*) que se produce cuando el NADH y el FADH<sub>2</sub> son oxidados (de allí *oxidativa*) por el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria. A diferencia de la fosforilación a nivel de sustrato (secciones J3 y L1), ésta no incluye intermediarios químicos fosforilados. En su lugar, en 1961, Peter Mitchell propuso un mecanismo muy diferente, la **hipótesis quimiosmótica**. Ésta propone que la energía liberada por el transporte de electrones se usa para crear un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna, que entonces se usa para dirigir la síntesis de ATP. Así, *el gradiente de protones se acopla al transporte de electrones y a la síntesis de ATP, no a un intermediario químico*. La evidencia es abrumadora acerca de que ésta es en efecto la forma en que trabaja la fosforilación oxidativa. La síntesis de ATP la lleva a cabo una enzima llamada ATP **sintasa** que se localiza en la membrana mitocondrial interna (figura L2-5).

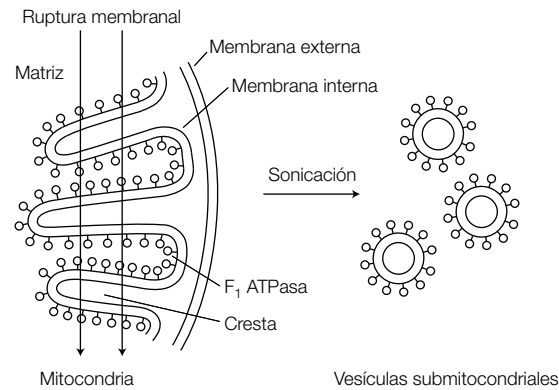
En resumen, el proceso es como sigue. El transporte de electrones por la cadena respiratoria desde la oxidación del NADH determina que los H<sup>+</sup> sean bombeados fuera de la matriz mitocondrial, a través de la membrana mitocondrial interna, hacia el espacio intramembranal (figura L2-5) por las tres bombas de H<sup>+</sup>: los Complejos I, III y IV (véase antes). [Debido a que el FADH<sub>2</sub> es reoxidado a través de la ubiquinona (figuras L2-1 y L2-2), su oxidación posterior determina que los iones H<sup>+</sup> sean bombeados sólo por los Complejos III y IV y de esta manera la cantidad de ATP producido a partir de FADH<sub>2</sub> es menor que desde NADH.]

El cambio de energía libre en el transporte de un ion con carga eléctrica a través de una membrana se relaciona con su carga eléctrica y con su concentración. El bombeo de los protones hacia fuera de la mitocondria genera una concentración más alta de estos iones en el espacio intramembranal y cambia el potencial eléctrico, por la conversión en positivo del lado de la membrana mitocondrial interna que mira hacia el espacio intramembranal (figura L2-5). En consecuencia, se forma un **gradiente electroquímico de protones**. Los protones fluyen de regreso hacia la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa, y dirige la síntesis de ATP. La ATP sintasa es dirigida por la **fuerza protón motriz**, que es la suma del gradiente de pH (es decir, el gradiente químico de los iones H<sup>+</sup>) y el potencial de membrana (es decir, el potencial de carga eléctrica a través de la membrana mitocondrial interna).

### ATP sintasa como un motor rotatorio

La ATP sintasa puede verse como una proyección esférica desde la membrana interna (figura L2-6). Si las mitocondrias se someten a ruptura sónica, se forman vesículas submitocondriales en las cuales las esferas de la ATP sintasa apuntan hacia fuera (figura L2-6). En 1960, Racker mostró que las esferas pueden removerse y que aisladas *hidrolizan* ATP, es decir, que las esferas tienen actividad de ATPasa (llamada F<sub>1</sub>; figura L2-7). Las vesículas submitocondriales desprovistas de la F<sub>1</sub>, pueden todavía transportar electrones a lo largo de la cadena de transporte de electrones, pero están imposibilitadas para sintetizar ATP. Estas vesículas submitocondriales sin F<sub>1</sub> contienen la otra parte importante de la ATP sintasa, llamada F<sub>0</sub> (factor de acoplamiento 0), la cual está embebida en la membrana mitocondrial interna (figura L2-7). Como está compuesta por estas dos partes principales, la ATP sintasa también se conoce como **F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPasa**. El complejo completo aprovecha la energía liberada por el transporte de electrones para dirigir la síntesis de ATP, mientras que sola, sin el acoplamiento al transporte de electrones, el componente F<sub>1</sub> hidroliza ATP.

La F<sub>1</sub> ATPasa consiste de cinco tipos de proteínas con la siguiente proporción: 3 α, 3 β, 1 γ, 1 δ, 1 ε. Las seis subunidades α y β están ordenadas de manera alternada en un anillo, con un tallo central formado por las subunidades γ y ε (figura L2-7). La F<sub>0</sub> consiste de un anillo de 10 a 14 **subunidades c** embebidas en la membrana mitocondrial interna. Ésta contacta con una **subunidad a** que se enlaza a dos **subunidades b** y a la única subunidad δ para formar una columna larga que se conecta a la cabeza de la porción F<sub>1</sub> de la ATPasa (figura L2-7). La estructura total de la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPasa es un motor molecular extraordinario. Durante la síntesis de ATP, los protones fluyen a través de un canal creado en la interfaz entre la subunidad **a** y las subunidades **c**, lo que determina que el anillo de la subunidad **c** gire respecto a la subunidad estática **a**. Por lo tanto, el anillo **c** actúa como la parte móvil o “rotor” y la subunidad **a** como un “estator”. A



**Figura L2-6.** La ruptura sónica (sonicación) de la mitocondria produce vesículas submitocondriales.

medida que el anillo de la subunidad **c** rota, hace girar el tallo de la subunidad  $\gamma\epsilon$ , el cual por lo tanto gira rápidamente dentro del anillo  $\alpha\beta$ . El anillo  $\alpha\beta$  no puede rotar porque es mantenido en su lugar por el brazo de las dos subunidades **b** y la subunidad  $\delta$  (figura L2-7).

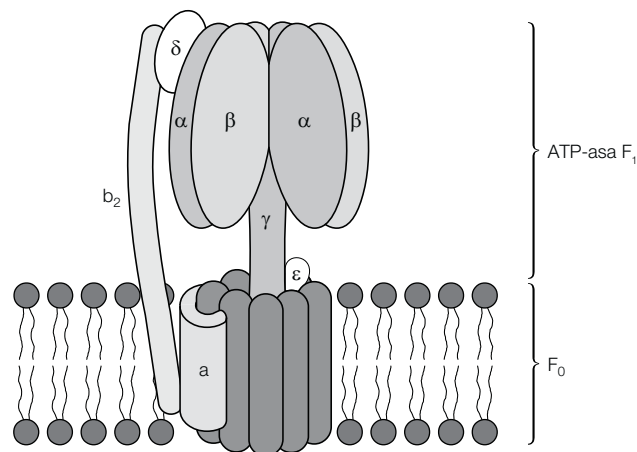
Las tres subunidades  $\beta$  del anillo  $\alpha\beta$  pueden unir ADP y fosfato inorgánico. A medida que la subunidad  $\gamma$  rota dentro del anillo  $\alpha\beta$ , la energía mecánica se usa para dirigir la síntesis de ATP; se sintetizan tres moléculas de ATP por cada  $360^\circ$  de rotación de la subunidad  $\gamma$  (lo cual equivale a ¡más de 1 000 moléculas por segundo!).

¿Cómo se hace el ATP? Experimentos de intercambio isotópico mostraron que el ATP es formado por la ATP sintasa incluso en ausencia de la fuerza protón motriz, pero el ATP no abandona a la enzima a menos que los protones fluyan a través de ella. Paul Boyer propuso el **mecanismo de unión y cambio**, el cual explica esta observación. En esencia, a medida que la subunidad  $\gamma$  rota, ese giro se transmite hacia las tres subunidades  $\beta$ , la conformación de la proteína en los sitios de unión de

nucleótidos de cada una de las subunidades  $\beta$  cambia y pasa a través de tres estados diferentes, los cuales son unión de ADP y  $P_i$ , síntesis de ATP y luego liberación del ATP. De este modo, la energía mecánica de la rotación de la subunidad  $\gamma$  dirige la interconversión de estos tres diferentes estados en los cuales el ATP no sólo es sintetizado sino que también es liberado de la enzima.

### Flujo de ATP y ADP a través de la membrana mitocondrial interna

Las grandes cantidades de ATP sintetizado dentro de las mitocondrias necesitan salir hacia el citoplasma para ser usadas en numerosas reacciones celulares y el ADP necesita ingresar en la matriz mitocondrial para ser fosforilado. Pese a ello, ninguna molécula puede difundirse a través de la membrana. Su paso a través de esta barrera es posible gracias a una muy abundante proteína de transporte, la **translocasa de ATP-ADP**, que está situada en la membrana mitocondrial interna. Ésta puede unir ATP o ADP y mirar de manera alternativa hacia el lado



**Figura L2-7.** Representación esquemática del complejo de la ATP sintasa.

matricial o citoplásmico de la membrana interna; une un ADP en el lado citoplásmico y luego lo libera en el lado matricial, donde une un ATP y lo libera en el lado citoplásmico. Resulta crucial que por cada ATP que salga ingrese un ADP y viceversa.

El otro componente requerido para la síntesis del ATP dentro de la matriz es por supuesto el  $P_i$ . Éste ingresa por medio de un **transportador de fosfato** en intercambio por un  $\text{OH}^-$  que sale. En combinación, la translocasa de ATP-ADP y el transportador de fosfato permiten que un ADP y un  $P_i$  ingresen en intercambio por un ATP y un  $\text{OH}^-$  que abandonan la mitocondria (al costo de un  $\text{H}^+$  que ingresa). Estas dos proteínas transportadoras en asociación con la ATP sintasa forman un gran complejo llamado el **sintasoma de ATP**.

### Producción de ATP

El número exacto de moléculas de ATP generadas por la oxidación del NADH y  $\text{FADH}_2$  ha sido sujeto de debate en años recientes debido a que su cálculo depende de la estequiometría del bombeo de protones.

Datos actuales sugieren que la NADH-Q oxidorreductasa, la Q-citocromo *c* oxidorreductasa y la citocromo *c* oxidasa bombean a través de la membrana mitocondrial interna y fuera de la matriz 4, 2 y 4 electrones, respectivamente. Alrededor de tres protones que fluyen a través de la ATP sintasa son suficientes para generar una molécula de ATP y es necesario un protón adicional para transportar el ATP desde la matriz mitocondrial hacia el citoplasma (véase antes). De esta manera, una molécula de NADH reoxidada por la cadena de transporte de electrones determina que ésta conduzca alrededor de 10 protones a través de la membrana mitocondrial interna y se requieren alrededor de cuatro protones para sintetizar una molécula de ATP; en otras palabras, se sintetizan cerca de 2.5 moléculas de ATP (10/4) por cada NADH reoxidado. En el caso de la oxidación del  $\text{FADH}_2$ , el producto es de alrededor de 1.5 moléculas de ATP (6/4).

### Acoplamiento y control respiratorio

De manera habitual, el transporte de electrones está estrechamente **acoplado** a la síntesis del ATP (es decir, que los electrones no fluyen a través de la cadena de transporte de electrones hacia el oxígeno a menos que el ADP sea simultáneamente fosforilado a ATP). Con toda claridad, también se deduce que el ATP no se sintetiza a menos que ocurra el transporte de electrones para proveer el gradiente de protones. Entonces, la fosforilación oxidativa necesita NADH o  $\text{FADH}_2$ , oxígeno, ADP y fosfato inorgánico. La tasa real de fosforilación oxidativa depende de la disponibilidad de ADP. Si se añade ADP a las mitocondrias, la tasa de consumo de oxígeno aumenta a medida que el flujo de electrones recorre la cadena y por lo tanto la tasa de utilización de oxígeno cae cuando todo el ADP ha sido fosforilado a ATP, un proceso denominado

**control respiratorio**. Este mecanismo asegura que el flujo de electrones a lo largo de la cadena sólo se produce cuando se necesita sintetizar ATP. Si el nivel de ATP es alto y el de ADP es bajo, no se produce transporte de electrones, la acumulación de NADH y  $\text{FADH}_2$ , así como el exceso de citrato inhiben el ciclo del ácido cítrico (sección L1) y la glucólisis (sección J3).

### Desacoplantes

Algunas sustancias químicas, como el 2,4-dinitrofenol (DNP), actúan como **agentes desacoplantes**, esto es, cuando se añaden a las células, detienen la síntesis de ATP mientras el transporte de electrones continúa y por lo tanto se consume oxígeno. La razón es que el DNP y otros agentes desacoplantes son pequeñas moléculas liposolubles que se unen a los  $\text{H}^+$  y los transportan a través de las membranas (es decir, son **ionóforos para los  $\text{H}^+$** ). El transporte de electrones tiene lugar y bombea hacia fuera los protones a través de la membrana mitocondrial interna, pero el DNP en la misma membrana transporta los  $\text{H}^+$  de regreso hacia la mitocondria, lo que evita la formación de un gradiente de protones. Como no se forma un gradiente de protones, es imposible que se produzca ATP por fosforilación oxidativa. En su lugar, la energía derivada del transporte de electrones se libera como calor.

La producción de calor por desacoplamiento se llama **termogénesis**. Es importante en ciertas situaciones biológicas. Por ejemplo, el desacoplamiento se presenta de manera natural en el tejido adiposo pardo. Este tejido es rico en mitocondrias, cuya membrana mitocondrial interna contiene una proteína llamada **termogenina** (o **proteína desacoplante**). La termogenina permite que los  $\text{H}^+$  fluyan de regreso hacia las mitocondrias sin tener que hacerlo a través de la ATP sintasa y de ese modo desacopla el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, lo que genera calor. La importancia de este fenómeno natural es que el tejido adiposo pardo se encuentra en áreas corporales sensibles de algunos animales neonatos (incluidos los seres humanos), donde la producción de calor suministra protección frente a un ambiente frío. Igualmente, la termogénesis del tejido adiposo pardo desempeña un papel en el mantenimiento de la temperatura corporal en los animales que hibernan.

### Reoxidación del NADH citosólico

La membrana mitocondrial interna es impermeable al NADH. En consecuencia, el NADH que se produce en el citoplasma durante la glucólisis debe reoxidarse a través de una **lanzadera de membrana**, una combinación de reacciones enzimáticas que superan la impermeabilidad de esta barrera. La figura L2-8 muestra la **lanzadera del glicerol 3-fosfato**. La dihidroxiacetona fosfato del citosol es reducida a glicerol 3-fosfato y el NADH oxidado a  $\text{NAD}^+$  por acción de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa

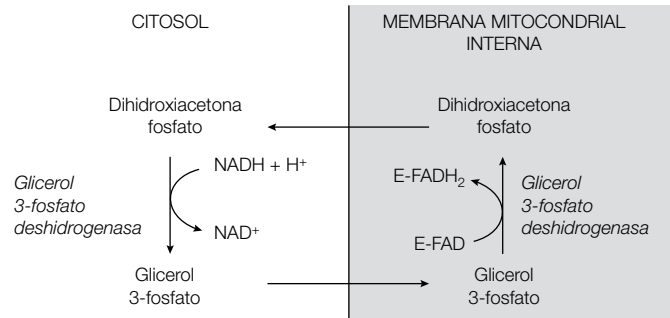


Figura L2-8. Lanzadera de glicerol 3-fosfato.

citoplásmica. El glicerol 3-fosfato se difunde a través de la membrana mitocondrial interna, donde la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (una proteína transmembranal de la membrana mitocondrial interna) lo vuelve a convertir en dihidroxiacetona fosfato. Acto seguido, la dihidroxiacetona fosfato se difunde de regreso hacia el citosol. La deshidrogenasa de glicerol 3-fosfato mitocondrial no usa  $\text{NAD}^+$  y en su lugar recurre al  $\text{FAD}$ . El  $\text{FADH}_2$  unido a la enzima ( $\text{E-FADH}_2$ ) es reoxidado por transferencia de sus electrones a la ubiquinona en la misma membrana mitocondrial interna (véase antes). Nótese que la lanzadera no permite que el  $\text{NADH}$  citoplásmico ingrese en la mitocondria, pero es una estrategia que permite transportar de manera efectiva los dos electrones del  $\text{NADH}$  a la mitocondria y alimenta con éstos la cadena de transporte de electrones. Como en realidad los electrones del  $\text{NADH}$  citoplásmico ingresan en la cadena de transporte de electrones desde el  $\text{FADH}_2$ , sólo se sintetiza alrededor de 1.5 en lugar de los cerca de 2.5 ATP que produce cada  $\text{NADH}$  que se producen dentro de la

mitocondria a partir del ciclo del ácido cítrico (sección L1) y de la oxidación de los ácidos grasos (sección K2).

Una lanzadera similar, la **lanzadera de malato-aspartato**, actúa en el corazón y el hígado (figura L2-9). El oxalacetato del citosol se convierte en malato por acción de la malato deshidrogenasa citoplásmica, en el proceso reoxida el  $\text{NADH}$  a  $\text{NAD}^+$ . El malato ingresa en la mitocondria a través del **transportador de malato- $\alpha$ -cetoglutarato** localizado en la membrana mitocondrial interna. En la matriz, el malato es reoxidado a oxalacetato por el  $\text{NAD}^+$  para formar  $\text{NADH}$ . El oxalacetato no cruza con facilidad la membrana mitocondrial interna y por ello es transaminado para formar aspartato, el cual abandona la mitocondria y es reconvertido en oxalacetato en el citosol, otra vez por transaminación. El resultado neto de este ciclo de reacciones es transferir los electrones del  $\text{NADH}$  del citosol al  $\text{NADH}$  de la matriz mitocondrial, el cual es reoxidado por la cadena de transporte de electrones.

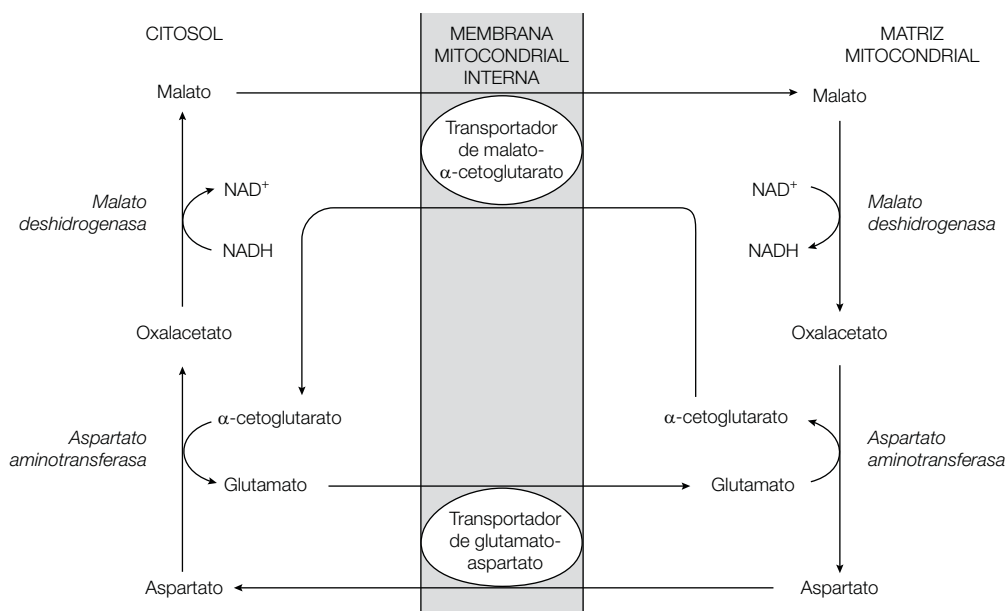


Figura L2-9. La lanzadera de malato-aspartato.



# L3 Fotosíntesis

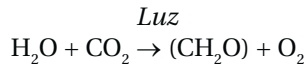
## Notas clave

|  |   |
|--|---|
| <b>Descripción</b>   | La fotosíntesis usa la energía solar para sintetizar carbohidratos a partir de dióxido de carbono y agua. En las reacciones dependientes de la luz ( <i>light reactions</i> ), la energía luminosa dirige la síntesis de NADPH y ATP. En las reacciones independientes de la luz (reacciones de fijación de carbono; <i>dark reactions</i> ), el NADPH y el ATP se usan para sintetizar carbohidratos a partir de la fijación de CO <sub>2</sub> y H <sub>2</sub> O.  |
| <b>Localización</b>  | En las plantas superiores (o de hojas verdes) y en las algas, la fotosíntesis tiene lugar en los cloroplastos. Las reacciones dependientes de la luz ocurren en las membranas de los tilacoides y las reacciones independientes de la luz tienen lugar en el estroma. En las bacterias fotosintéticas, las reacciones luminosas tienen lugar en la membrana plasmática bacteriana o en invaginaciones de ésta (cromatóforos).   |
| <b>Aprovechamiento de la luz en las plantas superiores</b> | La luz solar es absorbida por moléculas de clorofila, cada una de las cuales es una magnesio porfirina. Pigmentos accesorios, como los carotenoides, absorben luz en otras longitudes de onda y de esa manera maximizan la absorción de la luz. Los pigmentos están ordenados en fotosistemas, cada uno de los cuales consiste en un complejo antena y un centro de reacción fotosintético. Un complejo antena tiene varios cientos de moléculas de clorofila y pigmentos accesorios ensamblados juntos en la membrana tilacoidal. La absorción de un fotón por una molécula de clorofila eleva a un electrón a un orbital de energía más alto. La clorofila excitada puede pasar su energía extra a otra molécula de clorofila del complejo por transferencia de un excitón. La energía es canalizada hacia dos moléculas de clorofila especiales en el centro de reacción fotosintético.  |
| <b>Fotosistemas I y II</b>                                 | Las plantas de hojas verdes y las algas usan dos tipos de fotosistemas: el fotosistema I, con clorofila P700 en su centro de reacción, y el fotosistema II, con clorofila P680 en su centro de reacción. Los dos fotosistemas se enlazan a una cadena de transportadores de electrones. Cuando se disponen en el orden de sus potenciales redox, los componentes forman el llamado esquema Z. La luz excita al P680 del fotosistema II y lo lleva a un estado excitado P680*. El P680* excitado pasa un electrón de alta energía a la feofitina (clorofila sin el centro de magnesio) y se oxida a P680 <sup>+</sup> . Ésta acepta un electrón del agua y regresa al estado basal. En general, la remoción de cuatro electrones de dos moléculas de agua genera cuatro H <sup>+</sup> y una molécula de O <sub>2</sub> . Los electrones de alta energía aceptados por la feofitina se pasan en orden a la plastoquinona (Q), el complejo citocromo <i>bf</i> (también llamado complejo del citocromo <i>b<sub>6</sub>f</i> ) y a la plastocianina. La luz excita al P700 del fotosistema I a P700*. El P700* excitado pasa un electrón de alta energía a la ferredoxina y sufre una oxidación quedando como P700 <sup>+</sup> . El P700 <sup>+</sup> acepta un electrón procedente de la plastocianina y recupera el estado basal. Para finalizar, dos electrones de dos moléculas de ferredoxina reducida se transfieren al NADP <sup>+</sup> para formar NADPH. |
| <b>Fotofosforilación no cíclica</b>                        | El complejo del citocromo <i>bf</i> es una bomba de protones y, durante el transporte de electrones, bombea H <sup>+</sup> desde el estroma hacia el espacio tilacoidal, lo que genera un gradiente de H <sup>+</sup> . Los iones H <sup>+</sup> también se liberan dentro del espacio tilacoidal cuando el fotosistema II oxida agua para producir oxígeno, mientras que los iones H <sup>+</sup> usados para reducir NADP <sup>+</sup> a NADPH son tomados del estroma. Ambos efectos contribuyen a generar el gradiente de H <sup>+</sup> . El gradiente de protones dirige la síntesis de ATP a través de una ATP sintasa que se localiza en la   |

|  |  |
|--|--|
|  | <p>membrana del tilacoide (fotofosforilación). Como el transporte de electrones incluye una disposición lineal de los transportadores de electrones, el sistema se llama fotofosforilación no cíclica.</p>   |
| <b>Fotofosforilación cíclica</b>           | <p>Cuando hay poco <math>\text{NADP}^+</math> disponible para aceptar electrones, se usa una vía alternativa de transporte de electrones. Los electrones de alta energía donados por el fotosistema I pasan a la ferredoxina, después al complejo del citocromo <i>bf</i>, luego a la plastocianina y por último regresan a la P700 del fotosistema I. El gradiente de protones resultante generado por el complejo del citocromo <i>bf</i> dirige la síntesis del <math>\text{ATP}</math> (fotofosforilación cíclica), pero no se produce <math>\text{NADPH}</math> ni tampoco <math>\text{O}_2</math>.</p>   |
| <b>Fotosíntesis bacteriana</b>             | <p>Las cianobacterias utilizan dos fotosistemas como las plantas de hojas verdes. La bacteria fotosintética púrpura, <i>Rhodospirillum rubrum</i>, sólo tiene un fotosistema con un centro de reacción fotosintético. Éste puede llevar a cabo el transporte de electrones cíclico y sintetizar <math>\text{ATP}</math> (fotofosforilación cíclica). De manera alternativa, puede utilizarse un transporte de electrones no cíclico que produce <math>\text{NADH}</math>. El ácido sulfhídrico (<math>\text{H}_2\text{S}</math>) puede actuar como un donador de electrones, lo que genera azufre (S). El gas hidrógeno (<math>\text{H}_2</math>) y una variedad de compuestos orgánicos también pueden usarse como donadores de electrones. Al no usar el agua como donador de electrones no se produce oxígeno.</p>  |
| <b>Reacciones independientes de la luz</b> | <p>Las reacciones que no dependen de la luz (reacciones de fijación de carbono) usan el <math>\text{ATP}</math> y el <math>\text{NADPH}</math> producido por las reacciones luminosas para fijar dióxido de carbono y sintetizar los carbohidratos sacarosa y almidón. Las reacciones forman un ciclo (llamado ciclo de Calvin), en el cual la enzima ribulosa bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco), localizada en el estroma, condensa una molécula de dióxido de carbono con la ribulosa 1,5-bisfosfato para producir dos moléculas de 3-fosfoglicerato. Otras reacciones regeneran luego la ribulosa 1,5-bisfosfato. La fijación de tres moléculas de <math>\text{CO}_2</math> requiere seis <math>\text{NADPH}</math> y nueve <math>\text{ATP}</math> y conduce a la producción neta de una molécula de gliceraldehído 3-fosfato. Para la síntesis de sacarosa, el gliceraldehído 3-fosfato sale hacia el citosol y es convertido en fructosa 6-fosfato y glucosa 1-fosfato. Esta última es convertida en <math>\text{UDP-glucosa}</math>, que reacciona con la fructosa 6-fosfato para formar sacarosa 6-fosfato. La hidrólisis de la sacarosa 6-fosfato produce sacarosa. El gliceraldehído 3-fosfato procedente del ciclo de Calvin también se utiliza para sintetizar glucosa 1-fosfato, la cual genera <math>\text{ADP-glucosa}</math>, <math>\text{CDP-glucosa}</math> o <math>\text{GDP-glucosa}</math> como precursores para la síntesis de almidón.</p> |
| <b>Vía C4</b>                              | <p>Cuando la concentración de <math>\text{CO}_2</math> es baja, la rubisco puede agregar <math>\text{O}_2</math> a la ribulosa 1,5-bisfosfato (actividad de oxigenasa) en lugar del <math>\text{CO}_2</math> (actividad de carboxilasa) para producir 2-fosfoglicolato y 3-fosfoglicerato. El metabolismo del fosfoglicolato libera <math>\text{CO}_2</math> y <math>\text{NH}_4^+</math> y gasta energía. El consumo de <math>\text{O}_2</math> con liberación de <math>\text{CO}_2</math> se llama fotorrespiración. Las plantas de climas calientes cierran sus estomas para reducir la pérdida de agua. Esto causa una caída en la concentración de <math>\text{CO}_2</math> en la hoja y favorece la fotorrespiración. Para evitar este problema, estas plantas llevan a cabo el ciclo de Calvin sólo en las células de la vaina, que están protegidas del <math>\text{O}_2</math> del aire por las células del mesófilo. El <math>\text{CO}_2</math> es transportado desde la vía aérea de las células mesófilas hacia las células de la vaina mediante su combinación con tres moléculas de carbono (C3) para producir cuatro moléculas de carbono (C4). Esta vía del C4 asegura una concentración alta de <math>\text{CO}_2</math> para la fijación del carbono por la rubisco en las células de la vaina.</p>   |
| <b>Temas relacionados</b>                  | <p>(A2) Células eucariotas<br/>(L2) Transporte de electrones y fosforilación oxidativa<br/>(M4) Hemos y clorofilas</p>   |

## Descripción

La fotosíntesis ocurre en las plantas superiores, algas y bacterias fotosintéticas. Su papel es atrapar la energía solar y usarla para dirigir la síntesis de carbohidratos a partir de dióxido de carbono y agua. Si se usa (CH<sub>2</sub>O) para representar a los carbohidratos, la reacción general es:



Las reacciones de la fotosíntesis ocurren en dos fases:

- **Reacciones de la fase luminosa o dependientes de la luz:** las cuales usan la energía luminosa para sintetizar NADPH y ATP.
- **Reacciones de la fase oscura o independientes de la luz:** que usan NADPH y ATP para sintetizar carbohidratos a partir de la fijación de CO<sub>2</sub>. De hecho, el término “reacciones en la oscuridad” es un nombre erróneo; estas **reacciones de fijación de carbonos** deberían llamarse en realidad reacciones independientes de la luz.

## Localización

En las plantas superiores y las algas, la fotosíntesis tiene lugar en los cloroplastos (sección A2). En forma similar a una mitocondria, un cloroplasto tiene una **membrana externa** muy permeable y una **membrana interna** que es impermeable a la mayoría de las moléculas y iones. Dentro de cada cloroplasto está el **estroma**, que contiene enzimas solubles (análogas a las de la matriz de una mitocondria). Sin embargo, en tanto que la membrana interna de una mitocondria contiene la cadena de transporte de electrones y la ATP sintasa (sección L2), en un cloroplasto éstas se localizan, junto a sistemas fotosintéticos que absorben luz, membranas aplanadas apiladas dentro del estroma llamadas **tilacoides** (sección A2). Por lo tanto, los eventos primarios de atrapamiento de la energía solar en la fotosíntesis, las reacciones luminosas, se producen en las membranas de los tilacoides. Las reacciones en la oscuridad tienen lugar en el estroma. En las bacterias fotosintéticas, las reacciones luminosas se producen en la membrana plasmática bacteriana, o en invaginaciones de la misma llamadas **cromatóforos**.

## Aprovechamiento de la luz en las plantas superiores

La luz solar es absorbida por moléculas de **clorofila**. La **clorofila** es una porfirina en la cual los átomos de nitrógeno están coordinados con un ion de magnesio (sección M4, figura M4-1) (es decir, es una **magnesio porfirina**). Esto contrasta con un hemo, en el cual los átomos de nitrógeno están coordinados con un átomo de hierro para formar una hierro porfirina (secciones L2 y M4). Las plantas superiores contienen dos tipos de moléculas de clorofila, la **clorofila a** y la **clorofila b**, que difieren ligeramente en su estructura y en la longitud de onda de la luz que pueden absorber. Aunque la luz es atrapada

por las moléculas de **clorofila** en forma directa, también existen numerosos **pigmentos accesorios** que absorben luz y pasan la energía de excitación a las moléculas de clorofila. Por consiguiente, los **carotenoides** son pigmentos accesorios importantes en las plantas de hojas verdes, mientras que las **ficobilinas** son pigmentos accesorios de las bacterias fotosintéticas. Estos pigmentos absorben la luz a longitudes de onda diferentes que las de la clorofila y por eso actúan juntos para maximizar la luz cosechada.

Cuando una molécula de clorofila es excitada por un quantum de luz (un **fotón**), un electrón se excita y se proyecta hacia un orbital de energía más alto. La clorofila excitada puede pasar su energía extra a la molécula de clorofila vecina por **transferencia del excitón** (también llamada **transferencia de energía de resonancia**) y así regresar al estado de reposo o basal. En forma alternativa, el electrón de alta energía puede donarse, por lo que la clorofila acepta un electrón de baja energía de otras fuentes.

La captura de la energía solar se produce en los **fotosistemas**. Cada fotosistema consiste en un **complejo de antena** y en un **centro de reacción fotosintético**. El complejo antena está compuesto de varios cientos de moléculas de clorofila y de pigmentos accesorios agrupados juntos en la membrana tilacoidal. Cuando una molécula de clorofila en el complejo antena absorbe luz y se excita, la energía se transfiere mediante un excitón, de molécula en molécula, hasta que al final es canalizada hacia dos moléculas de clorofila especiales en el centro de reacción fotosintético. El centro de reacción pasa la energía como un electrón de alta energía a una cadena de transportadores de electrones de la membrana tilacoidal (véase más adelante).

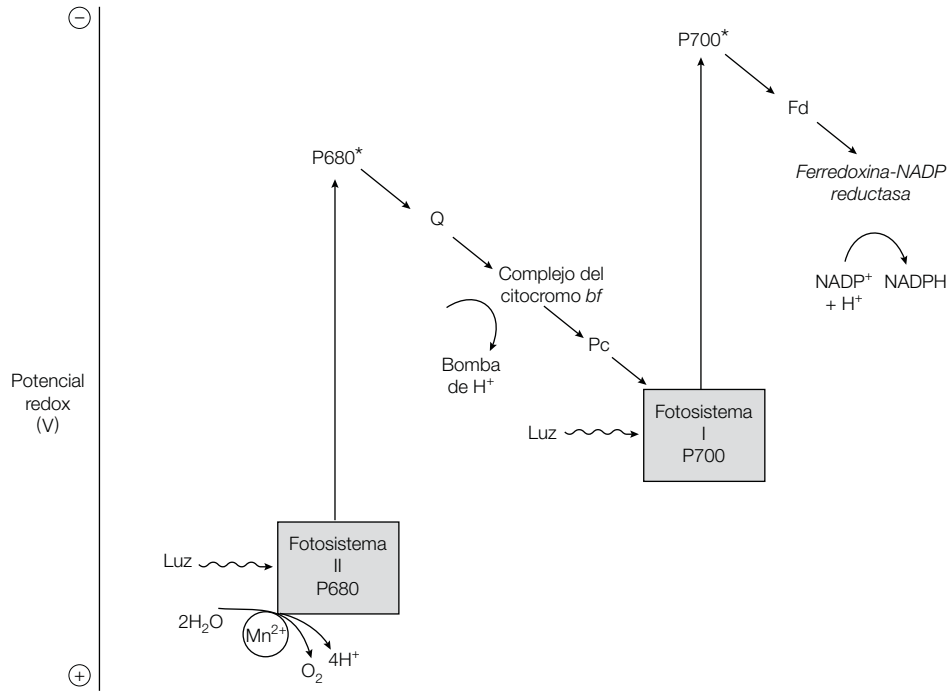
## Fotosistemas I y II

Las plantas superiores y las algas usan dos tipos de fotosistemas llamados **fotosistema I (PSI)** y **fotosistema II (PSII)**. La clorofila del centro de reacción del PSI tiene una absorción máxima a 700 nm y por eso recibe el nombre de **P700** (P por pigmento) y la clorofila del centro de reacción del PSII presenta una absorción máxima a 680 nm y por eso recibe el nombre de **P680**.

Los dos fotosistemas están unidos por otros transportadores de electrones, en particular al complejo de citocromo *bf*. Cuando se ordenan de acuerdo con sus potenciales redox (sección L2), los diversos componentes forman el llamado **esquema Z** (figura L3-1) debido a que la forma general del diagrama redox se ve como una Z.

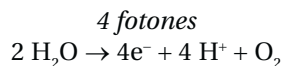
La secuencia de reacciones producidas durante la absorción de la luz (figura L3-1) es como sigue:

1. La luz es cosechada por el complejo antena por las clorofilas del PSII y la energía se canaliza hacia el centro de reacción en donde se localiza el P680.



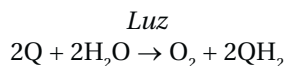
**Figura L3-1.** Esquema Z de la fotosíntesis no cíclica en las plantas de hojas verdes. Nótese que las flechas del diagrama representan la secuencia de eventos durante la fotosíntesis, como se describe en el texto, y no son interconversiones metabólicas.

- El P680 excitado (P680\*) emite un electrón de alta energía que pasa a la **plastoquinona (Q)**, una quinona móvil de la membrana tilacoide que tiene una estructura similar a la ubiquinona de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (sección L2). Esto deja a P680 como un catión **P680+**. La plastoquinona se reduce al aceptar un total de dos electrones y dos iones H<sup>+</sup> para formar **plastoquinol (QH<sub>2</sub>)**.
- El P680<sup>+</sup> extrae un electrón del agua, lo que lo devuelve al estado basal. La remoción de cuatro electrones de dos moléculas de agua requiere cuatro cuantos de luz que caen en el PSII y conduce a la producción de cuatro iones H<sup>+</sup> y una molécula de O<sub>2</sub>:



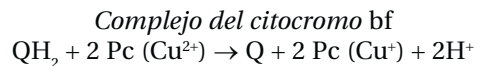
Esta reacción es mediada por un grupo de cuatro iones de manganeso (Mn<sup>2+</sup>) en el PSII.

La reacción general catalizada por el fotosistema II es:



- Luego los electrones se pasan desde QH<sub>2</sub> a través del **complejo del citocromo bf** (también llamado **complejo del citocromo b<sub>6</sub>f**) a la **plastocianina (Pc)**. La Pc es una proteína que contiene cobre y acepta

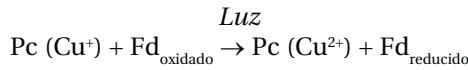
electrones por el cobre que cicla entre los estados Cu<sup>2+</sup> y Cu<sup>+</sup>:



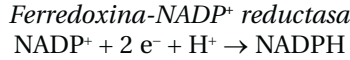
El complejo del citocromo *bf* es análogo al Complejo III de la fosforilación oxidativa (sección L2) y de manera similar la reacción funciona a través del ciclo Q (sección L2) con el plastoquinol y la plastocianina, que en esencia desempeñan los mismos papeles que el ubiquinol y el citocromo *c*. En el paso del Complejo III de la fosforilación oxidativa, los protones son tomados desde la matriz y liberados del lado citoplásmico de la membrana mitocondrial interna, mientras que en el paso del complejo del citocromo *bf* en la fotosíntesis, los protones son tomados del estroma y liberados en el lumen del tilacoide.

- La energía luminosa que llega al complejo antena del PSI se canaliza hacia el centro de reacción. Aquí, el P700 se excita (a P700\*) y emite un electrón de alta energía hacia la **ferredoxina** (una proteína que contiene como mínimo de centros FeS; sección L2) al tiempo que se convierte, en el **catión P700+**. El P700<sup>+</sup> recibe el electrón de la Pc reducida (del paso 4 previo) y de esta manera retorna al estado basal.

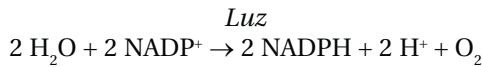
El fotosistema I cataliza la reacción general, como sigue:



6. Dos electrones de alta energía de dos moléculas de ferredoxina reducida se transfieren al  $\text{NADP}^+$  para formar  $\text{NADPH}$ . La **ferredoxina-NADP reductasa** es la encargada de la reacción.



Si se toma en cuenta la secuencia completa del transporte de electrones a través de PSI y PSII, la reacción puede escribirse como sigue, con los electrones que fluyen desde el  $\text{H}_2\text{O}$  hasta el  $\text{NADP}^+$ , reduciéndolo a  $\text{NADPH}$ :



### Fotofosforilación no cíclica

Durante la operación del esquema Z, se crean electrones de alta energía mediante el ingreso de energía a través de los dos fotosistemas, a partir de los cuales los electrones transitan a lo largo de una cadena de transportadores de potencial redox cada vez menor (figura L3-1). Esto es análogo al paso de los electrones a lo largo de la cadena respiratoria en la mitocondria (sección L2).

Como se describió antes, otra similitud es el funcionamiento del complejo del citocromo *bf* es una **bomba de protones** (figura L3-1), que bombea iones  $\text{H}^+$  desde el estroma hacia el espacio tilacoidal (figura L3-2), lo que produce un gradiente de  $\text{H}^+$  durante el transporte de electrones. Debido a la orientación de los diversos componentes del transporte de electrones en la membrana del tilacoide (figura L3-2), los iones  $\text{H}^+$  liberados cuando el PSII oxida al agua para producir oxígeno se liberan en el lumen del tilacoide, mientras que los iones  $\text{H}^+$  usados para reducir el  $\text{NADP}^+$  a  $\text{NADPH}$  por la ferredoxina-NADP reductasa son aceptados en el estroma. De esta manera, estas dos reacciones también contribuyen al gradiente de protones.

El gradiente de protones sustenta la síntesis de  $\text{ATP}$  mediante una  $\text{ATP}$  sintasa que se localiza en la membrana tilacoidal (figura L3-2). Esto lleva por nombre **fotofosforilación** y es análogo al mecanismo de síntesis de  $\text{ATP}$  a través de disipar el gradiente de protones durante la fosforilación oxidativa en las mitocondrias (sección L2).

La diferencia estriba en que los protones se bombean hacia *fuera* en el caso de las mitocondrias, pero *dentro* de un subcompartimiento, el espacio tilacoidal, en el caso de los cloroplastos. Debido a la vía alternativa (“cíclica”) para el transporte de electrones y la síntesis de  $\text{ATP}$  (véase más adelante), la formación de  $\text{ATP}$  a través de la operación conjunta de los PSI y PSII (figura L3-1; el esquema Z) se llama **fotofosforilación no cíclica**.

### Fotofosforilación cíclica

Cuando la relación  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$  es alta y hay poco  $\text{NADP}^+$  disponible para aceptar electrones, se usa una vía de transporte de electrones alternativa que incluye sólo al PSI y unos pocos transportadores de electrones (figura L3-3). Aquí el electrón de alta energía es pasado por la ferredoxina hacia el complejo del citocromo *bf* en lugar de hacerlo hacia el  $\text{NADP}^+$ . De aquí el electrón fluye hacia la plastocianina y regresa otra vez hacia el P700 del PSI. El gradiente de protones resultante generado por el bombeo de  $\text{H}^+$  por el complejo del citocromo *bf* estimula entonces la síntesis de  $\text{ATP}$ . Durante esta **fosforilación cíclica** se forma  $\text{ATP}$  pero no  $\text{NADPH}$ . De manera adicional, dado que el PSII no interviene, no se produce  $\text{O}_2$ .

En resumen, cuando el transporte de electrones opera en un modo no cíclico, a través de PSI y PSII, los productos son  $\text{NADPH}$  y  $\text{ATP}$ . Por el otro lado, en el transporte de electrones cíclico, el único producto es  $\text{ATP}$ .

### Fotosíntesis bacteriana

Las cianobacterias llevan a cabo la fotosíntesis mediante dos fotosistemas, como en las plantas de hojas verdes. No obstante, otras bacterias fotosintéticas, como la **bac-**

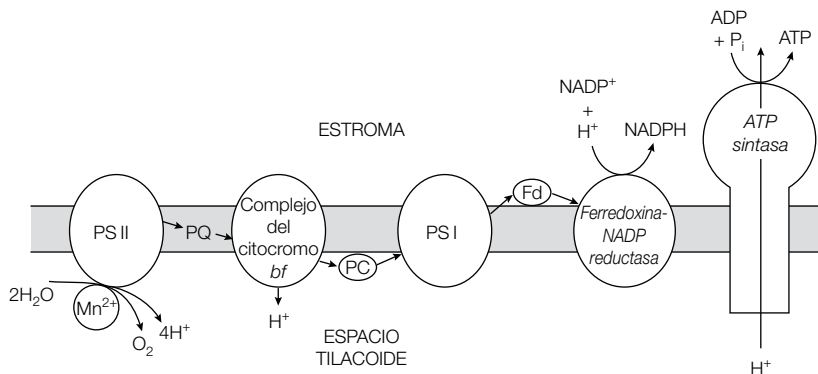


Figura L3-2. Formación del gradiente de protones y síntesis de  $\text{ATP}$ .

**teria púrpura fotosintética** *Rhodospirillum rubrum*, sólo tiene un fotosistema. Éste puede realizar el transporte de electrones cíclico, con el que genera un gradiente de protones y por lo tanto sintetiza ATP (fotofosforilación cíclica).

De manera alternativa, puede recurrir a un patrón de transporte de electrones no cíclico en el cual los electrones de los citocromos pasan al  $\text{NAD}^+$  (en lugar de hacerlo al  $\text{NADP}^+$  como las plantas superiores) para producir  $\text{NADH}$ . El donador de electrones es, por ejemplo, el sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ), el cual genera azufre (S). Ciertas bacterias fotosintéticas también pueden usar el gas hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) y una variedad de compuestos orgánicos como donadores de electrones. Como el  $\text{H}_2\text{O}$  no se usa como donador de electrones, no se produce oxígeno.

### Reacciones de la fase oscura

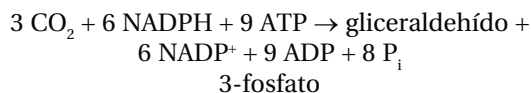
Las reacciones en la fase oscura (también denominadas **reacciones de fijación de carbono**) usan el ATP y el NADPH producidos por las reacciones en la claridad para convertir el dióxido de carbono en carbohidratos. Los productos finales son sacarosa y almidón.

Una extraordinaria enzima llamada **ribulosa bifsosfato carboxilasa/oxigenasa** (con frecuencia se abrevia **rubisco**) cataliza la reacción clave de fijación de carbono, que se localiza en el estroma. La reacción condensa una

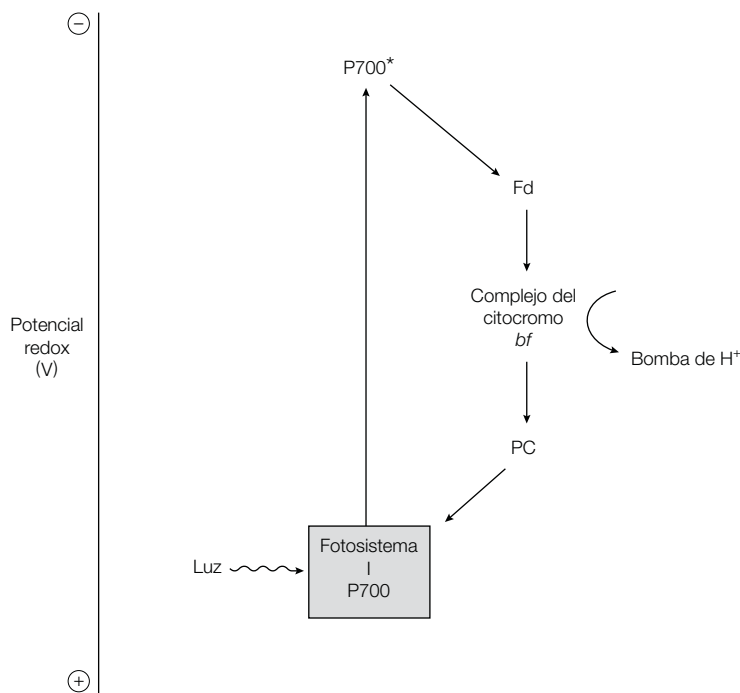
molécula de  $\text{CO}_2$  con la **ribulosa 1,5-bisfosfato** (una molécula de cinco carbonos) para producir un intermediario transitorio de seis carbonos que se hidroliza con rapidez a dos moléculas de 3-fosfoglicerato (figura L3-4).

La rubisco es una enzima muy lenta que fija sólo tres moléculas de su sustrato cada segundo y por lo tanto se necesita una gran cantidad de la enzima por cada planta. De manera típica, la rubisco representa 50% o más de las proteínas totales de un cloroplasto. En efecto, ésta es quizá la proteína más abundante de la Tierra.

La reacción de la rubisco forma parte de un ciclo de reacciones llamado **ciclo de Calvin**, que conduce a la regeneración de la ribulosa 1,5-bisfosfato (lista para fijar otra molécula de  $\text{CO}_2$ ) y a la producción neta de gliceraldehído 3-fosfato para la síntesis de sacarosa y almidón. Deben fijarse tres moléculas de  $\text{CO}_2$  para generar una molécula de gliceraldehído 3-fosfato (una molécula de tres carbonos). La reacción general es:



Las diversas reacciones se muestran en la figura L3-5. A continuación de la formación de seis moléculas de 3-fosfoglicerato, se usan seis ATP y seis NADPH para generar seis moléculas de gliceraldehído 3-fosfato.



**Figura L3-3.** Fotofosforilación cíclica en las plantas superiores. Nótese que las flechas de este diagrama representan la secuencia de sucesos durante la fotosíntesis, como se describe en el texto, y son interconversiones metabólicas.

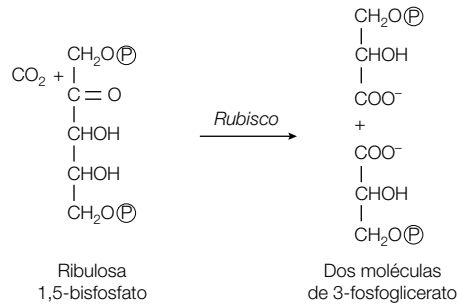


Figura L3-4. Reacción de la rubisco.

Después, sólo se usa una de estas moléculas de gliceraldehído 3-fosfato para formar fructosa 6-fosfato y, al final, almidón. Las otras cinco moléculas de gliceraldehído 3-fosfato se convierten en una serie de pasos (en los que participan la aldolasa, la transcetolasa y otras cinco enzimas diferentes) en tres moléculas de ribulosa 5-fosfato, las cuales luego se fosforilan (mediante tres moléculas de ATP), para formar tres moléculas de ribulosa 1,5-bisfosfato, lista para otra ronda del ciclo. Por lo tanto, una ronda completa del ciclo, donde se aprovechan tres moléculas de CO<sub>2</sub> para formar una molécula de gliceraldehído 3-fosfato, requiere 6 + 3 = 9 ATP y 6 NADPH.

### Síntesis de sacarosa

La mayor parte del gliceraldehído 3-fosfato producido por el ciclo de Calvin en los cloroplastos se exporta hacia el citosol y se utiliza para producir el disacárido sacarosa. Primero, el gliceraldehído 3-fosfato se convierte en fructosa 6-fosfato y glucosa 1-fosfato. Las reacciones químicas que intervienen son en esencia las contrarias a las de la glucólisis (sección J3). A continuación, la glucosa 1-fosfato se convierte en UDP-glucosa, que reacciona con la fructosa 6-fosfato para sintetizar sacarosa 6-fosfato:

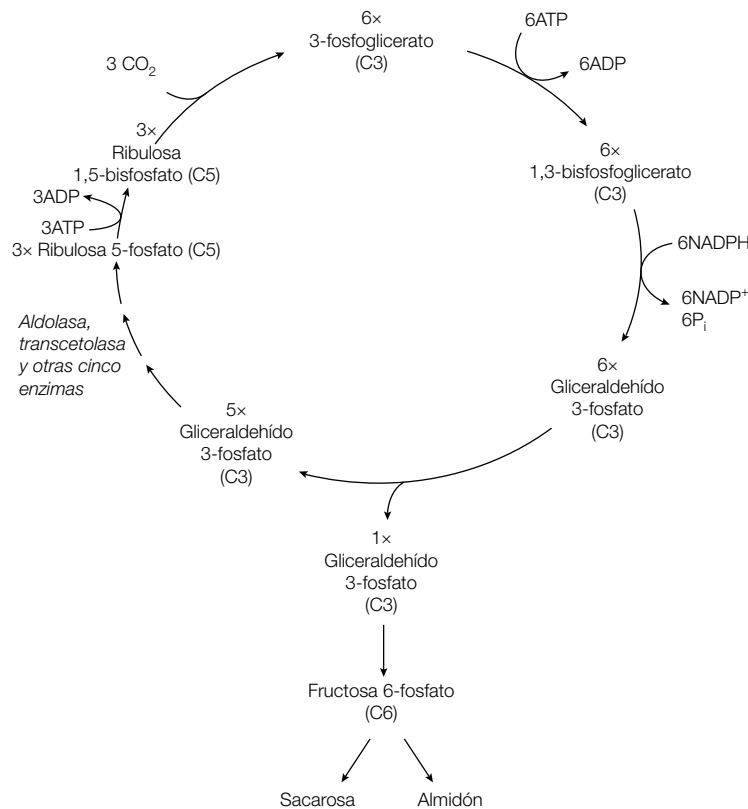
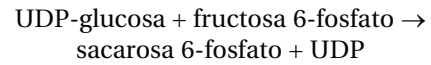


Figura L3-5. Ciclo de Calvin.

La hidrólisis de la sacarosa 6-fosfato produce sacarosa. Éste es el principal azúcar que se transporta entre las células de las plantas superiores, análogo al abastecimiento de glucosa a los tejidos a través de la corriente sanguínea en los animales (sección J4).

### Síntesis de almidón

En tanto que los animales almacenan el exceso de carbohidratos como glucógeno (secciones J2 y J6), las plantas lo hacen en la forma de almidón (sección J2). El almidón se produce en el estroma de los cloroplastos y se almacena como granos de almidón en ese mismo lugar. La síntesis de almidón sucede a partir de ADP-glucosa, CDP-glucosa o GDP-glucosa (pero *no* UDP-glucosa). La vía incluye la conversión de gliceraldehído 3-fosfato (procedente del ciclo de Calvin) en glucosa 1-fosfato, la cual a su vez es usada para sintetizar el azúcar que se utiliza en la síntesis de los diferentes nucleótidos.

### La vía C4

Bajo condiciones atmosféricas normales, la rubisco agrega CO<sub>2</sub> a la ribulosa 1,5-bisfosfato. Pese a ello, cuando la concentración de CO<sub>2</sub> es baja, puede agregar O<sub>2</sub> en su lugar. Esto produce 2-fosfoglucolato y 3-fosfoglicerato. El fosfoglucolato puede conservarse y usarse para reacciones biosintéticas, pero la vía para alcanzarlo libera CO<sub>2</sub> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y disipa energía metabólica. Debido a que el resultado neto de este proceso es consumir O<sub>2</sub> y liberar CO<sub>2</sub>, se conoce como **fotorrespiración**.

Éste representa un problema importante para las plantas en climas cálidos. Las plantas cierran los poros de intercambio de gas de sus hojas (estomas) para conservar el agua, pero esto conduce a una caída en la concentración de CO<sub>2</sub> dentro de la hoja, lo que favorece la fotorrespiración. Además, a medida que la temperatura

se eleva, la actividad de oxigenasa de la rubisco (que usa O<sub>2</sub>) aumenta con mayor rapidez que la actividad de carboxilasa (que usa CO<sub>2</sub>), lo que también favorece la fotorrespiración. Para evitar estos inconvenientes, algunas plantas adaptadas a vivir en climas calientes, como el maíz y la caña de azúcar, desarrollaron un mecanismo para maximizar la actividad de la rubisco carboxilasa. En tales plantas, la fijación del carbono que utiliza el ciclo de Calvin tiene lugar sólo en las **células de la vaina** que están protegidas del aire por las **células del mesófilo**. Como las células de la vaina no se exponen al aire, la concentración de O<sub>2</sub> es baja. El CO<sub>2</sub> se transporta del aire a las células de la vaina a través de las células del mesófilo y se combina con moléculas de tres carbonos (C3) para producir moléculas de cuatro carbonos (C4).

Éstas ingresan en las células de la vaina, donde son degradadas en compuestos de C3 con liberación de CO<sub>2</sub>. Las moléculas de C3 regresan a las células del mesófilo para aceptar más CO<sub>2</sub>.

Este ciclo garantiza una alta concentración de CO<sub>2</sub> para la actividad de carboxilasa de la rubisco en las células de la vaina. Como el ciclo se basa en el transporte de CO<sub>2</sub> a través de moléculas de cuatro carbonos (C4), se denomina **ciclo C4**, y las plantas que disponen del mismo se llaman **plantas C4**. Todas las plantas restantes reciben el nombre de **plantas C3** ya que atrapan el CO<sub>2</sub> de manera directa del compuesto de tres carbonos 3-fosfoglicerato (figura L3-4).

Los detalles de la vía C4 se presentan en la figura L3-6. Los pasos que intervienen son los siguientes:

- En la célula del mesófilo, el fosfoenolpiruvato (C3) acepta CO<sub>2</sub> para formar oxalacetato (C4), una reacción que cataliza la **fosfoenolpiruvato carboxilasa**.
- La malato **deshidrogenasa dependiente de NADP<sup>+</sup>** convierte al oxalacetato en malato (C4).

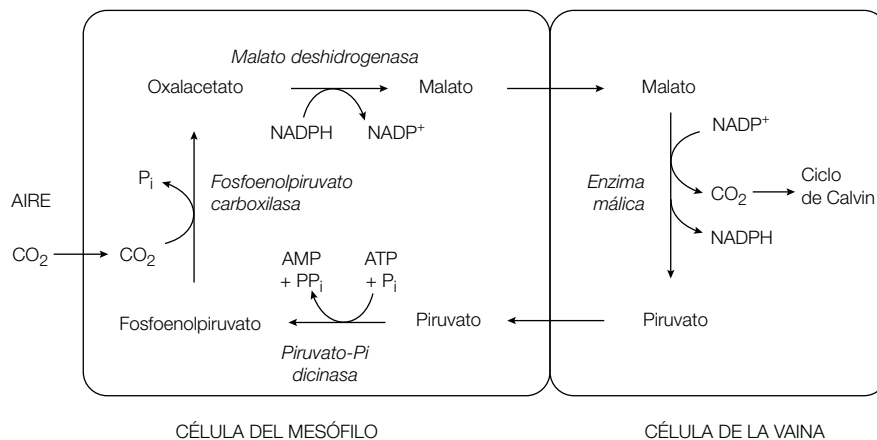
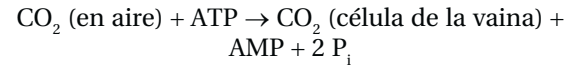


Figura L3-6. Vía del C4.



- El malato ingresa en la célula de la vaina y libera  $\text{CO}_2$  con formación de piruvato (C3); esta reacción es catalizada por la **enzima málica dependiente de  $\text{NADP}^+$** .
- El piruvato regresa a la célula del mesófilo, la que lo usa para regenerar fosfoenolpiruvato. Esta reacción, catalizada por la **piruvato- $\text{P}_i$  dicinasa** es inusual ya que requiere  $\text{ATP}$  y  $\text{P}_i$  y rompe un enlace de alta energía para generar  $\text{AMP}$  y pirofosfato.

El pirofosfato procedente de la piruvato- $\text{P}_i$  dicinasa es degradado con rapidez, de manera que, en general, el precio neto que deben pagar las plantas para que opere esta bomba de  $\text{CO}_2$  es la hidrólisis de dos enlaces de fosfato de alta energía por cada molécula de  $\text{CO}_2$  que transporte:



# M1 Fijación y asimilación del nitrógeno

## Notas clave

|                                  |   |   |
|----------------------------------|---|---|
| <b>Ciclo del nitrógeno</b>       | El ciclo del nitrógeno es el movimiento del nitrógeno a través de la cadena alimentaria a partir de compuestos inorgánicos simples, en primer lugar amoniacó, hasta compuestos orgánicos complejos.   |   |
| <b>Fijación del nitrógeno</b>    | La fijación del nitrógeno es la conversión del gas $N_2$ en amoniaco, un proceso realizado por algunas bacterias del suelo, cianobacterias y las bacterias simbióticas <i>Rhizobium</i> , que invaden los nódulos de las raíces de las plantas leguminosas. El complejo de la nitrogenasa es el responsable de este proceso, que consiste en un reductasa y una nitrogenasa que contiene hierro y molibdeno. Al menos se hidrolizan 16 moléculas de ATP para formar dos moléculas de amoniaco. En <i>Rhizobium</i> , la leghemoglobina se utiliza para proteger a la nitrogenasa de la inactivación por $O_2$ . |   |
| <b>Asimilación del nitrógeno</b> | El amoniaco es asimilado por todos los organismos en compuestos orgánicos que contienen nitrógeno (aminoácidos, nucleótidos, etc.) por la acción de la deshidrogenasa de glutamato (para formar glutamato) y la sintetasa de glutamina (para formar glutamina).   |   |
| <b>Temas relacionados</b>        | (B3) Mioglobina y hemoglobina<br>(L1) Ciclo del ácido cítrico<br>(L2) Transporte de electrones y fosforilación oxidativa  | (L3) Fotosíntesis<br>(M2) Metabolismo de aminoácidos<br>(M4) Hemos y clorofilas |

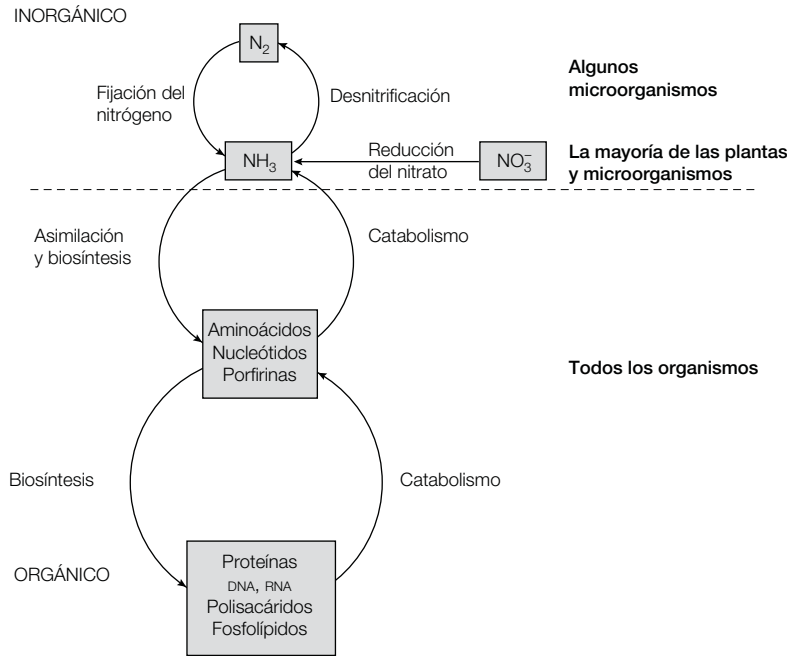
## Ciclo del nitrógeno

El ciclo del nitrógeno se refiere a la circulación de nitrógeno a través de la cadena alimenticia de los organismos vivos (figura M1-1). Este complejo ciclo incluye bacterias, plantas y animales. Todos los organismos pueden convertir el **amoniaco** ( $NH_3$ ) en compuestos orgánicos de nitrógeno, es decir, compuestos que contienen enlaces C-N. Sin embargo, sólo unos pocos microorganismos pueden sintetizar amoniaco a partir del gas nitrógeno ( $N_2$ ). Aunque el gas  $N_2$  constituye alrededor de 80% de la atmósfera de la Tierra, es un compuesto no reactivo desde el punto de vista químico. La primera etapa en el ciclo del nitrógeno es la reducción del gas  $N_2$  en amoniaco, un proceso al que se conoce como **fijación de nitrógeno**. El amoniaco también se puede obtener por reducción del ion nitrato ( $NO_3^-$ ) presentes en el suelo. La mayoría de las plantas y microorganismos son capaces de llevar a cabo la **reducción del nitrato**. El amoniaco que resulta de estos dos procesos puede ser asimilado por todos los organismos. Dentro de la biosfera, existe un equilibrio entre las formas orgánicas e inorgánicas totales de nitrógeno. La conversión de nitrógeno orgánico en inorgánico se produce a través de catabolismo, desnitrificación y decadencia (figura M1-1).

## Fijación de nitrógeno

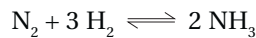
El proceso de conversión del gas  $N_2$  atmosférico en amoniaco (fijación de nitrógeno) lo llevan a cabo sólo unos pocos microorganismos denominados **diazótrofos**. Éstos son algunas de las bacterias del suelo de vida libre como *Klebsiella* y *Azotobacter*, las cianobacterias (algas verdeazules), y las **bacterias simbióticas** (sobre todo *Rhizobium*). Las bacterias simbióticas *Rhizobium* invaden las raíces de las **plantas verdes leguminosas** (plantas pertenecientes a la familia de los chícharos o guisantes; p. ej., los frijoles, el trébol, la alfalfa) y forman **nódulos radiculares** donde se lleva a cabo la fijación del nitrógeno. La cantidad de  $N_2$  que fijan estos microorganismos diazotróficos se estima dentro del orden de  $10^{11}$  kg por año, alrededor de 60% del nitrógeno de la Tierra que acaba de fijarse. Los relámpagos y la radiación ultravioleta fijan otro 15%, y el resto proviene de procesos industriales.

La falta de reactividad química del enlace  $N\equiv N$  se comprueba de forma clara cuando entra en consideración el proceso industrial de la fijación de nitrógeno. Este proceso, ideado por Fritz Haber en 1910 y que aún se utiliza en fábricas de fertilizantes, implica la reducción de  $N_2$  en



**Figura M1-1.** Interrelaciones entre el metabolismo del nitrógeno inorgánico y el orgánico.

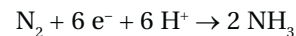
presencia de  $H_2$  gaseoso sobre un catalizador de hierro a una temperatura de  $500\text{ }^\circ\text{C}$  y una presión de  $300\text{ atm}$ ósferas.



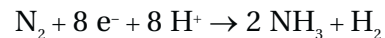
### Complejo de la nitrogenasa

El **complejo de la nitrogenasa** es el encargado de la fijación biológica del nitrógeno, que consta de dos proteínas: una **reductasa**, que proporciona electrones con alto poder reductor, y una **nitrogenasa**, que utiliza estos electrones para reducir el  $N_2$  a  $NH_3$  (figura M1-2). La reductasa es un dímero de  $64\text{ kDa}$  de subunidades idénticas que contiene un grupo hierro-azufre y dos sitios de unión de  $ATP$ . La nitrogenasa es una proteína más grande de  $220\text{ kDa}$ , que se compone de dos subunidades  $\alpha$  y dos

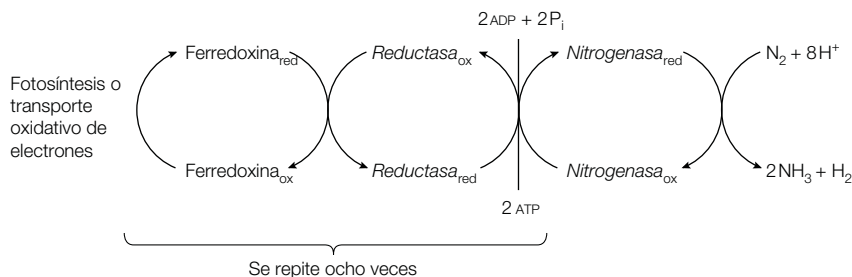
$\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ) y contiene un complejo de hierro-molibdeno. La transferencia de electrones de la proteína reductasa a la proteína nitrogenasa se acopla a la hidrólisis del  $ATP$  por la reductasa. A pesar de que la reducción de  $N_2$  en  $NH_3$  es sólo un proceso de seis electrones:



la reductasa es imperfecta y también se forma  $H_2$ . Por lo tanto, también se requieren dos electrones adicionales:



Los ocho electrones de alto potencial provienen de la **ferredoxina** reducida que se produce en los cloroplastos por acción del fotosistema I o en el transporte de electrones oxidativo (figura M1-2) (secciones L2 y L3). La reacción general de la fijación biológica de nitrógeno:



**Figura M1-2.** Flujo de electrones en la reducción del  $N_2$  catalizada por la nitrogenasa.



# M2 Metabolismo de los aminoácidos

## Notas clave

### Biosíntesis de aminoácidos

Algunos organismos pueden sintetizar los 20 aminoácidos esenciales, mientras que otros no. Los aminoácidos no esenciales son aquellos que pueden sintetizarse, los aminoácidos esenciales tienen que ingerirse en la alimentación. Los 20 aminoácidos esenciales se pueden agrupar en seis familias biosintéticas según el intermediario metabólico del cual deriva su esqueleto de carbono.

### Degradación de aminoácidos

Los aminoácidos se degradan por la eliminación del grupo amino  $\alpha$  y la conversión del esqueleto de carbono que resulta en uno o más intermediarios metabólicos. Los aminoácidos se denominan glucogénicos si sus esqueletos de carbono pueden dar lugar a la síntesis de glucosa, y cetogénicos si pueden dar lugar a los cuerpos cetónicos. Algunos aminoácidos son tanto glucogénicos como cetogénicos.

### Transaminación

Los grupos amino  $\alpha$  se remueven de los aminoácidos mediante un proceso que se denomina transaminación. El aceptor de esta reacción es por lo general el cetoácido  $\alpha$  cetoglutarato  $\alpha$ , lo que resulta en la formación de glutamato y el cetoácido  $\alpha$  que corresponde. La coenzima de todas las transaminasas es el fosfato de piridoxal, que deriva de la vitamina B<sub>6</sub>.

### Desaminación oxidativa del glutamato

El glutamato producto de la transaminación es desaminado por oxidación que lleva a cabo la deshidrogenasa de glutamato para producir amoníaco. Esta enzima es inusual al ser capaz de utilizar NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> y está sujeta a regulación alostérica.

### Oxidasas de aminoácidos

Oxidasas de L-aminoácidos y D-aminoácidos que utilizan FMN o FAD como coenzima, respectivamente, degradan pequeñas cantidades de aminoácidos.

### Metabolismo de la fenilalanina

Primero, la monooxigenasa hidroxilasa de fenilalanina convierte la fenilalanina en tirosina, una reacción en la que interviene la coenzima tetrahidrobiopterina. Por transaminación y una reacción de la dioxigenasa, la tirosina se convierte en homogentisato, que a su vez se metaboliza a fumarato y acetoacetato.

### Errores congénitos del metabolismo

Son trastornos metabólicos hereditarios cuya causa es la ausencia de una enzima de una vía metabólica. La alcaptonuria se debe a la falta de oxidasa de homogentisato y es inofensiva, mientras que la fenilcetonuria, que se debe a la falta de la hidroxilasa de fenilalanina, puede causar retraso mental grave.

### Temas relacionados

- |                                    |   |
|------------------------------------|---|
| (B1) Estructura de los aminoácidos | (L1) Ciclo del ácido cítrico                            |
| (J3) Glucólisis                    | (L2) Transporte de electrones y fosforilación oxidativa |
| (J4) Gluconeogénesis               | (M1) Fijación y asimilación del nitrógeno               |
| (J5) Vía de la pentosa fosfato     | (M3) El ciclo de la urea                                |
| (K2) Degradación de ácidos grasos  |   |
| (K3) Síntesis de ácidos grasos     |   |

## Biosíntesis de aminoácidos

Las plantas y los microorganismos pueden sintetizar los 20 aminoácidos estándar. Los mamíferos, sin embargo, no pueden sintetizar los 20, y deben obtener algunos de ellos en su dieta. Los aminoácidos que se suministran en la alimentación se conocen como **esenciales**, mientras que el resto que el organismo puede sintetizar se denominan **no esenciales**. Esta designación se refiere a las necesidades de un organismo bajo un conjunto particular de condiciones. En los seres humanos, los aminoácidos no esenciales son Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, Pro, Ser y Tyr, mientras que los esenciales son His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp y Val (véase la sección B1 para las estructuras de los 20 aminoácidos estándar). Las vías para la biosíntesis de los aminoácidos son diversas y a menudo varían de un organismo a otro. Sin embargo, todos tienen una característica en común: sus esqueletos de carbono provienen de intermediarios clave de las vías metabólicas centrales (glucólisis, sección J3; ciclo del ácido cítrico, sección L1, o la vía de la pentosa fosfato, sección J5) (figura M2-1). Los aminoácidos se pueden agrupar en seis rutas biosintéticas según el intermediario del cual derivan (figura M2-1). Por lo general, el grupo amino primario proviene de la transaminación del glutamato.

## Degradación de aminoácidos

Ya que no hay espacio para el exceso de aminoácidos, y como las proteínas se recambian de forma constante, los aminoácidos tienen que degradarse de manera continua. El grupo amino  $\alpha$  se elimina primero y el esqueleto de carbono que resulta se convierte en uno o más intermediarios metabólicos principales y se utiliza como combustible metabólico. Los esqueletos de carbono de los 20 aminoácidos estándar se canalizan en sólo siete moléculas: piruvato, acetyl-CoA, acetoacetyl-CoA, cetoglutarato  $\alpha$ , succinil-CoA, fumarato y oxalacetato (figura M2-2). Los aminoácidos que se degradan a piruvato, cetoglutarato  $\alpha$ , succinil-CoA, fumarato y oxalacetato se denominan **glucogénicos**, ya que pueden dar lugar a la síntesis de glucosa. Esto se debe a que los intermediarios del ciclo del ácido cítrico y el piruvato pueden convertirse en fosfoenolpiruvato y luego en glucosa a través de la gluconeogénesis (secciones J4 y L1). En contraste, los aminoácidos que se degradan a acetyl-CoA o acetoacetyl-CoA se denominan **cetogénicos**, ya que dan lugar a los cuerpos cetónicos (sección K2); la acetyl-CoA o la acetoacetyl-CoA también pueden utilizarse para sintetizar lípidos (sección K3). Del conjunto estándar de 20 aminoácidos, sólo Leu y Lys son exclusivamente cetogénicas. Ile, Phe, Trp y Tyr son tanto cetogénicos como glucogénicos ya que algunos de sus átomos de carbono terminan en acetyl-CoA o acetoacetyl-CoA, mientras que otros terminan en precursores de la glucosa. Los 14 aminoácidos restantes se clasifican únicamente como glucogénicos.

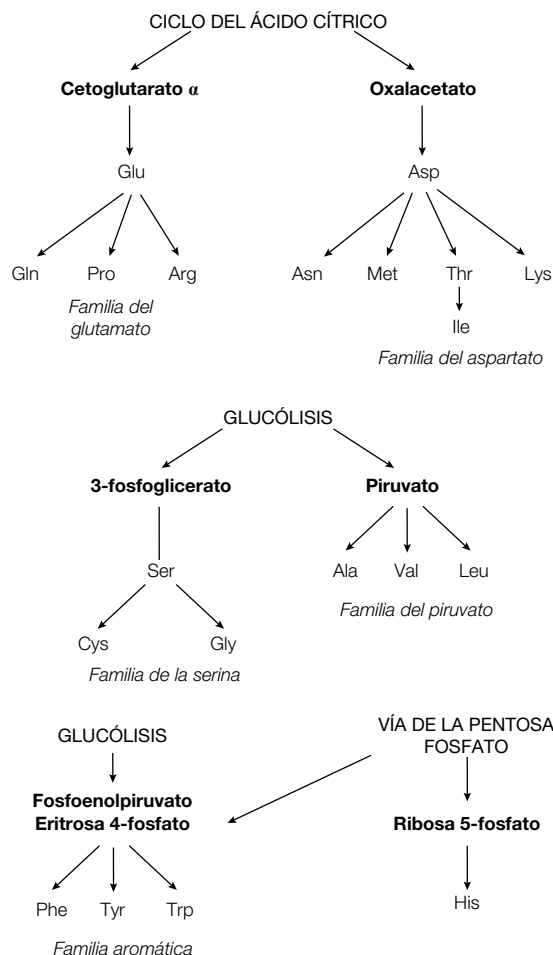
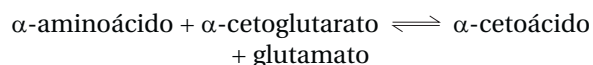


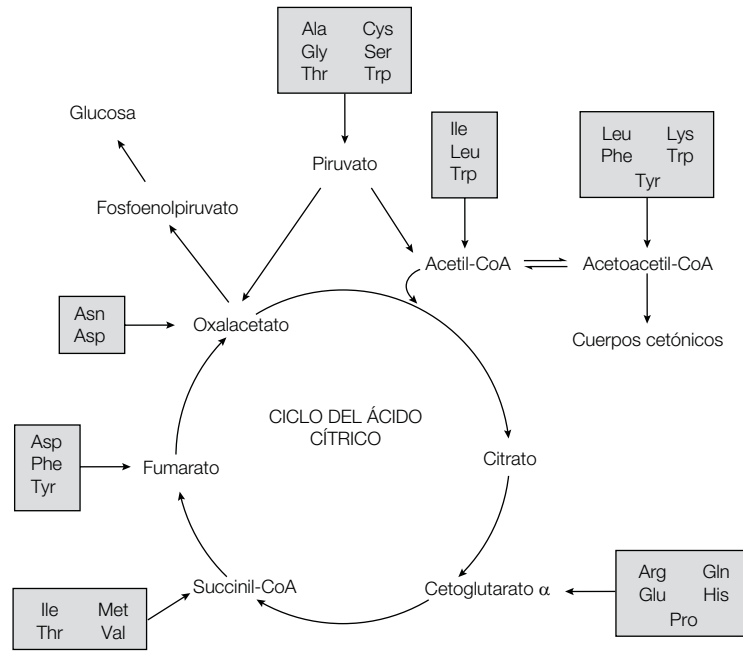
Figura M2-1. Familias biosintéticas de aminoácidos.

## Transaminación

Antes del metabolismo de los esqueletos de carbono en un importante intermediario metabólico, el grupo amino  $\alpha$  del aminoácido tiene que eliminarse primero por un proceso que se denomina **transaminación**. En este proceso, el grupo amino  $\alpha$  de la mayoría de los aminoácidos se transfiere al **cetoglutarato  $\alpha$**  para formar **glutamato** y el cetoácido  $\alpha$  correspondiente:



Las enzimas que catalizan estas reacciones se llaman **transaminasas** (aminotransferasas) y en los mamíferos se encuentran sobre todo en el hígado. Por ejemplo, la transaminasa de aspartato cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al cetoglutarato  $\alpha$  (figura M2-3a), mientras que la transaminasa de alanina cataliza la transferencia del grupo amino de la alanina al cetoglutarato  $\alpha$  (figura M2-3b).



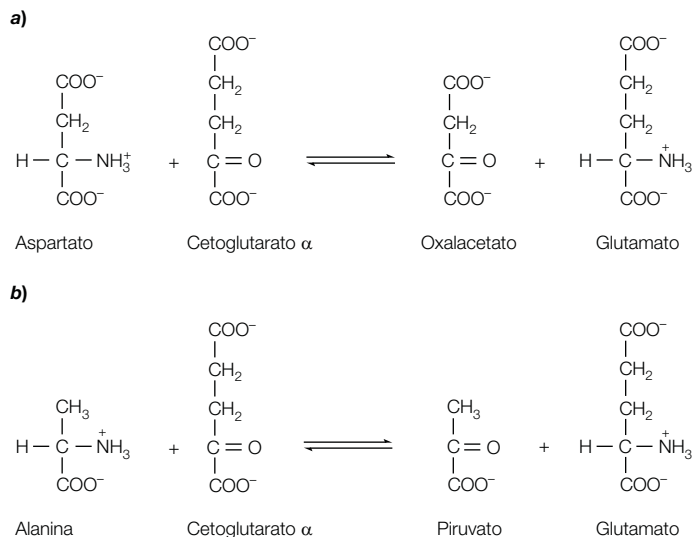
**Figura M2-2.** Destinos de los esqueletos de carbono de los aminoácidos.

**Fosfato de piridoxal**

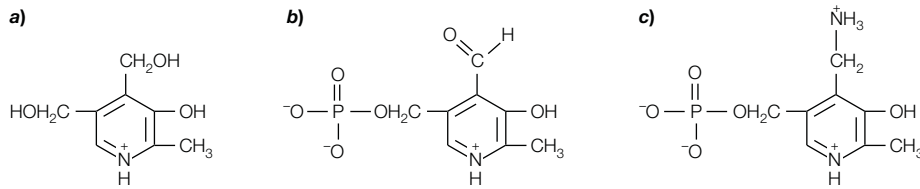
La coenzima (o grupo prostético) de todas las transaminasas es el **fosfato de piridoxal**, que deriva de la piridoxina (**vitamina B<sub>6</sub>**), y que de manera transitoria se convierte en **fosfato de piridoxamina** durante la transaminación (figura M2-4). En ausencia de sustrato, el grupo aldehído del fosfato de piridoxal forma un **enlace covalente de base de Schiff** (enlace de imina) con el grupo amino de la cadena lateral de un residuo de lisina específico en el sitio activo de la enzima. Además del

sustrato, el grupo amino α de los aminoácidos entrantes desplaza al grupo amino de la lisina del sitio activo y se forma un nuevo enlace de base de Schiff con el sustrato aminoácido. La base de Schiff-fosfato de piridoxal-aminoácido resultante que se forma se mantiene unido con firmeza a la enzima por múltiples interacciones no covalentes.

El aminoácido se hidroliza para formar un cetoácido α y fosfato de piridoxamina, y el grupo amino α se transfiere de forma temporal del sustrato aminoácido al fosfato de

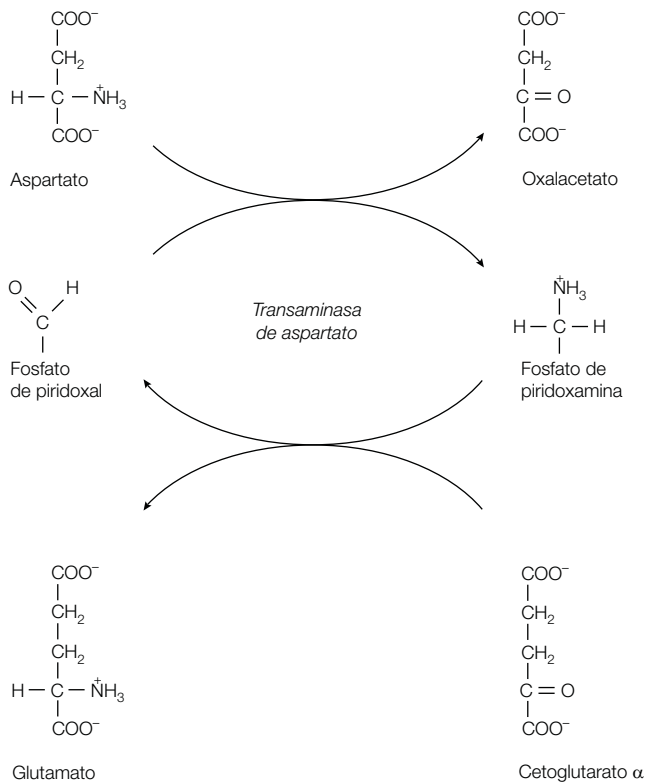


**Figura M2-3.** Reacciones catalizadas por: a) la transaminasa de aspartato y b) la transaminasa de alanina.

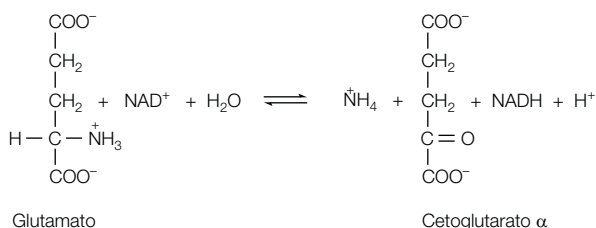


**Figura M2-4.** Estructuras de: a) la piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>), b) el fosfato de piridoxal y c) el fosfato de piridoxamina.

piridoxal (figura M2-5). Estos pasos constituyen la mitad de la reacción global de transaminación. La segunda mitad se produce por una inversión de las reacciones anteriores, cuando un segundo cetoácido  $\alpha$  reacciona con el fosfato de piridoxamina para producir un segundo



**Figura M2-5.** Reacción general de transaminación.



**Figura M2-6.** Desaminación oxidativa del glutamato por acción de la deshidrogenasa de glutamato.

aminoácido y regenerar el complejo enzima-fosfato de piridoxal (figura M2-5).

Las reacciones catalizadas por las transaminasas son **endergónicas**, ya que no requieren un aporte de energía metabólica. También son libremente reversibles y la dirección de la reacción está determinada por las concentraciones relativas de los pares aminoácidos-cetoácidos. El fosfato de piridoxal no sólo se usa como la coenzima en las reacciones de transaminación, sino que también es la coenzima de numerosas reacciones en las que intervienen los aminoácidos, como las descarboxilaciones, desaminaciones, racemizaciones y separaciones del grupo aldol.

### Desaminación oxidativa del glutamato

Los grupos amino  $\alpha$  que han sido canalizados hacia el glutamato a partir de otros aminoácidos se convierten a continuación en **amoniaco** por acción de la **deshidrogenasa de glutamato** (figura M2-6). Esta enzima encierra la peculiaridad de ser capaz de utilizar  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  (sección D1). En la biosíntesis del glutamato se usa la forma  $\text{NADP}^+$  de la coenzima (sección M1), mientras que la  $\text{NADP}^+$  se usa en su degradación. La deshidrogenasa de glutamato consiste en seis subunidades idénticas y está sujeta a **regulación alostérica** (véase la sección D5 para una descripción detallada de la regulación alostérica). El GTP y el ATP son **inhibidores alostéricos**, mientras que el GDP y el ADP son **activadores alostéricos**. En consecuencia, cuando la carga de energía de la célula es baja (es decir, que hay más ADP y GDP que sus formas trifosfato), la deshidrogenasa de glutamato se activa y se incrementa la oxidación de los aminoácidos. Los esqueletos de carbono resultantes se utilizan entonces como combustible metabólico, con ellos se alimenta el ciclo del ácido cítrico (sección L1) y acaban por generar energía a través de la fosforilación oxidativa (sección L2).

### Oxidación de aminoácidos

La ruta principal para la desaminación de los aminoácidos es la transaminación, seguida por la desaminación oxidativa del glutamato. Sin embargo, también existe una ruta menor que implica la oxidación directa del aminoácido por la **oxidasa de L-aminoácidos**. Esta enzima utiliza FMN como su coenzima (sección D1), en la que el  $\text{FMN}_{\text{H}_2}$



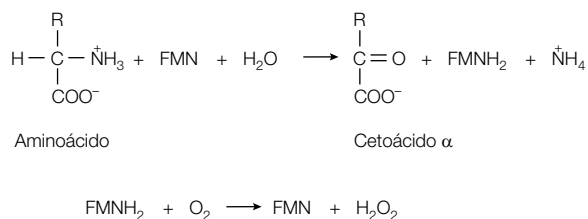


Figura M2-7. Acción de la oxidasa de L-aminoácidos.

resultante es reoxidado por el O<sub>2</sub> molecular, un proceso que también genera el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tóxico (figura M2-7). La **catalasa** se encarga de neutralizar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Riñón e hígado son también ricos en la **oxidasa de D-aminoácidos** que contiene FAD. No obstante, la función de esta enzima en los animales es poco clara ya que los isómeros D de los aminoácidos son raros en la naturaleza y sólo se presentan en las paredes de las células bacterianas (sección A1) y en ciertos antibióticos.

### Metabolismo de la fenilalanina

El metabolismo de la fenilalanina se estudiará con mayor detalle, ya que se conocen dos errores congénitos del metabolismo que afectan esta vía. En primer lugar, la **hidroxilasa de fenilalanina** hidroxila la **fenilalanina** para formar otro aminoácido aromático, la **tirosina** (figura M2-8). La coenzima de esta reacción es la **tetrahidrobiopterina** reductora, la cual es oxidada a **dihidrobiopterina**. La hidroxilasa de fenilalanina se clasifica como **monooxigenasa** porque uno de los átomos del O<sub>2</sub> aparece en el producto y el otro en el H<sub>2</sub>O. La tirosina es entonces transaminada a *p*-hidroxifenilpiruvato, el cual a su vez es convertido en **homogentisato** por la hidroxilasa de *p*-hidroxifenilpiruvato. Esta hidroxilasa es un ejemplo de una **dioxigenasa**, dado que ambos átomos de O<sub>2</sub> se incorporan en el producto (figura 8). Acto seguido, la oxidasa de homogentisato, otra dioxigenasa, divide el homogentisato antes de que se produzcan fumarato y acetoacetato en la reacción final. El fumarato puede alimentar el ciclo del ácido cítrico (sección L1), mientras que el acetoacetato puede usarse para formar cuerpos cetónicos (sección K2). Por consiguiente, la fenilalanina y la tirosina son glucógenas y cetógenas.

### Errores congénitos del metabolismo

Se conocen dos errores congénitos del metabolismo que afectan el metabolismo de la fenilalanina. Éstos son **trastornos metabólicos hereditarios** causados por la ausencia de una de las enzimas de la vía. Uno de estos trastornos, la **alcaptonuria**, se origina por la ausencia de la **oxidasa de homogentisato**. Esto provoca la acumulación de homogentisato, que de manera posterior se excreta en la orina, y el cual se oxida a color negro

mientras se está de pie. Este defecto carece de peligro, en contraste con el otro trastorno, la **fenilcetonuria**. En la fenilcetonuria hay un bloqueo en la hidroxilación de la fenilalanina a tirosina causado por una ausencia o deficiencia de la **hidroxilasa de fenilalanina** o, muy rara vez, de su coenzima tetrahidrobiopterina. El resultado es un incremento de 20 veces en los niveles de fenilalanina en la sangre, con la subsecuente **transaminación** a fenilpiruvato. Si se deja sin tratar, se produce un retardo mental grave, con una expectativa de vida de 20 años en promedio. Con una incidencia de 1:20 000, esta afección se detecta ahora en el nacimiento, con tratamientos que consisten en restringir el consumo de fenilalanina (para lo cual se coloca al individuo en una **dieta baja de fenilalanina**), y con la cual se minimiza la necesidad de metabolizar el exceso. Sin embargo, debe suministrarse suficiente fenilalanina para llenar las necesidades de crecimiento y reemplazo. El edulcorante artificial **aspartame** es el éster de Asp-Phe-metilo y con frecuencia se encuentra en bebidas dietéticas sin alcohol y otros productos alimenticios dietéticos. Como es una fuente de fenilalanina dietética, aparece una etiqueta de advertencia para los fenilcetonúricos en todos los productos que contienen aspartame.

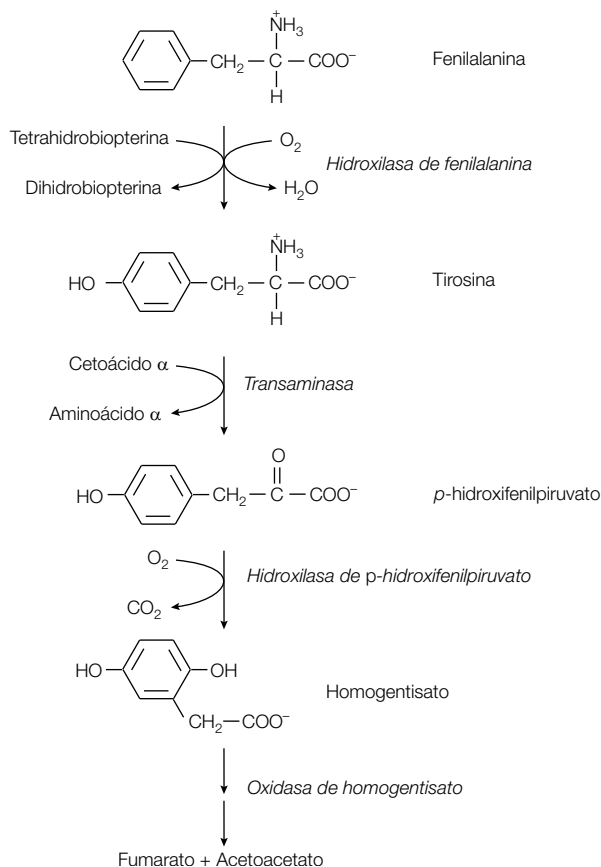


Figura M2-8. Metabolismo de la fenilalanina.

# M3 Ciclo de la urea

## Notas clave

**Excreción de amoniaco** El exceso de nitrógeno se excreta como amoniaco. Los organismos amoniotélicos excretan amoniaco en forma directa, los uricotélicos lo excretan como ácido úrico y los ureotélicos lo excretan como urea.

**Ciclo de la urea** En el ciclo de la urea, el amoniaco se combina en primer lugar con dióxido de carbono para formar carbamoilfosfato. Éste se combina con ornitina para formar citrulina, la que a su vez se condensa con aspartato, la fuente del segundo átomo de nitrógeno de la urea, para formar argininosuccinato. Este compuesto es a su vez dividido en arginina y fumarato, y la arginina a su vez se divide para formar urea y regenerar ornitina. Las primeras dos reacciones tienen lugar en las mitocondrias de las células hepáticas, mientras que las restantes tres suceden en el citosol.

**Enlace con el ciclo del ácido cítrico** El fumarato producido en el ciclo de la urea puede ingresar en forma directa en el ciclo del ácido cítrico y convertirse en oxalacetato. El oxalacetato puede ser transaminado a aspartato, el cual alimenta el ciclo de la urea, o convertirse en citrato, piruvato o glucosa.

**Hiperamonemia** La hiperamonemia es un incremento en los niveles de amoniaco de la sangre causado por un defecto en una enzima del ciclo de la urea. El amoniaco en exceso es canalizado hacia glutamato y glutamina, con un efecto deletéreo en la función cerebral.

**Formación de óxido nítrico** El gas óxido nítrico (NO) deriva de la arginina por la acción de la sintasa de óxido nítrico. Este metabolito de vida corta desencadena una vía de transducción de señales que provoca la dilatación de las arterias.

**Formación de creatina fosfato** El intermediario arginina del ciclo de la urea puede condensarse con glicina para formar guanidinoacetato, el cual a su vez es metilado por el donador de metilos S-adenosilmetionina a creatina. Luego, la creatina es fosforilada para formar creatina fosfato, un producto de alta energía almacenada que se encuentra en el músculo.

**Ciclo del metilo activado** La S-adenosilmetionina es el principal donador de metilo de las reacciones biológicas. Es regenerado a través de los intermediarios S-adenosilhomocisteína, homocisteína y metionina en el ciclo del metilo activado.

**Ácido úrico** El ácido úrico, el principal producto de desecho nitrogenado de los organismos uricotélicos, también se forma en otros organismos a partir de la degradación de las bases púricas. La gota es causada por el depósito excesivo de cristales de ácido úrico en las articulaciones.

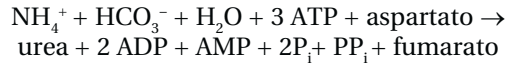
**Temas relacionados** (J4) Gluconeogénesis (L1) Ciclo del ácido cítrico  
 (J6) Metabolismos del glucógeno (M2) Metabolismo de los aminoácidos  
 (K4) Triacilgliceroles

**Excreción del amoniaco**

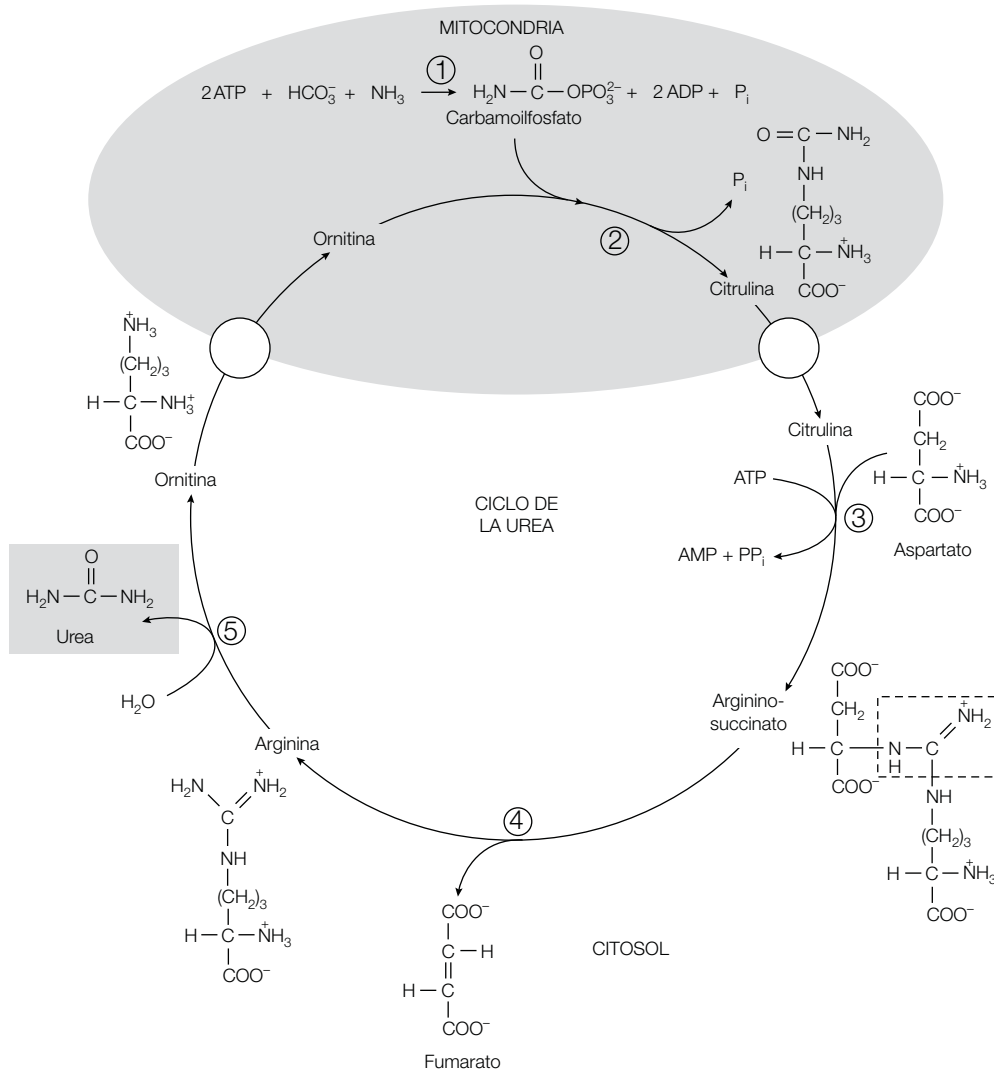
Los compuestos que contienen nitrógeno no se almacenan, como sucede con los carbohidratos (glucógeno, sección J6) o los lípidos (triacilglicerol, sección K4). Por consiguiente, el nitrógeno ingerido en exceso del que se requiere por el organismo debe excretarse. Primero, el exceso de nitrógeno se convierte en **amoniaco**, el cual luego se excreta de los organismos vivos en una de tres formas. Muchos animales acuáticos se limitan a excretar el amoniaco de manera directa en el agua circundante. Las aves y los reptiles terrestres excretan el amoniaco en la forma de **ácido úrico**, mientras que la mayoría de los vertebrados terrestres convierten el amoniaco en **urea** antes de excretarlo. Estas tres clases de organismos se llaman: **amoniotélicos**, **uricotélicos** y **ureotélicos**, respectivamente.

**Ciclo de la urea**

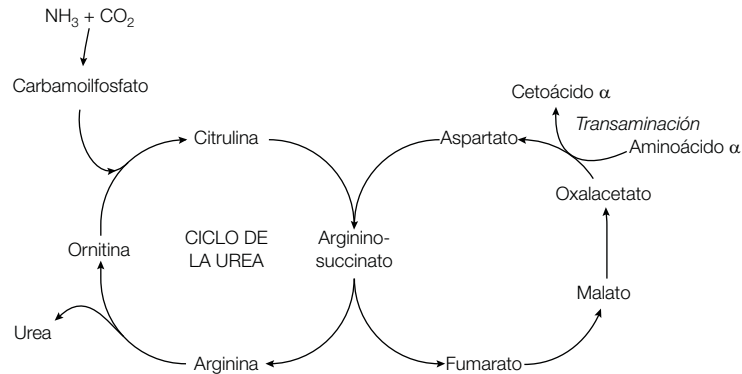
La urea se sintetiza en el hígado por intermedio del **ciclo de la urea**. Ésta luego es secretada en la corriente sanguínea y tomada por los riñones para su excreción en la orina. El ciclo de la urea fue la primera vía metabólica cíclica en descubrirse, mérito que correspondió a Hans Krebs y Kurt Henseleit en 1932, cinco años antes de que Krebs descubriera el ciclo del ácido cítrico (sección L1). La reacción general de esta vía es:



Uno de los átomos de nitrógeno de la urea proviene del amoniaco, el otro se transfiere desde el aminoácido aspartato, mientras que el átomo de carbono procede del CO<sub>2</sub> que se origina en el bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>).



**Figura M3-1.** Ciclo de la urea. Las enzimas que intervienen en este ciclo son: ①, sintetasa de carbamoilfosfato; ②, transcarbamoilasa de ornitina; ③, sintetasa de argininosuccinato; ④, argininosuccinasa, y ⑤, arginasa.



**Figura M3-2.** El ciclo de la urea y el ciclo del ácido cítrico están enlazados por el fumarato y la transaminación del oxalacetato a aspartato.

La **ornitina**, un aminoácido que no forma parte del conjunto estándar de los 20 aminoácidos y que no se encuentra en las proteínas, es el transportador de estos átomos de nitrógeno y carbono. En el ciclo de la urea intervienen cinco reacciones enzimáticas (figura M3-1), la primera de las cuales acontece en las mitocondrias y las otras tres en el citosol:

1. La **sintetasa de carbamoilfosfato**, la cual no es un miembro del ciclo de la urea desde el punto de vista técnico, cataliza la condensación y activación del amoníaco (desde la desaminación oxidativa del glutamato por la deshidrogenasa de glutamato; sección M2) y  $\text{CO}_2$  (en la forma de bicarbonato,  $\text{HCO}_3^-$ ) para formar **carbamoilfosfato**. La hidrólisis de dos moléculas de ATP convierte a esta reacción en esencialmente irreversible.
2. La segunda reacción también sucede en las mitocondrias e incluye la transferencia del grupo carbamoilo procedente del carbamoilfosfato a la **ornitina** por la acción de la **transcarbamoilasa de ornitina**. Esta reacción forma otro aminoácido no estándar, la **citrulina**, el cual debe ser transportado fuera de la mitocondria hacia el citosol, donde tienen lugar las restantes reacciones del ciclo.
3. A continuación, la citrulina se condensa con aspartato, la fuente del segundo átomo de nitrógeno de la urea, por la acción de la enzima **sintetasa de argininosuccinato** para formar **argininosuccinato**. La reacción es dirigida por la hidrólisis del ATP a AMP y  $\text{PP}_i$ , con la hidrólisis subsecuente del pirofosfato. En consecuencia, los dos enlaces de alta energía del ATP acaban por dividirse.
4. La **argininosuccinasa** retira entonces el esqueleto de carbono del aspartato del argininosuccinato en la forma de **fumarato**, lo que conduce al átomo de nitrógeno en otro producto, la **arginina**. Como el ciclo de

la urea también produce arginina, este aminoácido se clasifica como no esencial en los organismos ureotélicos. La arginina es el precursor inmediato de la urea.

5. Entonces se forma la **urea** a partir de la **arginina** por acción de la arginasa con la regeneración de ornitina. Acto seguido, la ornitina es llevada de regreso a la mitocondria lista para combinarse con otra molécula de carbamoilfosfato.

### Enlace con el ciclo del ácido cítrico

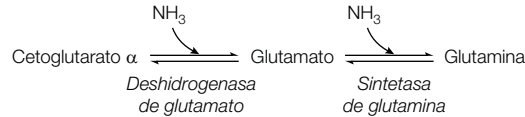
La síntesis de fumarato por la argininosuccinasa enlaza al ciclo de la urea con el ciclo del ácido cítrico (figura M3-2). El fumarato es un intermediario de este último ciclo, el cual es entonces hidratado a malato, que a su vez es oxidado a **oxalacetato** (sección L1).

El oxalacetato tiene diversos destinos posibles:

- **Transaminación** a aspartato (sección M2), el cual luego puede alimentar otra vez el ciclo de la urea.
- Condensación con acetyl-CoA para formar citrato, el cual luego continúa en una nueva ronda del ciclo del ácido cítrico (sección L1).
- Conversión en glucosa a través de la gluconeogénesis (sección J4).
- Conversión en piruvato.

### Hiperamonemia

¿Por qué los organismos necesitan destoxificar el amoníaco en primer lugar? La respuesta a esta pregunta es obvia cuando se considera qué sucede si se produce un bloqueo en el ciclo de la urea debido a una enzima defectuosa. Cualquier bloqueo de las enzimas del ciclo de la urea conduce a un incremento en la cantidad de amoníaco en la sangre, lo que se denomina



**Figura M3-3.** El exceso de amoníaco lleva a la formación de glutamato y glutamina.

**hiperamoniemia.** La causa más común de tal bloqueo es un defecto genético que se hace aparente poco después del nacimiento, cuando los lactantes afectados se vuelven letárgicos y presentan vómitos periódicos. Si se deja sin tratar, lo que sigue es un coma y un daño cerebral irreversible. Las razones de esto no se comprenden del todo, pero pueden deberse a que el exceso de amoníaco conduce a una formación incrementada de **glutamato** y **glutamina** (figura M3-3) (sección M1). Estas reacciones conducen al agotamiento del intermediario cetoglutarato  $\alpha$  del ciclo del ácido cítrico, el cual puede entonces comprometer la producción de energía, en especial en el cerebro. Esto también condiciona un incremento de los aminoácidos ácidos glutamato y glutamina, lo cual puede causar daño directo al cerebro.

**Formación del óxido nítrico**

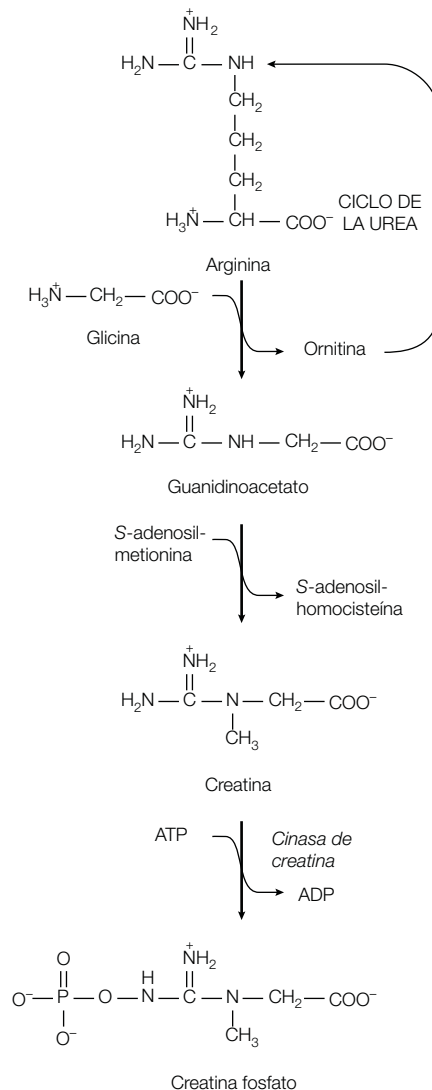
El gas **óxido nítrico** (NO), un radical libre de corta vida, es producido a partir de la arginina en una reacción compleja que cataliza la **sintasa de óxido nítrico** (NOS). El NO actúa al unirse y activar la ciclasa de guanilato, la cual participa en la **transducción de señales** (sección E5). El NO es producido por células endoteliales en respuesta a numerosos agentes y condiciones fisiológicas, induce la dilatación de las arterias y es responsable, entre otras cosas, de la erección del pene.

**Formación de creatina fosfato**

El ciclo de la urea es también el punto de arranque para la síntesis de otro metabolito importante, la **creatina fosfato**. Este **fosfógeno** provee un reservorio de fosfato de alta energía en las células musculares (sección B5) ya que la energía liberada por su hidrólisis es mayor que la liberada por la hidrólisis del ATP ( $\Delta G$  de la hidrólisis de la creatina fosfato =  $-10.3 \text{ kcal mol}^{-1}$  comparado con  $-7.3 \text{ kcal mol}^{-1}$  en el caso de la hidrólisis del ATP, sección D2). El primer paso en la formación de creatina fosfato es la condensación de la arginina y la glicina para formar guanidinoacetato (figura M3-4). En esta reacción se libera ornitina y luego puede ser reutilizada en el ciclo de la urea. A continuación, el guanidinoacetato es metilado con un grupo metilo que dona la **S-adenosilmetionina** para formar creatina, la cual a su vez es fosforilada por la **cinasa de creatina** para formar creatina fosfato (figura M3-4).

**El ciclo del metilo activado**

La **S-adenosilmetionina** sirve como un donador de **grupos metilo** en numerosas reacciones biológicas [p. ej., en la formación de creatina fosfato (véase antes) y en la síntesis de ácidos nucleicos]. Es formada a través de la acción del ciclo del metilo activado (figura M3-5). Durante



**Figura M3-4.** Formación de creatina fosfato.

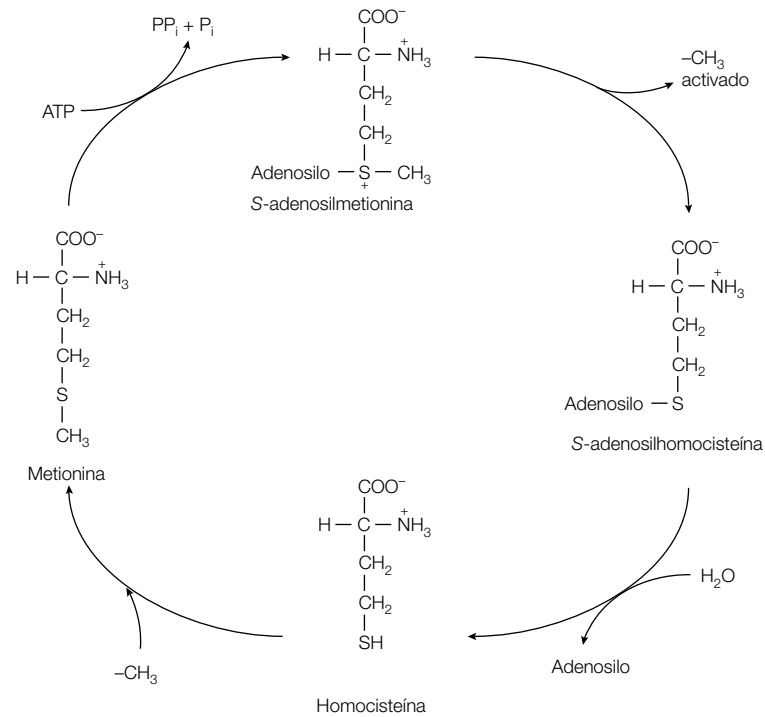


Figura M3-5. El ciclo del metilo activado.

la donación de su grupo metilo a otro compuesto, la S-adenosilmetionina se convierte en S-adenosilhomocisteína. Para regenerar S-adenosilmetionina, se retira el grupo adenosilo de la S-adenosilhomocisteína para formar homocisteína. Acto seguido, la enzima metiltransferasa de homocisteína se encarga de metilar a esta última para formar **metionina**. Esta enzima es una de sólo dos enzimas que contienen *vitamina B<sub>12</sub>* encontrada en los eucariotas. La metionina resultante es activada a S-adenosilmetionina con liberación de los tres fosfatos del ATP.

### Ácido úrico

El **ácido úrico** (figura M3-6) es el principal producto de desecho del nitrógeno de los organismos uricotélicos (reptiles, aves e insectos), pero también se forma en los

organismos ureotélicos por rotura de las bases púricas del DNA y el RNA (secciones F1 y G1). Algunos individuos tienen un alto nivel sérico de urato de sodio (la forma predominante de ácido úrico a pH neutro), el cual puede llevar a que los cristales de este compuesto puedan depositarse en las articulaciones y los riñones, una afección que se conoce como **gota**, un tipo de artritis que se caracteriza por articulaciones en extremo dolorosas.

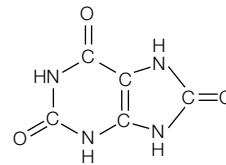


Figura M3-6. Ácido úrico.

# M4 Hemos y clorofilas

## Notas clave

### Tetrapirroles

Los tetrapirroles son una familia de pigmentos basados en una estructura química común que incluye los hemos y las clorofilas. Los hemos son tetrapirroles cíclicos que contienen hierro y que se encuentran de manera habitual como el grupo prostético de la hemoglobina, mioglobina y los citocromos. Las clorofilas son tetrapirroles modificados que contienen magnesio y que se presentan como pigmentos aprovechadores de la luz y del centro de reacción en la fotosíntesis de las plantas, algas y bacterias fotosintéticas.

### Biosíntesis de hemos y clorofilas

El punto de iniciación de la síntesis de hemos y clorofilas es el ácido aminolevulínico (ALA), al cual elaboran los animales a partir de glicina y succinil-CoA por intermedio de la enzima sintasa de ALA. La deshidratasa de ALA cataliza una reacción que condensa dos moléculas de ALA para formar porfobilinógeno. La desaminasa de porfobilinógeno cataliza la condensación de cuatro moléculas de porfobilinógeno para formar un tetrapirrol lineal. Este compuesto se cicliza para formar uroporfirinógeno III, el precursor de los hemos, clorofilas y vitamina B<sub>12</sub>. Se producen modificaciones adicionales para formar protoporfirina IX. Después, la vía biosintética se ramifica y el hierro se inserta para formar hemo, y el magnesio es insertado para comenzar una serie de conversiones que llevan a la clorofila.

### Degradación del hemo

El hemo es degradado por la oxigenasa de hemo a la biliverdina tetrapirrólica lineal. La reductasa de biliverdina convierte luego este pigmento verde en la bilirrubina rojo-anaranjada. La lipófila bilirrubina es transportada en la sangre unida a la albúmina sérica y luego convertida en el hígado en un compuesto más hidrosoluble al resultar conjugada con el ácido glucurónico. El diglucurónido de bilirrubina resultante se secreta en la bilis y al final se excreta en las heces. La ictericia se debe a la impregnación de una bilirrubina insoluble en la piel y en la esclerótica de los ojos. En las plantas más grandes, el hemo es degradado al fitocromo ficobiliproteína, la cual interviene en la coordinación de la respuesta a la luz, mientras que en las algas es metabolizada a los pigmentos aprovechadores de la luz ficocianina y ficoeritrina.

### Temas relacionados

(B3) Mioglobina y hemoglobina  
(D5) Regulación de la actividad enzimática  
(L1) Ciclo del ácido cítrico

(L2) Transporte de electrones y fosforilación oxidativa  
(L3) Fotosíntesis  
(M2) Metabolismo de los aminoácidos

## Tetrapirroles

Los pigmentos **hemo** rojo y **clorofila** verde, tan importantes en los mecanismos productores de energía de la respiración y la fotosíntesis, son miembros de la familia de pigmentos denominados **tetrapirroles**. Comparten estructuras similares (figura M4-1) y tienen algunos pasos comunes en su síntesis y degradación. La estructura básica de un tetrapirrol es de cuatro anillos pirrólicos rodeando a un átomo metálico central.

Los **hemos** (figura M4-1a) son un grupo diferente de pigmentos tetrapirrólicos que están presentes como el grupo prostético de las **globinas** (hemoglobina y mioglobina; sección B3) y los **citocromos** (con inclusión de aquellos que participan en el transporte de electrones respiratorio y fotosintético; secciones L2 y L3) y el citocromo P-450 que interviene en las reacciones de detoxificación. Algunas enzimas, como las catalasas y peroxidasas, contienen hemo. En todas estas hemoproteínas, la función del hemo es unirse y liberar un ligando de su

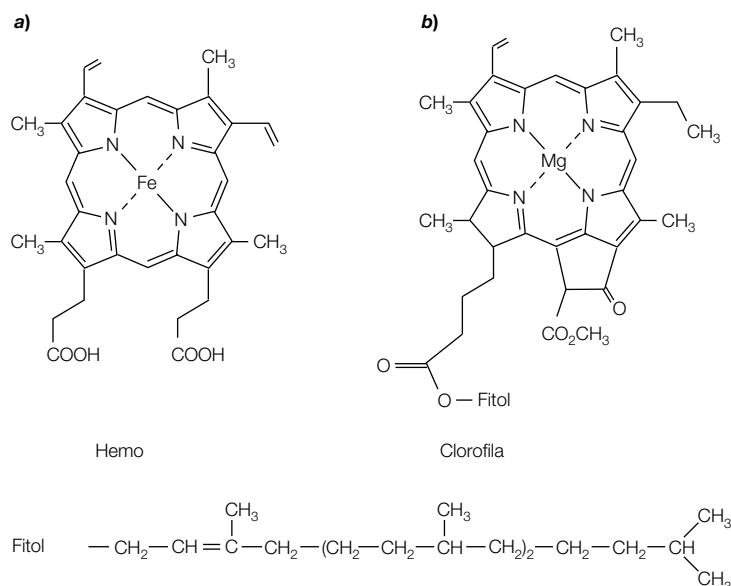


Figura M4-1. Estructura del a) hemo y b) la clorofila.

**átomo de hierro** central, o que el átomo de hierro sufra un cambio en su estado de oxidación y libere o acepte un electrón por su participación en una reacción redox.

Las **clorofilas** también son una familia diferente de pigmentos, dado que existen en formas distintas en las bacterias fotosintéticas, algas y plantas mayores. Comparten una función común en todos estos organismos al actuar como pigmentos aprovechadores de la luz y del centro de reacción en la **fotosíntesis** (sección L3). Esta función se logra mediante diversas modificaciones a la estructura tetrapirrólica básica. Éstas incluyen: la inserción del **magnesio** como el ion metálico central, la adición de un quinto anillo a la estructura tetrapirrólica, la pérdida de un doble enlace de uno o más de los anillos pirrólicos y la unión de una cadena lateral específica a una molécula larga similar a la de un ácido graso llamada **fitol** (figura M4-1b). Estos cambios dan a las clorofilas y a las bacterioclorofilas diversas propiedades útiles. Por ejemplo, las clorofilas están unidas a la membrana, absorben luz en longitudes de onda mayores que el hemo y son capaces de responder a la excitación por la luz. De esta forma, las clorofilas pueden aceptar y liberar energía luminosa y dirigir el transporte de electrones fotosintético (sección L3).

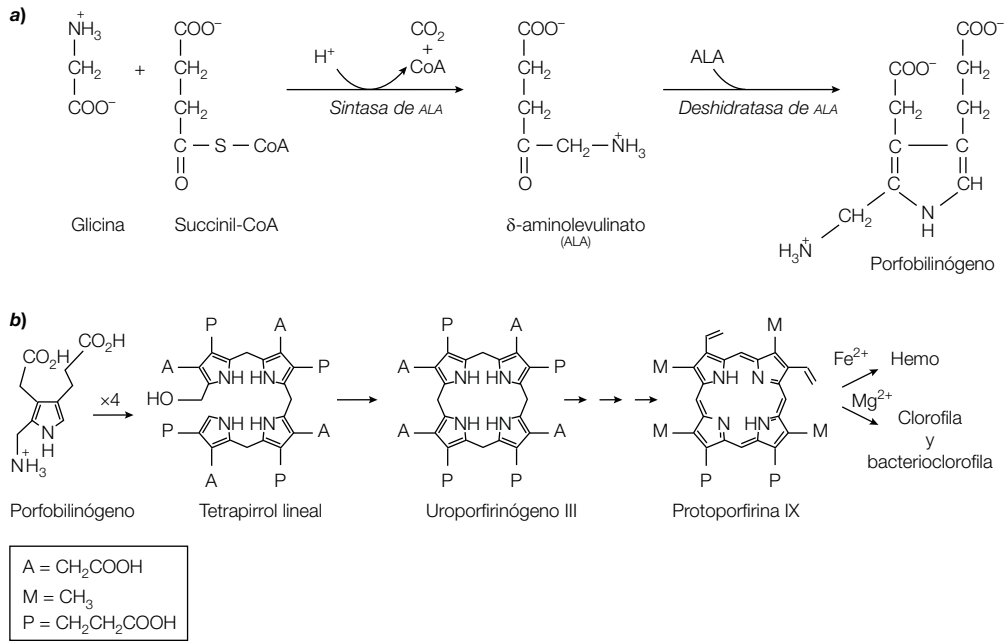
### Biosíntesis de hemos y clorofilas

En los animales, hongos y algunas bacterias, el primer paso en la síntesis de tetrapirroles es la condensación del aminoácido **glicina** con **succinil-CoA** (un intermediario del ciclo del ácido cítrico; sección L1) para formar **ácido aminolevulínico** (ALA). La enzima **sintasa de ALA** cataliza esta reacción (figura M4-2a), la cual requiere la coenzima **fosfato de piridoxal** (sección M2) y se localiza en las mitocondrias de los eucariotas. Este paso

obligado de la vía está sujeto a regulación. El hemo inhibe por retroalimentación la síntesis de la sintasa de ALA (sección D5). En las plantas, algas y muchas bacterias hay una vía alternativa para la síntesis de ALA que incluye la conversión del esqueleto de cinco carbonos del glutamato en una serie de tres pasos que llevan a producir ALA. En todos los organismos, dos moléculas de ALA se condensan para formar **porfobilinógeno** en una reacción catalizada por la **deshidratasa de ALA** (también llamada **sintasa de porfobilinógeno**) (figura M4-2a). La inhibición de esta enzima por el hierro es una de las principales manifestaciones del **envenenamiento por hierro agudo**.

Luego se condensan cuatro porfobilinógenos de la cabeza a la cola en una reacción catalizada por la **desaminasa de porfobilinógeno** para formar un **tetrapirrol lineal** (figura M4-2b). Este tetrapirrol lineal unido a la enzima se cicliza para formar **uroporfirinógeno III**, el cual presenta un ordenamiento asimétrico de las cadenas laterales (figura M4-2b). El uroporfirinógeno III es el precursor común de todos los hemos y clorofilas así como de la **vitamina B<sub>12</sub>**. La vía continúa con algunas modificaciones más a los grupos fijos al lado externo de la estructura anular, para terminar por formar **protoporfirina IX** (figura M4-2b). En este punto, ya sea el hierro o el magnesio son insertados dentro de la cavidad central, lo que fuerza a la porfirina a sintetizar hemo o clorofila, respectivamente. A partir de aquí, se producen otras modificaciones y al final los grupos prostéticos especializados de las porfirinas se fijan a sus respectivas **apoproteínas** (la forma de la proteína que consiste sólo en la cadena polipeptídica) para formar la **holoproteína** funcional desde el punto de vista biológico.





**Figura M4-2.** Vía de la síntesis del hemo y la clorofila: a) síntesis de porfobilinógeno a partir de glicina y succinil-CoA; b) síntesis de la protoporfirina IX a partir del porfobilinógeno. A = CH<sub>2</sub>COOH; M = CH<sub>3</sub>; P = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH.

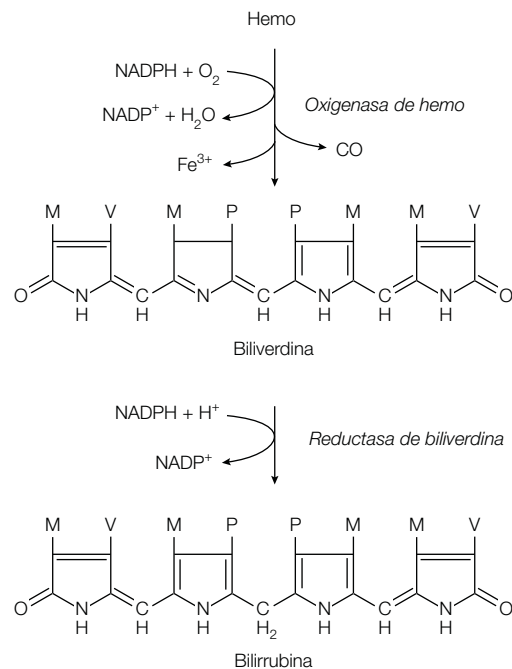
La biosíntesis del hemo se produce en primer lugar en los eritrocitos inmaduros (85% de los grupos hemo del cuerpo), con la parte restante en el hígado. Han sido identificados diversos defectos genéticos de la síntesis del hemo que dan origen a los trastornos llamados **porfirias**.

### Degradación del hemo

Los **pigmentos biliares** existen en los reinos vegetal y animal y están formados por la degradación de la estructura tetrapirrólica cíclica del hemo. En los animales, esta vía es un sistema excretor a través del cual el hemo de la hemoglobina de los glóbulos rojos envejecidos y otras hemoproteínas es removido del cuerpo. En el reino vegetal, sin embargo, el hemo es degradado para formar pigmentos biliares, los cuales tienen su principal función en la coordinación de las respuestas a la luz en las plantas mayores (la ficobiliproteína **fitocromo**) y en el aprovechamiento de la luz en las algas (las ficobiliproteínas **ficocianina** y **ficoeritrina**).

En todos los organismos, la degradación del hemo comienza con una reacción que lleva a cabo una enzima común. Esta enzima, la **oxigenasa de hemo**, está presente sobre todo en el bazo y el hígado de los vertebrados, y produce la abertura oxidativa del anillo del hemo para producir el pigmento biliar verde **biliverdina**, un tetrapirrol lineal (figura M4-3). La oxigenasa de hemo es un miembro de la familia de enzimas del **citocromo P-450** y requiere NADPH y O<sub>2</sub>. En las aves,

reptiles y anfibios, este pigmento hidrosoluble es el producto final de la degradación del hemo y se excreta directamente. En los mamíferos, sin embargo, acontece



**Figura M4-3.** Degradación del hemo a los pigmentos biliares biliverdina y bilirrubina. M = metilo (CH<sub>3</sub>); V = vinilo (CH=CH<sub>2</sub>); P = propionilo (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH).

una conversión adicional a la **bilirrubina** de color rojo anaranjado; esta reacción es catalizada por la **reductasa de biliverdina** (figura M4-3). El color cambiante de un hematoma es un indicador visible de estas reacciones degradativas. La bilirrubina, como otras moléculas lipófilas del tipo de los ácidos grasos libres, a continuación es transportada en la sangre unida a la **albúmina sérica**. En el hígado, su hidrosolubilidad se incrementa por la conjugación a dos moléculas de **ácido glucurónico**, un residuo azucarado que difiere de la glucosa en que tiene un grupo  $\text{COO}^-$  en el carbono 6 en lugar de un grupo  $\text{CH}_2\text{OH}$ . El **diglucurónido de bilirrubina**

resultante se secreta en la bilis y luego en el intestino, donde es metabolizado de manera adicional por las enzimas bacterianas y excretado de esta manera en las heces.

Cuando la sangre contiene cantidades excesivas de bilirrubina insoluble, éstas se depositan en la piel y en las escleróticas de los ojos, por lo cual resulta una decoloración amarilla. Esta afección, llamada **ictericia**, es indicativa de un deterioro de la función hepática, obstrucción del conducto biliar, o una degradación excesiva de los eritrocitos.

# Lecturas recomendadas

Si bien existen muchos libros de texto exhaustivos sobre bioquímica y biología molecular, ninguno de ellos puede satisfacer todas las necesidades. Por cuestiones subjetivas, los lectores pueden preferir diferentes libros y, por tanto, los autores opinan que no sería de gran ayuda recomendar un libro por encima de otro. En su lugar, se ofrece una lista de algunos de los títulos líderes sobre el tema, cuya lectura, por experiencia, resultaron de utilidad a sus alumnos.

## Lecturas generales

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2007) *Molecular Biology of the Cell*, 5a. ed., Garland Science, Taylor & Francis Group, Nueva York.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L. y Stryer, L. (2006) *Biochemistry: International Edition*, 6a. ed., W.H. Freeman and Company, Nueva York.

Brown, T.A. (2006) *Genomes 3*, 3a. ed., Garland Science, Taylor & Francis Group, Nueva York.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. y Matsudaira, P. (2007) *Molecular Cell Biology*, 6a. ed., W.H. Freeman and Company, Nueva York.

Voet, D., Voet, J.G. y Pratt, C.W. (2008) *Principles of Biochemistry*, 3a. ed., John Wiley and Sons, Nueva York.

Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., Losick, R. e Inglis, C. (2007) *Molecular Biology of the Gene*, 6a. ed., Pearson Education, San Francisco, CA.

## Lecturas avanzadas

La siguiente selección de libros y artículos se recomienda para aquellos lectores que desean conocer más acerca de aspectos específicos. En muchos casos pueden ser demasiado avanzados para los estudiantes de primer ingreso, pero son fuentes muy útiles de información en temas que pueden ser objeto de estudio en los últimos años.

## Sección A

Bergeron, J.J.M., Au, C.E., Desjardins, M., McPherson, P.S. y Nilsson, T. (2010) Cell biology through proteomics – ad astra per alia porci. *Trends Cell Biol.* 20: 337-345.

Brunet, S., Thibault, P., Gagnon, E., Kearney, P., Bergeron, J.J.M. y Desjardins, M. (2003) Organelle proteomics: looking at less to see more. *Trends Cell Biol.* 13: 629-638.

Egner, A. y Hell, S.W. (2005) Fluorescence microscopy with super-resolved optical sections. *Trends Cell Biol.* 15: 207-215.

Leis, A., Rockel, B., Andrees, L. y Baumeister, W. (2009) Visualizing cells at the nanoscale. *Trends Biochem. Sci.* 34: 60-70.

Lidke, D.S. y Wilson, B.S. (2009) Caught in the act: quantifying protein behaviour in living cells. *Trends Cell Biol.* 19: 566-574.

Lundin, V.F., Leroux, M.R. y Stirling, P.C. (2010) Quality control of cytoskeletal proteins and human disease. *Trends Biochem. Sci.* 35: 288-297.

McConnell, R.E. y Tyska, M.J. (2010) Leveraging the membrane – cytoskeleton interface with myosin-1. *Trends Cell Biol.* 20: 418-426.

Piston, D.W. y Kremers, G.-J. (2007) Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem. Sci.* 32: 407-414.

## Sección B

- Carugo, O. y Carugo, K.D. (2005) When X-rays modify the protein structure: radiation damage at work. *Trends Biochem. Sci.* 30: 213-219.
- Feige, M.J., Hendershot, L.M. y Buchner, J. (2010) How antibodies fold. *Trends Biochem. Sci.* 35: 189-198.
- Fitzkee, N.C., Fleming, P.J., Gong, H., Panasik Jr, N., Street, T.O. y Rose, G.D. (2005) Are proteins made from a limited parts list? *Trends Biochem. Sci.* 30: 73-80.
- Harding, C.V. y Neefjes, J. (2005) Antigen processing and recognition. *Curr. Opin. Immunol.* 17: 55-57.
- Hirokawa, N. y Takemura, R. (2003) Biochemical and molecular characterization of diseases linked to motor proteins. *Trends Biochem. Sci.* 28: 558-565.
- Hogg, P.J. (2003) Disulphide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem. Sci.* 28: 210-214.
- Koonce, M.P. y Samsó, M. (2004) Of rings and levers: the dynein motor comes of age. *Trends Cell Biol.* 14: 612-619.
- Livák, F. y Petrie, H.T. (2001) Somatic generation of antigen-receptor diversity: a reprise. *Trends Immunol.* 22: 608-612.
- Manis, J.P., Ming Tian, M. y Frederick, W.A. (2002) Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol.* 23: 31-39.
- Royer Jr, W.E., Knapp, J.E., Strand, K. y Heaslet, H.A. (2001) Cooperative hemoglobins: conserved fold, diverse quaternary assemblies and allosteric mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* 26: 297-304.
- Yildiz, A. y Selvin, P.R. (2005) Kinesin: walking, crawling or sliding along? *Trends Cell Biol.* 15: 112-120.

## Sección C

- Brunet, S., Thibault, P., Gagnon, E., Kearney, P., Bergeron, J.J.M. y Desjardins, M. (2003) Organelle proteomics: looking at less to see more. *Trends Cell Biol.* 13: 629-638.
- Goldman, R.D. (2000) Antibodies: indispensable tools for biomedical research. *Trends Biochem. Sci.* 25: 593-595.
- Rappsilber, J. y Mann, M. (2002) What does it mean to identify a protein in proteomics? *Trends Biochem. Sci.* 27: 74-78.
- Zhou, M. y Robinson, C.V. (2010) When proteomics meets structural biology. *Trends Biochem. Sci.* 35: 522-529.

## Sección D

- Belenky, P., Bogan, K.L. y Brenner, C. (2007) NAD<sup>+</sup> metabolism in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* 32: 12-19.
- Berger, F., Ramirez-Hernández, M.H. y Ziegler, M. (2004) The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem. Sci.* 29: 111-118.
- Daniel, R.M. y Danson, M.J. (2010) A new understanding of how temperature affects the catalytic activity of enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 35: 584-591.
- Krem, M.M. y Di Cera, E. (2002) Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends Biochem. Sci.* 27: 67-74.

## Sección E

- Bernards, A. y Settleman, J. (2004) GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol.* 14: 377-385.
- Carafoli, E. (2004) Calcium-mediated cellular signals: a story of failures. *Trends Biochem. Sci.* 29: 371-379.
- De Meyts, P. (2008) The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors? *Trends Biochem. Sci.* 33: 376-384.

- Gu, H. y Neel, B.G. (2003) The 'Gab' in signal transduction. *Trends Cell Biol.* 13: 122-130.
- Higgins, M.K. y McMahon, H.T. (2002) Snap-shots of clathrin-mediated endocytosis. *Trends Biochem. Sci.* 27: 257-263.
- Hofmann, K.P., Scheerer, P., Hildebrand, P.W., Choe, H.-W., Park, J.H., Heck, M. y Ernst, O.P. (2009) A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends Biochem. Sci.* 34: 540-552.
- Merrill Jr, A.H., Wang, M.D., Park, M. y Sullards, M.C. (2007) (Glyco)sphingolipidology: an amazing challenge and opportunity for systems biology. *Trends Biochem. Sci.* 32: 457-468.
- Mulkidjanian, A.Y., Galperin, M.Y. y Koonin, E.V. (2009) Co-evolution of primordial membranes and membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* 34: 206-215.
- Neel, B.J., Gu, H. y Pao, L. (2003) The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphates in cell signalling. *Trends Biochem. Sci.* 28: 284-293.
- Parton, R. y Hancock, J.F. (2004) Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends Cell Biol.* 14: 141-147.
- Patel, S. y Docampo, R. (2010) Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Trends Cell Biol.* 20: 277-286.
- Taylor, C.W., da Fonseca, P.C.A. y Morris, E.P. (2004) IP<sub>3</sub> receptors: the search for structure. *Trends Biochem. Sci.* 29: 210-219.

## Sección F

- Arezi, B. y Kuchta, R.D. (2000) Eukaryotic DNA primase. *Trends Biochem. Sci.* 25: 572-576.
- Corpet, A. y Almouzni, G. (2009) Making copies of chromatin: the challenge of nucleosomal organization and epigenetic information. *Trends Cell Biol.* 19: 29-41.
- Hübscher, U., Nasheuer, H.-P. y Syväoja, J.E. (2000) Eukaryotic DNA polymerases, a growing family. *Trends Biochem. Sci.* 25: 143-147.
- Kelleher, C., Teixeira, M.T., Förstemann, K. y Lingner, J. (2002) Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends Biochem. Sci.* 27: 572-579.
- Lansdorp, P.M. (2005) Major cutbacks at chromosome ends. *Trends Biochem. Sci.* 30: 388-395.

## Sección G

- Bentley, D.L. (2005) Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 251-256.
- Chadick, J.Z. y Asturias, F.J. (2005) Structure of eukaryotic Mediator complexes. *Trends Biochem. Sci.* 30: 264-271.
- Conaway, R.C., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Yao, T. y Conaway, J.W. (2005) The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* 30: 250-255.
- Granneman, S. y Baserga, S.J. (2005) Crosstalk in gene expression: coupling and co-regulation of rDNA transcription, pre-ribosome assembly and pre-rRNA processing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 281-286.
- Guthrie, C. y Steitz, J. eds. (2005) Nucleus and gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, Issue 3. Whole issue devoted to relevant articles.
- Hobert, O. (2005) Common logic of transcription factor and microRNA action. *Trends Biochem. Sci.* 29: 462-468.
- Kornblihtt, A.R. (2005) Promoter usage and alternative splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 262-268.
- Lilley, D.M.J. (2004) The origins of RNA catalysis in ribozymes. *Trends Biochem. Sci.* 28: 495-501.
- Rino, J. y Carmo-Fonseca, M. (2009) The spliceosome: a self-organized macromolecular machine in the nucleus? *Trends Cell Biol.* 19: 375-384.
- Russell, J. y Zomerdijk, J.C.B.M. (2005) RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem. Sci.* 30: 87-96.

Schellenberg, M.J., Ritchie, D.B. y MacMillan, A.M. (2008) Pre-mRNA splicing: a complex picture in higher definition. *Trends Biochem. Sci.* 33: 243-246.

Stuart, K.D., Schnauffer, A., Ernst, N.L. y Panigrahi, A.K. (2005) Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem. Sci.* 30: 97-105.

Warf, M.B. y Berglund, J.A. (2010) Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* 35: 169-178.

## Sección H

Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S. y Molinari, M. (2010) N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem. Sci.* 35: 74-82.

Connolly, K. and Culver, G. (2009) Deconstructing ribosome construction. *Trends Biochem. Sci.* 34: 256-263.

Gigliione, C., Fieulaine, S. y Meinnel, T. (2009) Cotranslational processing mechanisms: towards a dynamic 3D model. *Trends Biochem. Sci.* 34: 417-426.

Hernández, G. (2009) On the origin of the cap-dependent initiation of translation in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 34: 166-175.

Hernández, G., Altmann, M. y Lasko, P. (2010) Origins and evolution of the mechanisms regulating translation initiation in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 35: 63-73.

Korostelev, A. y Noller, H.F. (2007) The ribosome in focus: new structures bring new insights. *Trends Biochem. Sci.* 32: 434-441.

Mitra, N., Sinha, S., Ramya, T.N.C. y Surolia, A. (2006) N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. *Trends Biochem. Sci.* 31: 156-163.

Rodnina, M.V., Beringer, M. y Wintermeyer, W. (2007) How ribosomes make peptide bonds. *Trends Biochem. Sci.* 32: 20-26.

Rodnina, M.V. y Wintermeyer, W. (2010) The ribosome goes Nobel. *Trends Biochem. Sci.* 35: 1-5.

## Sección I

Blagoev, B. y Pandey, A. (2001) Microarrays go live – new prospects for proteomics. *Trends Biochem. Sci.* 26: 639-641.

Rommens, C.M. (2004) All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering. *Trends Plant Sci.* 9: 457-464.

## Sección J

Bolaños, J.P., Almeida, A. y Moncada, S. (2010) Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends Biochem. Sci.* 35: 145-149.

Kim, J. y Dang, C.V. (2005) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 30: 142-150.

Papin, J.A., Price, N.D., Sharon J., Wiback, S.J., Fell, D.A. y Palsson, B.O. (2003) Metabolic pathways in the post-genome era. *Trends Biochem. Sci.* 28: 250-258.

Schmidt, S., Sunyaev, S., Bork, P. y Dandekar, T. (2003) Metabolites: a helping hand for pathway evolution? *Trends Biochem. Sci.* 28: 336-341.

## Sección K

Anderson, R.G.W. (2003) Joe Goldstein and Mike Brown: from cholesterol homeostasis to new paradigms in membrane biology. *Trends Cell Biol.* 13: 534-539.

Beglova, N. y Blacklow, S.C. (2005) The LDL receptor: how acid pulls the trigger. *Trends Biochem. Sci.* 30: 309-317.

Wallis, J.G., Watts, J.L. y Browse, J. (2002) Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem. Sci.* 27: 467-473.

### **Sección L**

Oster, G. y Wang, H. (2003) Rotary protein motors. *Trends Cell Biol.* 13: 114-121.

Tielens, A.G.M., Rotte, C., Hellemond, J.J. y Martin, W. (2002) Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.* 27: 564-572.

Weber, J. (2007) ATP synthase – the structure of the stator stalk. *Trends Biochem. Sci.* 32: 53-56.

### **Sección M**

Braissant, O. (2010) Current concepts in the pathogenesis of urea cycle disorders. *Mol. Genet. Metab.* 100 Suppl. 1: S3-S12.

Downie, J.A. (2005) Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr. Biol.* 15: R196-198.

Fontecave, M., Atta, M. y Mulliez, E. (2004) S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem. Sci.* 29: 243-249.

# Abreviaturas

|                     |  |          |   |
|---------------------|--|----------|---|
| $\Delta E'_0$       | cambios en el potencial redox                                      | dNDP     | desoxirribonucleósido 5'-difosfato                        |
| $\Delta G^0$        | cambio de la energía libre estándar de una reacción a pH 7         | dNMP     | desoxirribonucleósido 5'-monofosfato                      |
| $\Delta G^\ddagger$ | energía libre de activación de Gibbs                               | DNP      | 2,4-dinitrofenol  |
| ACP                 | proteína transportadora de acilos                                  | dNTP     | desoxirribonucleósido 5'-trifosfato                       |
| ADP                 | difosfato de adenosina   | DPE      | elemento promotor corriente abajo                         |
| Ala                 | alanina  | DRE      | elemento de respuesta al cAMP                             |
| ALA                 | ácido aminolevulínico  | dsRNA    | RNA de doble cadena                                       |
| AMP                 | monofosfato de adenosina   | dTTP     | desoxitimidina 5'-trifosfato                              |
| Arg                 | arginina   | $E$      | energía   |
| Asn                 | asparagina   | $E'_0$   | potencial redox estándar                                  |
| Asp                 | ácido aspártico  | EC       | Comisión de Enzimas                                       |
| ATC-asa             | carbamoiltransferasa de aspartato                                  | ECG      | electrocardiograma  |
| ATP                 | trifosfato de adenosina  | eIF      | factor de iniciación eucariota                            |
| ATP-asa             | trifosfatasa de adenosina  | ELISA    | ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas               |
| bp                  | par de bases   | ER       | retículo endoplásmico                                     |
| BPG                 | 2,3-bisfosfoglicerato  | EtP      | etanolamina fosfato                                       |
| BSE                 | encefalopatía espongiiforme bovina                                 | ETS      | espaciador del transcrito externo                         |
| bZIP                | proteína básica de la cremallera de leucina                        | F-2,6-BP | fructosa 2,6-bisfosfato                                   |
| $C\alpha$           | átomo de carbono $\alpha$  | Fab      | unión al antígeno fragmentario                            |
| cAMP                | monofosfato de adenosina cíclico                                   | FACS     | clasificador celular activado por fluorescencia           |
| CAP                 | proteína activadora de catabolitos                                 | FAD      | dinucleótido de flavina y adenina                         |
| cDNA                | DNA complementario   | FBPasa2  | fructosa bisfosfatasa 2                                   |
| CDP                 | difosfato de citidina  | FMN      | mononucleótido de flavina                                 |
| CFP                 | proteína fluorescente azul   | FRAP     | recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo |
| CFTR                | regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística | FRET     | transferencia de energía por resonancia fluorescente      |
| cGMP                | monofosfato de guanosina cíclico                                   | $G$      | energía libre de Gibbs                                    |
| CJD                 | enfermedad de Creutzfeldt-Jakob                                    | GDP      | difosfato de guanosina                                    |
| CM                  | carboximetilo  | GEF      | factor de intercambio de nucleótidos de guanina           |
| CNBr                | bromuro de cianógeno   | GFP      | proteína fluorescente verde                               |
| CoA                 | acetilcoenzima A   | GlcNAc   | <i>N</i> -acetilglucosamina                               |
| COPI                | proteína de revestimiento  | Gln      | glutamina   |
| CRP                 | proteína de respuesta al cAMP                                      | Glu      | ácido glutámico   |
| CStF                | factor F de estimulación de escisión                               | GLUT1    | transportador o uniportador de glucosa eritrocitario      |
| CTD                 | dominio C terminal   | Gly      | glicina   |
| CTP                 | trifosfato de citosina   | GPCR     | receptor acoplado a la proteína G                         |
| Cys                 | cisteína   | GPI      | glucosilfosfatidilinositol                                |
| DAG                 | 1,2-diacilglicerol   | GTP      | trifosfato de guanosina                                   |
| dATP                | desoxiadenosina 5'-trifosfato                                      | $H$      | entalpía  |
| dCTP                | desoxicitidina 5'-trifosfato                                       | HbA      | hemoglobina del adulto                                    |
| DEAE                | dietilaminoetilo   |          |   |
| dGTP                | desoxiguanosina 5'-trifosfato                                      |          |   |
| DIPF                | diisopropilfosfluoridato   |          |   |
| DNA                 | ácido desoxirribonucleico  |          |   |



|                      |  |                 |   |
|----------------------|--|-----------------|---|
| HbF                  | hemoglobina F  | NMR             | resonancia magnética nuclear                              |
| HbS                  | hemoglobina de células falciformes                             | NOS             | sintasa de óxido nítrico                                  |
| HDL                  | lipoproteína de alta densidad                                  | Nt              | nucleótido  |
| His                  | histidina  | ORC             | origen del complejo de replicación                        |
| HIV                  | virus de inmunodeficiencia humana                              | ORF             | marco de lectura abierto                                  |
| HLH                  | hélice-asa-hélice  | ORT             | terapia de rehidratación oral                             |
| HMG                  | 3-hidroxi-3-metilglutarilo                                     | <i>P</i>        | presión   |
| HMM                  | mermiosina pesada  | PAGE            | electroforesis en gel de poliacrilamida                   |
| HPLC                 | cromatografía líquida de alto desempeño                        | PAP             | polimerasa poli(A)  |
| Hsp                  | proteína de choque por calor                                   | Pc              | plastocianina   |
| HTH                  | hélice-giro-hélice   | PEP             | fosfoenolpiruvato   |
| Hyl                  | 5-hidroxilisina  | PFK             | fosfofructocinasa   |
| Hyp                  | 4-hidroxiprolina   | PH              | homología con la pleckstrina                              |
| IDL                  | lipoproteína de densidad intermedia                            | Phe             | fenilalanina  |
| IF                   | factor de iniciación   | pI              | punto isoeléctrico  |
| IgA                  | inmunoglobulina A  | P <sub>1</sub>  | fosfato inorgánico libre                                  |
| IgG                  | inmunoglobulina G  | PI 3-cinasa     | 3-cinasa de fosfatidilinositol                            |
| IgM                  | inmunoglobulina M  | <i>pK</i>       | constante de disociación                                  |
| Ile                  | isoleucina   | PKA             | proteincinasa A   |
| IP <sub>3</sub>      | 1,4,5-trisfosfato de inositol                                  | PP <sub>1</sub> | pirofosfato inorgánico                                    |
| IPTG                 | isopropiltiogalactósido  | Pro             | prolina   |
| IRES                 | sitio interno de entrada al ribosoma                           | PSI             | fotosistema I   |
| ITS                  | espaciador del transcrito interno                              | PSII            | fotosistema II  |
| <i>K</i>             | constante de equilibrio  | PTB             | unión a fosfotirosina                                     |
| $\kappa_b$           | velocidad de reacción inversa                                  | PTH             | feniltiohidantoína  |
| $\kappa_f$           | velocidad de reacción anterógrada                              | RER             | retículo endoplásmico rugoso                              |
| <i>K<sub>m</sub></i> | constante de Michaelis   | RFLP            | polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción |
| LCAT                 | aciltransferasa de lecitina-colesterol                         | RIP             | proteólisis intramembrana regulada                        |
| LDH                  | deshidrogenasa de lactato                                      | RNA             | ácido ribonucleico  |
| LDL                  | lipoproteína de baja densidad                                  | RNA Pol         | polimerasa de RNA   |
| Leu                  | leucina  | RNAi            | interferencia del RNA                                     |
| LMM                  | mermiosina ligera  | RNP             | ribonucleoproteína  |
| Lys                  | lisina   | rRNA            | RNA ribosómico  |
| MALDI-TOF            | desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo-de-vuelo | <i>S</i>        | entropía  |
| MAP cinasa           | proteincinasa activada por mitógeno                            | [S]             | concentración del sustrato                                |
| Met                  | metionina  | SDS             | dodecilsulfato de sodio                                   |
| miRISC               | complejo de silenciamiento inducido por el miRNA               | SECIS           | secuencia de inserción de la selenocisteína               |
| miRNA                | micro-RNA  | SE-Cys          | selenocisteína  |
| miRNP                | microrribonucleoproteína                                       | SER             | retículo endoplásmico liso                                |
| mRNA                 | RNA mensajero  | Ser             | serina  |
| MS                   | espectrometría de masa   | SH2             | homología Src 2   |
| MWC                  | modelo de Monod-Wyman-Changeaux                                | SH3             | homología Src 3   |
| NAD <sup>+</sup>     | dinucleótido de nicotinamida y adenina                         | sida            | síndrome de inmunodeficiencia adquirida                   |
| NADH                 | dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido                | snoRNA          | RNA nucleolar pequeño                                     |
| NADP <sup>+</sup>    | dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato                 | snRNA           | RNA nuclear pequeño                                       |
| NADPH                | dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato reducido          | SREBP           | proteína de unión al elemento regulador de esteroides     |
| NAM                  | ácido N-acetilmurámico   | SRP             | partícula de reconocimiento de señal                      |
| NHP                  | proteína no histona  | SSB             | unión al DNA de cadena simple                             |
|                      |  | STR             | repeticiones cortas en tándem                             |
|                      |  | <i>T</i>        | temperatura   |

|              |  |            |                                      |
|--------------|--|------------|--------------------------------------|
| TBP          | proteína de unión a la caja <sup>TATA</sup>              | <i>trp</i> | operón del triptófano                |
| TCA          | ácido tricarbóxico                                       | Tyr        | tirosina                             |
| TFII         | factor de transcripción de la polimerasa de<br>RNA II    | U          | unidad enzimática                    |
| TFIID        | factor de transcripción IID                              | UBF        | factor de unión corriente arriba     |
| TFIIIA       | factor de transcripción A de la polimerasa de<br>RNA III | UCE        | elemento de control corriente arriba |
| TFIIIC       | factor de transcripción IIIC                             | UDP        | uridina disfosfato                   |
| TGF- $\beta$ | factor de crecimiento transformante $\beta$              | UTP        | uridina 5'-trifosfato                |
| Thr          | treonina   | UTR        | región sin traducir                  |
| Tris         | tris(hidroximetil)aminometano                            | UV         | ultravioleta                         |
| tRNA         | RNA de transferencia                                     | V          | volumen                              |
| Trp          | triptófano   | Val        | valina                               |
|              |  | VLDL       | lipoproteína de muy baja densidad    |
|              |  | YFP        | proteína fluorescente amarilla       |

# Índice alfabético

## A

- ABC, transportadores, 117
- Abierto, complejo promotor, 157, 170-171
- Accidente vascular cerebral, 303, 310
- Acetil-CoA, carboxilasa de, 295, 297, 298, 301, 302, 306
- Acetilcolina, 120, 132, 135
- Acetilcolinesterasa, 135, 194
- Acetoacetato, 288, 292, 293, 338, 342
- Acetona, 288, 292
- Acidobásico, par, conjugado, 20, 23
- Ácidos grasos, cadenas en esfingolípidos, 103, 104-105
- esenciales, 297
  - estructura y propiedades, 285-286
  - funciones, 285, 286-287
  - monoinsaturados, 285
  - nomenclatura, 285, 286
  - oxidación  $\beta$ . *Véase* Ácidos grasos, degradación de
  - poliinsaturados, 285, 291
  - prostaglandinas, 285, 287
- Ácidos grasos, degradación de, 288-293
- activación, 288-289
  - de ácidos grasos, 288, 289
  - cuerpos cetónicos, 288, 292
  - descripción, 288, 289
  - detalles de las reacciones, 289, 290
  - oxidación de ácidos grasos
    - de cadena impar, 288, 292
    - insaturados, 288, 291-292  - participación de la carnitina, 288, 289
  - producción de energía, 289, 292
  - regulación, 288, 292
  - transporte en las mitocondrias, 288, 289
  - vía de oxidación  $\beta$ , 288, 289-291
  - vía del glioxilato, 291
- Ácidos grasos, síntesis, 294-298
- descripción, 294, 295
  - estequiometría, 297
  - formación de los dobles enlaces, 294, 297
  - reacciones, 294, 295
  - regulación, 294, 297-298
  - transporte en el citosol, 294, 295
- Ácidos nucleicos, hibridación, 232-235
- chips de DNA, 290, 232, 234-235
  - desnaturalización, 232
  - hibridación *in situ*, 232, 234
  - medición de la concentración de la secuencia objetivo, 232
  - microordenamientos de DNA, 232, 234-235
  - Northern blotting, 232, 233-234
  - reacción de hibridación, 232, 233
  - reasociación, 232
  - renaturalización, 232
  - rigurosidad, 232
  - sondas de DNA, 232, 233, 234
  - Southern blotting, 232, 233
  - temperatura de fusión,  $T_m$ , 232
  - $T_m$ , 232
  - uso de disoxigenina, 232
- Acilcoenzima A (acil-CoA), 292, 299, 322
- sintasa, 289
- Acilo, proteína transportadora (ACP), 294, 295
- Aciltransferasa de colesterol (ACAT), 309
- Acoplamiento, 316, 324
- Acrilamida, 67
- Actina, 5, 7, 27, 47, 49, 50-51, 111
- Adelantada, cadena, 145, 147, 150, 151
- Adenilación, 101
- Adenilato, ciclasa de, 281, 283, 301
- cinasa de, 267
- Adenosina, difosfato de. *Véase* ADP monofosfato de. *Véase* AMP trifosfato de. *Véase* ATP
- ADP, 89
- ribosilación de, 101
- Adrenalina, control de degradación del triacilglicerol, 286, 288, 299, 301
- control de metabolismo del glucógeno, 281-282
  - control de síntesis de ácidos grasos, 297
- Afinidad, cromatografía de, 61, 64-65
- Agarosa, gel, electroforesis en, 227, 229, 230
- Agrobacterium tumefaciens*, 141
- Alcalina, fosfatasa, 19
- Alcaptonuria, 338, 342
- Alcohólica, deshidrogenasa, 96
- Aldosas, 252, 253, 256, 261
- Aldosterona, 307c
- $\alpha$ , hélice, 26, 29
- Alisina, 42, 46
- Almidón, estructura, 257, 258
- síntesis, 327, 331
- 3'5'-AMP cíclico. *Véase* cAMP
- Alosteria. *Véase* Alosteria, regulación
- Alosteria, regulación, 99
- modelo concertado (simetría), 98, 99
  - modelo de Monod-Wyman-Changeaux, 98
  - modelo de simetría (concertado), 98, 99
  - modelo secuencial, 99
- Alostérico, activador, 97, 99, 100
- inhibidor, 97, 99, 100
- Alzheimer, enfermedad de, 26
- Amiloide- $\beta$ , péptido, 35
- Aminoácidos, 20
- aminoácidos estándar, 20, 21-22
  - biosíntesis, 338, 339
  - cetogénicos, 338, 339
  - curva de titulación, 20, 24
  - degradación, 338-339
  - enantiómeros, 20, 21
  - esenciales, 338, 339
  - estructura, 20-25
  - glucogénicos, 338, 339
  - ionización, 21, 23, 24
  - metabolismo, 338-342
  - no esenciales, 338, 339
  - oxidasas, 338, 341-342
  - pesos moleculares, 27
  - valores pK, 20, 23-25
- Aminoácidos, degradación, 338-339.
- Véase también* Urea, ciclo
  - desaminación del glutamato, 338, 341
  - errores congénitos del metabolismo, 338, 342
  - fosfato de piridoxal, 338, 340-341
  - metabolismo de la fenilalanina, 338, 342
  - transaminación, 338, 339
  - vía de las oxidasas de aminoácidos, 338, 341-342
- Aminoazúcares, 252, 255
- Aminolevulínico, ácido (ALA), 348, 349
- sintasa de, 348, 349
- Amital, 316, 322
- Amoniaco, 337, 338, 341, 343, 344
- excreción, 343, 344
- Amonio, sulfato, precipitación, 60, 62
- Amoniotélicos, 343, 344
- Amortiguadores, 20, 24
- AMP, 89
- Andrógenos, 303, 307
- Anemia, falciforme, 40
- perniciosa, 85
- Angina, 126
- Angiotensina, enzima convertidora de, 95
- Aniones, intercambio de, proteína de banda, 3, 111
- Anómeros, 252, 255
- Anquirina, 111
- Anticongelante, envenenamiento por, 96
- Anticuerpos. *Véase también* Inmunitario, sistema; Anticuerpos, síntesis
- cadenas, ligeras, 54, 56
  - pesadas, 54, 56
  - clases, 54, 57-58
  - cromatografía de afinidad, 61, 64-65
  - determinante antigénico, 77
  - dominios, 54, 56
  - ELISA, 77, 78
  - epítipo, 54, 58, 77
  - estructura, 54-59
  - fragmento F(ab')<sub>2</sub>, 54, 56, 57
  - fragmento Fc, 54, 56-57
  - fragmentos Fab, 54, 56
  - IgA, 54, 58

- IgD, 54, 58  
 IgE, 54, 58  
 IgG, 54, 57  
 IgM, 54, 57  
 inmuno (western) blotting, 79-80  
 inmunocitoquímica, 77  
 inmunodetección, 77  
     métodos, 77-80  
 inmunoelectrónica, microscopía, 77  
 inmunofluorescente, microscopía de luz, 77  
 monoclonales, 54, 58  
 policlonales, 54, 58  
 recombinación somática, 54, 58. *Véase también* Anticuerpos, síntesis  
 regiones, constantes, 59  
     hipervariables, 56  
     marco, 56  
     variables, 56  
 síntesis, 54, 58-59  
 unión de antígenos, sitios, 54, 56  
 uso de un segundo anticuerpo, 78  
 Western blotting, 79-80  
 Anticuerpos, síntesis, 54, 58-59  
     cambio de clase, 59  
     recombinación somática, 58  
     unión D<sub>H</sub>, 59  
     unión V<sub>DJ</sub>, 59  
     unión V<sub>H</sub>, 59  
 Antígeno, 65  
 Antimicina A, 316, 322  
 Anti-SD, secuencia, 206  
 Apical, membrana, 115, 118  
 Apolipoproteínas, edición de premRNA, 190  
 Apoptosis, 97, 101  
 Araquidónico, ácido, 105, 126  
 Arginasa, 344, 345  
 Argininosuccinasa, 345  
 Argininosuccinato, 343, 345  
 Arqueobacterias, 1, 2  
     DNA, 141  
 Artritis, 347  
 Ascórbico, ácido. *Véase* Vitamina, C  
 Aspartame, 342  
 Aspartato, transcarbamoilasa, 97, 99  
 Aspirina, 94, 126, 285, 287  
 Atenuación, 161, 163-164  
 Aterosclerosis, 308, 310  
 Ateromas, 308, 310  
 ATP-asa, Ca<sup>2+</sup>, 113-114, 130  
     contracción-relajación del músculo, 49  
     F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>, 3, 316, 322  
     Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, 115, 117-118  
     tipo P, 115, 117  
 ATP, ATP-asa F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>, 3, 316, 322  
     estructura, 89  
     sintasa de, 316, 322-323, 328, 330, 323  
     síntesis. *Véase* Oxidativa, fosforilación;  
         Sustrato, fosforilación a nivel de  
 Autoempalme del RNA, 184,  
 Autorradiografía, 66, 70, 77, 80  
 Axón, 132, 133  
     montículo, 133  
 Axonema, 52, 53  
 Azida, 316, 322  
 Azúcares, 252-256. *Véase también*  
     Monosacáridos  
     derivados del azúcar, 256  
     enlaces glucosídicos, 255  
     nomenclatura, 256  
**B**  
 β-Aminopropionitrilo, 46  
 B, linfocitos, 54, 55, 58  
 Bacterias. *Véase también* Replicación del  
     DNA en bacterias; Transcripción  
     en eucariotas; Transcripción  
     en procariontes; Traducción  
     en eucariotas; Traducción en  
     procariontes  
     clasificación, 3  
     estructura, 1-3  
     flagelos, 1, 3  
     gramnegativas, 3  
     grampositivas, 3  
     pared celular, 2-3  
 Bacteriorrodopsina, 110  
 Baja densidad, lipoproteínas (SDF), receptor  
     de, 123, 186, 308, 309  
 Bases, DNA, 136, 138  
     RNA, 154, 156  
 Basolateral, membrana, 115, 118  
 Bicapa lipídica, 2, 103, 105-106, 109, 110,  
     113  
 Bidimensional, electroforesis en gel,  
     66, 69  
 Biliar, conducto, 351  
 Biliares, pigmentos, 350  
     sales, 301, 303, 306, 310  
 Bilirrubina, 348, 351  
 Biliverdina, 348, 350  
     reductasa de, 348, 351  
 Biógenas, aminas, 124, 126, 132, 135  
 Biotina, 271, 272, 294, 295  
 Bohr, efecto de, 39  
*Borrelia burgdorferi*, 141  
 Botulínica, toxina, 122  
 Bromofenol, azul, 67  
**C**  
 Ca<sup>2+</sup>, activación de la proteína cinasa C, 130  
     ATP-asa de, 113, 116, 130  
     cinasas de proteína dependientes de  
         calmodulina-Ca<sup>2+</sup>, 131  
     como segundo mensajero, 130  
     contracción muscular y, 51, 281, 284  
     control del metabolismo del glucógeno  
         y, 281  
     proteínas de unión de, 130-131  
     transducción de señales, 159  
     transporte, 115, 116  
 CAAT, caja, 172, 174  
 Cadena, terminación, secuenciación del  
     DNA y, 240-241, 242  
 Calmodulina, 125, 130-131  
 Calor, proteínas de choque por, 35  
 Calvin, ciclo de, 327, 331, 332, 333  
 cAMP, elemento de respuesta al, 174  
     fosfodiesterasa de, 284  
     proteína de respuesta al, 160, 163  
     proteína cinasa dependiente de, 130, 283,  
         297, 299, 301  
     segundo mensajero, 125, 129, 130, 301  
 Canales, 116  
     iónicos, ligados a receptores, 124, 128  
     sensibles al voltaje, 133-134  
 Carbamoilfosfato, 343, 344, 345  
     sintetasa de, 345  
 Carbónica, anhidrasa, 39  
 Cardioplipina. *Véase* Fosfatidilglicerol  
 Cardiotónicos, esteroides, 118  
 Cardiovascular, enfermedad, 303  
 Carnitina, 288, 289  
     aciltransferasa de, 289  
     translocasa de, 288, 289  
 Carotenoides, 326-328  
 Caspasa, 101  
 Casquete o caperuza, formación, en el  
     mRNA, 179, 181-182  
 Catabolitos, proteína activadora de (CAP),  
     160, 163  
     represión de, 160, 163  
 Catalasa, 4, 7, 12, 19  
 Catalítico, RNA, 184, 193  
 Catepsina C, 19  
 cDNA, bibliotecas, 236, 237-239  
     expresión, 236, 239  
     microordenamientos de DNA y, 323, 325  
 Célula nerviosa, canales iónicos con  
     compuerta de voltaje, 169-170  
     estructura, 168-169  
     periodo refractario, 171  
     permeabilidad, 169  
     potencial de acción, 168, 169  
 Celular, división, 5, 8, 9, 10  
     estructura, eucariota, 4-8  
     procarionte, 1-3  
     señalización, 103-135  
 Celulosa, 5, 8, 257, 258  
 Centrifugación, gradiente de densidad de  
     equilibrio, 16, 18-19  
     velocidad diferencial, 16, 18  
 Centrosoma, 8  
 Cepillo, membrana con borde en. *Véase*  
     Apical, membrana  
 Cerrado, complejo del promotor, 157  
 Cesio, cloruro, 19  
 Cetogénesis, 292  
 Cetónicos, cuerpos, 264, 292-293  
 Cetosos, 252, 253  
 cGMP, como segundo mensajero, 125, 130  
 Chaperonas, 216, 218  
     moleculares, 26, 35  
*Chlamydomonas*, 144  
 Cianobacterias, 2, 327, 330, 335  
 Cianógeno, bromuro de, 71, 72  
 Ciclo celular, eucariotas, 9, 10, 150  
     procariontes, 9  
 Ciclosporina A, 35  
 Cilios, 48, 52, 53  
 Cimógenos, 101  
 Cinesinas, 47, 51-52  
 Citocinas, receptores de, 126-127

- Citocinesis, 10  
 Citocromo *b<sub>f</sub>*, complejo, 326, 327, 328, 329  
 Citocromo *b<sub>f</sub>*, complejo, 326, 329  
 Citocromo P-450, 346, 350  
 Citocromos, 348  
 Citoesqueleto, 5, 7-8  
 Citosol, 4, 7  
 Cítrico, ciclo del ácido, 311-314  
   deshidrogenasa de  $\alpha$ -cetoglutarato, regulación, 313  
   deshidrogenasa de isocitrato, regulación, 313-314  
   deshidrogenasa de piruvato, regulación, 313-314  
   función, 311, 312  
   localización, 311, 312  
   pasos de la reacción, 312-313  
   producción de energía, 311, 313  
   provisión de precursores de vías biosintéticas, 314  
   regulación, 311, 313-314  
   sintasa de citrato, regulación, 313-314  
 Citrulina, 343, 345  
 Clase I o clase II, aminoacilsintetasa, 204, 205-206  
 Clatrina, cavidades revestidas, 120, 121, 123  
   endocitosis mediada por el receptor, 120, 122-123  
   vesículas revestidas, 120, 121, 123  
 Clorofila, 7, 326, 328  
 Cloroplasto, 4, 7, 16, 18, 140, 144, 166, 167, 184, 213, 218, 326, 328, 330, 331, 333  
   genoma del, 144  
 Cobalamina, 85  
 Código genético, 199-203  
   anticodones, 199, 201  
   código de tripletes, 199, 200  
   codón, de iniciación, 199, 200  
   de terminación, 199, 200  
   codones, 199, 200, 202  
   de detención, 200  
   con sentido, 202  
   colineal, 200  
   degeneración, 199, 201-202  
   marcos de lectura, 199, 202  
   abiertos, 199, 203  
   mutación puntual, 202  
   "pareos de bases tambaleantes", 202  
   secuencia de proteínas deducida, 203  
   sinónimos, 199, 202  
   superposición de genes, 199  
   tRNA de isoaceptación, 199, 202  
   universalidad, 199, 202  
 Colágena, 42-46  
   agregación, 42, 45  
   biosíntesis, 42, 43-44  
   composición, 42, 44  
   entrecruzamientos, 42  
   estructura, 42, 44-45  
   función y diversidad, 42, 43  
   hélice, 42, 44, 45  
   modificación postraducción, 42, 43, 44  
   péptidos de extensión, 42, 44  
   procolágena trihelicoidal, 42  
   secreción y agregación, 42, 45  
 Colchicina, 5, 8  
 Colecalciferol, 306  
 Cólera, toxina del, 130  
 Colesterol, 103, 303-307  
   biosíntesis, 304-306  
   endocitosis mediada por receptor del, 103, 122-123  
   excreción, 306  
   fluidez de la membrana y, 103, 107  
   funciones, 303  
   regulación de la biosíntesis, 303, 306  
   síntesis, de hormonas esteroideas, 303, 307  
   de vitamina D, 303, 306  
 Colil-CoA, 306  
 Colonia, levantamiento de, 238  
 Complementariedad geométrica, 82  
 Conector, DNA, 140, 142  
 Congelada, fractura, técnica de, 112  
 Congénitos, errores del metabolismo, 338, 342  
 Coomassie, azul brillante, 66, 70  
 COPI, 120, 122  
 Cori, ciclo de, 269, 274  
 Cortisol, 303  
 Creatina, cinasa de, 86  
   formación de fosfato, 343, 346  
 Crestas, 4, 6  
 Crioelectrónica, microscopía, 15  
 Cromatina, 142. *Véase también*  
   Cromosomas  
   estructura superior, 143  
 Cromatografía, afinidad, 61, 64, 65  
   filtración por gel, 60, 62-63  
   inmunoafinidad, 61, 65  
   interacción hidrófoba, 61  
   intercambio de iones, 60, 63-64  
   líquida de alto desempeño (HPLC), 72  
 Cromosomas, eucariotas, proteínas de  
   andamiaje, 141, 144  
   asas radiales, 142, 144  
   comparación con cromosomas procaríotas, 5  
   cromatina, 142  
   fibra de 30 nm, 140, 143  
   genomas de los organelos, 140, 144  
   histonas, 140, 142  
   interfase, 140, 142  
   matriz nuclear, 144  
   modelo en zigzag, 143  
   modelo solenoide, 143  
   nucleosomas, 140, 142-143  
   octámero de histonas, 141  
   proteínas no histonas, 142  
   relación de empaque, 143  
   replicación, 150-153  
 Cromosomas, procaríotas, 140, 141-142  
 C terminal, dominio (CTD), de la polimerasa II de RNA, 168, 171, 179, 181  
 Cultivo celular, 9
- D**
- D-3-Hidroxibutirato, 292  
 Dansilo, cloruro, 71, 72  
 Desacoplantes, 316, 324  
 Desnaturalización, enzimas, 24, 90, 92  
   PCR, 243, 250  
   proteínas, 92  
 Desoxirribionucleósidos, 136, 137  
 Desoxirribonucleótidos, 136, 137  
 Detección, bibliotecas de DNA, 236, 238, 239  
   enfermedades genéticas humanas, por PCR, 243, 245  
 Detergente, solubilización de proteínas de membrana, 60, 61, 108, 113  
   uso de SDS en SDS-PAGE, 66, 67-68  
 Dextrano, 257, 258  
 Diabetes, 292  
 1,2-Diacglicerol, 125  
 Diálisis, 62, 65  
 Digitalina, 115, 118  
 Dihidrobiopterina, 342  
 Dihidrolfolato, reductasa de, 95  
 Diisopropilfosfluoridato (DIPF), 94  
 Dinamina, 123  
 Dineína, 48, 52-53  
 2,4-Dinitrofenol, como desacoplador, 316, 324  
 Direccionamiento de proteínas  
   mitocondriales, proteínas hsc60 y hsc70, 218  
   proteínas Tim, 218  
   proteínas Tom, 218  
 Disacáridos, 252, 255  
 Disulfuro, enlace, 20, 22, 29, 33  
 Ditiotreitól, 67, 73  
 DNA, bibliotecas, 236, 237-238  
   chips, 232, 234-235  
   microordenamientos, 232, 234-235  
 DNA, clonación, 236-239  
   bibliotecas de cDNA, 236, 237-238  
   genómico, 237  
   detección de bibliotecas de DNA, 236, 238-239  
   expresión de la biblioteca de cDNA, 236, 239  
   levantamiento, de colonia, 238  
   de placa, 239  
   pasos básicos participantes, 236, 237  
   principios de, 236, 237  
   réplica de la placa, 238  
   transfección, 237  
   vector de expresión, 239  
 DNA, organización, eucariotas, 140, 142  
   procaríotas, 140, 141-142  
 DNA, polimerasa I de, 145-146  
   polimerasa II, 145, 146  
   polimerasa III, 145, 146, 147, 148  
 DNA genómico, bibliotecas, 236, 237  
 DnaA, proteína de reconocimiento del origen, 146  
 DnaB, 146, 148  
 Doble hélice, 138-139  
 Dolicolfosfato, 220, 221  
 Dopamina, 135
- E**
- Edman, degradación de, 71, 72  
 Ehlers-Danlos, síndrome de, 46

- Eicosanoides, 285, 287  
 Elastasa, 82, 83, 101  
 Electrones, transporte, 315-325  
     acoplamiento, 316, 324  
     amital, 316-322  
     antimicina A, 316, 322  
     ATP-asa  $F_0F_1$ , 316, 322  
     azida, 316, 322  
     centro de  $2Fe2C$  de Rieske, 319  
     cianuro, 316, 322  
     ciclo Q, 319  
     citocromo b, 315, 319  
     citocromo c, 315, 320  
     citocromo c1, 315, 320  
     complejo I, 318, 322  
     complejo II, 318, 321  
     complejo III, 318, 319-320  
     complejo IV, 318, 320, 321  
     control respiratorio, 316, 324  
     desacoplamiento en el tejido adiposo pardo, 324  
     desacoplantes, 316-317, 324  
     descripción, 315, 317  
     desde el  $FADH_2$ , 321-322  
     desde el  $NADH$ , 315, 318-320  
     2,4-dinitrofenol, como desacoplante, 316, 324  
     formación del gradiente de  $H^+$ , 315, 322  
     fosforilación oxidativa, 316, 322  
     fuerza protón motriz, 322  
     gradiente electroquímico de protones, 322  
     hipótesis quimiosmótica, 316, 322  
     lanzadera, de glicerol 3-fosfato, 317, 324  
     de malato-aspartato, 317, 325  
     monóxido de carbono como inhibidor, 216, 322  
     oxidasa del citocromo c, 315, 320, 321  
     oxidoreductasa, de  $NADH-Q$ , 315, 318  
     de Q-citocromo c, 315, 318, 319  
     potencial redox, 315, 317-318  
     estándar, 315, 317  
     proteínas de hierro-azufre, 318, 319  
     reductasa de succinato-Q, 321  
     rotenona, 316, 322  
     sintasa de ATP, 316, 322  
     termogenina, 316, 324  
     ubiquinona, 315, 318  
 Electrónica, microscopía, 11, 14-15  
 ELISA, 77, 78-79  
     sándwich de, 77, 78  
 Empacamiento, relación de, del DNA en los cromosomas, 142, 143  
 Empalme, factores del, 183  
 Empalme del pre-mRNA, 179-182-183  
 Encefalinas, 135  
 Endocitosis, 5, 7, 120, 122  
     mediada por receptor, 120, 122-123  
 Endosimbótica, teoría, 167  
 Endosoma, 120, 123, 218  
 Endosomas iniciales, 123  
 Energía libre, 87, 88  
 Entalpía, 88  
 Enteropeptidasa, 101  
 Entropía, 88  
 Enzima, 81-86  
     actividad específica, 91  
     alostérica, 97, 98  
     apoenzima, 85  
     cambio de energía libre, 87, 88-89  
     catalizadores, 81, 82  
     cinética, 90  
     clasificación, 81, 83  
     coenzimas y grupos prostéticos, 81, 84-86  
     cofactores, 84  
     complejo enzima-sustrato, 82  
     desnaturalización, 90  
     energía de activación y estado de transición, 87, 88  
     ensayo, 81, 83-84  
     especificidad del sustrato, 81, 82-83  
     gráfica de Lineweaver-Burk, 90, 93  
     grupos prostéticos, 81, 84-86  
     holoenzima, 85  
     inhibición por retroalimentación, 91  
     inhibidor, 93  
     isoenzimas, 86  
     modelo, de ajuste inducido, 82  
         de cerradura y llave, 82  
         de Michaelis-Menten, 90, 92-93  
     nomenclatura, 83  
     pH óptimo, 86, 92  
     sitio activo, 81, 82  
     temperatura, 91-92  
     termodinámica, 87-88. *Véase también* Termodinámica  
     unidades enzimáticas, 91  
     velocidad de la reacción inicial, 84  
 Eosina, 12  
 Epímeros, 254  
 Equilibrio, constante de, 23, 89  
 Escorbuto, 44, 85  
 Escualeno, 303, 304  
 Esfingolípidos, 103, 104, 285  
 Esfingomielina, 103, 104, 106, 108, 113, 132  
 Espectrina, 111  
 Espliceosomas, 179, 181, 183, 184  
 Esqueléticas, deformidades, 45  
 Estatinas, 306, 310  
 Estearato, 103, 104-105  
 Estereoisómeros, aminoácidos, 22  
     monosacáridos, 252, 253  
 Esteroides, hormonas, clases, 307  
     control de la transcripción, 174  
     receptores, 174, 175  
     señalización por, 124, 126  
     síntesis, 126, 303, 307  
     transporte a través de las membranas, 115, 116, 124, 126  
 Esteroles, 103, 104  
 Estrógeno, 126  
 Estroma, 4, 7  
 Estrona, 307  
 Estructura del DNA, bases del DNA, 136  
     desoxirribonucleósidos, 136, 137  
     desoxirribonucleótidos, 136, 137  
     disposición antiparalela, 139  
     doble hélice, 136, 138-139  
     enlaces 3'5'-fosfodiéster, 136, 137  
     nucleósidos, 136  
     nucleótidos, 136-137  
     pareamiento de bases, 139  
     pirimidinas, 136, 139  
     purinas, 136, 139  
     secuencia de bases, 138  
 Eubacterias, 1, 2  
 Exocitosis, 4, 5, 120, 121-122, 135, 214  
 Exones, corte y empalme alternativo, 180, 185  
     descripción, 168  
     unión por corte y empalme del RNA, 181, 182  
**F**  
 FAD, 86  
 Fagocitosis, 57, 120, 122  
 Fagosoma, 120, 122  
 Falciforme, anemia por célula, 40, 41, 231  
 Farnesilo, 111  
     pirofosfato, 111  
 Fenilalanina, hidroxilasa de, 338, 342  
 Fenilcetonuria, 338, 342  
 Feniltiohidantoína, aminoácidos, 72  
 Fermentación alcohólica, 260, 264, 265  
 Ferredoxina, 326, 329  
 Fibra de 30 nm, 140, 143  
 Fibrosis quística, 117  
 Ficobilinas, 328  
 Ficocianina, 348, 350  
 Ficoeritrina, 348, 350  
 Filamentos, flagelares, 3  
     intermedios, 8  
     microfilamentos, 7-8  
     microtúbulos, 8  
 Fitocromo, 348, 350  
 Fitol, 349  
 Flagelina, 1, 3  
 Flagelos, 1, 3, 48, 52  
 Flavina, mononucleótido de. *Véase* FMN  
 Flavina y adenina, dinucleótido de. *Véase* FAD  
 Flujo, citometría de, 16-17  
 Flujo de ATP y ADP a través de la membrana mitocondrial interna, 316, 323-324  
     sintasoma de ATP, 324  
     translocasa de ATP-ADP, 323  
     transportador de fosfato, 324  
 Fluorescamina, 71, 72  
 Fluoresceína, 11, 13, 77  
 Fluorescencia, clasificador celular activado por, 16, 17  
     microscopía de, 13, 15  
     recuperación, después del fotoblanqueo (FRAP), 11, 14, 108, 112  
 FMN, 86  
 Fosfatasa ácida, 19  
 Fosfatídico, ácido, 299, 300, 301  
 Fosfatidilcolina, 103, 104, 105, 106  
 Fosfatidiletanolamina, 103, 104, 105, 106  
 Fosfatidilglicerol, 104  
 Fosfatidilinositol, 104, 105, 110, 127  
     4,5-bisfosfato, 130  
     3-cinasa de, 127  
 Fosfatidilserina, 103, 104, 105, 106

- 3'5'-Fosfodiéster, enlaces, 136, 137, 138, 145, 146, 148  
 Fosfoglucolato, 327, 333  
 Fosfogluconato, vía. *Véase* Pentosa fosfato, vía  
 Fosfolipasa C, 125, 130, 131  
 Fosfopanteteína, 295  
 Fosforilación/desfosforilación, 311, 314  
 Fosfotirosina, dominios de unión de, 127  
 Fotosíntesis, 326-334  
 aprovechamiento de la luz en plantas de hojas verdes, 326, 328  
 bacterias, 327, 330-331  
 carotenoides, 326, 328  
 centro de reacción fotosintética, 326, 327, 328  
 ciclo de Calvin, 327, 331, 332, 333  
 clorofila, 326, 328  
 complejo, antena, 328  
 citocromo *b<sub>f</sub>*, 326, 329  
 citocromo *bf*, 326, 327, 329, 330, 331  
 descripción, 326, 328  
 esquema Z, 326, 328, 329, 330, 331  
 ferredoxina, 326, 327, 329, 330  
 ficobilinas, 328  
 fotofosforilación, cíclica, 327, 330, 331  
 no cíclica, 326, 327, 329, 330  
 fotorrespiración, 327, 333  
 fotosíntesis bacteriana, 327, 330-331  
 fotosistemas I y II, 326, 328-330  
 localización, 326, 328  
 plantas C3, 333  
 plantas C4, 333  
 plastocianina, 326, 327, 329, 330  
 plastoquinol, 329  
 plastoquinona, 326, 329  
 reacciones, en la claridad, 331  
 en la oscuridad, 328  
 fijación de carbono, 326, 327, 328  
 reductasa de ferredoxina-NADP, 329, 330  
 rubisco (carboxilasa de ribulosa bisfosfato), 327, 331, 332, 333  
 síntesis, de almidón, 327, 333  
 de sacarosa, 327, 331, 332-333  
 transferencia de energía de resonancia, 328  
 vía C4, 327, 333-334  
 FRAP, 11, 14, 108, 112  
 FRET, 13-14  
 Fructosa, ciclización, 254  
 estructura, 253  
 metabolismo, 260, 265  
 Fuerzas electrostáticas, 26, 31, 33, 82  
 Furanosas, 254  
 Fusión, temperatura de,  $T_m$ , de los ácidos nucleicos, 232  
 Fútiles, ciclos, 272
- G**
- G, proteína, receptores acoplados a, 110, 124, 128-129  
 G1, fase, 9, 10  
 G2, fase, 9, 10  
 Galactitol, 260, 266  
 Galactosa, estructura, 254  
 galactosemia, 260, 266  
 metabolismo, 260, 265-266  
 nomenclatura, 252, 256  
 vía de interconversión galactosa-glucosa, 260, 265  
 Gel, electroforesis en, 66-70  
 Genes codificantes de proteínas, expresión en eucariotas  
 caja TATA, 168, 170, 174  
 casquete del mRNA, 168, 169, 179, 181-182, 187, 188  
 edición del RNA, 180, 186  
 elementos de control corriente arriba en eucariotas, 213-214  
 elongación, 168, 170-171  
 empalme alternativo, 185  
 empalme del RNA, 179, 181, 182-183.  
*Véase también* RNA, empalme del  
 factores de transcripción de la polimerasa II de RNA, 168, 170, 172-173  
 factores de transcripción general, 168, 170  
 iniciación, 168, 169, 171  
 organización génica, 168-169  
 poliadenilación del mRNA, 180, 181, 184-185  
 pre-mRNA, 179, 180  
 procesamiento alternativo, 180, 185  
 procesamiento del pre-mRNA, 179-188  
 regulación de la transcripción, 171-178.  
*Véase también* Regulación de la transcripción en eucariotas  
 secuencia iniciadora (Inr), 168, 170  
 sitios de poliadenilación alternativos, 141, 185  
 sitios promotores de la polimerasa II de RNA, 169  
 terminación, 168, 169, 170-171, 180, 185  
 transcripción por la polimerasa II de RNA, 172-178. *Véase también* Transcripción en eucariotas; Regulación de la transcripción en eucariotas  
 Genes codificantes de proteínas, expresión en procariotas, 156, 159.  
*Véase también* Regulación de la transcripción en procariotas  
 mRNA policistrónico, 160, 161, 163, 164  
 operón *lac*, 160, 161. *Véase también* *Lac*, operón  
 operón *trp*, 160, 161, 163. *Véase también* *Trp*, operón  
 Genoma Humano, Proyecto, 224  
 Genómica, 224-225  
 funcional, 224  
 Geranilgeranilpifosfato, 305-306  
 Geranilpifosfato, 303, 304  
 Gibbs, energía libre de activación, 87, 88, 92  
 Gliceraldehído, 253  
 Glicerofosfolípidos, 103, 104  
 Glicerol 3-fosfato, lanzadera de, 317, 324-325  
 Glioxilato, vía del, 291  
 Glucagon, control de la degradación del triacilglicerol, 299, 301  
 control del metabolismo del glucógeno, 130, 281  
 inhibición de la síntesis de ácidos grasos, 294, 297  
 Glucocorticoides, 303  
 Glucoesfingolípidos, 104, 113  
 Glucoforina, 108, 109  
 Glucógeno, estructura, 257, 258  
 síntesis y degradación. *Véase* Glucógeno, síntesis y degradación  
 Glucógeno, síntesis y degradación, 278-280  
 cascada, 284  
 control, alostérico y modificación covalente, 281, 282-283  
 metabolismo del glucógeno dependiente de calcio, 281, 284  
 control hormonal, por adrenalina y glucagon, 281, 283-284  
 por insulina, 281, 284  
 enzima desramificante del glucógeno, 278  
 enzima ramificante, 278, 279  
 del glucógeno, 278, 279  
 fosforilasa de glucógeno, control de, 278  
 reacción, 279  
 fosforilasa de UDP-glucosa, 278, 279  
 función, de ciclasa de adenilato, en el control de, 283  
 de cinasa fosforilasa, en el control de, 282  
 de fosfatasa de proteína, en el control de, 281, 282  
 de proteincinasa, en el control de, 281, 283-284  
 funciones del metabolismo del glucógeno, 278  
 glucogenina, 278, 279  
 reacciones de degradación del glucógeno, 278-279  
 regulación, 281, 282  
 a través de la proteincinasa dependiente de cAMP, 283-284  
 sintasa de glucógeno, control de, 278  
 reacciones, 279  
 síntesis de glucógeno, reacciones, 279-280  
 Glucólisis, 260-267  
 control, cinasa de piruvato, 261, 267  
 fosfofructocinasa, 261, 266-267  
 hexocinasa, 261, 267  
 conversión en etanol, 260, 264  
 descripción, 260, 261  
 destinos del piruvato, 260, 264  
 fosforilación a nivel de sustrato, 263-264  
 metabolismo, fructosa, 260, 265  
 galactosa, 260, 265-266  
 lactato, 264  
 piruvato, 260, 263  
 producción de energía, 260, 264-265  
 regulación, 266-267  
 regulación recíproca, con la gluconeogénesis, 267, 268, 272-274  
 vía metabólica, pasos, 260, 261-263

Gluconeogénesis, 268-274  
 activación de la carboxilasa de piruvato, 268, 271-272  
 ciclo de Cori, 269, 274  
 descripción, 268, 269  
 energía usada, 268, 271  
 precursores, 269, 271  
 regulación recíproca con la glucólisis, 268, 272-274  
 transporte de oxalacetato, 268, 271  
 vía metabólica, 268, 269  
 Glucoproteínas, 114, 255, 258  
 Glucosa, ciclización, 254, 255  
 ensayo ligado, 84  
 estructura, 252, 254  
 glucosilación de proteínas, 220-223  
 inhibición, de ciclasa de adenilato, 163  
 del operón *lac*, 162, 163  
 metabolismo. *Véase* Glucólisis  
 nomenclatura, 252, 256  
 oxidasa de, 184  
 terapia de rehidratación, 115, 119  
 oral, 115, 119  
 transporte, 115, 118, 119  
 Glucósidos cardiacos, 115, 118  
 Glucosilación, 220-223  
 Glucosilfosfatidilinositol (GPI), proteínas unidas al, 110  
 Glucurónico, ácido, 256, 348, 351  
 GLUT1, 116-117  
 Glutamato, biosíntesis, 341  
 degradación, 341  
 desaminación oxidativa, 338, 341  
 deshidrogenasa de, 335, 337  
 estructura, 23  
 hiperamonemia y, 343, 345-346  
 neurotransmisor, 135  
 peso molecular, 23, 25  
 pK, 25  
 3'5'-GMP cíclico. *Véase* cGMP  
 Golgi, aparato de, 4, 6, 18, 42, 43, 120, 121  
 Granos, 4, 7  
 GTP-asa, proteínas interruptoras de, 128, 129-130  
 Guanilciclase, 124, 126, 130  
 Guaniltransferasa, 179, 181  
 Guanina, factor de intercambio del nucleótido, 129  
 metiltransferasa de, 181

**H**

Haworth, proyecciones de, 255  
 Hemiactal, 254  
 Hemicetal, 254  
 Hemo, biosíntesis, 348-350  
 citocromos y, 315, 319, 320, 348  
 clorofila y, 348  
 degradación, 348, 350-351  
 hemoglobina y, 36, 37  
 leghemoglobina, 337  
 mioglobina y, 36, 37  
 unión del oxígeno a, 36, 37-39  
 Hemoglobina y mioglobina, 36-41  
 alosteria, 36, 39

curva de disociación del oxígeno, 36, 39  
 efecto Bohr, 39-40  
 fetal, 36, 40  
 hemoglobinoatías, 36, 40-41  
 histidina, distal, 36, 37, 40  
 proximal, 36, 37, 40  
 mecanismos de cambio alostérico, 39  
 unión del oxígeno al hemo, 36, 37-39  
 Hemoglobinoatías, 36, 40-41  
 Henderson-Hasselbalch, ecuación de, 23-24  
 Hendidura, proteína de, 81, 82  
 Hepatitis, 86  
 Heptosas, 253  
 Hexosa monofosfato, cortocircuito; *Véase* Pentosa fosfato, vía  
 Hexosas, 253  
 Hibridación. *Véase* Ácidos nucleicos, hibridación  
 Hidrófobo, efecto, 33, 106  
 Hidrógeno, enlaces de, 33  
 peróxido, 7  
 Hidrolasa, 83  
 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG CoA), 292, 303, 304  
 5-Hidroxilisina, 42, 44  
 4-Hidroxiprolina, 42, 44  
 Hierro, envenenamiento por, 349  
 Hiperamonemia, 343, 345-346  
 Hipercolesterolemia, 306, 308, 310  
 Histamina, 58, 126  
 Histonas, 140, 142-143  
 Hoja  $\beta$ . *Véase* Plegada  $\beta$ , hoja  
 Homocisteína, 347  
 Homogenización, 18, 60, 61  
 Homogentisato, 338, 342  
 Hormona, lipasa de triacilglicerol sensible a, 292, 299, 301  
 Hormonas, 124-126  
 control, metabolismo del glucógeno, 281-284  
 síntesis de ácidos grasos, 294-298  
 descomposición de los triacilgliceroles, 299, 301  
 esteroideas, 303, 307  
 Hueso, formación, 42, 46  
 Huesos frágiles, 45

**I**

Ibuprofeno, 287, 307  
 Ictericia, 266, 351  
 Iminoácido, 20, 21  
 Inmunoeléctronica, microscopia, 77  
*In situ*, hibridación, 232, 234  
*In vitro*, mutagénesis, 248. *Véase también* Mutagénesis dirigida al sitio  
 Inclusión, cuerpos de, 7  
 Indirecta, ELISA, 78  
 Inhibición enzimática, 94-96  
 competitiva reversible, 94, 95-96  
 irreversible, 94-95  
 no competitiva reversible, 94, 96  
 Inmóviles, síndrome de los cilios, 53  
 Inmunitario, sistema, 55

Inmunoabsorbente ligado a enzimas, ensayo. *Véase* ELISA  
 Inmunoafinidad, cromatografía por, 61, 65  
 Inmunocitoquímica, 77  
 Inmunodeficiencia humana, virus de la, 95  
 Inmunodetección, métodos, 77-80  
 Inmunofluorescente, microscopia de luz, 77  
 Inmunoglobulina, pliegue, 32  
 Inmunosupresor, fármaco, 35  
 Inositol, 1,4,5-trisfosfato de (IP3), 125, 130  
 Insuficiencia cardiaca congestiva, 115, 118  
 Insulina, control, degradación de triacilglicerol, 299, 301  
 síntesis de ácidos grasos, 294, 297  
 metabolismo del glucógeno, 282, 284  
 receptor, 124, 126  
 regulación de la gluconeogénesis, 268, 273  
 Interfase, 10, 140, 142  
 Intermedios, filamentos, 5, 8  
 Intestinales, células epiteliales, 115, 118  
 Intrones, autoempalme, 184  
 descripción, 168  
 remoción por empalme del RNA, 179, 182  
 Inversa, genética, 224  
 transcriptasa, 95  
 Ionización, ácidos y bases, 23  
 aminoácidos, 21  
 Isoaceptación, tRNA, 202  
 Isoeléctrico, enfoque, 61, 66, 68-69  
 punto (pI), 25, 66  
 Isoenzima (isozima), 86  
 Isopentenilpírofosfato, 142, 304

**K**

Krebs, ciclo de. *Véase* Cítrico, ciclo del ácido

**L**

*Lac*, operón, control negativo, 163  
 control positivo, 163  
 CRP/CAP, 160, 163  
 estructura, 161, 162  
 inducción, 161  
 mRNA policistrónico, 161  
 regulación de la glucosa, 161, 163  
 represor del *lac*, 160, 162-163  
 Lactato, deshidrogenasa de, 81, 86, 260, 264  
 Lactosa, control del operón *lac*, 161  
 enzimas del metabolismo de la lactosa, 161  
 estructura, 256  
 intolerancia (hipolactasia), 260, 266  
 nomenclatura, 252, 256  
 Lanosterol, 305  
 Latirismo, 46  
 LDL, receptor, 123, 309  
 Lecitina-colesterol, aciltransferasa de (LCAT), 309  
 Leucotrienos, 285, 297  
 Lignina, 6-7



Lineweaver-Burk, gráfica, 90, 93  
 Linoleato, 285, 286, 287, 297  
 Linolenato, 285, 295, 297  
 Lipasas, 7, 299, 301, 306  
 Lipídicas, balsas, 113  
 Lipídicos, dominios, 108, 113  
 Lipoproteínas, 308-310  
 alta densidad (HDL), 308, 310  
 apolipoproteína B, 186  
 baja densidad (LDL), 123, 308, 309  
 densidad intermedia (IDL), 308, 309  
 estructura y función, 308, 309  
 lipasa, 309  
 muy baja densidad (VLDL), 308, 309  
 quilomicrones, 308, 309  
 tipos, 308  
 Liposomas, 108, 113  
 Lisiloxidasas, 46  
 Lisina, hidroxilasa de, 42, 44  
 Lisofosfatídico, ácido, 299, 300, 301  
 Lisosoma, 4, 5, 6, 7, 8, 16, 18, 19, 62, 104, 120, 121, 122, 123, 213, 214, 218, 309, 310  
 Lisozima, 3  
 Lovastatina, 306

## M

M, fase, 9, 10  
 Macrófagos, 57, 120  
 Madre, células, 9, 10  
 Malato-aspartato, lanzadera de, 265, 317, 325  
 MALDI-TOF, 71, 73, 75  
 Malonato, 95, 96  
 Malonil-CoA, 294, 295, 296, 297  
 Maltosa, 255, 256  
 Manchado. *Véase* Southern blotting; Northern blotting; Western blotting  
 Masa, espectrometría, 69, 71, 73, 74, 75, 225  
 Maxam-Gilbert, método de, 240  
 Mediado, transporte, 115, 116  
 Membrana, balsas lipídicas, 113  
 bicapa lipídica, 2, 3, 61, 103, 105, 107, 109, 110  
 carbohidratos, 103, 104, 108, 114  
 dominios lipídicos, 108, 113  
 fluidez, 103, 107  
 lípidos, 103-107  
 modelo de mosaico fluido, 108, 111  
 permeabilidad, 115, 116, 133  
 potencial eléctrico, 117, 128, 133  
 proteínas, 103, 104, 108, 109, 110, 111, 115, 124, 129, 213, 215  
 integrales de la membrana, 7, 108, 109, 110, 112, 113  
 periféricas de la membrana, 108, 111  
 purificación de las proteínas de membrana, 108, 113  
 temperatura de transición, 107  
 Membrana, transporte de, 115-119  
 activo, 115, 117, 150-151  
 antiporte, 115, 118  
 difusión, facilitada, 115, 116-117  
 simple, 115, 116  
 dirigido, por ATP, 115, 117-118  
 por iones, 115, 118  
 pasivo, 115, 116  
 simporte, 115, 118  
 uniportadores, 116, 118  
 Mensajero RNA. *Véase* Transcripción en eucariotas; Transcripción en procariontes; *Lac*, operón; *Trp*, operón  
 Meromiosina, 49  
 Metabólica, 224, 225  
 flujo metabólico, 225  
 metaboloma, 224, 225  
 perfil metabólico, 225  
 Metanol, envenenamiento por, 95-96  
 Metilo activado, ciclo, 343, 346-347  
 Metotrexato, 95  
 Mevalonato, 303, 304  
 Mevinolina. *Véase* Lovastatina  
 Micelas, 33  
 Michaelis, constante (Km sigla), 90, 93, 98  
 Michaelis-Menten, ecuación de, 93  
 modelo de, 90, 92  
 Microfilamentos, 5, 7-8  
 Micro-RNA (miRNA), 186, 187-188  
 Microsatélites, 243, 245  
 Microscopia, confocal, 13  
 contraste de fase, 12-13  
 crioelectrónica, 15  
 de luz, 11, 12  
 electrónica, 11, 14-15  
 de barrido (o rastreo), 11, 15  
 de transmisión, 11, 14-15  
 fluorescencia, 11, 13-14  
 FRAP, 11, 14  
 FRET, 11, 13-14  
 inmunofluorescencia, 11, 13  
 Microtúbulos, 5, 7, 8  
 Mielina, vaina, 104, 132, 133  
 Mineralocorticoides, 303, 307  
 Miocárdico, infarto, 81, 86, 308, 310  
 Mioglobina, curva de disociación del oxígeno, 36, 39  
 estructura, 36, 37  
 unión de oxígeno, 36, 37-39  
 Miosina, 47, 48-49  
 Miristato, 110, 111, 287  
 Mitocondrias, autoempalme de intrones, 184  
 ciclo de la urea, 343, 345  
 ciclo del ácido cítrico. *Véase* Cítrico, ciclo del ácido  
 código genético, 199, 202  
 degradación de ácidos grasos y, 289-290  
 direccionamiento de proteínas, 213-219  
 edición del RNA, 186  
 estructura, 4, 6-7  
 fosforilación oxidativa. *Véase* Oxidativa, fosforilación  
 fraccionamiento subcelular, 16, 17-18  
 genoma, 144  
 proteínas marcadoras, 16, 19  
 replicación del DNA, 151  
 síntesis de tetrapirrol, 349  
 transcripción, 166, 167  
 transporte, de acetyl-CoA, 288, 289  
 de electrones; *Véase* Electrones, transporte  
 de oxalacetato, 294, 295  
 Mitógeno, proteincinasa activada por, 165  
 Mitosis, 10  
 Mitótico, huso, 5, 8  
 Moleculares, motores, 47-53  
 Monosacáridos, 252-256  
 aldosas, 252, 253  
 anómeros, 252, 255  
 azúcares reductores, 253  
 cetosas, 252, 256  
 configuraciones en bote/silla, 252, 254  
 derivados del azúcar, 252, 254-255  
 D-galactosa, 254  
 D-glucosa, 253, 254  
 dihidroxiacetona, 253  
 epímeros, 254  
 estereoisómeros, 252, 253-254  
 estructuras anulares, 252, 254-255  
 furanosas, 254  
 gliceraldehído, 262, 263  
 hemiacetal, 254  
 hemicetal, 254  
 heptosas, 253  
 hexosas, 253  
 isómeros ópticos, 253  
 mutarrotación, 252, 255  
 nomenclatura, 252, 256  
 pentosas, 253  
 piranosas, 254  
 proyecciones de Haworth, 255  
 tetrosas, 252, 253, 254  
 triosas, 253  
 Monóxido de carbono, 36, 37, 126, 307, 316, 322  
 mRNA, silenciamiento del, 180, 186-187  
 complejo microprocesador, 187, 188  
 Dicer, 188  
 Drosha, 188  
 miRISC (RNA-complejo de silenciamiento inducido), 180, 187, 188  
 miRNA (cadena inútil), 187, 188  
 miRNA, mecanismo de acción, 188  
 Pasha, 188  
 pre-mRNA, 179, 180, 181  
 síntesis, 181  
 Multipartitas, genomas, 141-142  
 Multiplex, PCR, 246  
 Músculo, actina, 47, 48, 49  
 cinesinas, 47, 48, 51-52  
 dineína, 47, 48, 52-53  
 estriado, 47, 48, 49  
 estructura, 47, 48  
 filamentos, delgados, 47, 48, 49, 50  
 gruesos, 47, 48, 49, 50  
 generación de fuerza en, 49-51  
 miofibrilla, 47, 48  
 miosina, 47, 48-49  
 modelo de filamento deslizante, 48  
 sarcómero, 47, 48, 49, 50

tropomiosina, 47, 48, 50, 51  
 troponina, 47, 48, 51  
 Mutagénesis dirigida al sitio, 247-251  
 con la PCR, 247, 249-250  
 diseño racional, 251  
 evolución dirigida, 251  
 ingeniería de proteínas, 247, 251  
 mutagénesis de casete, 247, 249  
 por oligonucleótidos, 247, 248  
 síntesis *de novo*, 247, 250  
 Mutarrotación, 252, 255

**N**

N-Acetilglucosamina, 2, 220, 256  
 N-Acilmurámico, ácido, 2  
 N, oligosacáridos unidos a, centro de  
 pentasacárido y, 223  
 dolicolfosfato, función, 220, 221  
 estructura, 220, 221  
 síntesis, 220, 221-223  
 tipo alto en manosa, 220, 221-223  
 tipo complejo, 220, 221  
 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, ATP-asa de, 115, 117-118, 119,  
 132, 133  
 NADH, 84, 85  
 NADH-Q, oxidorreductasa de, 315, 318, 319,  
 322, 324  
 NADPH, 84, 86  
 Negativo, control transcripcional, 160,  
 163  
 Neurona. Véase Célula nerviosa  
 Neurotransmisores, 168, 171-172  
 Neutrófilo, 16  
 Nexina, 67  
 Niacina, 106  
 Ninhidrina, 91  
 Nítrico, óxido, 160, 436, 440  
 sintasa de, 440  
 Nitrocelulosa, 89  
 Nitrógeno, asimilación, 424, 426-427  
 ciclo, 425-426  
 fijación, ciclo del nitrógeno, 335  
 complejo de la nitrogenasa, 335,  
 336-337  
 diazótrofos, 335  
 leghemoglobina, 335, 337  
 reacciones, 337  
 Nitroglicerina, 126  
 No esteroideos antiinflamatorios,  
 fármacos, 287  
 No mediado, transporte, 115  
 Noradrenalina, 299, 301, 302  
 Northern blotting, 80, 232, 233-234  
 Nuclear pequeño, rRNA. Véase snRNA  
 Nuclear, resonancia magnética,  
 espectroscopia, 26, 34  
 Nucleares, poros, 5, 214, 219  
 Núcleo, 1, 2, 3, 4, 5  
 Nucleoide, 1, 2, 3, 140, 141  
 Nucleolar pequeño, rRNA. Véase snoRNA  
 Nucleolo, 4, 5, 6  
 Nucleósidos, 136, 137, 154  
 Nucleosomas, 140, 142-143, 150, 153  
 Nucleótidos, 136-137, 138, 154

**O**

O, oligosacáridos unidos a, estructura, 220,  
 221, 257, 258  
 síntesis, 220  
 Octilglucósido, 113  
 Okazaki, fragmentos de, 145, 146-147, 148,  
 150, 151  
 Oleato, 103, 105, 285, 287  
 Oligopéptido, 27  
 Oligosacáridos, 220, 257, 258-259. Véase  
 también N, oligosacáridos unidos a;  
 O, oligosacáridos unidos a  
 Operones, 160-165. Véase también Lac,  
 operón; Trp, operón  
 Ópticos, isómeros, de monosacáridos, 253  
 Organelos, genomas de, 140 144  
 transcripción, 166, 167  
 Organismo(s), amoniotéticos, 344  
 oriC, locus, 146  
 Origen de los complejos de replicación  
 (ORC) en eucariotas, 150  
 Ornitina, 343, 344, 345  
 transcarbamoilasa, 345  
 Osmio, tetróxido, 14-15  
 Osmótica, lisis, 60, 61  
 Osteogénesis imperfecta, 45  
 Osteomalacia, 303, 307  
 Oxidativa, fosforilación, 315-325  
 acoplamiento, 316, 324  
 ATPasa de F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>, 316, 322  
 control respiratorio, 316, 324  
 definición, 315, 322  
 desacoplamiento en el tejido adiposo  
 pardo, 316, 324  
 desacoplantes, 316, 324  
 descripción, 316, 317  
 2,4-dinitrofenol, como desacoplador,  
 316, 324  
 fuerza motriz de los protones, 315, 321  
 función de la sintasa de ATP, 316, 322  
 gradiente electroquímico de protones,  
 316, 322  
 hipótesis quimiosmótica, 322  
 mecanismo, 316-317  
 sintasa de ATP, 322-323  
 unida al transporte de electrones y al  
 gradiente de H<sup>+</sup>, 315, 316, 321-322  
 Oxígeno, curva de disociación, 36, 39  
 proteínas de unión. Véase Hemoglobina y  
 mioglobina; Mioglobina

**P**

P, ATP-asas tipo, 115, 117  
 Palíndromo, terminación de la  
 transcripción, 159  
 Palmitato, 103, 104, 105, 110, 111, 285, 286,  
 287  
 Palmítico-CoA, 291, 292, 294, 298  
 Palmitoleato, 286, 291  
 Paludismo, 36, 41  
 Páncreas, 101, 120, 121, 125, 283, 284  
 Pancreatitis, 101  
 Pantoténico, ácido, 85

Papaína, 49, 50, 54, 56, 57  
*Paramecium*, 144  
 Pareamiento de bases,  
 complementariedad, 139, 188  
 Pared celular, bacteriana, 1, 2-3  
 vegetal, 5, 8  
 Pareos de bases tambaleantes, 202  
 PCR. Véase Polimerasa, reacción en cadena  
 de (PCR)  
 Pegajosos, extremos, 228  
 Pelagra, 85  
 Penicilina, 1, 2, 94-95  
 Pentosa fosfato, vía, 7, 267, 275-277  
 control de la, 346, 348-349  
 descripción, 346  
 detalles de la reacción, 347-348  
 relación con la glucólisis, 348  
 Pentosas, 253, 275  
 Pepstatinas, 96  
 Peptidilprolilo, isomerasas *cis-trans* de, 35  
 Peptidoglucano, 1, 2, 3  
 Péptidos, enlaces, 26, 27-29  
 síntesis, 71, 76  
 Periplasma, 3  
 Permeasas, 116  
 Peroxisoma, 6, 214  
 Pinocitosis, 120, 122  
 Pinza-parcela, 135  
 Piranosas, 317  
 Piridoxal, fosfato de, 59, 106, 430-341,  
 445  
 Piridoxamina, fosfato de, 431  
 Piridoxina. Véase Vitamina, B6  
 Pirofosfato de isopentenilo, 111  
 Piruvato, carboxilasa de, 104, 339, 340  
 pK, 20, 21, 23, 24, 25  
 Placa, "levantamiento de", 238  
 Plasmática, membrana, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 16,  
 17, 18, 19  
 Plastoquinol, 329  
 Pleckstrina, dominios de homología, 127  
 Plegada β, hoja, 26, 28, 29, 30  
 Poliácridamida, gel, electroforesis en, 61, 63,  
 66, 67, 68, 69, 73, 79  
 Poliadenilación del mRNA, descripción,  
 171, 180, 184  
 mecanismo, 171, 180, 184  
 participación en la terminación  
 de la transcripción, sitios de  
 poliadenilación alternativos, 159,  
 169, 171, 180, 181, 185  
 Polianfólito, 66, 68, 69  
 Policistrónico, mRNA, 140, 160-161, 163,  
 164  
 Polimerasa, reacción en cadena de (PCR),  
 243-246  
 análisis de microsátélites, 243, 245  
 aplicaciones, 243, 245  
 ciclo PCR, 243, 244-245  
 diagrama, 244  
 PCR con la transcriptasa inversa, 235,  
 236, 245  
 PCR en tiempo real, 243, 245-246  
 PCR multiplex, 246  
 principios, 243  
 Polimerasas de DNA, eucariota, 145, 150-153

- Polisacáridos, 257-259  
 almidón, 257, 258. *Véase también*  
 Almidón  
 amilopectina, 257, 258  
 amilosa, 257, 258  
 celulosa, 257, 258  
 dextrano, 257, 258  
 glucógeno, 257, 258, 267, 269, 278-280.  
*Véase también* Glucógeno  
 Porfiria, 350  
 Porfirina, 36, 37, 38, 39, 311, 314, 326, 328,  
 348, 349, 350  
 Porfobilinógeno, 348, 349, 350  
 Porina, proteína, 3, 4, 6, 110, 115, 117  
 Prostraducción, modificación, 4, 6, 42, 43,  
 44, 71, 74, 75, 76  
 Potencial de acción. *Véase* Membrana,  
 potencial eléctrico  
 Pregnenolona, 307  
 Primario, transporte activo, 115, 117-118  
 Priones, enfermedades por, 35  
 Priónica, proteína, 35  
 Procolágena, 42, 43, 44, 45, 46  
 Proelastasa, 97, 101, 102  
 Proenzima. *Véase* Cimógenos  
 Progestágenos, 303, 307  
 Progesterona, 126, 303, 307  
 Programada, muerte celular. *Véase*  
 Apoptosis  
 Propionil-CoA, 288, 292  
 Prostacilinas, 285, 287, 297  
 Prostaglandina H2, sintasa de, 94, 285, 287  
 Prostaglandinas, 124, 126, 285, 287, 297  
 Prostéticos, grupos, 81, 84-85, 349  
 Protaminas, 142  
 Proteasas, 2, 7, 60, 61, 62  
 caspasa, 101  
 inhibidores, 60, 61, 62  
 lisosómicas, 7  
 pancreáticas, 97, 101  
 VIH, 95  
 Proteína, direccionamiento, 267-275  
 chaperonas, 274  
 descripción, 268  
 endocitosis mediada por el receptor, 273  
 exocitosis, 269  
 función de la hsc70 mitocondrial, 274  
 partícula de reconocimiento de señal  
 (SRP), 269  
 peptidasa señal, 269  
 proteínas, cloroplasto, 268, 275  
 integrales de la membrana, 267  
 lisosómicas, 267, 272-273  
 membrana plasmática, 267, 270-271  
 mitocondriales, 268, 272-274  
 nucleares, 268, 275  
 que atraviesan la membrana, 271  
 retículo endoplásmico, 271-272  
 secretoras, 267, 268-270  
 secuencia de direccionamiento de la  
 matriz, 274  
 secuencia de señal, 269  
 interna, 271  
 secuencias, de detención-transferencia,  
 271  
 topógenas, 271  
 señal, KDEI, 271  
 localización nuclear, 275  
 manosa 6-fosfato, 272  
 Proteína, glucosilación, 220-223  
 central, 223  
 centro de pentasacárido, 220, 223  
 descripción, 2206  
 dolicolfosfato, función de, 220, 221, 222  
 glucosilación terminal, 223  
 oligosacáridos unidos al N, estructura,  
 220, 221-223  
 síntesis, 220, 221-223  
 oligosacáridos unidos al O, estructura,  
 220  
 tipos de glucosilación, 220  
 Proteína(s), de andamiaje, 140  
 determinación de la estructura, 33-34  
 disulfuro, isomerasa de, 35  
 ensayo, 60, 62  
 estabilidad, 26, 33  
 estabilización, 61-62  
 estructura, 26-35  
 cuaternaria, 26, 31, 32-33  
 primaria, 26, 29, 31, 34  
 secundaria, 26, 29-31  
 terciaria, 26, 31-32  
 fosfatasa de, 281, 282, 284  
 huella digital, 71  
 integral de la membrana, 109, 112, 113  
 miristoilada, 110, 111, 113  
 modificación covalente, 97, 101-102  
 palmitoilada, 110, 111, 113  
 periférica de la membrana, 108, 111  
 plegamiento, 26, 29, 30, 31, 34-35  
 erróneo, 26, 35  
 prenilada, 110, 111  
 purificación, 60-65  
 que atraviesan la membrana, 110, 111  
 secuenciación, 71-76  
 secuencia, base de datos de, 94  
 síntesis. *Véase* Traducción en eucariotas;  
 Traducción en procariontes  
 transportadoras, 4, 115, 116  
 unida al GPI, 110, 113  
 unida a lípidos, 110, 113  
 Proteincinasa, 101  
 activada por el AMP, 294, 297, 298  
 dependiente del CAMP, 283  
 proteincinasa A, 130, 281, 282, 283, 284  
 proteincinasa C, 130, 131  
 Proteómica, 95, 282-283  
 expresión de la proteómica, 282  
 perfilamiento de proteínas, 282  
 procesividad, 301  
 proteoma, 88, 95, 282  
 Protón, fuerza motriz del, 408  
 Protoporfirina IX, 50, 445  
 Puntuales, mutaciones, 245, 247, 248, 249
- Q**
- Q, ciclo, cloroplastos, 418  
 mitocondrias, 405  
 Q-citocromo c, oxidorreductasa de, 399,  
 402  
 Quilomicrones, 308, 309-310  
 remanentes de, 309  
 Quimiosmótica, hipótesis, 316, 322  
 Quimiotaxis, 1, 3  
 Quimotripsina, 72, 82, 83, 97, 101  
 Quimotripsinógeno, 97, 101
- R**
- Rab, proteínas, 165  
 Ramachandran, gráfica de, 37  
 Ranvier, nodos de, 132, 133  
 Raquitismo, 303, 306  
 Ras, proteínas, 165  
 Rayos X, cristalografía, 34  
 Reasociación, ácidos nucleicos, 291  
 Receptor, acoplado a la proteína G, 140,  
 163-165  
 adrenérgico  $\beta$ , 356  
 Ca<sup>2+</sup>, 167  
 de importación, 274  
 endocitosis mediada por el, 153, 156,  
 390  
 ensayo, 78  
 fagocitosis, 155  
 glucocorticoides, 223  
 hormona, esteroidea, 219, 220, 221  
 tiroidea, 223  
 insulina, 357  
 intracelular, 160  
 LDL, 390  
 manosa 6-fosfato, 272  
 posináptico, 169  
 reciclamiento, 157, 273  
 rianodina, 166  
 SRP, 269  
 superficie celular, 8, 156, 161  
 unido a un canal iónico, 161  
 unido a una enzima, 159  
 Receptora, cinasa de tirosina, 357  
 Recombinante, DNA, 161-163. *Véase*  
 también DNA, clonación  
 Red, trans Golgi, 6, 121  
 Redox, potencial, 398, 401  
 Reductores, azúcares, 315  
 Regulación de la transcripción en  
 eucariotas, genes codificantes de  
 proteínas, caja CAAT, 218  
 caja GC, 218  
 caja TATA, 213  
 control por hormonas esteroideas, 219  
 CRE (elemento de respuesta al CAMP), 219  
 dominios del factor de transcripción,  
 219-223. *Véase también*  
 Transcripción, factores de la  
 elemento, celular hipofisario, 219  
 promotor corriente abajo, 213  
 respuesta a la hormona, 219  
 elementos, *cis*, 218  
 de control corriente arriba, 213  
 reguladores, 216, 218-219  
 factores de transcripción, 214, 218,  
 219-233. *Véase también*  
 Transcripción, factores de la  
 general, 214

- factores *trans*. Véase Transcripción, factores de la
- mecanismo, 217-218
- mejoradores, 216, 219
- organización del promotor, 213-214
- promotor, central, 213
- polimerasa II de RNA, 213-214
- secuencia iniciadora Inr, 213
- silenciadores, 223
- Regulación de la transcripción en procariotas, caja Pribnow, 157
- control, negativo, 163
- positivo, 163
- elemento corriente arriba, 158
- elongación, 156, 158
- genes codificantes de proteínas. Véase también *Lac*, operón; *Trp*, operón
- iniciación, 156, 157-158
- mRNA policistrónico, 161
- operón *lac*, 161-162
- operón *trp*, 163
- promotores, 157-158. Véase también *Lac*, operón; *Trp*, operón
- proteína, activadora de catabolitos (CAP), 163
- de respuesta al CAMP (CRP), 163
- represión de catabolitos, 162
- secuencia -10, 157
- secuencia -35, 157
- subunidades de la polimerasa de RNA, 157, 166, 167
- terminación, 159
- Renina, 96
- Replicación, burbuja de, 146, 147, 151
- horquilla de, 145, 146, 147, 151
- ojo de, 146, 147, 151
- unidades de, 151
- Replicación del DNA en bacterias, 145-149
- bidireccionalidad, 146
- burbuja de replicación, 145, 146
- cadena, adelantada, 145, 147
- retrasada, 145, 147
- cebador de RNA, 145, 147-148
- DnaA, 146
- DnaB, 146
- fragmentos de Okazaki, 145, 146-147
- horquillas de replicación, 145, 146
- plantilla, 145
- polimerasas de DNA, 145-146
- primasa, 145, 147
- problema del desenrollamiento, 148
- proteína SSB, 148
- proteínas accesorias, 145, 148-149
- reacción de la polimerasa de DNA, 145
- semiconservativa, 146
- topoisomerasa I, 145, 148
- topoisomerasa II, 145, 148-149
- Replicación del DNA en eucariotas, 150-153
- ambas direcciones, 150
- burbujas de replicación, 151
- cadenas adelantada y retrasada, 150, 151
- cebadores de RNA, 151
- fragmentos de Okazaki, 150, 151
- horquillas de replicación, 151
- origen de los complejos de replicación (ORC), 150
- polimerasas de DNA, 145, 150-153
- primasa, 151
- replicación de la cromatina, 150, 153
- replicones múltiples, 150-151
- telomerasa, en replicación de cromosomas eucariotas, 150, 152
- telómeros, replicación, 150, 152-153
- unidades de replicación, 151
- Replicón, 151
- Respiratoria, cadena; Véase Electrones, transporte
- Respiratorio, control, 316, 324
- Restricción, enzimas de, 227-231
- digestión, 227-229
- extremos adhesivos, 228
- "extremos pegajosos", 228
- mapas restricción, 227, 230
- polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), 227, 230-231
- 3' sobresaliente, 228
- 5' sobresaliente, 228
- Restricción, fragmentos de, polimorfismos de longitud (RFLP), 227, 230-231
- mapas de, 227, 230
- Retículo endoplásmico, 4, 6, 18, 213, 216-217
- liso, 4, 268, 269, 271
- rugoso, 4, 42, 43, 213, 216-217
- Retinoico, ácido, 126
- Revestidas, vesículas, 121, 123
- Revestimiento, proteínas de, 121
- Rezagada, cadena, 145, 147, 150, 151
- Rianodina, receptor de, 125, 130
- Riboflavina, 85
- Ribonucleósidos, 136, 154, 156, 157, 158
- Ribonucleótidos, 154
- Ribosomas, estructura, 189, 190
- función en la traducción. Véase Traducción en eucariotas; Traducción en procariotas
- Ribosómico, genes de RNA en eucariotas, autoempalme, 184
- elemento de control corriente arriba, 192
- elemento promotor, de la caja A, 194 de la caja C, 194
- factor de unión corriente arriba, 192
- organización en eucariotas, 192
- procesamiento del rRNA, 192
- promotor, 192
- ribozimas, 193-194
- snoRNA, 193
- transcripción, del gen 5S, 194
- de genes 28S, 18S, 5.8S, 191-193
- por polimerasa I de RNA, 191
- por polimerasa III de RNA, 194
- Ribosómico, genes de RNA en procariotas, transcripción y procesamiento, 191
- Ribozimas, 82, 184, 190, 193-194, 208
- Rigurosidad, de hibridación, 232, 233
- RNA de interferencia (RNAi), 224
- RNA, edición del, 180, 186
- polimerasa de, procariota, 156-159
- polimerasa I de, 166, 189, 191, 192, 193
- polimerasa II de, 166, 168, 169-170, 171, 172-178, 181, 185, 187. Véase también Transcripción; Regulación de la transcripción en eucariotas; Regulación de la transcripción en procariotas
- polimerasa III de, 166, 175, 194, 196, 197
- procesamiento. Véase Casquete o caperuza; RNA, empalme del; RNA, edición del; Poliadenilación del mRNA
- RNA, empalme del, 179, 182-184, 186
- autoempalmes de intrones, 184
- compromiso snRNA/snRNP, 184
- espliceosoma AT-AC, 183
- función del espliceosoma, 183
- intrones AT-AC, 183
- premRNA, 183, 184-185
- prerRNA, 191, 193
- pretRNA, 195, 196, 198
- punto de ramificación, 182
- reacciones de transesterificación, 182
- ribozimas, 184
- RNA catalítico, 184, 193
- sitio de corte y empalme, 183
- sitios de empalme, 182
- soga intermedia, 182
- vías de empalme alternativas, 185
- RNA, estructura, bases en el RNA, 136
- estructura secundaria, 154, 155
- ribonucleósidos, 136
- ribonucleótidos, 136-137
- Rodamina, 11, 13, 112
- Rotenona, 316, 322
- Rubisco (ribulosa bisfosfato carboxilasa/oxigenasa), 327, 331, 332, 333

**S**

- S-Adenosilhomocisteína, 343, 347
- S-Adenosilmetionina, 343, 346, 347
- S, fase, 9, 10
- Salino, puente, 33
- Sanger, método didesoxi de, 240, 241, 242
- Sanguínea, coagulación, cascada de, 97, 101
- Sarcómero, 48, 50
- Sarcoplasma, 48
- Sarcoplásmico, retículo, 51
- Sarina, 94
- SDS PAGE, 66, 67-68
- Secuenciación del DNA, 240-242
- automatizada, 240, 241
- elección de la polimerasa de DNA, 240, 241
- método, de degradación química, 240
- didesoxi de Sanger, 240
- de Maxam-Gilbert, 240
- terminación de la cadena, 240, 241
- numerosos métodos, 240-241
- pirosecuenciación, 240
- Secundario, activo, transporte, 115, 118
- Sedimentación, coeficiente de, 190
- Segundo mensajero, 125, 130

- Selenocisteína, secuencia de inserción de (elemento SECIS), 199, 202
- Selenoproteínas, 202
- Sentido, codones con, 2021
- Señales, transducción de, 124-131. *Véase también* Receptor
- Señalización, complejos de, 127
- Señalización celular, 125, 131
- Serina, proteasas de, 82, 83
- Seudouridilación, 241
- Sigma, factor  $\sigma^{70}$ , 157
- Silenciadores, 178
- Sinapsis, 132
- Sináptica, hendidura, 135  
vesícula, 135
- Sinaptobrevina, 122
- Sinvastatina, 306
- SL1, 192
- SNAP-25, 122
- SNARE, 122
- snoRNA, caja C/D, 193  
caja H/ACA, 193  
función en el procesamiento del pre-rRNA, 189, 193  
transcripción, 166-167
- snRNA, función en el empalme del rRNA, 182-184  
transcripción, 166
- Solubilización de proteínas de la membrana, 108, 113, 114
- Southern blotting, 80, 232, 233
- Src, homología, dominios de, 127
- Streptomyces coelicolor*, 141
- Subcelular, fraccionamiento, 16, 17-18
- Succinato, deshidrogenasa de, 19, 95, 96, 264
- Sucrosa, estructura, 255  
síntesis, 327, 331, 332-333
- Suicida, inhibidor, 95
- Sustrato, ciclos, 313  
fosforilación a nivel de, 263-264
- Svedberg, unidades (S), 190
- T**
- Tándem cortas, repeticiones en (STR), 245
- Taq, polimerasa, 245
- Tardíos, endosomas, 123
- Taurocolato, 306
- Taxol, 8
- TCA, ciclo. *Véase* Cítrico, ciclo del ácido
- Telómero, replicación del, 152-153
- Termodinámica, 87-89  
primera ley de la, 87-88  
segunda ley de la, 88
- Testosterona, 307
- Tetánica, toxina, 122
- Tetrahidrobiopterina, 342
- Tetrahidrofolato, 85
- Tetrapirroles, 348, 349
- Tetrodotoxina, 135
- Tetrosas, 253
- Tiamina, pirofosfato de, 85
- Tiempo real, PCR en, 303, 306-307
- Tilacoides, vesículas, 218, 328
- Tiroxina, 126
- $T_m$ , temperatura de fusión, de los ácidos nucleicos, 232
- Tomografía electrónica, 15
- Topoisomerasa I, 148
- Topoisomerasa II, 148
- Traducción en eucariotas, 210-212  
comparación con procariotas, 211  
complejos de iniciación, 211  
consenso de Kozak, 211  
elongación, 21  
estructura del ribosoma, 190  
exploración, 211  
factores de iniciación, 211  
iniciación, por exploración, 210  
sin exploración, 210, 212  
participación de la proteína de unión poli(A), 211  
RNA de picornavirus, 212  
sitio interno de entrada del ribosoma (IRES), 212  
terminación, 212
- Traducción en procariotas, 204-209  
activación de aminoácidos, 205  
anticodón, 205  
codón de inicio o codón de iniciación, 206  
codones de terminación, 208  
comparación con eucariotas, 211  
complejos de iniciación, 206-207  
descripción, 205  
elongación, 204, 207-208  
factores, de elongación, 207-208  
de iniciación, 206-207  
de liberación, 208  
formación del enlace peptídico, 207  
iniciación, 204, 206-207  
ribosomas; tres sitios, 206  
secuencia, anti-sb, 206  
de Shine-Dalgarno, 206  
síntesis de aminoacil-tRNA, 204, 205  
terminación, 205, 208-209
- Trans*, factores. *Véase* Transcripción, factores de la
- Transaminación, 338, 339
- Transaminasas, 339
- Transcripción, factores de la, cremallera de leucina, 177  
dedo de cinc, 175-176  
dominios, básicos, 176  
de activación, 173, 177  
de dimerización, 173, 177  
de unión del DNA, 175  
múltiples, 175  
motivo hélice-asa-hélice, 177  
motivo hélice-giro-hélice, 175  
represores, 178
- Transcripción en eucariotas, descripción, 166-167  
genes, 5S rRNA, 166, 194  
codificantes de proteínas, 169-171.  
*Véase también* Regulación de la transcripción en eucariotas  
de rRNA, 166, 189  
tRNA, 166
- mRNA, 169-171. *Véase también* Genes codificantes de proteínas, expresión en eucariotas; Regulación de la transcripción en eucariotas  
polimerasas de rRNA, 166-167  
regulación. *Véase* Regulación de la transcripción en eucariotas  
snoRNA, 166  
snRNA, 166  
subunidades de la polimerasa de rRNA, 166, 167  
tres polimerasas de rRNA, 166
- Transcripción en procariotas, elemento de secuencia -10, 157  
elemento de secuencia -35, 157  
elementos promotores, 156, 157-158  
elongación, 157, 158  
factor rho, 159  
iniciación, 157, 158-159  
mRNA, 166. *Véase también* Lac, operón; *Trp*, operón  
rRNA, 159  
terminación, 157, 159  
tRNA, 189
- Transcriptasa inversa-PCR (RT-PCR), 245
- Transcriptoma, 225
- Transcriptómica, 225
- Transfección, 237
- Transferencia, rRNA de, estructura, 196  
modificación, 198  
procesamiento, en eucariotas, 196-198  
en procariotas, 196  
síntesis, en eucariotas. *Véase* Transcripción en eucariotas  
en procariotas. *Véase* Transcripción en procariotas
- Transferencia de fluorescencia por energía de resonancia (FRET), 13-14
- Transgénicos, organismos, 224, 225-226
- Translocón, 213, 215-219
- Transportadores, 116, 117
- Transporte. *Véase también* Membrana, transporte de  
macromoléculas a través de las membranas, 120-122  
moléculas pequeñas a través de las membranas, 115-119
- Triacilgliceroles, 299-302  
descomposición, 299, 301  
estructura, 299  
función, 299  
regulación, 299, 301-302  
síntesis, 299-301
- Triglicéridos. *Véase* Triacilgliceroles
- Triosas, 253
- Tripsina, activación proteolítica, 101  
clasificación, 82-83  
especificidad del sustrato, 82-83  
proteína inhibidora de la tripsina, 101  
sitios de unión de sustrato, 83
- Tripsinógeno, 101
- Triton X-100, 61, 113
- tRNA. *Véase* Transferencia, rRNA de
- Tromboxanos, 287
- Tropocolágena, 44, 45, 46
- Tropomiosina, 47, 51

Troponina, 47, 51  
*Trp*, operón, 161, 163, 164  
 atenuación, 161, 163-164  
 contra represión, 165  
 regulación, 163  
 represión, 165  
 represor, 160, 165  
 terminador de la transcripción, 164  
 Tubulina, 8

**U**

Unión, mecanismo de, y cambio, 323  
 Unión(es), estrechas, 118  
 Uniportador (GLUT-1), 116  
 UP, elemento (elemento corriente arriba),  
 158  
 Urea, ciclo, 343-347  
 descripción, 344  
 enlace con el ciclo del ácido cítrico,  
 343, 345  
 formación de creatina fosfato, 343,  
 346-347  
 hiperamonemia, 343, 345-346

Ureotélicos, 344  
 Úrico, ácido, 343, 344, 347  
 Uricotélicos, 344  
 Uroporfirinógeno III, 349  
 3'UTR (región no traducida 3') del mRNA,  
 169  
 5'UTR (región no traducida 5') del mRNA,  
 169

**V**

van der Waals, fuerzas de, 33  
 Vector de expresión, 239  
 Vegetal, célula, vacuola, 5, 6, 8  
 Verde, proteína fluorescente, 11, 13  
*Vibrio cholerae*, 142  
 Vimblastina, 8  
 Vitamina, A, 126, 385  
 B<sub>1</sub>, 85  
 B<sub>2</sub>, 85  
 B<sub>6</sub>, 46, 85, 338, 340, 341  
 B<sub>12</sub>, 85, 347, 348, 349  
 C, 56, 85  
 D, 85, 126, 304, 306-307

D<sub>3</sub>, 306  
 E, 306  
 K, 306  
 precursores, 85

**W**

Western blotting, 79-80

**X**

Xantoma, 310

**Y**

Yodoacetamida, 94  
 Yodoacetato, 73

**Z**

Zigzag, modelo en, 143







