

# Capítulo 1

## CONCEPTOS BÁSICOS SOBRE METABOLISMO



### 1.1 Bioenergética

La parte de la física que estudia los cambios de energía entre los sistemas materiales es conocida como termodinámica. El mismo estudio, cuando es realizado en los seres vivos, recibe el nombre de bioenergética. Las leyes físicas de la termodinámica son aplicadas de igual forma a los seres vivos y a los sistemas materiales. Los seres vivos necesitan producir energía para poder mantener el equilibrio de su estructura, para su locomoción, para la reproducción, para mantener las funciones normales en los diferentes procesos, tales como crecimiento, gestación, lactación, oviposición y ciclicidad reproductiva. Esa energía es obtenida a partir de procesos químicos que ocurren en el interior de las células.

#### *Energía libre*

La energía capaz de producir un trabajo es denominada energía libre. Existen varias formas de energía, las cuales pueden ser interconvertidas entre sí: energía potencial, cinética, térmica, eléctrica, radiante, química, nuclear, calórica, hidráulica y eólica. En el proceso de interconversión de una forma de energía a otra siempre hay pérdida de energía útil. En las máquinas es aprovechable hasta el 25% de la energía en una interconversión, mientras que en los procesos biológicos la eficiencia de conservación de la energía en una interconversión es del orden de 38%. En los animales la energía es obtenida a partir de la oxidación de compuestos orgánicos. Según Lavoisier, uno de los pioneros en el estudio de la bioenergética, “[...] los animales que respiran son verdaderos cuerpos combustibles que se queman y se consumen a sí mismos [...]”; se podría decir que “[...] la llama de la vida se enciende por primera vez al momento de nacer y solamente se extingue con la muerte [...]” (Nelson & Cox, 2000).

### *Leyes de la termodinámica*

En termodinámica un sistema, caracterizado por un conjunto finito de variables que lo identifican, desde el punto de vista físico se define como una parte limitada del universo. Un sistema puede ser un organismo, una célula, un organelo citoplasmático, o los componentes de una reacción química. El sistema es ‘abierto’ cuando está en contacto con un medio con el que tiene intercambio de materia y energía, como es el caso de los sistemas vivos. Estos nunca están en equilibrio con su medio, pues el nivel de organización interna de los sistemas es mayor que el del medio.

La primera ley de la termodinámica es el principio de conservación de la energía, la cual establece que, en cualquier cambio físico o químico, la energía del sistema más la energía del medio, o sea, la energía del universo, permanece igual. En otras palabras, la energía se puede transformar de una forma a otra, pero no puede ser creada ni destruida. La segunda ley de la termodinámica dice que todos los cambios físicos o químicos tienden a realizarse, de forma espontánea, en aquella dirección que lleve la energía del universo a degradarse hacia una forma más dispersa. Por tanto, las reacciones fisicoquímicas que ocurren en la naturaleza tienden al aumento de la entropía. En todos los procesos la entropía del universo (sistema + medio) tiende a aumentar hasta alcanzar el equilibrio, esto es, hasta que la energía del sistema sea igual a la energía del medio. De cierto modo, la entropía puede ser interpretada como tendencia al desorden o a la aleatoriedad de los procesos. La segunda ley de la termodinámica establece, por consiguiente, que el direccionamiento de los procesos fisicoquímicos en el universo está determinado por la tendencia a alcanzar un valor máximo de entropía.



## Entropía y entalpía

La entropía es una forma de energía no utilizable, o sea, una energía 'inútil'. Los cambios de entropía en un sistema o en una reacción química pueden ser medidos a partir de la variación de energía libre, definida, según la ecuación de Gibbs, así:

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

Dónde:

$\Delta G$  = variación de la energía libre del sistema (en J/mol)

$\Delta H$  = variación de la entalpía del sistema (en J/mol)

T = temperatura en la cual se realiza el proceso (en °K)

$\Delta S$  = variación de la entropía del sistema (en J/°K)

Por tanto, la variación de energía libre de un sistema está determinada por la variación de la entalpía, por la temperatura del medio y por la variación de la entropía.

La entalpía se define como el contenido calórico de un sistema. En sistemas químicos, se refiere al número y al tipo de enlaces entre los átomos de una molécula, de forma que, mientras más enlaces tenga la molécula y mayor sea la energía de esos enlaces, mayor es la entalpía del sistema. Cuando una reacción química es termodinámicamente favorable, es decir, cuando la reacción puede ocurrir espontáneamente, ella se realiza hasta alcanzar su punto de equilibrio, aumentando la entropía del sistema. Eso significa que toda reacción con tendencia a ocurrir de forma espontánea tendrá una variación de entropía ( $\Delta S$ ) con valor positivo, con lo cual la entropía del sistema aumenta al ocurrir la reacción. Una vez que, según la ecuación de Gibbs, concomitante con el aumento de la entropía hay disminución de la energía libre del sistema,  $\Delta G$  (variación de energía libre) tendrá un valor negativo. Por otra parte, en una reacción favorable el sistema disminuye su energía interna (entalpía), pues pierde organización interna. De esa forma, aumenta el 'desorden' del sistema, esto es, aumenta la entropía. En compensación, la reacción libera energía que puede ser aprovechada en algún trabajo (energía útil). Si la energía libre no es utilizada para una actividad, puede ser disipada en forma de calor.

Como ejemplo pueden ser citadas las reacciones de oxidación de la glucosa, que constituyen la forma como los animales superiores toman energía del medio.

En el proceso, una molécula de glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) y seis de  $O_2$  son convertidas en seis moléculas de  $CO_2$  y seis de  $H_2O$ , con producción de energía libre. Esas reacciones son termodinámicamente favorables, pues la energía contenida en la glucosa (entalpía) es mayor que la energía del  $CO_2$  y del agua. Las reacciones ocurren con mayor velocidad en las células por acción de las enzimas, que son catalizadores biológicos. La energía generada en el proceso de oxidación es empleada para sintetizar biomoléculas complejas y para realizar otros trabajos biológicos. O sea, la glucosa aumenta su entropía, pues siete moléculas fueron transformadas en doce, pero el organismo gana organización estructural al sintetizar biomoléculas (disminuye su entropía).

De acuerdo con la segunda ley de la termodinámica, la tendencia al aumento de la entropía en el universo es lo que direcciona los procesos fisicoquímicos. Por eso los organismos vivos (sistemas) pueden mantener su estructura organizada, pues a partir de esas reacciones es que obtienen la energía necesaria para los procesos requeridos en la manutención de su organización, aunque esto ocurra a expensas del aumento del desorden de medio. Cuando los productos de una reacción son menos complejos o más 'desordenados' que los sustratos, la reacción sufre aumento de entropía, esto es, libera energía. En ese caso, se trata de una reacción exérgica, la cual siempre tendrá un  $\Delta G$  negativo, pues el sistema libera energía. Una vez que, de acuerdo con la segunda ley de la termodinámica, la tendencia natural de los procesos es la de aumentar la entropía, las reacciones termodinámicamente favorables son aquellas que tienen  $\Delta G$  negativo. Por otro lado, las reacciones con  $\Delta G$  positivo deben ganar energía para que puedan ocurrir, o sea, requieren disminuir su entropía, no siendo termodinámicamente favorables, a menos que ocurra entrada de energía en el sistema. Estas son las llamadas reacciones endérgicas.

## Flujo de energía en la biosfera

El flujo de energía biológica tiene tres fases:

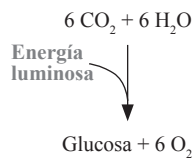
En una primera fase, la energía es liberada a partir de la fusión nuclear que ocurre en el Sol, el cual está compuesto de hidrógeno:





Esa reacción es posible debido a las elevadas temperaturas presentes en el interior del Sol (millones de grados centígrados). La energía liberada en el proceso de fusión termonuclear sale en forma de fotones (cuanta de energía luminosa).

En la segunda fase la energía luminosa es absorbida por las células fotosintéticas, presentes en los organismos autotróficos, representados por 90% de los microorganismos del mar y por las hojas verdes de las plantas:



Esa reacción tiene una variación de energía libre altamente positiva ( $\Delta G^{0'} = +2.870 \text{ kJ/mol}$ ), o sea, debe absorber gran cantidad de energía para que pueda ocurrir.

En la tercera y última fase ocurre la utilización de las moléculas producidas en las células fotosintéticas por parte de los organismos heterotróficos. Carbohidratos, grasas y proteínas son oxidados para producir energía química (en la forma de ATP), necesaria para los trabajos biológicos. Estas actividades que demandan energía incluyen: 1) trabajos químicos, tales como la biosíntesis de moléculas complejas como DNA, RNA y proteínas; 2) trabajos osmóticos, como el transporte activo a través de membranas y la actividad eléctrica en la conducción de impulsos nerviosos. El trabajo de transporte intermembranal es uno de los que más consume energía, siendo la bomba de Na-K ATPasa en todas las células del organismo responsable por mantener constante la concentración de esos iones ( $\text{Na}^+$  está más concentrado en el exterior de las células, mientras que  $\text{K}^+$  está más concentrado en el interior); 3) trabajos mecánicos, como la contracción muscular y el movimiento de cilios y flagelos. Los trabajos biológicos citados son procesos irreversibles, una vez que provocan aumento de la entropía, causando disipación de la energía para el medio.

**Relación entre energía libre y constante de equilibrio de una reacción**

En toda reacción química existe una constante de equilibrio, indicadora de la velocidad de la reacción.

Por ejemplo, en la reacción:  $A \rightarrow B$  la constante de equilibrio es:

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

De acuerdo con la segunda ley de la termodinámica, para que una reacción espontánea sea energéticamente posible debe tener una  $\Delta G^{0'}$  negativa, o sea, debe ocurrir disminución de la energía libre del sistema. La cantidad de energía liberada en el proceso puede entonces realizar un trabajo cuando la reacción exergónica está acoplada a otra reacción que requiere energía (reacción endergónica). Si la constante de equilibrio de la reacción es mayor que 1, la reacción tiende a realizarse espontáneamente en la dirección  $A \rightarrow B$ , teniendo  $\Delta G^{0'}$  negativo (reacción exergónica). Si, por el contrario, la constante es menor que 1, la reacción tenderá a realizarse en el sentido  $B \rightarrow A$ , y el valor de  $\Delta G^{0'}$  deberá ser positivo (reacción endergónica).

La relación entre el valor de la constante de equilibrio y la variación de energía libre de la reacción está definida por una relación matemática expresada en la siguiente ecuación:

$$\Delta G^{0'} = -RT \ln K_{eq}$$

Dónde:

- $\Delta G^{0'}$  = variación de energía libre en J/mol bajo condiciones estándar (pH 7,0; temperatura 25°C; presión 1 atm; concentraciones de sustrato y de producto 1 M)
- R = constante universal de los gases (8,3 J/mol/°K)
- T = temperatura estándar (298°K = 25°C)
- $K_{eq}$  = constante de equilibrio de la reacción

En la **Tabla 1.1** se presenta la relación numérica entre la constante de equilibrio de una reacción y la variación de energía libre estándar. La señal de  $\Delta G^{0'}$  indica la dirección del proceso. Una reacción que proceda para la derecha ( $A \rightarrow B$ ) tendrá señal negativa, indicando disminución de la energía libre del sistema, siendo termodinámicamente favorable. Una reacción que proceda para la izquierda ( $B \rightarrow A$ ) tendrá señal positiva, indicando que el sistema debe ganar energía para que la reacción ocurra. Las condiciones existentes en la célula son diferentes de las condiciones estándar, pero por convención, todas las reacciones son calculadas como variación de energía libre estándar ( $\Delta G^{0'}$ ), sabiendo que la variación de energía libre real ( $\Delta G$ ) es generalmente mayor que la  $\Delta G$  bajo condiciones estándar.

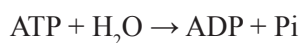
**Tabla 1.1.** Relación entre constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ) y variación de energía libre ( $\Delta G^{0'}$ )

$K_{eq}$	$\Delta G^{0'}$
$10^{-3}$	+17,1
$10^{-2}$	+11,4
$10^{-1}$	+5,7
1	0
10	-5,7
$10^2$	-11,4
$10^3$	-17,1
$10^4$	-22,8
$10^5$	-28,5
$10^6$	-34,2

La variación de energía libre real ( $\Delta G$ ), o sea, la que ocurre bajo las condiciones reales de la célula, está determinada por la siguiente ecuación:

$$\Delta G = \Delta G^{0'} + RT \ln K'_{eq}$$

Para visualizar la diferencia entre la variación de energía libre estándar y la real, considérese el ejemplo de la reacción de hidrólisis del ATP en el eritrocito:



Considerando un valor de  $-30,5 \text{ kJ/mol}$  para  $\Delta G^{0'}$  (energía libre estándar) y las siguientes concentraciones intracelulares de sustratos y productos:

$$\begin{aligned} [ATP] &= 2,25 \text{ mM (0,00225 M)} \\ [ADP] &= 0,25 \text{ mM (0,00025 M)} \\ [Pi] &= 1,65 \text{ mM (0,00165 M)} \end{aligned}$$

Reemplazando esos valores en la ecuación, tendremos que:

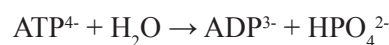
$$\Delta G = -30.500 + 8,3 \times 298 \times \ln \left[ \frac{0,00025 \times 0,00165}{0,00225} \right]$$

de donde  $\Delta G = -51,8 \text{ kJ/mol}$ . Esto significa que la energía libre producida por la hidrólisis del ATP en el espacio intracelular del eritrocito es mayor ( $-51,8 \text{ kJ/mol}$ ) que la producida bajo condiciones estándar de laboratorio ( $-30,5 \text{ kJ/mol}$ ).

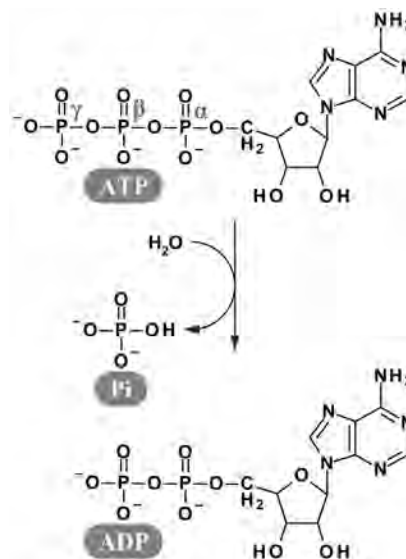
### El ATP y la transferencia de energía química

El ATP constituye el vínculo entre las reacciones productoras y las reacciones consumidoras de energía. Durante el catabolismo la producción de energía libre obtenida mediante la oxidación de los sustratos disponibles es conservada en la formación de ATP a partir de  $ADP + Pi$  (reacción de fosforilación del ADP). Después, en el anabolismo, cuando la energía es requerida para los diferentes trabajos biológicos, el ATP es hidrolizado en  $ADP + Pi$ , siendo transferida la energía de esta reacción para las reacciones acopladas que así lo requieren. La reacción de hidrólisis del ATP posee una variación de energía libre altamente negativa ( $\Delta G^{0'} = -30,5 \text{ kJ/mol}$ ), lo cual significa que tiene alta tendencia a ser realizada, hecho que es favorecido por varios factores:

(a) El ATP posee, en promedio, 3,5 cargas negativas en el pH celular (7,4) en sus grupos hidroxilo disociables, y los productos de la hidrólisis tienden a repelerse por causa de sus cargas (**Figura 1.1**):



(b) Los productos, especialmente el ion fosfato, tienden a estabilizarse como híbridos de resonancia (doble enlace con carácter de simple y viceversa) conteniendo, por tanto, menos energía libre (mayor estabilidad).



**Figura 1.1.** Reacción de hidrólisis del ATP

Los diferentes agrupamientos de fosfato del ATP están indicados con letras griegas.





(c) Los complejos de  $Mg^{2+}$ , cofactor participante de la reacción, tienen mayor afinidad por el ATP que por el ADP.

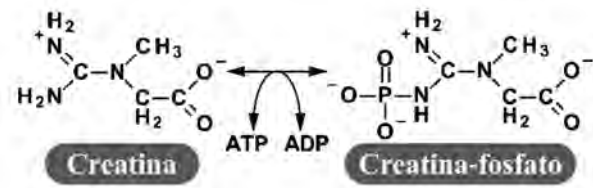
La energía contenida en la unión fosfato no está determinada por la quiebra de esta unión fosfato, sino por la diferencia entre la energía libre de los productos y la energía libre de los sustratos. El ATP, sin embargo, no es el compuesto fosfatado de mayor energía, ocupando un lugar intermediario entre ellos (**Tabla 1.2**). Los compuestos fosfatados cuya energía libre de hidrólisis sea menor que  $-25$  kJ/mol son considerados de baja energía, mientras que aquellos con mayor valor son considerados de alta energía, como es el caso del ATP.

El ATP y el ADP son reactivos obligatorios en casi todas las reacciones enzimáticas de transferencia de grupos fosfato. El ADP sirve como intermediario receptor del grupo fosfato que proviene de los compuestos fosfatados de alta energía y el ATP como donante del grupo fosfato para compuestos de baja energía. Las reacciones endergónicas o consumidoras de energía, las cuales están relacionadas, principalmente, con los procesos de síntesis, pueden ser realizadas en el metabolismo debido a que están acopladas con reacciones exergónicas, como la reacción de hidrólisis del ATP. De esa forma, las reacciones acopladas sirven para conservar la energía de oxidación, que se encuentra en la forma de ATP. Las reacciones acopladas representan procesos de dos etapas. En la primera, el grupo fosfato es transferido a un sustrato, mediante enlace covalente, conservando la alta energía de la unión fosfato. En la segunda etapa, el grupo fosfatado es desplazado para formar Pi, y la energía libre de esta hidrólisis es aprovechada para dirigir la reacción endergónica acoplada. Esto implica que las enzimas participantes en este tipo de reacción tengan sitios de unión tanto para el ATP como para los demás sustratos.

Como ejemplo de reacción acoplada puede ser citada la conservación de la energía de oxidación del gliceraldehído en la forma de ATP (**Figura 1.2**). En la primera reacción, la energía obtenida por la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato es utilizada para fosforilar el producto en el C1, convirtiéndolo en un compuesto de alta energía. En la segunda reacción, el compuesto energizado transfiere el grupo fosfato de C1 para el ADP, conservando la energía en la forma de ATP. El

valor de  $\Delta G^{0'}$ , consideradas las dos reacciones, es de  $-49,3$  kJ/mol, siendo, por tanto, favorable para que la reacción total ocurra.

El ATP no es un almacenador de energía, sino un intermediario (transmisor) de energía entre compuestos, mientras que la creatina-fosfato, compuesto formado en el tejido muscular a partir de la creatina, se constituye un almacenador de energía cuando la concentración de ATP en el músculo se encuentra elevada:

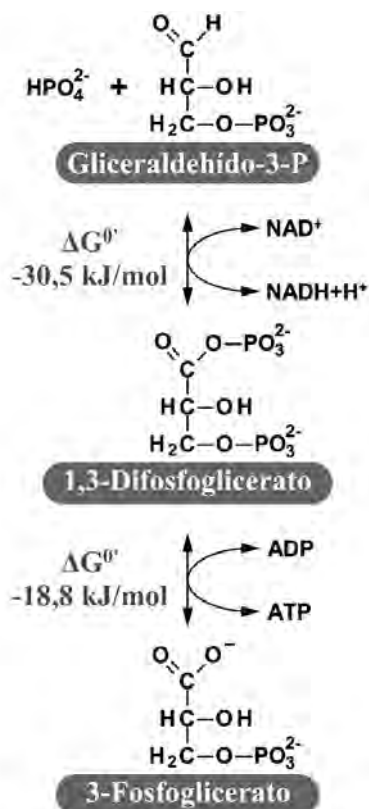


Cuando la concentración de ATP disminuye, durante la contracción muscular, la reacción se desplaza a la izquierda para regenerar el ATP necesario.

Existen algunas reacciones que consumen más energía que la generada con la hidrólisis simple del ATP. En esos casos, el ATP puede sufrir pirofosforólisis, una reacción de hidrólisis en el grupo fosfato  $\beta$  en vez del grupo  $\gamma$ , como ocurre en la hidrólisis común. Con eso, es generado AMP y un grupo pirofosfato (PPi:  $H_2P_2O_7^{2-}$ ). Posteriormente, el PPi es desdoblado en dos moléculas de Pi ( $HPO_4^{2-}$ ). La reacción de pirofosforólisis produce una cantidad de energía libre mayor ( $\Delta G^{0'} = -43,1$  kJ/mol) que la hidrólisis normal ( $\Delta G^{0'} = -30,5$  kJ/mol).

**Tabla 1.2.** Variación de energía libre de la hidrólisis de compuestos fosfatados de alta energía

Compuesto fosfatado	$\Delta G^{0'}$ (kJ/mol)
Fosfoenolpiruvato	-61,9
1,3-Difosfoglicerato	-49,4
Fosfocreatina	-43,1
ATP	-30,5
Glicose-1-fosfato	-20,9
Fructose-6-fosfato	-15,9
Glicose-6-fosfato	-13,8
Glicerol-3-fosfato	-9,2



**Figura 1.2.** Síntesis de ATP a nivel de sustrato usando la energía de oxidación del gliceraldehído

## 1.2 Ciclos de la materia en la biosfera

El flujo de energía en la biosfera es de vía única. Así, la energía solar es captada por los organismos autotróficos, los cuales la aprovechan para realizar la fotosíntesis y la transfieren para los organismos heterotróficos. En estos, parte de la energía de cada una de las reacciones químicas es aprovechada para la producción de trabajo y parte es disipada, especialmente en forma de calor. De esa forma, la materia (C, H, O, N) es reciclada, siendo la energía libre degradada. En otras palabras: C, O, N y H<sub>2</sub>O son reciclados en la biosfera entre los seres autotróficos y los heterotróficos, siendo la energía solar la fuerza direccional de estos procesos. Los ciclos biogeoquímicos comprenden la retirada y el retorno de los elementos químicos en la biosfera.

### *Ciclo del carbono*

La vida en la biosfera depende del Sol y de los organismos autotróficos, los cuales utilizan la energía luminosa para, a partir del CO<sub>2</sub> de la atmósfera y del H<sub>2</sub>O, sintetizar compuestos orgánicos, únicas fuentes de carbono utilizables por los seres vivos heterotróficos.

Ejemplos de organismos autotróficos son las bacterias fotosintéticas y las hojas verdes de las plantas. Los organismos autotróficos reducen el CO<sub>2</sub> para sintetizar carbohidratos. Los organismos heterotróficos no pueden utilizar el CO<sub>2</sub> atmosférico, debiendo utilizar, como fuente de energía, los compuestos sintetizados por los organismos autotróficos, oxidándolos gracias al oxígeno atmosférico. En este proceso el CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O son liberados para el medio. El CO<sub>2</sub> es reciclado, siendo reutilizado por los organismos autotróficos. Ese evento constituye el ciclo del carbono en la biosfera. Aproximadamente 3,5 × 10<sup>11</sup> toneladas de CO<sub>2</sub> son liberadas anualmente a la atmósfera por los organismos heterotróficos, la mayor parte del cual es reciclada por los organismos autotróficos. Mucho del carbono puede quedar retenido por largos períodos en la forma de combustibles fósiles (carbón, petróleo), habiendo, por tanto, un intercambio demorado de carbono en la biosfera, diferente del intercambio rápido que existe entre el CO<sub>2</sub> utilizado en la fotosíntesis por las plantas y el liberado en la respiración por los animales. La combustión completa de los compuestos orgánicos libera dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), mientras que la combustión incompleta, como la que ocurre en los motores de combustión interna, libera monóxido de carbono (CO), el cual es tóxico para los animales.

### *Ciclo del oxígeno*

El oxígeno representa 21 % de la atmósfera, estando sobre todo como O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Otras fuentes son nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y sulfatos (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). El más importante proceso formador de O<sub>2</sub> es la fotosíntesis. El ciclo del oxígeno está directamente relacionado con el ciclo del carbono. Los animales y vegetales fijan de manera directa el O<sub>2</sub> de la atmósfera, pero los vegetales, a diferencia de los animales, también liberan O<sub>2</sub> en el proceso de la fotosíntesis (fotólisis del agua). En el caso de los animales, el oxígeno es liberado en la forma de CO<sub>2</sub>, y no libre, como es el caso de los vegetales. La fotosíntesis y la respiración, por ser cíclicas, se contrabalancean, no habiendo alteración en la cantidad de O<sub>2</sub> en la atmósfera. La mayor parte del O<sub>2</sub> atmosférico es producido por los organismos marinos y otra gran parte por los bosques.

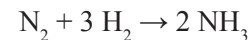
### *Ciclo del nitrógeno*

El nitrógeno es el mayor componente atmosférico (78 % del aire). Sin embargo, el nitrógeno en forma soluble, esto es, en la forma biológicamente útil, es

escaso en la naturaleza. Su forma más abundante es como nitrógeno molecular ( $N_2$ ) presente en el aire, a partir del cual debe ser incorporado en los seres vivos. Algunos microorganismos pueden utilizar ese nitrógeno volátil a través del proceso denominado fijación biológica del nitrógeno, en el cual el  $N_2$  atmosférico es reducido a amonio ( $NH_4^+$ ). Entre esos organismos están las bacterias de los géneros *Nitrobacter* y *Rhizobium*, este último asociado a las raíces de leguminosas y a las algas cianofíceas. Un número relativamente abundante de bacterias del suelo, como las del género *Nitrossomonas*, las cuales obtienen su energía mediante la oxidación de  $NH_3$ , asimila el amonio oxidándolo para formar nitritos ( $NO_2^-$ ). Posteriormente las bacterias del género *Nitrobacter* oxidan los nitritos a nitratos ( $NO_3^-$ ). El proceso de oxidación del amonio hasta nitrato es conocido como nitrificación y constituye el modo por el cual prácticamente todo el  $NH_3$  presente en el suelo es conservado, que, de otra forma, se volatilizaría. Otras fuentes de nitratos en el suelo son la combinación directa de  $N_2$  con  $O_2$  por acción de descargas eléctricas (rayos), la descomposición de materia orgánica y los fertilizantes nitrogenados. La fijación biológica del nitrógeno contribuye con cerca de 90% del  $N_2$  fijado en la biosfera. Los nitratos y nitritos producidos por las bacterias nitrificantes son captados por las plantas, que los reducen de nuevo a  $NH_3$  por acción de la enzima nitrato reductasa, en el proceso conocido como desnitrificación. El  $NH_3$  dentro de las células vegetales es utilizado para la biosíntesis de aminoácidos y proteínas. Estas proteínas vegetales son después usadas por los animales para cubrir las demandas de aminoácidos. Con la muerte de los animales sus proteínas son degradadas, generando como producto nitrogenado el  $NH_3$ , que es devuelto al suelo para ser convertido nuevamente en nitratos y nitritos por las bacterias nitrificantes, cerrando así el ciclo del nitrógeno planta-animal-atmósfera. El nitrógeno puede ser excretado en los animales en la forma de urea (mamíferos), ácido úrico (aves y reptiles) o amonio (peces). De cualquier forma, el producto final de la descomposición siempre es el amonio. El nitrato también puede ser reducido a amonio por la acción de las bacterias desnitrificantes (*Pseudomonas spirillum*) y el  $N_2$  retornar a la atmósfera por volatilización del  $NH_3$ . Se estima que 80 millones de toneladas de  $N_2$  circulan entre la atmósfera y la biosfera anualmente.

Los organismos fijadores de nitrógeno pueden ser de varios tipos: (a) cianobacterias y algas verde-azules presentes en el suelo y en las aguas dulces y saladas,

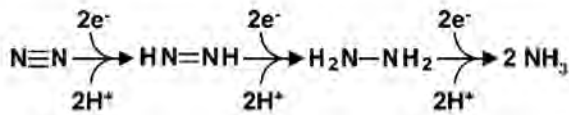
(b) *Azotobacter* o bacterias presentes en forma abundante en el suelo; y (c) bacterias en simbiosis con plantas leguminosas. Entre estas últimas, son importantes las bacterias del género *Rhizobium*, las cuales se localizan en los nódulos de las raíces de las leguminosas, fijan el nitrógeno para su propia multiplicación y para uso de la planta, y reciben a cambio compuestos necesarios para el propio proceso de fijación de nitrógeno, que la planta puede sintetizar pero que no utiliza en su metabolismo. Así, la planta sintetiza la porción hemo de la leghemoglobina, proteína de alta afinidad por el oxígeno, que la bacteria necesita para mantener bajos los niveles de  $O_2$ , que es inhibidor del proceso de fijación de  $N_2$ . El proceso de fijación de nitrógeno es bastante complejo y realizado por el sistema enzimático nitrogenasa. En este proceso ocurre reducción de una molécula de  $N_2$  para producir dos moléculas de  $NH_3$ :



Esta reacción es bastante exergónica ( $\Delta G^0 = -33,5$  kJ/mol), estando direccionada para la derecha bajo condiciones estándar. Sin embargo, el fuerte enlace covalente entre los dos nitrógenos de la molécula de  $N_2$  representa una gran barrera energética de activación (energía de unión de 942 kJ/mol), la cual puede ser superada por el sistema nitrogenasa y por la energía de hidrólisis del ATP. El ATP también tiene una función catalítica, además de termodinámica en el proceso, pues se une a la enzima y causa un cambio conformacional que contribuye a disminuir la energía de activación del sistema. Los átomos de hidrógeno son donados por la coenzima NADPH a través de la ferredoxina, una proteína ferrosulfurada que transfiere los electrones al nitrógeno. Los hidrógenos iniciales son obtenidos por la oxidación del piruvato.

La reacción completa de la fijación del nitrógeno atmosférico se muestra en la **Figura 1.3**. El complejo nitrogenasa está formado por dos enzimas. La primera de ellas, la dinitrogenasa reductasa, es un homodímero con peso molecular total de 60 kD que posee un centro ferrosulfurado ( $Fe_4-S_4$ ) de reducción-oxidación. La segunda es la dinitrogenasa, un tetrámero que contiene dos subunidades diferentes repetidas (peso molecular total de 240 kD) y un centro de Fe y Mo de óxido-reducción. Los ocho electrones necesarios en la reacción (seis para reducir el  $N_2$  y dos para producir  $H_2$  como parte obligatoria del mecanismo de la reacción) son transferidos por la dinitrogenasa reductasa en etapas sucesivas:





El sistema nitrogenasa es muy lábil en presencia de oxígeno. Así, las bacterias aeróbicas tienen mecanismos para evitar el aumento de  $\text{O}_2$  en su interior, tales como paredes más gruesas que dificultan la difusión de  $\text{O}_2$ , desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para consumir rápidamente el  $\text{O}_2$  y la acción de la leghemoglobina en las bacterias simbióticas con leguminosas. La leghemoglobina es una proteína de alta afinidad por  $\text{O}_2$ , llevándolo directamente a sus receptores en el sistema de transporte electrónico de la bacteria, impidiendo que quede soluble y aumente su concentración. Gracias a la fijación del nitrógeno atmosférico por las bacterias *Rhizobium* en simbiosis con las leguminosas, los suelos pueden ser enriquecidos mediante la utilización de esas culturas (frijol, alfalfa, trébol, maní), disminuyendo así el uso de fertilizantes químicos. Los estudios de biología molecular y las técnicas del DNA recombinante tratan de identificar y caracterizar los genes relacionados con el complejo nitrogenasa para incorporarlos en bacterias y plantas (organismos transgénicos) que naturalmente no pueden captar el  $\text{N}_2$  atmosférico. El desafío es conseguir también incorporar los mecanismos para evitar la acción inhibitoria del  $\text{O}_2$  en el sistema, así como los mecanismos de regulación de la expresión de esos genes.

### 1.3 Metabolismo intermediario

El metabolismo corresponde al total de reacciones químicas que ocurren en una célula o en un organismo, reacciones que son realizadas en forma perfectamente coordinada y llevan al intercambio de materia y de energía entre la célula y su medio para la manutención de los procesos vitales del organismo. En las diferentes vías metabólicas existen, generalmente, los compuestos precursores, varios metabolitos intermediarios y los productos finales. El término ‘metabolismo intermediario’ es frecuentemente utilizado para referirse a todas las reacciones intermediarias de las diferentes etapas que componen las vías metabólicas.

Las funciones específicas del metabolismo son: (a) obtención de energía química a partir de moléculas combustibles, en el caso de los organismos heterotróficos, o a partir de la absorción de luz solar en el caso de los organismos autotróficos. Los primeros requieren formas reducidas de carbohidratos (glucosa) como fuente básica de energía, mientras que los últimos requieren solamente  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono exógeno, además de energía solar; (b) conversión de las moléculas exógenas (nutrientes) en unidades estructurales de las biomoléculas componentes del organismo animal; (c) montaje de estas unidades para formar biomoléculas más complejas, como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos; (d) formación y degradación de biomoléculas funcionales, como enzimas, hormonas, receptores, transportadores y coenzimas.

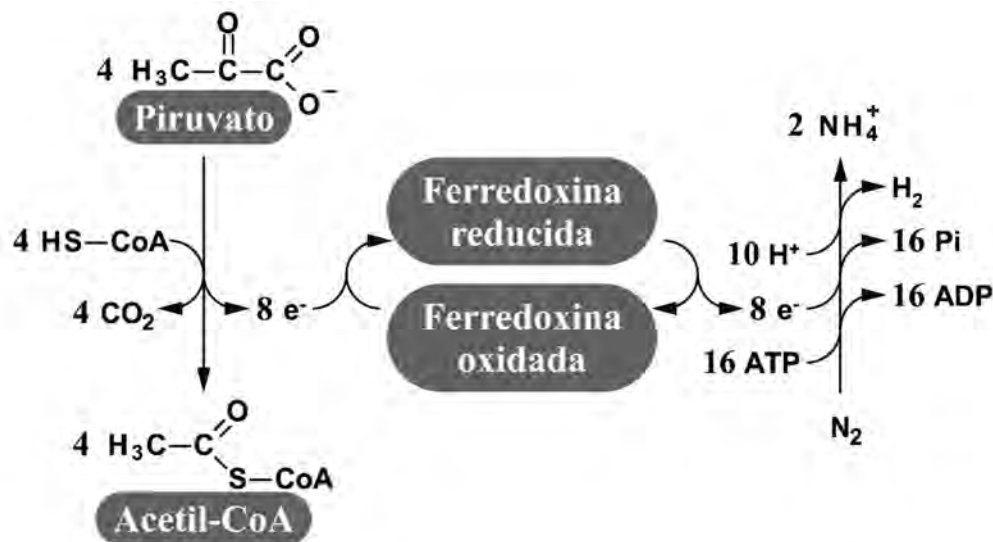


Figura 1.3. Reacciones químicas de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico





El metabolismo, a pesar de su aparente complejidad de vías y reacciones, puede ser resumido en dos fases: catabolismo y anabolismo. El catabolismo también es llamado fase degradativa u oxidativa. En las vías catabólicas las moléculas exógenas o las moléculas de reserva son degradadas mediante oxidación, resultando en moléculas más simples, tales como acetil-CoA, lactato,  $\text{CO}_2$  o  $\text{NH}_3$ . Ese proceso está acompañado de producción de energía química mediante reacciones oxidativas que permiten la conservación de la energía en la forma de ATP y de coenzimas reducidas (NADH y NADPH). En el anabolismo, también conocido como fase biosintética o reductiva, ocurre la biosíntesis enzimática de moléculas complejas a partir de unidades simples. En este proceso es consumida la energía química obtenida mediante la producción de ATP y ocurren reacciones de reducción, para lo cual son utilizadas las coenzimas reducidas NADH y NADPH.

Las múltiples etapas presentes en las vías metabólicas son necesarias para hacer más flexible y versátil el metabolismo intermediario y realizar interconversiones. Si las rutas ocurrieran en una única etapa el metabolismo sería muy rígido e irreversible. También, a través de estas etapas, es posible maximizar la producción de ATP con la energía específica requerida en cada etapa. De otra forma, si la síntesis de ATP ocurriera en una sola etapa o en muy pocas etapas, sería liberada excesiva energía en pocas reacciones, produciéndose mucho calor y ocurriendo gran pérdida de energía.

Las vías metabólicas pueden ser lineares, cíclicas o ramificadas. Estas últimas pueden ser convergentes (catabolismo) o divergentes (anabolismo). El metabolismo, de forma global, comprende la integración de tres fases: (a) degradación y/o síntesis de moléculas complejas a partir de unidades simples; (b) producción de biomoléculas simples, que son compuestos intermediarios comunes de las rutas metabólicas, tal como el acetil-CoA; (c) oxidación completa de los compuestos intermediarios comunes hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Esta última fase también suministra las moléculas precursoras necesarias para las rutas biosintéticas, recibiendo el nombre de fase anfibólica, o sea, una fase que puede tener reacciones tanto degradativas como biosintéticas, dependiendo de las necesidades metabólicas.

Las rutas catabólica y anabólica generalmente tienen diferentes enzimas, aunque a veces pueden compartir caminos (enzimas) comunes. En el control

del metabolismo es observado que las vías degradativa y de síntesis tienen rutas diferentes, lo cual es necesario porque: (a) el reverso de la ruta catabólica es un imposible energético; (b) la regulación del anabolismo y del catabolismo es diferente e independiente, lo cual significa que si una ruta está activa la otra debe estar interrumpida, y (c) las rutas ocurren generalmente en diferentes compartimentos celulares, por ejemplo, la oxidación de los ácidos grasos ocurre en la mitocondria, mientras que su síntesis ocurre en el citosol.

Las vías metabólicas son reguladas en tres niveles: (a) por la acción de las enzimas alostéricas, las cuales controlan vías metabólicas por modificación de sus actividades, a través de moduladores estimuladores o inhibitorios; (b) por medio de hormonas, mensajeros químicos que regulan el metabolismo de órganos, tejidos y, en ocasiones, de aparatos y sistemas; este nivel de control puede tener efectos de mayor alcance que las enzimas alostéricas; (c) por la velocidad de las etapas metabólicas, que está en función de la concentración de las enzimas correspondientes, esto es, de la tasa de síntesis y degradación de esas enzimas, lo cual depende del control de la expresión génica en las células.

Frente a la gran cantidad de reacciones químicas existentes en el metabolismo y para encontrar sentido a determinada reacción o vía metabólica, es necesario preguntar: (a) ¿Qué ventaja tiene para la célula y para el organismo la realización de esa reacción o vía metabólica? (b) ¿Qué relación existe entre esa reacción o vía con otras vías metabólicas y cómo ellas favorecen el crecimiento y/o la manutención de las funciones de organismo? (c) ¿De qué forma los niveles de control del metabolismo que actúan sobre esa vía en particular contribuyen para mantener el equilibrio del organismo?

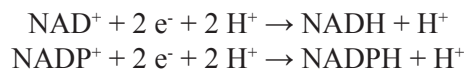
### ***Función del ATP y del NAD en el metabolismo***

La gran mayoría de la energía libre obtenida por la oxidación de los nutrientes durante el catabolismo es conservada mediante reacciones acopladas a la síntesis de ATP a partir de ADP y de fosfato inorgánico (Pi). Tanto ATP como ADP y Pi están presentes en todos los seres vivos y sirven universalmente como sistemas de transmisión de energía. La energía presente en el ATP es utilizada posteriormente en los procesos celulares que requieren energía (biosíntesis, contracción y motilidad,



transporte activo y transmisión de la información genética), pues el ATP transfiere su energía cuando ocurre la pérdida (hidrólisis) de su grupo fosfato y cuando esta reacción está acoplada con aquellas reacciones que demandan energía. El ADP resultante de la hidrólisis del ATP es nuevamente fosforilado en reacciones acopladas del catabolismo, que producen energía suficiente para regenerar ATP (fosforilaciones oxidativa y a nivel de sustrato). De esa forma, es generado un ciclo de energía en la célula, en el cual el ATP sirve de transmisor de energía, que liga las reacciones productoras de energía con las reacciones consumidoras de energía.

Una segunda forma de transferir la energía química del catabolismo para el anabolismo, simultáneamente con la fosforilación de ADP, es mediante el transporte de átomos de hidrógeno o de electrones. Los hidrógenos (o los electrones) son obtenidos a partir de la oxidación de los sustratos alimenticios por deshidrogenasas específicas, que los reciben de los sustratos reducidos y los transfieren a las coenzimas oxidadas  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ :



Esas coenzimas, al quedar en su forma reducida ( $\text{NADH}$  y  $\text{NADPH}$ ), sirven de transportadores de electrones energizados, los cuales son transferidos de las reacciones catabólicas a las reacciones de síntesis que demandan electrones en los procesos reductivos. La concentración total de  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADH}$  en la mayoría de los tejidos está en torno de  $10^{-5}$  M, y la concentración de  $\text{NADP}^+$  y  $\text{NADPH}$  es de  $10^{-6}$  M. Cuando la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  es alta en la célula son favorecidos los procesos oxidativos a fin de obtener la transferencia de electrones para  $\text{NAD}^+$  y así aumentar la concentración de  $\text{NADH}$ . De modo inverso, cuando la relación  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  es baja son favorecidos los procesos reductivos, esto es, la transferencia de electrones a sustratos oxidados. Se conocen más de doscientas enzimas oxidoreductasas o deshidrogenasas que requieren  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  en reacciones de oxidación de sustrato, o  $\text{NADH}$  o  $\text{NADPH}$  en reacciones de reducción de sustrato. Otras coenzimas que participan en reacciones de transferencia de electrones son los nucleótidos flavínicos FMN y FAD, derivados de la riboflavina, cuyas formas reducidas son  $\text{FMNH}_2$  y  $\text{FADH}_2$ .

## La división del trabajo en el metabolismo

Cada célula, cada tejido y cada órgano en el organismo animal tienen una función específica, hecho que se refleja en su anatomía y en su actividad metabólica. El músculo esquelético usa la energía metabólica para el movimiento, el tejido adiposo almacena y libera grasa que sirve como combustible en las otras células del organismo, y las neuronas utilizan el transporte de iones y neurotransmisores a través de la membrana para la propagación de información. Los principales tejidos del organismo animal y el trabajo que ellos desempeñan serán discutidos a continuación.

### El hígado

Este órgano ejerce un papel centralizador en el metabolismo, sintetizando y distribuyendo nutrientes a los órganos periféricos por la circulación sanguínea. La importancia del hígado como órgano centralizador está claramente expresada en el hecho de que los otros órganos y tejidos son llamados extrahepáticos o periféricos. Durante la digestión, en el tracto gastrointestinal, las tres principales clases de nutrientes (carbohidratos, proteínas y lípidos) sufren hidrólisis enzimática para ser convertidos en sus monómeros básicos. Esa quiebra es necesaria porque las células del epitelio intestinal solamente pueden absorber moléculas pequeñas (monosacáridos, aminoácidos, ácidos grasos, monoglicéridos). Los rumiantes absorben ácidos grasos volátiles y amonio en el rumen. Después de la absorción, la mayoría de los monosacáridos y aminoácidos, así como algunos triglicéridos, son llevados por el sistema portal hepático al hígado. Algunos triglicéridos van vía linfática a la circulación sanguínea y alcanzan el tejido adiposo. En el hígado los nutrientes absorbidos son transformados en combustibles o en moléculas precursoras que serán requeridas en otros tejidos periféricos. El hígado ajusta su metabolismo de una forma flexible y rápida, en función del tipo de nutriente que el organismo recibe.

En la **Figura 1.4** se presenta un esquema simplificado del metabolismo hepático, con las rutas metabólicas numeradas que serán referenciadas en el texto a seguir, entre corchetes.

La glucosa que llega al hígado es fosforilada y convertida en glucosa-6-fosfato por la enzima



glucoquinasa [1]. Otros monosacáridos, como fructosa, galactosa o manosa, son convertidos en glucosa-6-fosfato por vías metabólicas alternativas [2]. La glucosa-6-fosfato está en un cruzamiento de caminos de las rutas de los carbohidratos en el hígado. Ella puede tomar cinco posibles rutas, dependiendo de las necesidades metabólicas del organismo. Esas rutas están controladas por enzimas reguladoras (enzimas alostéricas) o por hormonas que controlan la actividad de ciertas enzimas. Las posibles rutas de la glucosa-6-fosfato en el hígado son las siguientes:

(a) Puede ser defosforilada por la enzima glucosa-6-fosfatasa, generando glucosa libre, la cual es exportada para mantener la concentración de glucosa en la sangre [3]. Tal concentración debe estar siempre constante (4-5 mM) para que el aporte de energía al cerebro y a otros tejidos sea mantenido.

(b) Si no hay necesidad de glucosa en la sangre, la glucosa-6-fosfato es convertida en glicógeno hepático y almacenado [4].

(c) Puede ser oxidada para la producción de energía vía glucólisis [5], descarboxilación del piruvato [6] y ciclo de Krebs [7 → 8]. Sin embargo, en el hígado, el combustible preferido para la producción de energía son los ácidos grasos.

(d) Cuando hay un exceso de ingestión de carbohidratos, no siendo necesario reponer la glucosa sanguínea, y cuando el hígado satura su capacidad de almacenamiento de glicógeno, la glucosa-6-fosfato es degradada vía glucólisis hasta acetil-CoA [5 → 6]. Este compuesto es usado para sintetizar ácidos grasos [9], los cuales son incorporados a los triglicéridos [10], fosfolípidos [11] y colesterol [12]. Esos lípidos son llevados para otros tejidos mediante las lipoproteínas [13].

(e) Finalmente, la glucosa-6-fosfato puede entrar en la ruta de las pentosas-fosfato [14] con la finalidad de producir la coenzima reducida NADPH [15], necesaria para la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol, y ribosa-5-fosfato, necesaria para la biosíntesis de nucleótidos.

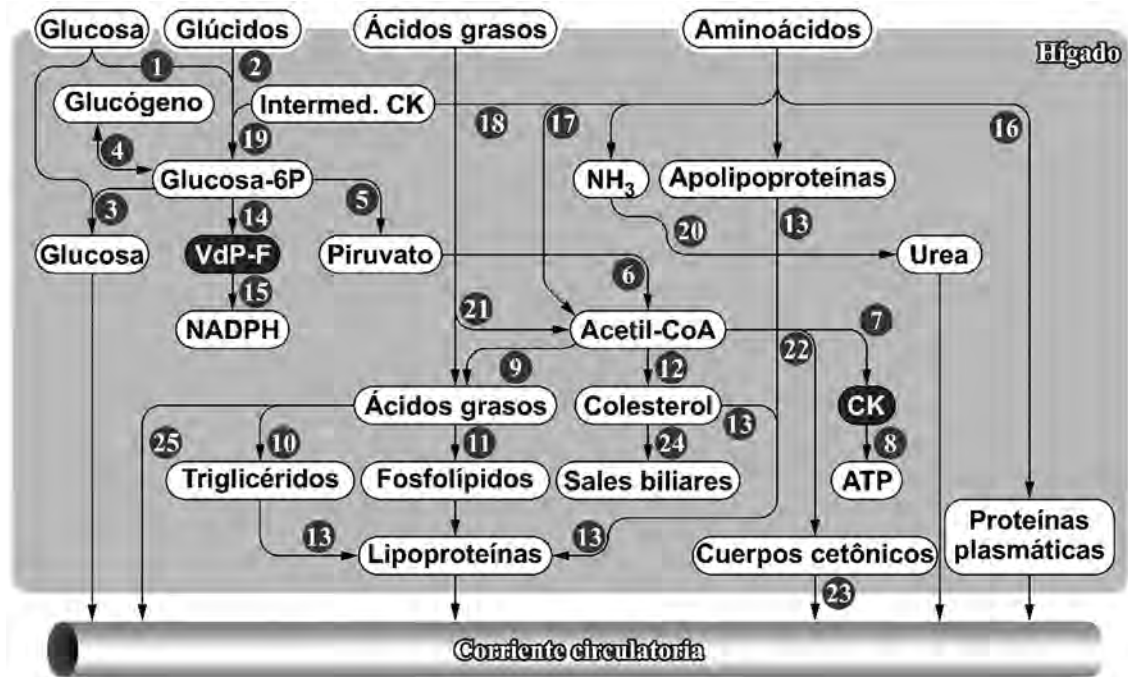


Figura 1.4. Esquema del metabolismo hepático de lípidos, glúcidos y proteínas.

Los nombres de los metabolitos están en fondo blanco mientras que los nombres de las rutas metabólicas están en fondo gris oscuro. Los números correspondientes a las diferentes rutas están referenciados en el texto. VdP-F, vía de las pentosas-fosfato; CK, ciclo de Krebs.



En los animales rumiantes generalmente no ocurre exceso de glucosa, pues los carbohidratos de la dieta son convertidos, en el rumen, en ácidos grasos volátiles. Tales ácidos son absorbidos por el epitelio del rumen y transportados por la sangre al hígado (principalmente propionato y acetato) o al tejido adiposo (sobre todo butirato y  $\beta$ -hidroxibutirato). La manutención de los niveles de glucosa sanguínea en los rumiantes está en especial determinada por la conversión del propionato en glucosa vía gliconeogénesis.

Los aminoácidos que llegan al hígado tienen varias rutas metabólicas:

(a) Pueden actuar como precursores de proteínas, para uso dentro del hígado o para formar proteínas plasmáticas [16].

(b) Pueden pasar al torrente circulatorio e ir a los órganos periféricos, donde son utilizados como precursores de proteínas.

(c) Pueden servir de precursores de compuestos no proteicos, tales como nucleótidos y hormonas.

(d) Cuando no son necesarios como precursores de proteínas o de otros compuestos, son desaminados y degradados para producir acetil-CoA [17] e intermediarios del ciclo de Krebs [18]. Los intermediarios de ese ciclo pueden ser utilizados para generar glucosa vía gliconeogénesis [19]. El acetil-CoA puede ser utilizado para generar energía mediante su completa oxidación en el ciclo de Krebs [7  $\rightarrow$  8], o servir como precursor para la biosíntesis de ácidos grasos [9]. El grupo amina, en la forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), es convertido en urea [20] para ser excretado, pues es tóxico.

Los ácidos grasos que llegan al hígado pueden tener diferentes destinos metabólicos:

(a) Su oxidación hasta acetil-CoA (a través de la  $\beta$ -oxidación) para la producción de energía [21]. El acetil-CoA, a su vez, puede entrar al ciclo de Krebs para producir más energía [7  $\rightarrow$  8].

(b) El exceso de acetil-CoA producido en la oxidación de los ácidos grasos puede generar cuerpos cetónicos (acetoacetato y  $\beta$ -hidroxibutirato) [22], los cuales pueden ir a los tejidos periféricos [23] para servir de combustible vía ciclo de Krebs. Los cuerpos cetónicos pueden constituir una importante fracción de

la energía utilizada por los órganos periféricos (30% en el corazón, 70% en el cerebro) especialmente en situaciones de ayuno prolongado, cuando la glucosa se encuentra deficitaria y la fuente de energía proviene de la oxidación de los ácidos grasos.

(c) Parte del acetil-CoA proveniente de los ácidos grasos o de la glucosa es utilizado para sintetizar colesterol [12], el cual es esencial para la estructura de las membranas y como precursor de los ácidos biliares [24] y de las hormonas esteroideas.

(d) Pueden hacer parte de los fosfolípidos y de los triglicéridos de las lipoproteínas del plasma [10  $\rightarrow$  13 y 11  $\rightarrow$  13], las cuales transportan lípidos al tejido adiposo para su almacenamiento (en la forma de triglicéridos).

(e) Pueden seguir a la sangre, siendo transportados por la albúmina sérica [25] y pudiendo ser captados por las células musculares cardíacas y esqueléticas (por difusión pasiva), donde son utilizados como fuente de energía. La albúmina es la proteína más abundante en la sangre. Una molécula de albúmina puede transportar hasta diez moléculas de ácidos grasos.

Además de servir como órgano centralizador, procesador y distribuidor de nutrientes, el hígado también sirve como órgano detoxificante de compuestos orgánicos exógenos, tales como drogas, aditivos de alimentos, agentes preservativos y otros agentes dañinos sin valor nutricional. En el proceso de detoxificación está involucrada una hidroxilación del compuesto, con acción del citocromo P-450, el cual vuelve al compuesto más soluble para ser excretado.

### *El tejido adiposo*

El tejido adiposo, compuesto por las células adiposas o adipocitos, es un tejido amorfo distribuido ampliamente por todo el organismo: bajo la piel, alrededor de los vasos sanguíneos mayores y en la cavidad abdominal. En condiciones normales forma hasta 15% del peso de un animal adulto. Los adipocitos son células metabólicamente muy activas, que responden a estímulos hormonales, interactuando con el hígado, el tejido muscular esquelético y el corazón. Las células adiposas pueden realizar la glucólisis, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa.





Cuando la ingestión de carbohidratos es abundante los adipocitos pueden convertir la glucosa en acetil-CoA, vía piruvato, para sintetizar ácidos grasos y, después, triglicéridos, los cuales son almacenados en grandes glóbulos de grasa en el interior de los adipocitos. Los adipocitos también almacenan los triglicéridos provenientes del hígado y del tracto gastrointestinal, que llegan por la sangre transportados en las VLDL (lipoproteínas de densidad muy baja). Cuando es necesario, los triglicéridos almacenados en los adipocitos son hidrolizados por lipasas, que liberan los ácidos grasos, los cuales pasan a la circulación sanguínea y van para el músculo esquelético y el corazón. Las lipasas de los adipocitos son sensibles a la acción de algunas hormonas: la adrenalina y el glucagón estimulan su actividad, mientras que la insulina la inhibe.

### *El tejido muscular*

El tejido muscular consume cerca del 50 % del oxígeno que entra en el organismo en condiciones de reposo o de ejercicio leve y 90 % en condiciones de trabajo muscular intenso. El metabolismo de la célula muscular está especializado en generar ATP como fuente inmediata de energía. Está adaptado para hacer su trabajo mecánico de forma intermitente, o sea, trabajo intenso en corto tiempo (como en una rápida corrida) o trabajo lento durante un intervalo mayor (como en una larga caminata).

El músculo puede usar ácidos grasos, cuerpos cetónicos o glucosa como combustibles, dependiendo del grado de actividad muscular. Durante el reposo o en trabajo muscular leve, la fuente primaria de combustible son los ácidos grasos provenientes del tejido adiposo y los cuerpos cetónicos provenientes del hígado. Ellos entran al ciclo de Krebs en la forma de acetil-CoA para su completa oxidación hasta  $\text{CO}_2$  y para la producción de ATP mediante fosforilación oxidativa. En trabajo muscular moderado es utilizada la glucosa, además de los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos. La glucosa sufre glucólisis, generando acetil-CoA, el cual entra en el ciclo de Krebs para la producción de energía (ATP). Cuando la actividad muscular es intensa la demanda por ATP es muy alta, y el oxígeno y los combustibles que llegan al músculo por la sangre son insuficientes para producir, solamente mediante respiración aeróbica, la cantidad de ATP requerida. En esas condiciones, el glicógeno almacenado en el músculo es metabolizado

a glucosa, que es degradada vía glucólisis anaeróbica generando dos moléculas de lactato y dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. El uso de glicógeno muscular como combustible de emergencia para producir ATP en el músculo es favorecido por la adrenalina, que estimula la degradación del glicógeno hepático para liberar más glucosa en la sangre, y del glicógeno muscular, para generar glucosa en el músculo. Como el tejido muscular no posee la enzima glucosa-6-fosfatasa, no puede convertir la glucosa-6-fosfato en glucosa libre a fin de que esta última pueda ser usada para mantener la glicemia. En otras palabras, el glicógeno muscular es utilizado en la producción de energía exclusivamente para el músculo. Sin embargo, la cantidad de glicógeno en el músculo es limitada, máximo 1 % del peso total de la masa muscular, para que pueda ser usado indefinidamente. Por otro lado, la acumulación de lactato, producto final de la glucólisis anaeróbica, y la consecuente disminución del pH, reducen la eficiencia de la actividad muscular. Después de intensa actividad muscular la frecuencia respiratoria continúa aumentada por más tiempo. Eso ocurre porque el oxígeno es usado para la obtención de ATP mediante fosforilación oxidativa (respiración celular), siendo este ATP usado para la síntesis de nueva glucosa a partir del lactato producido durante el ejercicio. El lactato generado en estos procesos debe ser llevado, a través de la sangre, desde el músculo hasta el hígado, para que sea realizada la vía gliconeogénica. La glucosa así sintetizada retorna al músculo para reponer el glicógeno gastado y completar el llamado ciclo de Cori.

El músculo esquelético también posee grandes cantidades de fosfocreatina, compuesto almacenador de energía gracias a su capacidad para transferir grupos fosfato. Cuando no hay necesidad energética en el músculo la creatina es fosforilada a costa de la transferencia del grupo fosfato del ATP. En períodos de intensa actividad muscular el sentido de la reacción es invertido, produciendo ATP.

El músculo cardíaco difiere del músculo esquelético en las siguientes características: (a) el músculo cardíaco está continuamente activo, en un proceso permanente de contracción y relajamiento; (b) el corazón tiene un metabolismo completamente aeróbico; (c) el tejido cardíaco posee un número mucho mayor de mitocondrias, las cuales ocupan más de la mitad del volumen de las células. Los combustibles



usados para el funcionamiento cardíaco son una mezcla de glucosa, ácidos grasos libres y cuerpos cetónicos, provenientes de la sangre. De modo similar al músculo esquelético, el músculo cardíaco tiene poca capacidad de almacenamiento de glicógeno y tiene algunas reservas de energía en la forma de fosfocreatina. El corazón es estrictamente aeróbico, obteniendo su energía de la fosforilación oxidativa. Cualquier falla que impida al  $O_2$  alcanzar una porción de músculo cardíaco, como en una obstrucción de los vasos sanguíneos del corazón por depósitos grasos (aterosclerosis) o por coágulos (trombosis coronaria), causa la muerte de aquella región del corazón en la cual faltó oxígeno, evento conocido como infarto del miocardio.

### *El cerebro*

El metabolismo del cerebro presenta algunas peculiaridades en relación con los otros órganos. En los mamíferos adultos el cerebro usa, normalmente, glucosa como combustible y tiene un metabolismo respiratorio muy activo. Casi 20% del oxígeno consumido por el organismo es gastado en el cerebro sin que este gasto tenga mucha variación durante la vigilia o el sueño. Como el cerebro contiene muy poco glicógeno, es dependiente de la glucosa sanguínea. Si ocurre una disminución en el nivel de glucosa sanguínea pueden ocurrir daños irreparables en la función cerebral.

El cerebro no puede usar directamente ácidos grasos como combustible, aunque en ocasiones de ayuno prolongado utiliza  $\beta$ -hidroxibutirato, el cual es formado a partir de ácidos grasos en el hígado. El cerebro puede oxidar el  $\beta$ -hidroxibutirato vía acetyl-CoA, evitando que se gasten proteínas musculares, usadas como fuente de energía por otros órganos durante períodos prolongados de ayuno. El cerebro puede realizar glucólisis aeróbica y ciclo de Krebs para obtener el ATP necesario en su actividad. El ATP se requiere para originar y mantener el potencial eléctrico a través de la membrana plasmática de las neuronas durante la transmisión de impulsos nerviosos. La membrana plasmática de las células nerviosas posee un transportador antiporte dependiente de ATP, que lleva iones  $K^+$  al interior e iones  $Na^+$  al exterior de la neurona. Para cada molécula de ATP hidrolizada, tres iones  $Na^+$  son transportados hacia fuera de la neurona y dos iones  $K^+$  entran. Con eso se genera una diferencia de potencial eléctrico a través de la

membrana de la neurona, que tiene el lado interior negativo en relación con el exterior. Los cambios de potencial transmembranal constituyen señales eléctricas transitorias que pasan de una neurona a otra y son la principal forma de transferencia de información en el sistema nervioso.

### *La sangre*

La corriente circulatoria es el medio de interconexión entre todos los tejidos. A través de ella son transportados los nutrientes desde el tracto gastrointestinal hasta el hígado y de este al tejido adiposo y demás órganos. También son transportados los productos de excreción de todos los tejidos para el riñón, el oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos y el  $CO_2$  generado en la respiración celular desde los tejidos hasta los pulmones. Por la sangre son transportadas las hormonas de un tejido a otro, es así como el tejido nervioso sirve de regulador e integrador de las actividades entre los diferentes órganos.

La sangre constituye del 8% al 10% del peso de un animal. Casi la mitad de este volumen es ocupado por tres tipos de células sanguíneas: (a) los eritrocitos, que constituyen la gran mayoría y contienen hemoglobina, especializados en transportar  $O_2$ ; (b) los leucocitos, que están en menor número que los eritrocitos, son de varios tipos y tienen funciones de defensa contra las infecciones, y (c) las plaquetas (trombocitos), que contribuyen al proceso de coagulación de la sangre.

La fracción líquida de la sangre está constituida por el plasma sanguíneo, que contiene 90% de agua y 10% de solutos. Entre los solutos del plasma están: (a) las proteínas plasmáticas (70% del total de solutos), entre ellas la albúmina, las lipoproteínas VLDL, LDL (lipoproteínas de baja densidad), HDL (lipoproteínas de alta densidad), las inmunoglobulinas (anticuerpos), el fibrinógeno, la protrombina, las proteínas transportadoras y las hormonas peptídicas; (b) moléculas orgánicas pequeñas (20% de los solutos), como glucosa, aminoácidos, lactato, piruvato, cuerpos cetónicos, citrato, urea y ácido úrico; (c) compuestos inorgánicos (10% de los solutos) tales como NaCl, ión bicarbonato, ión fosfato,  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$ , KCl y  $Na_2SO_4$ . Los solutos de bajo peso molecular presentes en la sangre están en constante flujo entre este y los otros tejidos. La entrada de iones inorgánicos por la alimentación es equilibrada con la eliminación



a través del riñón. Algunos de los iones tienen un estado dinámico estable, o sea, son intercambiados entre la sangre y los tejidos, pero su concentración no varía mucho. Así, los niveles de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , y  $\text{Ca}^{2+}$  en la sangre son mantenidos en torno de 140 mM, 5 mM y 2,5 mM, respectivamente, control este ejercido por el riñón.

La concentración de glucosa también es mantenida constante. En animales monogástricos está en torno de 80 mg/dL (4,5 mM) y en rumiantes alrededor de 60 mg/dL (3,3 mM). Una caída del nivel de glucosa sanguínea (hipoglucemia) lleva a fallas en la función cerebral, causando confusión mental. Abajo de cierto nivel (menor que 30 mg/dL) ocurre letargo, coma, convulsiones y muerte. El nivel de glucosa en la sangre es controlado hormonalmente por la insulina, la cual tiene acción hipoglucemiante, y por el glucagón y la adrenalina, que tienen efecto hiperglucemiante.

## 1.4 Enzimas

Las enzimas ilustran la gran variedad de proteínas existentes en la naturaleza. Gracias a ellas son posibles todas las reacciones químicas que ocurren en los seres vivos y permiten mantener la vida. El proceso enzimático más antiguo que se conoce es el de la fermentación de la glucosa hasta etanol, realizado por las levaduras, descrito por Pasteur en 1850. El término 'enzima' (del griego *en*, 'en el interior' y *zimé*, 'levadura o fermento', "en la levadura") fue propuesto por Pasteur en 1877, pues se creía que las enzimas no podían actuar fuera de las células. Sin embargo, el gran acontecimiento que marcó la historia de la enzimología y de la bioquímica misma fue el aislamiento de todas las enzimas que participan en el proceso de fermentación de la glucosa, realizado por Büchner en 1897, probando que las enzimas podían actuar en forma aislada de las células. Después, Sumner, en 1926, aisló la enzima ureasa en forma cristalina y propuso que era una proteína. No obstante, un conocido bioquímico de la época, Willstätter, rechazó esta tesis alegando que las enzimas eran moléculas de bajo peso molecular. Finalmente, Northrop, en 1930, trabajando con pepsina y tripsina, mostró evidencias contundentes de que las enzimas eran proteínas (Semenza, 2003). Hoy se conocen clasificadas cerca de 2.000 enzimas, prácticamente todas proteínas, a excepción de un pequeño grupo de ácidos nucleicos (RNA) con acción catalítica (ribozimas).

La función catalítica de las enzimas depende de que su estructura esté intacta. Agentes físicos o químicos tales como calor o extremos de pH o agentes desnaturantes causan pérdida de la acción catalítica. El metabolismo depende de la acción directa de las enzimas y de su control a través de diferentes mecanismos que envuelven las hormonas, la expresión génica y el autocontrol a partir de los metabolitos resultantes de la acción enzimática. Las enzimas poseen las siguientes características: (a) alto grado de especificidad, determinado por el sitio activo de la molécula proteica enzimática, donde la unión sustrato-enzima es específica, pudiendo haber especificidad absoluta (a un compuesto) o relativa (a un grupo de compuestos); (b) son catalizadores que no generan subproductos, o sea que no sufren alteraciones durante la catálisis, y su eficiencia catalizadora es del 100%; y (c) actúan en soluciones intracelulares, esto es, en soluciones acuosas bajo condiciones de temperatura y pH moderadas (37 °C y 7,4, respectivamente).

### *Clasificación sistemática de las enzimas*

Además de los nombres genéricos con que son conocidas las enzimas (formados según un sistema basado por lo general en la adición del sufijo *asa* al nombre de su sustrato o a una palabra que describa su actividad), existe una nomenclatura dentro de un sistema internacional, elaborado por la Comisión de Enzimas de la IUB (International Union of Biochemistry). Este sistema está basado en el tipo de reacción catalizada, estableciendo seis clases de enzimas, las cuales tienen subclases e sub-subclases. Cada enzima tiene designado un código de cuatro dígitos. Las seis clases, que corresponden al primer dígito, son las siguientes:

1. Oxidorreductasas: transfieren electrones.
2. Transferasas: transfieren grupos funcionales.
3. Hidrolasas: participan en reacciones de hidrólisis (transfieren grupos funcionales al agua).
4. Liasas: adicionan grupos a enlaces dobles, o forman enlaces dobles por remoción de grupos.
5. Isomerasas: producen formas isoméricas mediante la transferencia de grupos.
6. Ligasas (sintetasas): condensan grupos en reacciones acopladas con la hidrólisis del ATP, formando uniones C-C, C-S, C-O y C-N.

Los demás dígitos corresponden a subgrupos específicos de acción de la enzima.



## Cinética enzimática

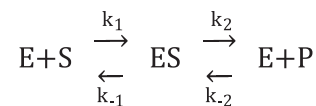
Para que una reacción ocurra ella debe vencer la energía de activación de esa reacción, es decir, aquella cantidad de energía aplicada al sustrato de la reacción necesaria para superar la barrera energética a fin de generar un producto. Una forma de superar la energía de activación para aumentar la velocidad de una reacción es aumentando la temperatura del sistema, obteniendo así mayor interacción entre las moléculas. La velocidad de la reacción es duplicada por cada 10 °C de aumento en la temperatura del sistema. Sin embargo, en las células, donde las condiciones son isotérmicas y las condiciones de pH son casi neutras, las enzimas actúan como catalizadores, esto es, como otra forma de aumentar la velocidad de una reacción. Las enzimas actúan disminuyendo la energía de activación de la reacción debido a la formación de un complejo con el sustrato que causa cambios conformacionales y facilita el paso del estado transicional a la generación del producto. La catálisis ocurre en el sitio activo de la enzima, donde solamente se une el sustrato específico, mediante interacciones que, generalmente, son de tipo no covalente. Las enzimas pueden aumentar la velocidad de la reacción, pero no afectan el equilibrio termodinámico de la reacción; así, esta obedece a cambios de energía libre del sistema, o sea que es realizada en el caso de ser energéticamente posible. La velocidad de la reacción puede aumentar, debido a la acción catalítica de la enzima, desde  $10^7$  veces (como en la anhidrasa carbónica) hasta  $10^{14}$  veces (como en la ureasa). Este evento es posible porque el sitio activo de la enzima es complementario con el estado energético de transición del sustrato (después de superar la energía de activación), esto es, la interacción óptima entre el sustrato y el sitio activo de la enzima es obtenida en el estado energético de transición y no en el estado basal.

La cinética enzimática es estudiada *in vitro* con las enzimas purificadas, identificando el efecto de varios factores, como la concentración del sustrato y los cambios de pH y temperatura, sobre la velocidad de la reacción.

### *Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de la reacción enzimática*

La velocidad de la reacción enzimática, expresada como velocidad inicial ( $V_0$ ), aumenta con el incremento en la concentración del sustrato [S] cuando se mantiene

constante la concentración de la enzima. Este aumento continúa hasta un punto en el cual se obtiene la velocidad máxima de reacción ( $V_{\max}$ ). Dicha velocidad máxima corresponde al punto de saturación de la enzima, es decir, cuando el número de moléculas del sustrato excede al número de moléculas de la enzima. A partir de ese punto la velocidad de la reacción se mantiene constante. En bajas concentraciones de sustrato la  $V_0$  aumenta de forma lineal a medida que la concentración del sustrato aumenta. No obstante, después de determinada [S], la velocidad se vuelve cada vez más lenta hasta llegar a cero, o sea, cuando no hay más aumento de  $V_0$ , alcanzando la  $V_{\max}$ . La curva correspondiente a esta reacción describe una hipérbola rectangular con una asíntota en  $V_{\max}$  (**Figura 1.5**). Michaelis y Menten, en 1913, estudiaron la cinética que tienen las reacciones catalizadas por enzimas con un sustrato (Nelson & Cox, 2000). La reacción presupone la formación de un complejo de la enzima con el sustrato, que posteriormente libera el producto y la enzima libre:



Las dos reacciones son reversibles y tienen sus propias constantes de velocidad:  $k_1$  ( $k_{-1}$  en el sentido inverso) y  $k_2$  ( $k_{-2}$  en el sentido inverso) que determinan las velocidades de reacción. La segunda reacción es más lenta, limitando la velocidad de la reacción, la cual está determinada por la concentración del complejo ES.

La enzima puede estar en forma libre (E) o unida al sustrato (ES). Cuando hay baja [S] la mayor parte de la enzima está en forma libre (E). Así, habrá poco [ES] y la velocidad de la reacción será baja. Cuando aumenta [S] hay mayor [ES] disponible y la reacción incrementa su velocidad, al punto que toda la enzima estará como ES, esto es, cuando alcanza el punto de saturación. Cuando [ES] es constante, la velocidad de la reacción también se mantiene constante (*plateau* de la curva). Michaelis y Menten dedujeron una constante que es indicadora de la velocidad de la reacción y, por extensión, del grado de afinidad que la enzima tiene por su sustrato. Esta constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ), es definida como la concentración de sustrato (molar) necesaria para que la mitad de la velocidad máxima ( $\frac{1}{2}V_{\max}$ ) de la reacción sea alcanzada. La relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de





la reacción puede ser expresada matemáticamente a partir de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

Dónde:

$V_0$  = velocidad inicial

$V_{\max}$  = velocidad máxima

$K_M$  = constante de Michaelis-Menten

$[S]$  = concentración del sustrato (mol/L).

Cuando la velocidad de reacción ( $V_0$ ) es la mitad de la velocidad máxima, o sea, cuando  $V_0 = V_{\max}/2$ , la ecuación será:

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

Dividiendo ambos términos por  $V_{\max}$  se tiene:

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Esto es:

$$K_M + [S] = 2[S]$$

$$K_M = [S]$$

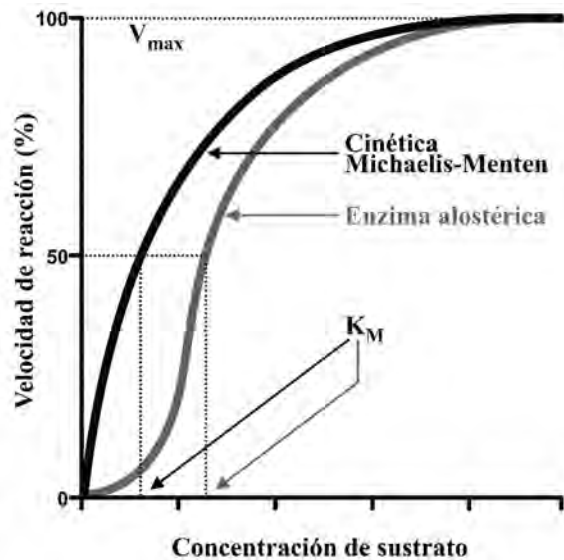


Figura 1.5. Cinética en enzimas alostéricas y no alostéricas

La deducción anterior explica la definición de la constante de Michaelis-Menten, o sea la concentración de sustrato necesaria para obtener la mitad de la velocidad máxima de la reacción. La ecuación de Michaelis-Menten es útil para determinar  $V_{\max}$  y  $K_M$  de una enzima. Sin embargo, por el hecho de corresponder a una ecuación hiperbólica, es más fácil trabajar con transformaciones para volverla lineal. Es el caso de la ecuación de los dobles recíprocos o ecuación de Lineweaver-Burk, basada en la inversión de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max} \times [S]}$$

Transformándola, separando los términos del lado derecho de la ecuación, tenemos:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max} \times [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} \times [S]}$$

Simplificando, tenemos la ecuación de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Esta ecuación puede ser considerada como la de una línea recta ( $y = ax + b$ ), donde:

$$y = 1/V_0$$

$$x = 1/[S]$$

$$a = K_M/V_{\max}$$

$$b = 1/V_{\max}$$

Esta linearización es muy útil para calcular la  $K_M$  de una enzima de forma más confiable. La  $K_M$  puede ser aplicada a aquellas enzimas cuya cinética muestra una curva hiperbólica (cinética Michaelis-Menten). Los valores de  $K_M$  y de  $V_{\max}$  son característicos de cada enzima y pueden variar para los diferentes sustratos de la misma enzima (Tabla 1.3). En las reacciones enzimáticas, donde participa más de un sustrato, existe una  $K_M$  para cada sustrato. Así, en la reacción de fosforilación de la glucosa por la hexoquinasa, donde el donador del grupo fosfato es el ATP:





El valor de  $K_M$  de la hexoquinasa es 0,05 M para la glucosa y 0,4 M para el ATP, indicando que la enzima tiene mayor afinidad por la glucosa que por el ATP.

### *Efecto del pH y la temperatura sobre la velocidad de la reacción enzimática*

Las enzimas poseen valores óptimos de pH y temperatura, esto es, aquellos puntos en los que su actividad es mayor. El grado de ionización de los grupos ionizables de la enzima, el cual depende del pH, influye en la interacción del sitio activo de la enzima con su sustrato. Así, a nivel intracelular, el pH del medio controla la actividad de la enzima, pues el pH óptimo no es necesariamente el pH del medio. Diferentes enzimas pueden tener distintos valores de pH óptimo, en función del pH del medio donde actúan. Así, en la pepsina del jugo gástrico el pH óptimo es de 1,6 (pH del estómago: 1-2); en la glucosa-6-fosfatasa del hepatocito, es de 7,8 (pH del hepatocito: 7,2); en la fosfatasa alcalina del epitelio intestinal, es de 10. Una vez que ninguna célula del organismo tiene un valor de pH tan alcalino, en este caso, como en algunos otros, se presume que el pH del medio sea un factor de control sobre la actividad enzimática.

El aumento de la temperatura, cuando las enzimas son analizadas *in vitro*, hasta cierto punto provoca un incremento de la actividad enzimática mediante la disminución de la energía de activación de la reacción.

No obstante, como la mayoría de las enzimas son proteínas termolábiles, ellas se desnaturan cuando se exponen a altas temperaturas, perdiendo su actividad.

### *Medida de la actividad enzimática*

La actividad enzimática puede ser medida conociendo las siguientes variables: (a) los sustratos, los productos y los cofactores de la reacción enzimática; (b) un método para analizar cualquiera de las sustancias anteriores; (c) la estequiometría de la reacción, y (d) los valores óptimos de pH y temperatura de la actividad de la enzima estudiada. La actividad enzimática se expresa en unidades internacionales (UI). Una UI es la cantidad de enzima necesaria para transformar 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto, a 25 °C, bajo condiciones óptimas de trabajo. La actividad de las enzimas de uso en clínica se expresa en U/L. La actividad específica de una enzima corresponde al grado de actividad y de purificación de la enzima, siendo expresada como UI/mg de proteína, esto es, tiene mayor valor mientras más purificada esté la enzima. La actividad enzimática también puede ser medida por el número *turnover* o número de conversión, también expresado como *kcat* (constante de catálisis). Esa constante equivale al número de moléculas de sustrato transformadas por una molécula de enzima por segundo cuando la enzima está saturada con este sustrato. El número *turnover* es medido con la enzima purificada y con un sustrato específico (**Tabla 1.4**).

**Tabla 1.3.** Constantes de Michaelis-Menten (mM) de algunas enzimas

Enzima	Sustrato	$K_M$
Catalasa	$\text{H}_2\text{O}_2$	25
Hexoquinasa	Glucosa	0,05
	Fructosa	1,5
	ATP	0,4
AST	Aspartato	0,9
	$\alpha$ -cetoglutarato	0,1
	Oxalacetato	0,04
Anhidrasa carbónica	Glutamato	4
	$\text{HCO}_3^-$	9
$\beta$ -galactosidasa	Lactosa	4
Quimotripsina	Gly-Tyr-Gly	108
	N-benzoiltirosinamida	2,5



**Tabla 1.4.** Números turnover (kcat) de algunas enzimas

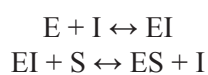
Enzima	Sustrato	N.º turnover
Catalasa	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	40.000.000
Anhidrasa carbónica	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	400.000
Colinesterasa	Acetilcolina	140.000
Fumarasa	Fumarato	800
β-galactosidasa	Lactosa	208
Fosfoglucomutasa	Glucosa-6-fosfato	20,7
ATPasa	ATP	0,4

### *Inhibidores de la acción enzimática*

El estudio de los inhibidores de la acción enzimática ha proporcionado importantes contribuciones al conocimiento de la especificidad de los sustratos enzimáticos, la naturaleza de los sitios activos en las enzimas, los mecanismos de la actividad enzimática, y las vías metabólicas y su control. Su aplicación farmacéutica es también relevante. Así, importantes inhibidores han sido analizados, como la aspirina, que inhibe la enzima prostaglandina sintetasa, evitando la formación de prostaglandinas, sustancias asociadas con el proceso inflamatorio. Esencialmente, los diferentes tipos de inhibición enzimática pueden ser divididos en dos grandes grupos: reversible e irreversible.

#### *Inhibición reversible*

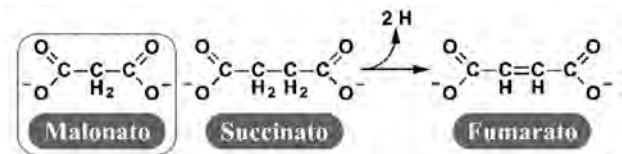
Existen dos tipos de inhibición reversible: la competitiva y la no competitiva. En la inhibición reversible competitiva el inhibidor compite con el sustrato por el sitio activo de la enzima, debido a su similitud estructural. Mientras el inhibidor esté ocupando el sitio activo, el sustrato no se puede unir a la enzima. La inhibición es revertida cuando suficiente cantidad del sustrato desplaza al inhibidor del sitio activo. Las reacciones pueden ser expresadas así:



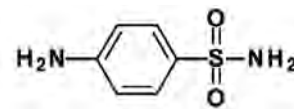
El complejo enzima-inhibidor (EI) no genera ningún producto. El efecto del inhibidor competitivo sobre la cinética enzimática es el de disminuir la velocidad de la reacción y aumentar la constante de Michaelis. La V<sub>max</sub> puede ser alcanzada después

de que altas cantidades del sustrato desplacen la totalidad del inhibidor unido a la enzima.

Un ejemplo de inhibidor competitivo es el malonato, que inhibe la enzima succinato deshidrogenasa (enzima del ciclo de Krebs), por competir con su sustrato natural, el succinato, evitando la generación del producto normal, el fumarato. La reacción normal es mostrada abajo (la presencia de malonato inhibe la reacción):



Otro ejemplo de inhibición competitiva ocurre por la acción de las sulfas, cuyo efecto bacteriostático está basado en la inhibición de la enzima que tiene como sustrato el ácido p-aminobenzoico (PABA), evitando la síntesis de ácido fólico en las bacterias, el cual es esencial para su multiplicación. La semejanza estructural entre sustrato e inhibidor se evidencia al comparar las estructuras del PABA (**Figura 1.15**) con la sulfanilamida, abajo:

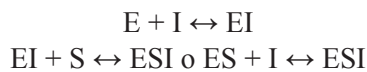


En la intoxicación por metanol este compuesto debe ser oxidado por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, con formación de formaldehído, que causa daño al nervio óptico, provocando ceguera. En esos casos es usado etanol para competir con el



metanol, favoreciendo la formación de acetaldehído, el cual es excretado por la orina, inhibiendo la formación de formaldehído.

En la inhibición reversible no competitiva el inhibidor se une a un sitio diferente del sitio activo de la enzima, afectando también su actividad a pesar de no existir similaridad estructural entre sustrato e inhibidor. La unión del inhibidor a la enzima induce un cambio conformacional en la enzima, reduciendo la tasa de formación del complejo enzima-sustrato (ES) y/o reduciendo la tasa de degradación de ES para formar el producto. El inhibidor no bloquea la unión del sustrato con la enzima, pero el complejo ES no forma ningún producto mientras el inhibidor esté unido a la enzima. La inhibición, entonces, no puede ser revertida con aumento de la concentración del sustrato. El inhibidor puede unirse a la enzima libre o al complejo ES:

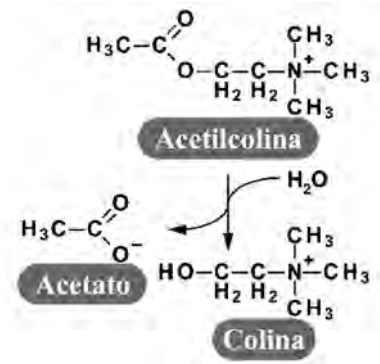


Inhibidores que se unen solamente al complejo ES son definidos como incompetivos. La  $V_{max}$  no es alcanzada aún con el aumento en la concentración de sustrato. La afinidad de la enzima por su sustrato no varía, pues el sitio activo está libre y, por tanto, no se altera el valor de la  $K_M$ . En las condiciones intracelulares este tipo de inhibición es utilizado por ciertos moduladores de la acción enzimática, que se unen a las enzimas controladoras de diferentes vías metabólicas. Estos moduladores alostéricos se unen al sitio alostérico de la enzima, sitio este diferente del activo. Como ejemplo puede citarse la inhibición de la treonina deshidratasa por la isoleucina, que se une a la enzima de forma reversible. La modulación depende del estado metabólico de la célula; en este caso, de la necesidad de metabolizar la treonina.

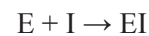
### *Inhibición irreversible*

Ocurre con aquellos compuestos que se unen irreversiblemente a grupos funcionales del sitio activo de la enzima, en ocasiones mediante enlaces covalentes, formando complejos inactivos. Como ejemplo de este tipo de inhibición están los compuestos organofosforados, los cuales son frecuentemente usados en los animales domésticos como antiparasitarios. Estos compuestos, inicialmente derivados del diisopropil-

fluorofosfato, inhiben la enzima colinesterasa, que cataliza la siguiente reacción:



La acetilcolina es un neurotransmisor en los animales superiores e insectos, siendo la colinesterasa la enzima encargada de su hidrólisis, controlando, así, la transmisión de los impulsos nerviosos. Los compuestos organofosforados se unen de forma irreversible a residuos de serina en el sitio activo de la colinesterasa, mediante ésteres fosfóricos, impidiendo su acción catabólica y causando parálisis. Los compuestos organofosforados actúan también como inhibidores sobre otras enzimas que poseen residuos de serina en su sitio activo, como la tripsina, la quimotripsina, la elastasa y la fosfoglucomutasa. Mediante este inhibidor fue descubierto que la serina formaba parte del sitio activo de esas enzimas. En los inhibidores irreversibles no se aplica la cinética de Michaelis-Menten, ya que la reacción no es reversible:



Otros inhibidores irreversibles son los agentes alquilantes yodoacetato ( $I-CH_2-COO^-$ ) y yodacetamida ( $I-CH_2-CO-NH_2$ ), que se unen a grupos sulfhidrilo ( $-SH$ ) presentes en los sitios activos de algunas enzimas, alquilándolas e inhibiéndolas de forma irreversible ( $enzima-S-CH_2-COO^-$ ). Existen algunos inhibidores irreversibles que son sustancias que inicialmente reaccionan con la enzima, pero cuyo producto de reacción es un inhibidor que se une irreversiblemente a la misma enzima. Reciben el nombre de inhibidores ‘suicidas’.

### **Regulación enzimática**

Las enzimas reguladoras son aquellas enzimas que controlan vías metabólicas, encontrándose generalmente al inicio de las rutas metabólicas. El efecto regulador



o modulador puede ser ejercido mediante unión no covalente de moduladores (en el caso de las enzimas alostéricas), o por modificación covalente de la enzima.

### *Enzimas alostéricas*

Comúnmente estas enzimas son inhibidas por el producto final de la vía metabólica, evento conocido como inhibición por *feedback*. El metabolito inhibidor (modulador negativo) se une reversiblemente a un sitio diferente del sitio activo de la enzima: es el sitio regulador o alostérico (del griego *alos*, 'otro', y *stereos*, 'sitio'). Este sitio es específico en cada enzima alostérica para el respectivo modulador. En general, las enzimas alostéricas son grandes y complejas, con varias subunidades, y no obedecen a la cinética de Michaelis-Menten. La cinética de estas enzimas muestra un patrón de tipo sigmoidal, en vez de hiperbólico típico (**Figura 1.5**). Pueden también existir moduladores positivos, esto es, metabolitos de la vía metabólica que aumentan la actividad de la enzima. Generalmente, tales moduladores son los propios sustratos de la enzima. En algunos casos la enzima puede tener simultáneamente dos sitios alostéricos: uno para un modulador positivo y otro para un modulador negativo. Si la enzima tiene el mismo sustrato de la reacción como modulador positivo (enzima alostérica homotrópica), tiene varios sitios activos y ocurre un aumento en la velocidad catalítica por cooperatividad positiva, o sea que la unión del sustrato al sitio activo favorece la unión de más moléculas del sustrato a los otros sitios activos. En enzimas cuyo modulador es diferente del sustrato de la reacción (enzimas alostéricas heterotrópicas), la velocidad catalítica puede aumentar o disminuir, según sea modulador positivo o negativo, respectivamente, mediante alteraciones en su  $K_M$  o su  $V_{max}$ .

### *Enzimas reguladas por modificación covalente*

Estas enzimas por lo general son modificadas en su actividad catalítica mediante procesos reversibles de fosforilación (adición de un grupo fosfato en residuos de serina, tirosina, treonina o histidina), adenilación (adición de un AMP a un residuo de tirosina), uridilación (adición de un UMP en un residuo de tirosina), ADP-ribosilación (adición de ADP-ribosa a residuos de arginina, glutamina o cisteína), o metilación (adición de un grupo metilo a un residuo de glutámico). Son enzimas que contienen varias subunidades. La glicógeno fosforilasa, enzima

que degrada el glicógeno en el hígado y el músculo, es activada por dos fosforilaciones en los grupos -OH de dos serinas (forma activa o fosforilasa a) e inactivada por la defosforilación (forma inactiva o fosforilasa b). Lo contrario ocurre con la glicógeno-sintetasa, enzima que forma glicógeno: es activada por defosforilación e inactivada por fosforilación. Ambas enzimas, a su vez, están controladas por hormonas que inducen los mecanismos de fosforilación o defosforilación (adrenalina, glucagón e insulina).

Otros tipos de regulación enzimática incluyen:

- Proteínas separadas que se unen a enzimas para inhibir o estimular su actividad, como la proteína inhibidora de la tripsina y la  $\alpha$ 1-antitripsina, que inhibe la elastasa.
- Clivaje proteolítico de ciertas enzimas con inducción de su actividad, como en la conversión de protrombina en trombina y en la activación de los zimógenos digestivos tripsinógeno y quimotripsinógeno.

### *Isoenzimas*

Son diferentes formas moleculares de la misma enzima, que pueden estar presentes en el mismo individuo, en el mismo tejido o en la misma célula, aunque en un compartimiento diferente. Cada isoforma puede variar en su cinética, su regulación, en el cofactor que usa o en la distribución subcelular. Generalmente son muy similares en la secuencia de aminoácidos. Así, la lactato deshidrogenasa (LDH) tiene cinco isoenzimas, cada una con cuatro subunidades. Estas subunidades pueden ser del tipo A (M) y B (H), pudiendo haber isoenzimas de tipo  $A_4$ ,  $A_3B$ ,  $A_2B_2$ ,  $AB_3$  y  $B_4$ . En el músculo esquelético predominan las isoenzimas con mayor número de cadenas A, mientras que en el corazón predominan las que tienen cadenas B. La distribución de las isoenzimas de una misma enzima depende de diversos factores, tales como: (a) las características metabólicas del tejido, como en el caso de la glicógeno fosforilasa presente en el hígado o en el músculo, (b) diferente localización intracelular y el papel metabólico realizado, como en la isocitrato deshidrogenasa mitocondrial o citosólica, (c) la diferenciación del tejido, y (d) el control sobre las vías metabólicas, como ocurre con la glucoquinasa y la hexoquinasa en el hígado ante diferentes concentraciones de glucosa.





## 1.5 Cofactores enzimáticos

Los cofactores enzimáticos son componentes requeridos por algunas enzimas para su actividad catalítica. El cofactor es el componente no proteico de la acción enzimática, pudiendo ser ion metálico o molécula orgánica (coenzimas). Las enzimas que necesitan cofactores para ejercer su acción son llamadas holoenzimas, término que incluye el complejo catalítico enzima-cofactor. Estas enzimas, cuando se encuentran solas, son denominadas apoenzimas o apoproteínas.

Las enzimas que precisan de iones son llamadas metaloenzimas, y el ion puede actuar de varias formas: (a) como centro catalítico primario, en el sitio activo de la enzima; (b) como complejo de coordinación o grupo de unión entre el sustrato y la enzima; o (c) como estabilizador de la conformación de la enzima. Ejemplos de metaloenzimas y sus correspondientes iones son: anhidrasa carbónica ( $Zn^{2+}$ ), fosfotransferasas ( $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ ), citocromos ( $Fe^{2+}$  o  $Fe^{3+}$ ), citocromo oxidasa ( $Cu^+$ ), piruvato quinasa ( $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ), ATPasa ( $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ), ureasa ( $Ni^{2+}$ ), dinitrogenasa (Mo) y glutatión peroxidasa (Se).

Las coenzimas son generalmente derivadas de alguna vitamina hidrosoluble, principalmente del complejo B. Normalmente actúan como transportadoras intermediarias de grupos funcionales, átomos o electrones. La coenzima incorporada a la estructura de la enzima recibe el nombre de grupo prostético. Entre las principales coenzimas se encuentran: (i) los nucleótidos piridínicos derivados de nicotinamida; (ii) los nucleótidos flavínicos derivados de riboflavina; (iii) la tiamina pirofosfato derivada de la vitamina  $B_1$ ; (iv) la coenzima A derivada del ácido pantoténico; (v) el piridoxal-fosfato derivado de la vitamina  $B_6$ ; (vi) la biocitina derivada de la biotina; (vii) la coenzima  $B_{12}$  (cobamamida) derivada de la cianocobalamina (vitamina  $B_{12}$ ); y (viii) la lipoil-lisina derivada del ácido lipoico.

### *Nucleótidos piridínicos*

Las formas coenzimáticas de los nucleótidos piridínicos son el NAD (nicotinamida-adenina-dinucleótido) y el NADP (nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato). Esos nucleótidos son derivados de la nicotinamida, amida del ácido nicotínico (niacina), una vitamina del complejo B (**Figura 1.6**).

En el sentido exacto de la palabra, la niacina no es una vitamina (esto es, compuesto esencial que precisa ser incorporado en la dieta), pues ella puede ser sintetizada en el organismo a partir de triptofano (Trp). Sin embargo, la conversión de Trp en niacina es relativamente ineficiente y solo ocurre después de que los requerimientos de Trp están cubiertos. Por otro lado, la biosíntesis de niacina necesita de tiamina, riboflavina y piridoxina. Así, en términos prácticos, tanto la niacina como el Trp son esenciales y precisan estar en la dieta. La deficiencia moderada de niacina causa pelagra en humanos, enfermedad caracterizada por tres Ds: dermatitis, diarrea y demencia. En el perro la deficiencia de niacina causa la enfermedad lengua negra, debido a la glositis. Las señales neurológicas de la deficiencia son debidas a la degeneración del sistema nervioso. La avitaminosis está asociada a dietas pobres en proteína, alcoholismo crónico y síndrome de mala absorción. La niacina se encuentra en las carnes, las leguminosas y los cereales.

Los nucleótidos NAD y NADP son llamados también nucleótidos de piridina, pues la nicotinamida es un derivado de la piridina. Estos nucleótidos actúan como coenzimas de muchas enzimas óxido-reductasas, las cuales actúan como receptoras de electrones de sustratos específicos.  $NAD^+$  y  $NADP^+$  (formas oxidadas) sufren reducción reversible en su anillo nicotinamida debido a la oxidación de un sustrato que dona un par de átomos de H. El nucleótido oxidado recibe un ion hidruro ( $H^-$ ), equivalente a un protón y dos electrones, y se transforma en NADH o NADPH (formas reducidas). Las formas reducidas, a su vez, pueden donar H para reducir otros compuestos y, así, volver a la forma oxidada. La unión del NAD a la enzima es débil (no covalente). El nucleótido se mueve a través de la superficie de una enzima a otra, actuando como un transportador de electrones entre un metabolito y otro. Existen aproximadamente 200 deshidrogenasas identificadas: las deshidrogenasas NAD-dependientes participan de la transferencia de electrones en procesos oxidativos (catabólicos), mientras las deshidrogenasas NADP-dependientes participan de la transferencia de electrones en procesos reductivos (biosintéticos o anabólicos). Los estados oxidado ( $NAD^+$ ) y reducido (NADH) pueden ser diferenciados por espectrofotometría ultravioleta, pues el espectro de absorción del NADH presenta dos longitudes de onda de máxima absorción (260 y 340 nm), mientras que el  $NAD^+$  presenta absorción únicamente a 260 nm.

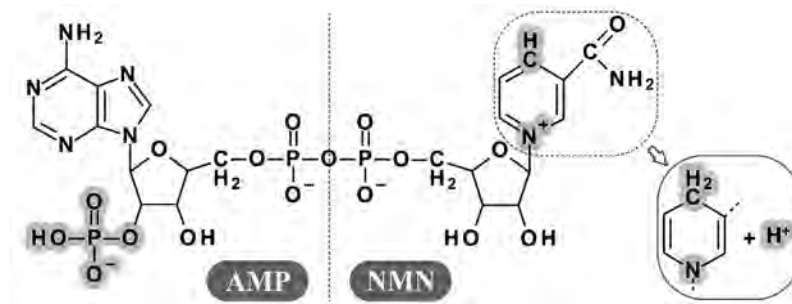


Figura 1.6. Estructuras de  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  y  $\text{NADH}+\text{H}^+$

El grupo fosfato, presente exclusivamente en el  $\text{NADP}^+$  (y en el  $\text{NADPH}+\text{H}^+$ ), está resaltado en fondo gris, mientras que el grupo nicotinamida está circundado por línea punteada. En el detalle a la derecha se muestra la forma reducida del grupo nicotinamida presente en el  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  y en el  $\text{NADH}+\text{H}^+$  (resaltadas en fondo gris las alteraciones entre las formas oxidadas y las reducidas).  $\text{NADP}$ , nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato;  $\text{NAD}$ , nicotinamida-adenina dinucleótido;  $\text{AMP}$ , adenosina monofosfato (o 2'-fosfo-adenosina monofosfato);  $\text{NMN}$ , nicotinamida mononucleótido.

### Nucleótidos flavínicos

Las formas coenzimáticas de los nucleótidos flavínicos son el  $\text{FAD}$  (flavina-adenina-dinucleótido) y el  $\text{FMN}$  (flavina-mononucleótido). Ambas formas son derivadas de la riboflavina (vitamina  $\text{B}_2$ ) (Figura 1.7). Señales características de la deficiencia de riboflavina incluyen glositis y dermatitis escamosa (especialmente en los dobleces nasolabiales y en el área escrotal). Esta vitamina es encontrada en la leche, la carne, los huevos y los cereales. La deficiencia severa está relacionada con subnutrición y alcoholismo crónico. Se puede decir que las coenzimas flavínicas no son nucleótidos verdaderos, pues en lugar de pentosa

como azúcar, contienen ribitol. Los flavonucleótidos están unidos fuertemente a la enzima, actuando como grupo prostético (flavoproteína), pudiendo esta unión ser covalente, como en el caso de la succinato deshidrogenasa. Las formas oxidada ( $\text{FAD}$  y  $\text{FMN}$ ) y reducida ( $\text{FADH}_2$  y  $\text{FMNH}_2$ ) pueden ser diferenciadas por espectrofotometría, pues la forma oxidada tiene dos puntos de máxima absorción, a 370 y a 450 nm, mientras que la forma reducida solamente tiene el pico de absorción a 450 nm. Las flavoenzimas actúan como oxido-reductasas en muchos procesos oxidativos, como del ácido pirúvico, de los ácidos grasos y de los aminoácidos, así como en la cadena de transporte electrónico.

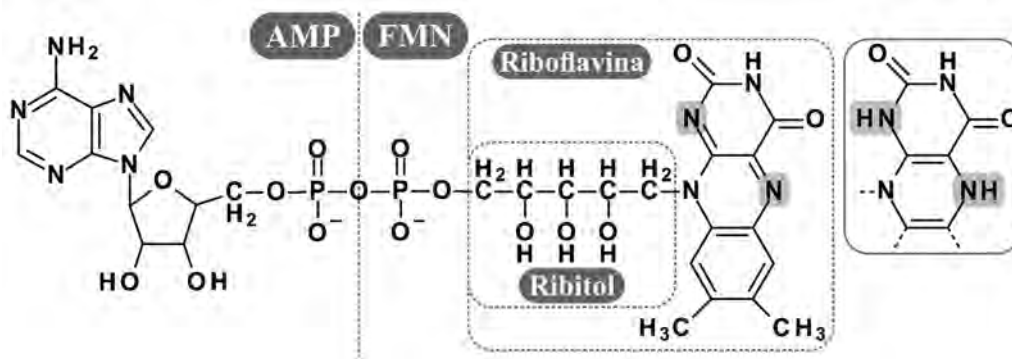


Figura 1.7. Estructuras del  $\text{FAD}$  y del  $\text{FMN}$

Las estructuras de la riboflavina y del ribitol están circundadas por líneas punteadas. Los átomos de nitrógeno donde son introducidos los átomos de hidrógeno para generar las formas reducidas  $\text{FADH}_2$  o  $\text{FMNH}_2$  están resaltados en fondo gris. El detalle a la derecha muestra la estructura de la forma reducida.  $\text{FAD}$ , flavina-adenina dinucleótido;  $\text{AMP}$ , adenosina monofosfato;  $\text{FMN}$ , flavina mononucleótido.

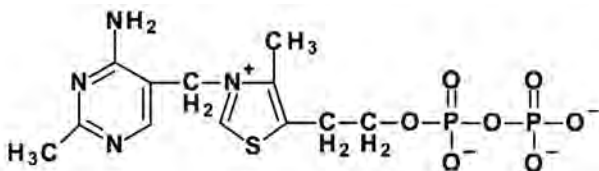
### Tiamina-pirofosfato (TPP)

También es conocida como tiamina difosfato (**Figura 1.8**). Es derivada de la tiamina (vitamina B<sub>1</sub>). El grupo activo de la TPP es el tiazol, y necesita también de Mg<sup>2+</sup> como cofactor. La TPP funciona como coenzima en dos tipos de reacciones: (a) en la descarboxilación-oxidación del piruvato, con su conversión en acetil-CoA, y del  $\alpha$ -cetoglutarato en el ciclo de Krebs, formando succinil-CoA; y (b) en las reacciones de las transcetolasas, en la vía de las pentosas-fosfato.

Por otro lado, la TPP parece tener importante papel en la transmisión del impulso nervioso: la coenzima se localiza en las membranas periféricas de las neuronas, siendo requerida en la biosíntesis de acetilcolina y en las reacciones de translocación de iones en la estimulación nerviosa. El conocimiento de la acción bioquímica de la TPP no explica aún claramente todas las señales derivadas de la deficiencia de tiamina: pérdida de apetito, constipación, náusea, depresión, neuropatía periférica, irritabilidad y fatiga. Deficiencia de moderada a severa causa confusión mental, ataxia (andar tambaleante y disfunción motora) y oftalmoplejía (pérdida de la coordinación ocular). Deficiencia severa causa beriberi en humanos y polineuritis en aves, enfermedades caracterizadas por acumulación de fluidos (edema) en el sistema neuromuscular, dolor, atrofia y debilidad muscular, parálisis y muerte. También puede ocurrir falla cardíaca congestiva. La deficiencia de tiamina es observada en desnutrición avanzada, en alimentación exclusivamente a base de arroz pulido y en alcoholismo crónico. En aves es frecuente cuando ocurren tratamientos prolongados con amprolio, un compuesto anticoccidial, antagonista de la tiamina. El café y el té también contienen sustancias antitiamínicas, pero que no representan problema con consumos normales de esas bebidas.

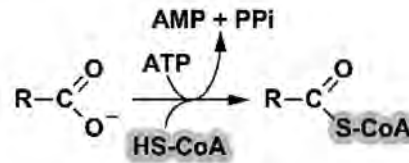
### Coenzima A (CoA)

La coenzima A es derivada del ácido pantoténico. Es un nucleótido de adenina que contiene  $\beta$ -mercaptoetilamina



**Figura 1.8.** Estructura de la tiamina pirofosfato (TPP)

(**Figura 1.9**). El ácido pantoténico también es componente de la porción fosfopanteteína de la proteína transportadora de grupos acilo (ACP) que actúa en la biosíntesis de ácidos grasos. Por lo menos 70 enzimas utilizan la coenzima A o la ACP, siendo una coenzima importante en el metabolismo de lípidos, proteínas y en el ciclo de Krebs. Es difícil observar deficiencia de ácido pantoténico debido a su amplia distribución en los alimentos naturales. La coenzima A actúa como transportador de grupos acilo en reacciones de: (a) oxidación y biosíntesis de ácidos grasos; (b) oxidación del piruvato, y (c) acetilaciones (la letra A en el nombre de la coenzima es debido a su participación en reacciones de acetilación). El grupo activo de la coenzima A es el tiol (-SH), el cual es esterificado con un grupo acilo (R-COOH) generando un tioéster durante el transporte del grupo acilo:



### Piridoxal-fosfato

Es la forma coenzimática de la vitamina B<sub>6</sub>. Puede estar como piridoxamina, piridoxina, piridoxina-fosfato o piridoxal, siendo estas dos últimas las formas activas. En el organismo todas las formas son convertidas en piridoxal-fosfato, coenzima requerida para la biosíntesis, catabolismo e interconversión de los aminoácidos (**Figura 1.10**).

Son muchas las reacciones que dependen de la piridoxina. Entre los procesos más importantes con la participación de esta coenzima, pueden ser citadas: (a) reacciones de transaminación entre aspartato y oxalacetato,  $\alpha$ -cetoglutarato y glutamato, y alanina y piruvato (**Figura 1.11**); (b) reacciones de la glicogenólisis, en las cuales la piridoxina es componente esencial de la glicógeno fosforilasa y se une a residuos de lisina, estabilizando la enzima; (c) biosíntesis de las aminas serotonina, noradrenalina e histamina; (d) formación de niacina a partir de triptofano; (e) biosíntesis del ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA), precursor del grupo hemo; (f) biosíntesis de esfingolípidos, componentes de la mielina.



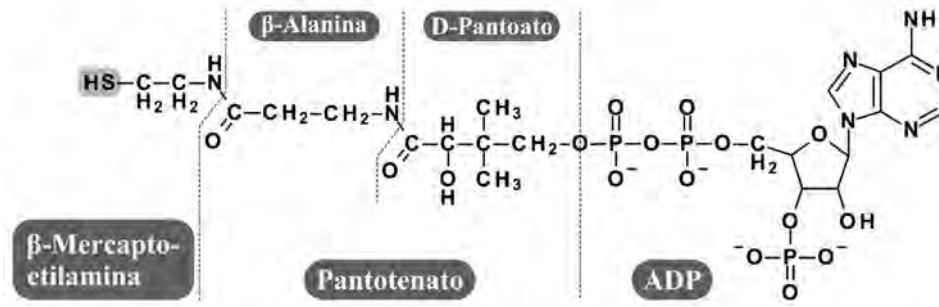


Figura 1.9. Estructura de la coenzima A

El grupo tiol (SH) activo está resaltado en fondo gris. ADP: adenosina difosfato.

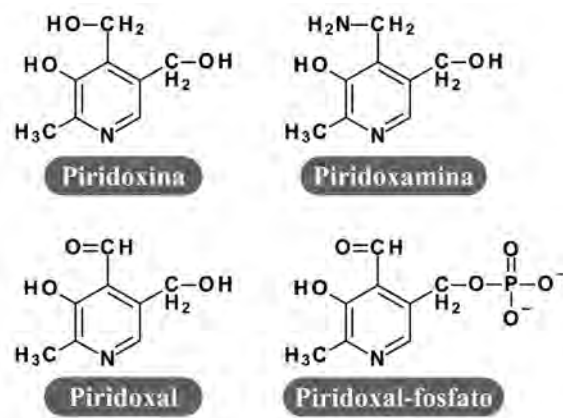


Figura 1.10. Estructura de las diferentes formas de la vitamina B<sub>6</sub> y del piridoxal-fosfato

La deficiencia moderada de piridoxina puede causar irritabilidad, nerviosismo y depresión, así como anemia sideroblástica (por deficiencia de hemoglobina), caracterizada por anemia microcítica con alta concentración sérica de hierro. Una deficiencia más severa causa neuropatía y convulsiones. Fuentes de piridoxina pueden ser encontradas en las carnes, verduras, cereales, y en la yema de huevo. La gestación y la lactación aumentan los requerimientos de piridoxina en por lo menos 30%. Algunas drogas (isoniazida usada en la tuberculosis y penicilamina usada en la artritis reumatoide) se unen a las formas coenzimáticas de la piridoxina inhibiendo las enzimas correspondientes.

### Coenzima B<sub>12</sub> (cobamamida)

La cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) está caracterizada por tener en su molécula un átomo de cobalto, microelemento esencial, en estado coordinado seis. La porción orgánica de la cianocobalamina es un

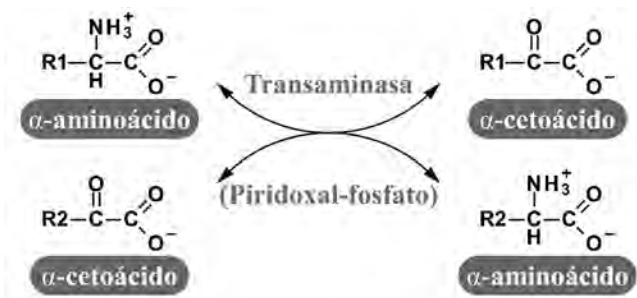
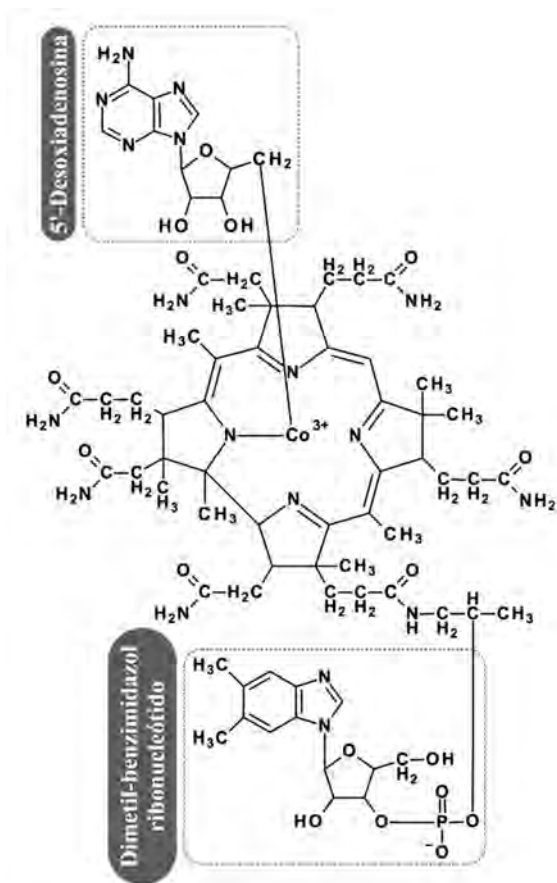


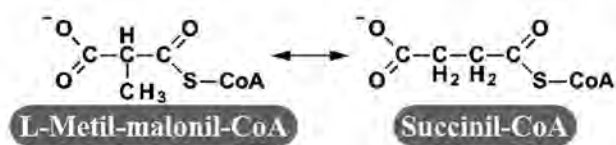
Figura 1.11. Reacción genérica de transaminación

complejo formado por un anillo corrina, similar al anillo porfirínico del grupo hemo, al cual está unido un nucleótido (dimetil-benzimidazol ribonucleótido) y un grupo cianuro (CN<sup>-</sup>) que está unido al cobalto. En la coenzima B<sub>12</sub> (cobamamida) el grupo cianuro es sustituido por un grupo 5'-desoxiadenosil (Figura 1.12), el cual se une al Co mediante un ATP, debido a la hidrólisis de todo su grupo trifosfatado. Solamente existen dos casos de ese tipo de hidrólisis: en la formación de la coenzima B<sub>12</sub> y en la formación de S-adenosilmetionina. La unión del grupo adenosil al Co es débil y fotolábil, lo que explica el hecho de que las plantas no lo contienen. La vitamina B<sub>12</sub> está presente en los alimentos de origen animal, siendo también producida por algunas bacterias del tracto gastrointestinal. La cianocobalamina está unida a una proteína y para ser utilizada debe ser hidrolizada por el ácido del jugo gástrico, donde se combina con una glicoproteína secretada por el estómago, llamada factor intrínseco (el factor 'extrínseco' es la cobalamina). Esa proteína transporta la cianocobalamina hasta el íleon, donde es absorbida. La deficiencia de cianocobalamina provoca dos tipos principales de señales clínicas: hematopoyético y neurológico.



**Figura 1.12.** Estructura de la coenzima B<sub>12</sub> (cobamamida)

Las reacciones en que participa la coenzima B<sub>12</sub> tornan relativamente fácil la explicación sobre los mecanismos de la deficiencia de cianocobalamina. El derivado 5'-desoxiadenosil es requerido en la reacción de la enzima metilmalonil-CoA mutasa:



En esta reacción el grupo -CO-S-CoA del C2 del metil-malonil es transferido al C3, siendo cambiado por un H que estaba en este último. Dicha reacción hace parte del metabolismo de los ácidos grasos y de algunos aminoácidos. En los animales rumiantes es una reacción indispensable para la conversión del propionato (proveniente del metabolismo de los carbohidratos en el rumen) hasta succinil-CoA,

fuelle de glucosa (ruta de la gliconeogénesis). El derivado metilo de la coenzima B<sub>12</sub> es requerido en la conversión de homocisteína en metionina. La deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> provoca anemia perniciosa, una anemia megaloblástica asociada con deterioración neurológica. La anemia es debida al efecto de la B<sub>12</sub> sobre el metabolismo del folato, en el cual ella participa de la formación de tetrahidro-folato (**Figura 1.13**).

En la deficiencia de B<sub>12</sub> ocurre deficiencia de derivados de H<sub>4</sub>folato (**Figura 1.15**), necesarios para la síntesis de purinas y dTMP (por tanto de DNA). El deterioro neurológico se debe a la desmielinización progresiva del tejido nervioso. En la deficiencia de B<sub>12</sub> ocurre interferencia con la formación de mielina debido a la acumulación de metil-malonil, el cual es inhibidor competitivo del malonil-CoA, intermediario en la síntesis de ácidos grasos, interfiriendo, por tanto, en la síntesis de esfingomielina. El metil-malonil puede también sustituir el malonil en la síntesis residual de ácidos grasos, causando la producción de ácidos grasos ramificados, los cuales afectan la estructura normal de las membranas nerviosas. En los rumiantes es difícil encontrar esta deficiencia debido a su producción por los microorganismos del rumen a menos que la dieta sea deficiente en cobalto. La vitamina B<sub>12</sub> está distribuida ampliamente en los alimentos, especialmente en las carnes. Las reservas de B<sub>12</sub> en el hígado pueden durar hasta seis años. Las deficiencias son raras y están relacionadas con fallas en la secreción de HCl gástrico y del factor intrínseco, con el síndrome de mala absorción o con dietas vegetarianas de larga duración.

### Biotina

Constituye el grupo prostético de varias enzimas que participan en reacciones de carboxilación (**Figura 1.14**). Las más importantes de esas enzimas son la piruvato carboxilasa (que cataliza la conversión del piruvato en oxalacetato), participando en la vía de la gliconeogénesis, y la acetil-CoA carboxilasa (que cataliza la conversión del acetil-CoA en malonil-CoA), participando en la biosíntesis de ácidos grasos. La biotina se encuentra en el maní, el chocolate y los huevos, siendo también sintetizada por las bacterias intestinales. La deficiencia de biotina puede ser observada en tratamientos prolongados con antibióticos vía oral o en consumo excesivo de huevos crudos, los cuales contienen la avidina, una proteína presente en la clara, que se une a la biotina e impide su absorción.

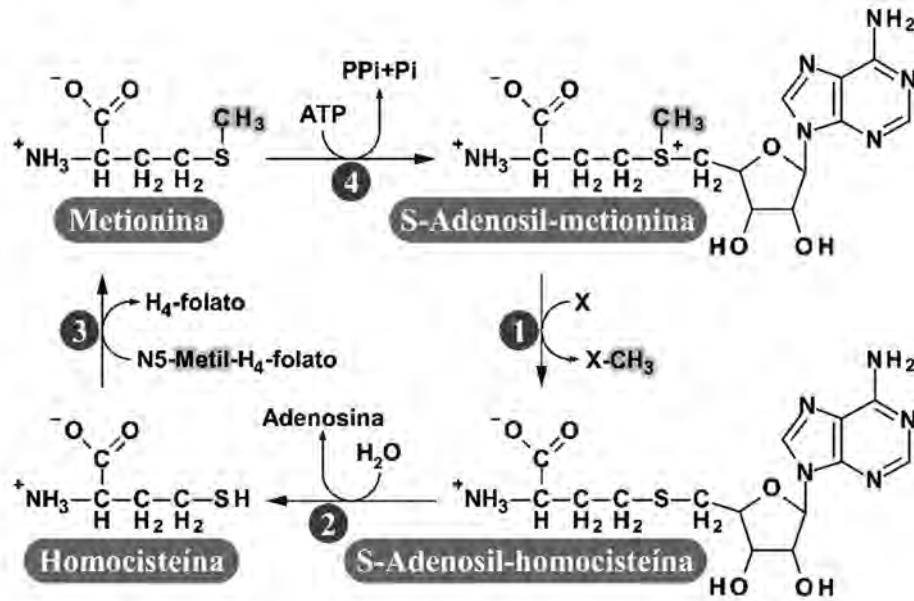


Figura 1.13. S-adenosil-metionina como donante de grupos metil.

Después de la transferencia del grupo metil de la S-adenosil-metionina (para un sustrato X), la S-adenosil-homocisteína resultante es hidrolizada, liberando adenosina y homocisteína. Esta última es nuevamente metilada a las costas del N5-metil- $\text{H}_4\text{-folato}$  (Figura 1.15) para formar metionina. Las enzimas participantes son: [1] metilasa dependiente de S-adenosil-metionina; [2] S-adenosil-homocisteína hidrolasa; [3] metionina sintetasa y [4] metionina adenosil transferasa.

### Ácido fólico (Folacina)

Esta vitamina está involucrada con los procesos de la hematopoyesis. Está ampliamente distribuida en los alimentos, especialmente en las carnes. Posee de uno a siete residuos de glutamato en su estructura (Figura 1.15). Después de ser absorbido en el intestino, el ácido fólico es reducido a tetra-hidrofolato ( $\text{H}_4\text{folato}$ ) en los lisosomas, por la enzima  $\text{H}_2\text{folato-reductasa}$ . En circulación, la vitamina se encuentra como N5-metil- $\text{H}_4\text{folato}$ . Dentro de las células el  $\text{H}_4\text{folato}$  aparece en la forma poliglutámica, que es biológicamente más potente, siendo, de esa forma, almacenado en el hígado.

El  $\text{H}_4\text{folato}$  participa de reacciones biosintéticas como cargador de unidades de un carbono. Así, participa en la biosíntesis de colina, serina, glicina, metionina, purinas y dTMP. Las dos últimas son las reacciones más significativas, pues tanto purinas como dTMP deben ser sintetizados, mientras que los otros compuestos pueden ser suministrados por la dieta. Por tanto, el efecto más notorio de la deficiencia de  $\text{H}_4\text{folato}$  es la inhibición de la síntesis de DNA,

debido a la baja disponibilidad de purinas y de dTMP. Eso lleva a la detención de la multiplicación de las células en la fase S del ciclo celular, lo que provoca un característico cambio megaloblástico en la forma y el tamaño de las células de división rápida. Se observa también reducción en la maduración de los eritrocitos con aumento de su tamaño y mayor fragilidad de las membranas, provocando anemia macrocítica, típica de la deficiencia de folato. La deficiencia de folato, aunque difícil de ocurrir en animales, puede ser causada por ingestión o absorción inadecuadas, o por aumento en la demanda (gestación y lactación).

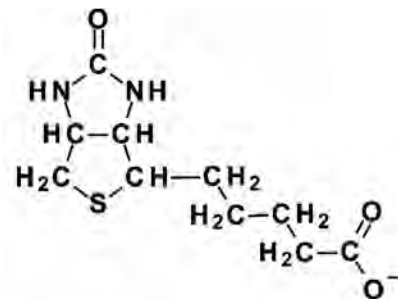
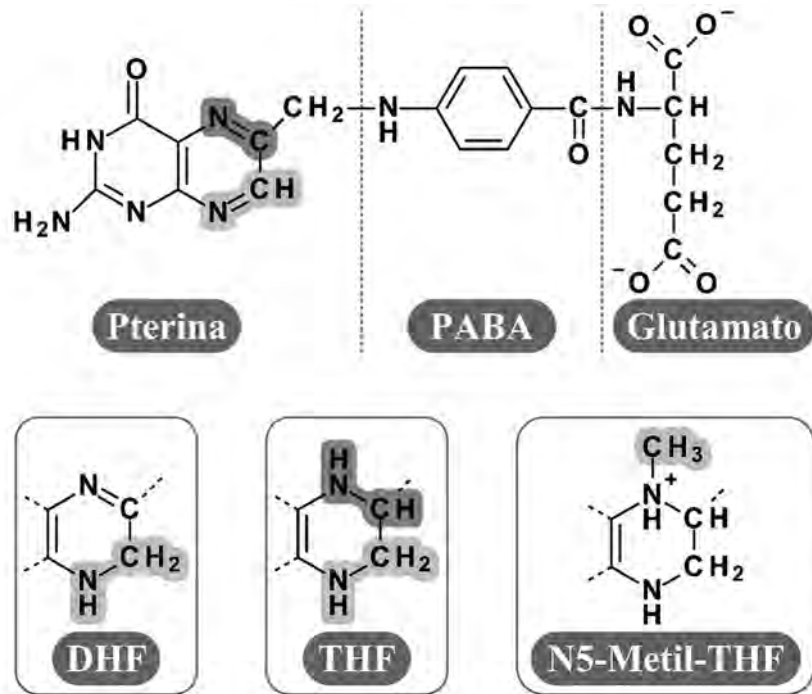


Figura 1.14. Estructura de la biotina



**Figura 1.15.** Estructura del folato y derivados

Los átomos de carbono y nitrógeno del folato donde son introducidos los dos átomos de hidrógeno para formar dihidrofolato (DHF) están resaltados en fondo gris claro. Dos átomos de hidrógeno adicionales son introducidos en átomos de carbono y nitrógeno (resaltados en fondo gris oscuro) para la formación del tetrahydrofolato (THF). Partes relevantes de las moléculas de DHF y THF son mostradas en los detalles, así como el grupo metilo adicional presente en el N5-metiltetrahydrofolato. PABA, ácido paraaminobenzoico.



## 1.6 Bibliografía

- Ackerson, B. J. (1993). Entropy. When order is disordered. *Nature*, 365, 11-12.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 90, 7915-7922.
- Atkins, P. W. (1984). *The Second Law*. New York, USA: Scientific American Books.
- Babcock, G. T. & Wickström, M. (1992). Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature*, 356, 301-309.
- Boyer, P. D. (1987). The unusual enzymology of ATP synthase. *J. Biochem*, 26, 8503-8507.
- Fesus, L. (1993). Biochemical events in naturally occurring forms of cell death. *FEBS Letters*, 328, 1-5.
- Godwinje, J. & Coleman, W. J. (1990). How plants make oxygen. *Sci. Am.* 262, 50-58.
- Hansen, D. E. & Raines, R. T. (1990). Binding energy and enzymatic catalysis. *J. Chem. Educ.*, 67, 483-489.
- Hanson, R. W. (1989). The role of ATP in metabolism. *J. Biochem. Educ.*, 17, 86-92.
- Hinckle, P. C. & McCarty, R. E. (1978). How cells make ATP. *Sci. Am.*, 238, 104-123.
- Kaufman, B. T. (1993). Why NADP? *Trends Biochem. Science*, 18, 278-279.
- Kraut, J. (1988). How do enzymes work? *Science*, 242, 533-540.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2000). *Lehninger principles of biochemistry*. 3.<sup>a</sup> ed. New York, USA: Worth Publishers.
- Pedersen, P. L. & Carafoli, E. (1987). Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.*, 12, 145-150.
- Pedersen, P. L. & Carafoli, E. (1987). Ion motive ATPases. II. Energy coupling and work output. *Trends Biochem. Sci.*, 12, 186-189.
- Racker, E. (1980). From Pasteur to Mitchell: a hundred years of bioenergetics. *Fed. Proc.*, 36, 210-215.
- Semenza, G. (2003). *A history of biochemistry*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Senior, A. E. (1988). ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiol. Rev.*, 68, 177-231.
- Siegenthaler, V. & Sarmiento, J. L. (1993). Atmospheric carbon dioxide and the ocean. *Nature*, 365, 119-125.
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, 215, 213-220.
- Skulachev, V. P. (1992). The laws of cell energetics. *Eur. J. Biochem.*, 208, 203-209.
- Westheimer, F. H. (1987). Why nature chose phosphates. *Science*, 235, 1173-1178.
- Williams, R. J. (1993). Are enzymes mechanical devices? *Trends Biochem. Sci.*, 18, 115-116.



