



Material  
Didáctico  
para Estudiantes

---

# GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS: Química Biológica

---

Licenciatura en Biotecnología

FQByF

Facultad de Química , Bioquímica y Farmacia



Universidad Nacional  
de San Luis

# **SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES**

## **Guías de Trabajos Prácticos: Química Biológica**

Dra. Ana Cecilia ANZULOVICH  
Dra. Ethelina CARGNELUTTI  
Lic. María Gabriela PLATEO

FACULTAD DE  
QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2019

Decana

***Dra. Mercedes Edith CAMPDERRÓS***

Vice Decana

***Dra. Lucía Beatriz FUENTES***

Secretaria académica

***Dra. Estela Isabel GASULL***

Comisión de la Serie Didáctica

Coordinadora

***Dra. María Cristina ALMANDOZ***

Integrantes

Departamento de Bioquímica  
y Ciencias Biológicas

***Dra. Susana I. SÁNCHEZ***

***Dra. Verónica P. FILIPPA***

Departamento de Farmacia

***Dr. Luis A. DEL VITTO***

***Dra. Alejandra O. MARIA***

Departamento de Química

***Dra. Yamina A. DÁVILA***

***Dra. María de los Ángeles ÁLVAREZ***

## SUMARIO

La publicación periódica Serie Didáctica ha sido creada en el ámbito de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (Ordenanza N° 008/07-CD) con el fin de proporcionar material de estudio a los estudiantes de las Carreras de grado impartidas en la Facultad.

Actualmente, la SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES (Resolución N° 269/16) ofrece guías de Trabajos Prácticos de Laboratorio y de campo, guías de resolución de problemas, material teórico, propuestas de estudios dirigidos y comprensión de textos, entre otros materiales, elaborados por el cuerpo docente de las diferentes Áreas de Integración Curricular de la Facultad. Estas producciones didácticas significan un aporte para cubrir necesidades académicas acorde al enfoque de cada asignatura o que no se encuentran habitualmente en bibliografía específica. Las mismas están disponibles en la página de la UNSL ( <http://www.fqbf.unsl.edu.ar/mda.html>) lo que facilita la accesibilidad por parte de los estudiantes, docentes y comunidad educativa en general, garantizando la calidad de la visualización y la amplia difusión del material publicado en este sitio. De igual modo, la Serie Didáctica realiza una extensión invitando a docentes y alumnos de diferentes niveles educativos a participar, crear, producir y utilizar este espacio fomentando así el vínculo entre esta Institución y la comunidad.

En nuestra opinión, es de vital importancia producir y compartir el conocimiento con los estudiantes y la sociedad. De este modo, se tiende a facilitar los procesos de enseñanza y de aprendizaje y la transmisión de una idea directriz de conducta humana y científica, fortaleciendo los vínculos entre docentes-alumnos-conocimientos y sociedad.

Dado que la presente SERIE DIDÁCTICA resulta de la participación de numerosos actores, ante los posibles errores humanos y cambios en la ciencia, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación del material didáctico garantizan íntegramente que la información sea precisa o completa.

## **Guía de Trabajos Prácticos de Química Biológica para Lic. en Biotecnología**

El curso de Química Biológica se desarrolla para los estudiantes de tercer año de la Lic. en Biotecnología. El objeto de estudio de la Química Biológica es el metabolismo y para su abordaje requiere de los conocimientos de las estructuras químicas y celulares construidos en las asignaturas Química Orgánica, Química de Biomoléculas y Biología Celular. Partiendo de esos conocimientos previos, el curso se organiza en tres Unidades temáticas, en función de sus objetivos: Unidad 1. Catálisis y regulación de las reacciones bioquímicas; Unidad 2. Bioenergética y metabolismo intermedio; Unidad 3. Integración metabólica. Así, se estudia primero las enzimas, como catalizadores biológicos de las reacciones metabólicas, luego, la digestión, absorción y metabolización de los principales nutrientes y su regulación: carbohidratos, lípidos, proteínas y nucleótidos, y finalmente, la interrelación e integración de sus vías de síntesis y de degradación y su regulación en distintos organismos y condiciones ambientales. Estos conocimientos constituyen las bases adecuadas para los cursos de Microbiología y Biología Molecular e Ingeniería Genética, del ciclo superior de la carrera de Lic. en Biotecnología. La enseñanza de los conocimientos del curso de Química Biológica se aborda través de clases teóricas seguidas de Trabajos Prácticos de Laboratorio y Aula. Los Trabajos Prácticos comprenden: experiencias de laboratorio, donde se plantea la enseñanza del uso de materiales biológicos necesarios para demostrar empíricamente los distintos procesos metabólicos y destrezas en el manejo de técnicas de laboratorio e instrumental, y trabajos prácticos de aula, en los que se proponen la resolución de problemas y ejercicios para permitir a los estudiantes aclarar y aplicar conceptos teóricos para la construcción de un aprendizaje significativo.

La presente Guía de Trabajos Prácticos incluye el material utilizado para el desarrollo de los Trabajos Prácticos de Aula (TPA) y los Trabajos Prácticos de Laboratorio (TPL).

ÍNDICE

<i>Reglamento para el cursado y aprobación de la asignatura.....</i>	<i>V</i>
<i>Normas de bioseguridad.....</i>	<i>VII</i>
<i>Guía para la elaboración de informe final TPL.....</i>	<i>X</i>
<i>Trabajo Práctico de Aula Nº 1: Enzima .....</i>	<i>12</i>
<b>Introducción teórica .....</b>	<b>12</b>
<b>Problemas de aplicación.....</b>	<b>21</b>
<b>Guía de estudio.....</b>	<b>25</b>
<i>Trabajo Práctico de Laboratorio Nº 1: Estudio de la actividad de la enzima invertasa.....</i>	<i>27</i>
<b>Introducción teórica .....</b>	<b>27</b>
<b>Influencia del pH sobre la actividad de la enzima .....</b>	<b>29</b>
<b>Dependencia de la velocidad de reacción enzimática con la concentración de sustrato.....</b>	<b>32</b>
<b>Anexo: curva de calibración de glucosa .....</b>	<b>36</b>
<i>Trabajo Práctico de Aula Nº 2: Transporte electrónico mitocondrial. Fosforilación oxidativa.....</i>	<i>39</i>
<b>Introducción teórica .....</b>	<b>39</b>
<b>Problemas de aplicación.....</b>	<b>45</b>
<b>Guía de estudio.....</b>	<b>47</b>
<i>Trabajo Práctico de Laboratorio Nº 2: Transporte electrónico mitocondrial. Fosforilación oxidativa.....</i>	<i>49</i>
<b>Introducción teórica .....</b>	<b>49</b>
<i>Trabajo Práctico de Aula Nº 3: Metabolismo de Hidratos de Carbono. Parte I.....</i>	<i>52</i>
<b>Metabolismo. Introducción teórica .....</b>	<b>52</b>
<b>Metabolismo de Hidratos de Carbono. Introducción teórica.....</b>	<b>54</b>
<b>Vía Glicolítica. Introducción teórica.....</b>	<b>56</b>
<b>Problemas de aplicación.....</b>	<b>62</b>
<b>Guía de estudio.....</b>	<b>64</b>
<i>Trabajo Práctico de Laboratorio Nº 3: Metabolismo de Hidratos de Carbono: vía glicolítica. Demostración de fermentación en levaduras.....</i>	<i>65</i>
<b>Introducción teórica .....</b>	<b>65</b>
<b>Determinación de la concentración de glucosa .....</b>	<b>67</b>
<b>Determinación de etanol .....</b>	<b>68</b>
<i>Trabajo Práctico de Aula Nº 4: Metabolismo de Hidratos de Carbono. Parte II.....</i>	<i>72</i>
<b>Introducción teórica.....</b>	<b>72</b>
<b>Metabolismo de glucógeno. Introducción teórica.....</b>	<b>73</b>

## Guía de Trabajos Prácticos de Química Biológica para Lic. en Biotecnología

<b>Descarboxilación oxidativa del piruvato.....</b>	<b>77</b>
<b>Ciclo de Krebs.....</b>	<b>78</b>
<b>Vía de las pentosas fosfato.....</b>	<b>82</b>
<b>Problemas de aplicación.....</b>	<b>84</b>
<b>Guía de estudio.....</b>	<b>87</b>
<i>Trabajo Práctico de Laboratorio N° 4: Determinación de ácido cítrico.....</i>	<i>89</i>
<b>Introducción teórica .....</b>	<b>89</b>
<b>Determinación de la ácido cítrico .....</b>	<b>91</b>
<i>Trabajo Práctico de Aula N° 5: Metabolismo de lípidos. Biosíntesis de ácidos grasos</i>	
<i>Degradación de ácidos grasos. Ciclo del glioxilato.....</i>	<i>94</i>
<b>Introducción teórica.....</b>	<b>94</b>
<b>Degradación de ácidos grasos.....</b>	<b>95</b>
<b>Biosíntesis de ácidos grasos saturados.....</b>	<b>99</b>
<b>Ciclo del glioxilato.....</b>	<b>103</b>
<b>Problemas de aplicación.....</b>	<b>105</b>
<b>Guía de estudio.....</b>	<b>107</b>
<i>Trabajo Práctico de Aula N° 6: Metabolismo de aminoácidos y nucleótidos. Degradación de aminoácidos.....</i>	<i>109</i>
<b>Metabolismo de aminoácidos. Introducción teórica.....</b>	<b>109</b>
<b>Problemas de aplicación.....</b>	<b>119</b>
<b>Guía de estudio.....</b>	<b>119</b>
<b>Biosíntesis de nucleótidos. Introducción teórica.....</b>	<b>122</b>
<b>Problemas de aplicación.....</b>	<b>133</b>
<b>Guía de estudio.....</b>	<b>134</b>

## REGLAMENTO PARA EL CURSADO Y APROBACIÓN DE LA ASIGNATURA

### Estudiantes regulares

1. Para el cursado de la asignatura el estudiante deberá haber aprobado los cursos de Biología General y Química Orgánica y regularizado los siguientes cursos: Química de Biomoléculas, Biología Celular y Fisicoquímica (Plan 7/17).

2. Los estudiantes conocerán, al comenzar el cuatrimestre, las fechas y los temas de las clases teóricas y de los Trabajos Prácticos, como así también las fechas de las Evaluaciones Parciales. Todo lo mencionado será informado en el avisador de la asignatura.

3. La fundamentación teórica de los trabajos prácticos se desarrollará en las clases teóricas, así como en la guía de trabajos prácticos.

4. La bibliografía de cada uno de los temas a desarrollar estará a disposición de los alumnos en el Área de Química Biológica y se les dará a conocer la que se encuentra para consulta en Biblioteca.

5. De acuerdo a una concepción de evaluación formativa, los TPA serán evaluados mediante la resolución y exposición de los ejercicios por parte de los estudiantes y la elaboración de un informe final escrito en el cual se incluya dicha resolución. Previo a la jornada del TPA, existirá una instancia de consulta con el docente responsable del práctico.

6. Para el caso de la evaluación de los TPL, se utilizará una lista de control para registrar la expresión o adquisición práctica, como también la presentación de un informe final de laboratorio, cuya guía de elaboración se encuentra anexa a la presente guía.

7. Para poder rendir cada evaluación parcial, los estudiantes deberán tener aprobado el ciento por ciento (100%) de los trabajos prácticos cuyos contenidos se evalúan en la misma. Estas evaluaciones podrán ser escritas u orales y se aprobarán con el **65%** del puntaje total.

8. Teniendo en cuenta la Ord. N° 32/14, para ser considerado como alumno regular se deberá aprobar el 100% de las Evaluaciones Parciales. Cada Parcial tendrá dos (2) recuperaciones. La primera recuperación se llevará a cabo en no menos de 48 horas de publicado el resultado del Parcial. La segunda recuperación se realizará al final del cuatrimestre. Ambas instancias de recuperación se aprobarán con el **75%** del puntaje total.

9. De acuerdo a la reglamentación vigente (Ord. N° 13/03 y su modificatoria Ord. N° 32/14) para aprobar la asignatura, los estudiantes deberán aprobar el cien por ciento (100%) de los Trabajos Prácticos y las Evaluaciones Parciales sobre los mismos. Además, deberán haber asistido al sesenta por ciento (60 %) de las clases teóricas



### Estudiantes con promoción sin examen final

Este Curso de Química Biológica considera la posibilidad de aprobación por Promoción sin examen final. Para acceder a dicha Promoción los estudiantes deberán:

**1-** En el momento de inscribirse al curso, cumplir con las exigencias de correlatividades establecidas en el Plan de Estudio de la carrera (Plan 7/17) para rendir el examen final de esta asignatura. Las materias que deberán estar aprobadas son: Fisicoquímica, Biología Celular y Química de Biomoléculas.

**2-** Para mantener la condición de alumno promocional deberá cumplir, como mínimo, con la asistencia al ochenta por ciento (**80%**) de las actividades teóricas programadas.

**3-** Aprobar los TPA y TPL con igual exigencia que los estudiantes regulares.

**4.** Evaluaciones y recuperaciones: se realizarán evaluaciones parciales de la totalidad del programa teórico y de Trabajos Prácticos.

**5.** Cada evaluación será escrita u oral, según la naturaleza del tema. Para aprobar cada evaluación parcial se requiere el 70% del puntaje total.

**6-** Los alumnos que opten por la Promoción sin examen final tendrán solo dos (2) recuperaciones para todas las evaluaciones Parciales. Estas recuperaciones se aprobarán con el 75% del puntaje total.

**8-** Pérdida de la promoción: en el caso de no satisfacerse algunas de las condiciones establecidas en este reglamento, el estudiante será considerado regular si cumple con las respectivas condiciones de regularidad.

## NORMAS DE BIOSEGURIDAD QUE EL ESTUDIANTE DEBERA CUMPLIR PARA TRABAJAR EN EL LABORATORIO

### Riesgo biológico

La manipulación o exposición a los agentes biológicos puede traer como consecuencia la infección del personal expuesto, con o sin manifestación de la enfermedad. En el hombre, el riesgo de infección es el más significativo (por la frecuencia e importancia) y el más antiguo de los reconocidos por los profesionales de la salud. Entre las causas atribuidas a las infecciones del personal de laboratorio se destacan: el uso de objetos punzo-cortantes contaminados con fluidos corporales, los derrames o salpicaduras, el trabajo con animales de laboratorio, no tomar las adecuadas medidas de protección, etc.

### Reglas críticas de higiene y seguridad

Al formarse como profesional, debe tener en cuenta una serie de normas, que contribuirán a llegar a resultados exactos, a un correcto desempeño en las actividades a desarrollar en un laboratorio, y al cuidado de la salud.

Las normas de seguridad están hechas para la protección de su vida, por lo tanto su cumplimiento es **OBLIGATORIO**. A saber:

- 1) Los pasillos de circulación, vías de evacuación y puertas de emergencia no deben estar obstruidas.
- 2) El **uso del guardapolvo es obligatorio** dentro del laboratorio. El uso de guantes de látex, barbijo y lentes es obligatorio en el trabajo práctico que lo requiera.
- 3) No se permitirá la entrada a los laboratorios con pantalones cortos, chinelas o cabello largo suelto.
- 4) Está terminantemente prohibido fumar, comer, e ingerir bebidas en el laboratorio.
- 5) Deberá mantener su mesada y pileta limpias. Para ello a cada trabajo práctico debe traer una rejilla o repasador limpio.
- 6) Al comenzar el trabajo práctico, todo el material debe estar limpio y seco para evitar inexactitudes.
- 7) No malgaste los reactivos. No los impurifique con pipetas sucias, esto perjudicará su trabajo y el de sus compañeros. Nunca devuelva al recipiente original una sustancia que se ha sacado del mismo, pues podría contaminarla.
- 8) Cuando trabaje con material biológico (sangre total, suero, orina) utilice guantes de látex, debe considerarlo material infecto contagioso.

- 9) Las puntas plásticas o tips y pipetas de vidrio, luego de ser utilizados, deberán ser descartados dentro de los correspondientes recipientes con lavandina, para una descontaminación previa al lavado final. No los deje apoyados sobre la mesada.
- 10) No deberá pipetear ácidos, álcalis, o cualquier producto corrosivo o tóxico, con la boca, use una pera o pro-pipeta. Si algún reactivo es accidentalmente ingerido, avise de inmediato al personal docente.
- 11) Si algún líquido corrosivo toca su cuerpo, use la ducha y lave la zona afectada con abundante agua, si los afectados son los ojos use el lavaojos y lávelos durante 15 minutos luego solicite primeros auxilios.
- 12) Todas las operaciones que desprendan gases tóxicos y/o irritantes deberán efectuarse **bajo la campana extractora sin excepción.**
- 13) En caso de derrame de ácidos o solventes se procederá a volcar sobre el mismo un balde de arena destinado a tal fin, ubicado en nuestro laboratorio, en la mesa lateral.
- 14) Dilución de ácidos: Cuando realice la dilución de un ácido proceda a añadir lentamente el ácido al agua contenida en un vaso, agitando constantemente y enfriando el vaso receptor. Nunca añadir agua al ácido (*no se debe bañar el ácido*).
- 15) Uso y Tratamiento de reactivos y soluciones químicas:
  - a- Al usar cualquier tipo de reactivos, asegúrese que es el correcto y **lea bien su etiqueta.** Si es transferido a otro recipiente, **rotúlelo de nuevo.**
  - b- Todos los reactivos deberán manejarse con el material perfectamente limpio. Todos los sólidos deberán manejarse con espátula.
  - c- No utilizar reactivos sin haber registrado sus propiedades en el cuaderno de laboratorio, enterándose de los riesgos de su uso y tomando las precauciones pertinentes.
  - d- No manipular productos inflamables (benceno, tolueno, éter, etc.) en presencia de mecheros encendidos.
  - e- Cuando un reactivo requiera una agitación vigorosa por inversión del recipiente, tápelo con un tapón de vidrio esmerilado o de goma, nunca lo haga con la mano.
  - f- Al calentar una solución y/o reactivo, hágalo en recipientes adecuados para ese efecto.
  - g- Al calentar una solución en un tubo de ensayo debe hacerse bajo el nivel del líquido y agitando constantemente. No dirigir la boca del tubo hacia compañero o a sí mismo, pues puede proyectarse.
  - h- Cualquier material caliente debe colocarse sobre una placa resistente al calor.
  - i- Algunos desperdicios líquidos podrán desecharse en las piletas de descarga con un rango pH moderado de 6-8, dejando correr suficiente agua, ya que muchos de ellos pueden ser corrosivos. Soluciones alejadas de estos pH deberán primero ser neutralizadas antes de desecharlas.

- 16) Todos los desperdicios sólidos y papeles, no patológicos o contaminantes, deberán colocarse en los botes de basura. Los residuos sólidos patológicos o contaminantes deberán desecharse en los recipientes con **bolsas rojas** destinados a tal fin. El material de vidrio roto deberá descartarse en recipientes especiales para ese efecto.
- 17) Controle que todo el instrumental que utilizó (espectrofotómetro, centrifugas, medidor de pH, etc.) quede limpio, apagado y cubierto con su funda si fuera necesario.
- 18) Las bromas en su trabajo pueden causar accidentes, no las haga, trabaje con seriedad pensando que está próximo a desempeñarse como profesional.

## GUÍA PARA LA ELABORACIÓN DE INFORMES DE TPL

*El objetivo de estos informes de TPL es el desarrollo de las capacidades de expresión escrita de los estudiantes, como también el de comparar observaciones, constatar resultados y argumentar las experiencias a partir de las prácticas de laboratorio realizadas.*

ESTE TRABAJO ATENDERÁ LOS SIGUIENTES REQUISITOS PARA LA EVALUACIÓN:

- Elaborado en grupo, de acuerdo a las comisiones que realizaron la experiencia de laboratorio (un informe por comisión).
- Emplear bibliografía básica de la asignatura y consignarla al final del informe (puede consistir en libros de texto o la guía de Trabajos Prácticos).
- Constituir una elaboración propia, coherente, reflexiva y fundamentada. No es una copia de fragmentos de la guía de Trabajos Prácticos.
- Presentado en tiempo y forma. Es posible realizarlo vía correo electrónico a la siguiente dirección: Qca.biologica.FQBF.UNSL@gmail.com

El no cumplimiento de las características solicitadas implica el pedido de la re-elaboración del informe. Para rendir el examen parcial, todos los informes de los temas evaluados en dicho parcial, deberán estar aprobados.

**Usted posee la libertad de agregar lo que considere importante, pero debe respetar como base, los ítems detallados en esta guía.**

### Características del texto

- Fuente y tamaño: letra arial, tamaño 11.
- Interlineado: 1,5 líneas.
- Márgenes: superior e inferior de 2,5 cm, e izquierdo y derecho de 2,5 cm.
- Párrafo: texto justificado.

Prestar especial atención a la redacción, las faltas de ortografía y las expresiones coloquiales. Indague el significado de una palabra, en caso de ignorarlo. Utilice los correctores de gramática y ortografía disponibles.

### Contenido del informe

OBJETIVOS: explique con sus palabras qué objetivos se plantearon en el TPL.

**INTRODUCCIÓN TEÓRICA:** **breve** introducción con información pertinente del tema que se estudió en el laboratorio, es decir información teórica que permita comprender la fundamentación de la experiencia práctica. La introducción se ubica en el informe luego de los objetivos, pero su elaboración se realiza luego de concluir el informe ya que en esa instancia es posible comprender qué información conceptual es pertinente mencionar.

**MATERIALES y MÉTODOS:** incluir reactivos utilizados y fundamento de las reacciones involucradas. No copiar de la guía, explique y argumente de acuerdo a lo que realizó en la experiencia de laboratorio. Justifique la realización de los diferentes métodos y las reacciones que ensayó.

**RESULTADOS:** comente los resultados obtenidos. Si corresponden a una determinación cuantitativa, coloque los datos numéricos obtenidos y explique cómo los procesó para obtener un resultado. En cambio, si se trata de una determinación cualitativa, comente qué observó (ej.: un color, un cambio de color, etcétera).

**CONCLUSIÓN:** aquí hay varias opciones. Una de ellas implica comentar el resultado esperado y compararlo con el obtenido, a partir de ello es posible describir las conclusiones. Además, al final de cada TPL, se presenta en una serie de preguntas que le ayudarán a elaborar las conclusiones del Práctico.

## TRABAJO PRÁCTICO DE AULA Nº 1

### ENZIMAS

#### Objetivos

- Describir las propiedades generales de las enzimas.
- Comprender la cinética enzimática y mecanismos de regulación.
- Determinar gráficamente los valores de Km.
- Interpretar la acción de distintos tipos de inhibidores sobre la actividad enzimática.

#### Introducción teórica

Las enzimas catalizan prácticamente todas las reacciones biológicamente importantes. Se encuentran entre las más notables biomoléculas conocidas debido a su extraordinaria especificidad y a su poder catalítico. Una reacción catalizada por una enzima se puede esquematizar:



La actividad de una enzima puede determinarse midiendo la cantidad de producto formado o de sustrato consumido, en un tiempo dado, en una mezcla que contenga todos los factores y condiciones requeridos para la reacción. Para que la determinación de actividad enzimática guarde relación con la cantidad de enzima presente en solución, es necesario medir la velocidad inicial, entendiéndose como aquella obtenida cuando todavía la cantidad de sustrato consumido es insignificante, en relación con el sustrato total presente de la mezcla.

Para medir la actividad de una preparación enzimática en solución se utiliza distintas expresiones:

La cantidad de enzima se indica habitualmente en Unidades Internacionales.

Una Unidad de cualquier enzima es la cantidad que cataliza la transformación de un micromol ( $1\mu\text{mol} = 10^{-6}\text{mol}$ ) de sustrato por minuto, en condiciones definidas de pH y temperatura.

$\text{Unidad de enzima} = \frac{\mu\text{mol de sustrato transformado}}{\text{min}}$
---

La actividad específica indica la pureza relativa de una preparación enzimática y relaciona la actividad enzimática no ya al volumen de la muestra, sino al total de proteínas existentes en la misma.

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{moles de sustrato transformado/min}}{\text{mg de proteínas}}$$

El incremento de la actividad específica indica la eliminación de proteínas que no poseen la acción catalítica perseguida. La actividad específica llega a ser máxima y constante cuando la enzima en solución, se encuentra al estado puro.

Cuando se tiene la enzima al estado puro y se conoce su peso molecular, se puede calcular su actividad molar o número de recambio, que corresponde al número de moléculas (o moles) de sustrato convertidos en producto por unidad de tiempo (minuto) por una molécula (o mol) de enzima, trabajando en condiciones de saturación de sustrato, lo que corresponde a la velocidad máxima en presencia de un mol de enzima.

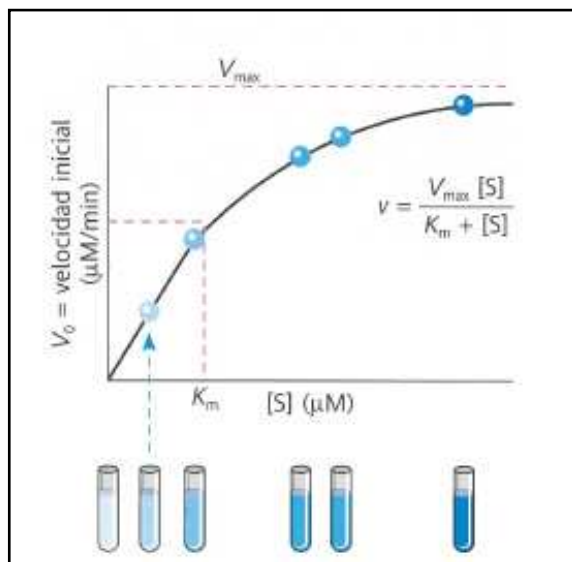
$$\text{Número de recambio} = \frac{\text{moles de sustrato transformado/min.}}{\text{mol de proteínas}}$$

Diversos factores modifican la actividad enzimática, por lo tanto, deben ser considerados al momento de determinar la actividad de enzima presente en una muestra. Entre dichos factores se encuentran:

- concentración de enzima
- concentración de sustrato
- temperatura
- pH
- concentración de cofactores
- presencia de inhibidores

Si se mide la actividad de una enzima utilizando diferentes concentraciones de sustrato, inicialmente cuando las concentraciones de sustrato son bajas, la actividad aumenta rápidamente con los incrementos en la concentración de sustrato, pero a niveles más elevados de sustrato, el incremento de la velocidad enzimática comienza a ser más lento, tendiendo a alcanzar un valor de actividad máximo, que no es superado a pesar de que se continúe incrementando la concentración de sustrato. Este comportamiento queda expresado en la siguiente gráfica (fig. 1.1):





**Figura 1.1.** Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima.  $V_0$ : velocidad inicial.  $K_m$ : constante de Michaelis-Menten.  $V_{m\acute{a}x}$ : velocidad máxima.  $[S]$ : concentración de sustrato. Feduchi y cols. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2011. Ed. Panamericana.

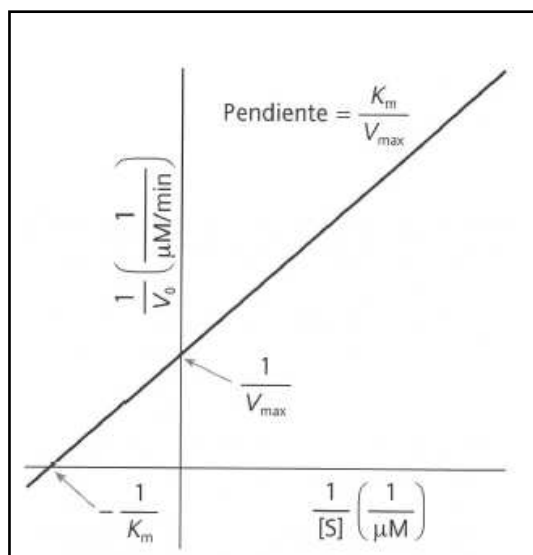
Michaelis y Menten establecieron una relación entre la velocidad de reacción y la concentración de sustrato mediante una constante llamada  $K_m$  (constante de Michaelis Menten), y dedujeron que la hipérbola que corresponde a la curva de saturación de una enzima por su sustrato, puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Se puede definir  $K_m$  como la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción enzimática alcanza un valor igual a la mitad de la velocidad máxima. En condiciones definidas de medio de reacción, pH, temperatura, etc., el valor de  $K_m$  permanece fijo para cada sustrato de una misma enzima, se expresa en unidades de concentración, y permite caracterizarla.

La ecuación de Michaelis-Menten puede ser transformada algebraicamente en ecuaciones equivalentes utilizables para la determinación práctica del valor de  $K_m$ . Un ejemplo de ello es la ecuación de Lineweaver-Burk, que es la recíproca de la ecuación de Michaelis-Menten, y corresponde a la ecuación de una recta que no pasa por el origen (fig. 1.2).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}}$$



**Figura 1.2.** Representación gráfica de la ecuación de Lineweaver-Burk. [S]: concentración de sustrato;  $v_0$ : velocidad enzimática;  $K_m$ : constante de Michaelis-Menten;  $V_{m\acute{a}x}$ : velocidad máxima. Feduchi y cols. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2011. Ed. Panamericana.

### Mecanismos de regulación de la actividad enzimática

Además, de la concentración de sustrato, el valor de pH en solución, la temperatura, la presencia de cofactores, etc., la actividad de las enzimas intracelulares puede ser regulada por varios mecanismos. En casi todas las vías metabólicas existen una o más enzimas que actúan como reguladoras que pueden aumentar o disminuir su actividad de acuerdo a señales específicas.

Existen varios mecanismos de regulación de las reacciones enzimáticas:

**a)** Los que modifican la actividad de las enzimas:

- Enzimas alostéricas
- Enzimas reguladas por modificación covalente
- Enzimas reguladas por modificación proteolítica: zimógenos
- Enzimas reguladas por compartimentalización celular: Isoenzimas

**b)** Los que regulan la cantidad de enzima presente:

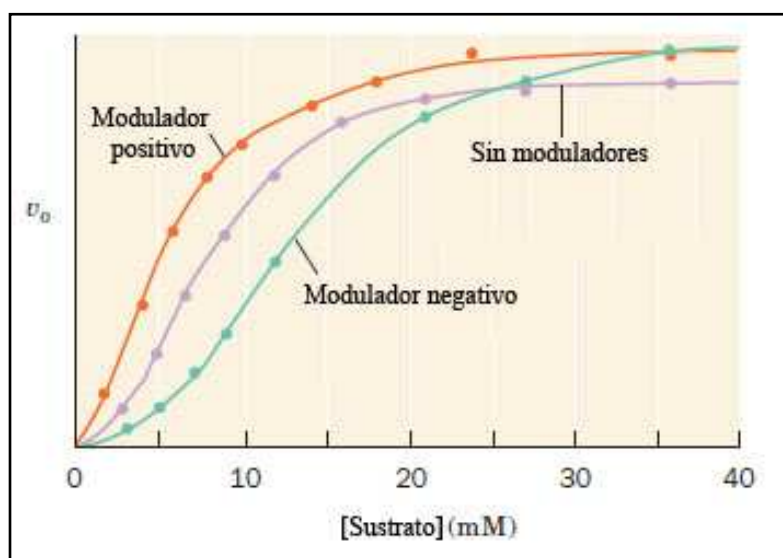
- Inducción o represión de la síntesis de enzimas.
- Degradación proteolítica de la proteína enzimática

### Enzimas alostéricas

A diferencia de las enzimas "michaelianas", las enzimas alostéricas no poseen una cinética de tipo hiperbólica, sino que la representación de la actividad de estas enzimas, en

función de la concentración de sustrato ( $[S]$ ), responde a una curva sigmoidea. Este comportamiento cinético radica a que en la estructura molecular de las enzimas alostéricas, además del sitio catalítico, existen otros sitios denominados reguladores, a los cuales se unen específicamente moléculas que ejercen acción activadora o inhibidora sobre la actividad enzimática. Estos agentes se llaman moduladores, modificadores o efectores alostéricos y pueden actuar de modo positivo o negativo.

Las enzimas alostéricas están constituidas por varias subunidades polipeptídicas, entre las cuales existe algún tipo de comunicación, que permite que cuando un modulador positivo o negativo se une a ellas, ocurra un cambio de conformación que se transmite a las otras subunidades, de manera tal que se favorece o impide la unión del sustrato al sitio activo, según se trate de un modulador positivo o negativo, respectivamente (fig. 1.3).

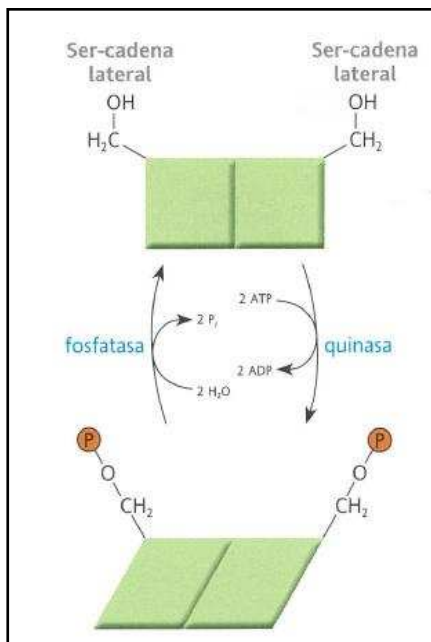


**Figura 1.3.** Representación gráfica del comportamiento cinético de una enzima alostérica, en presencia y ausencia de moduladores alostéricos. Modificado desde Voet y cols. "Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular", 2013. Ed. John Wiley & Sons, Inc.

### Enzimas reguladas por modificación covalente

La actividad de algunas enzimas también es regulada por la unión covalente o remoción de grupos químicos (fosfatos, AMP, metilo, etc.) a la estructura proteica. Las enzimas que responden a este tipo de regulación son denominadas "enzimas reguladas por modificación covalente". Con mayor frecuencia el grupo añadido o removido es un grupo fosfato, el cual se une o remueve sobre residuos de los aminoácidos serina, treonina o tirosina, específicos de la proteína enzimática. Las reacciones de fosforilación son catalizadas por una familia de enzimas llamadas quinasas de proteínas, las cuales utilizan

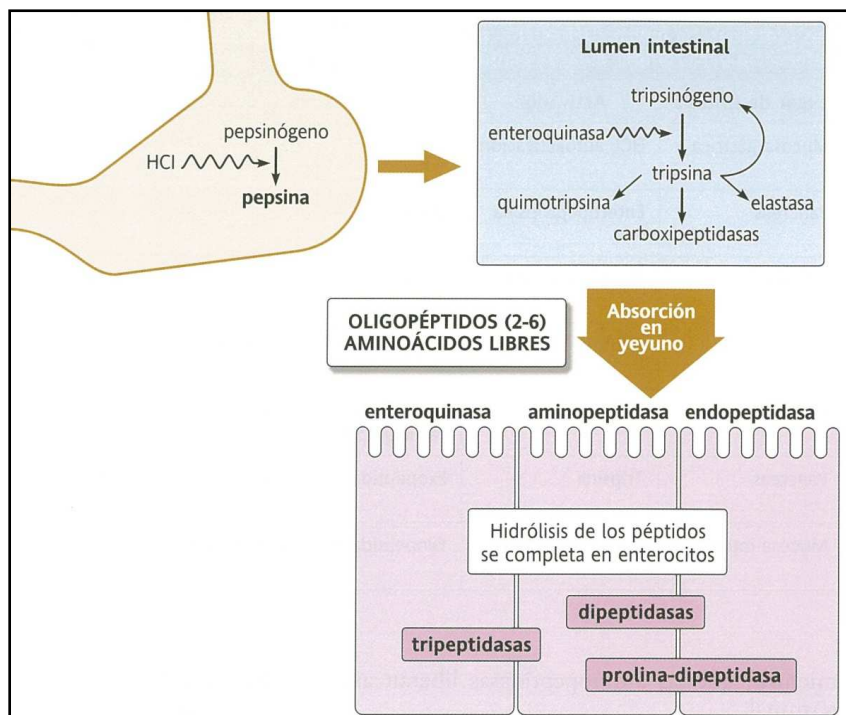
como dador del grupo fosfato al ATP. A su vez, los grupos fosfatos se separan de las enzimas fosforiladas por la acción de enzimas llamadas fosfatasas de proteínas (fig. 1.4).



**Figura 1.4.** Esquema de la regulación de una enzima por modificación covalente mediante la participación de grupos fosfatos. Feduchi y cols. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2011. Ed. Panamericana.

### Enzimas reguladas por modificación proteolítica: zimógenos

Ciertas enzimas son producidas en las células de origen como precursores inactivos llamados zimógenos, proenzimas o preenzimas. La mayoría de estos precursores son proteínas simples que se convierten en enzima activa por un proceso de hidrólisis. Ejemplos de zimógenos son algunos componentes de los jugos digestivos, los cuales se activan al llegar a la luz intestinal. Así, el pepsinógeno en presencia de la acidez del estómago se convierte en pepsina, la enzima activa; el tripsinógeno, secretado por el páncreas, se hidroliza por la enteroquinasa a tripsina, la enzima activa (fig. 1.5)



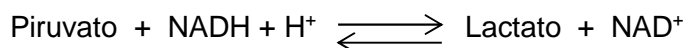
**Figura 1.5.** Esquema del proceso de activación zimógenos. Tomado desde Feduchi y cols. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2011. Ed. Panamericana.

### Enzimas reguladas por compartimentalización celular: Isoenzimas

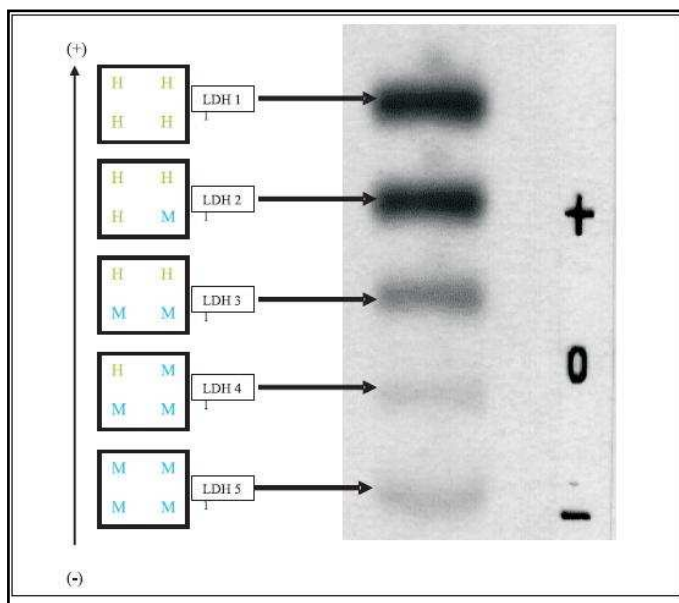
Las isoenzimas son diferentes formas moleculares de una misma enzima. Estas enzimas se caracterizan por presentar igual especificidad por el sustrato, pero diferente afinidad por el mismo, es decir, presentan distintos valores de  $K_m$  y  $V_{máx}$ . Un ejemplo de isoenzimas son la hexoquinasa y la glucoquinasa (isoenzima IV de la primera). Ambas, utilizan como sustrato a glucosa con un  $K_m$  de 0,1 mM y 10 mM, respectivamente. La reacción que catalizan es la siguiente:



Debido a que poseen diferente estructura aminoacídica, por lo tanto, distinto peso molecular (PM) y/o carga, las isoenzimas se pueden separar mediante electroforesis en gel. En este sentido, una de las mejores estudiadas es la "lactato deshidrogenasa", que presenta cinco isoenzimas cada una con una composición aminoacídica diferente. El sustrato de la misma es el piruvato o el lactato. La reacción que catalizan es la siguiente:



La distribución relativa de la actividad enzimática entre las cinco formas es característica para cada tejido dependiendo de la función del mismo.



**Figura 1.6.** Patrón electroforético y composición de cada una de las isoenzimas de lactato deshidrogenasa (LDH). Maestre-Serrano y cols. Universitas Scientiarum, 2008. 13(1), 11-20.

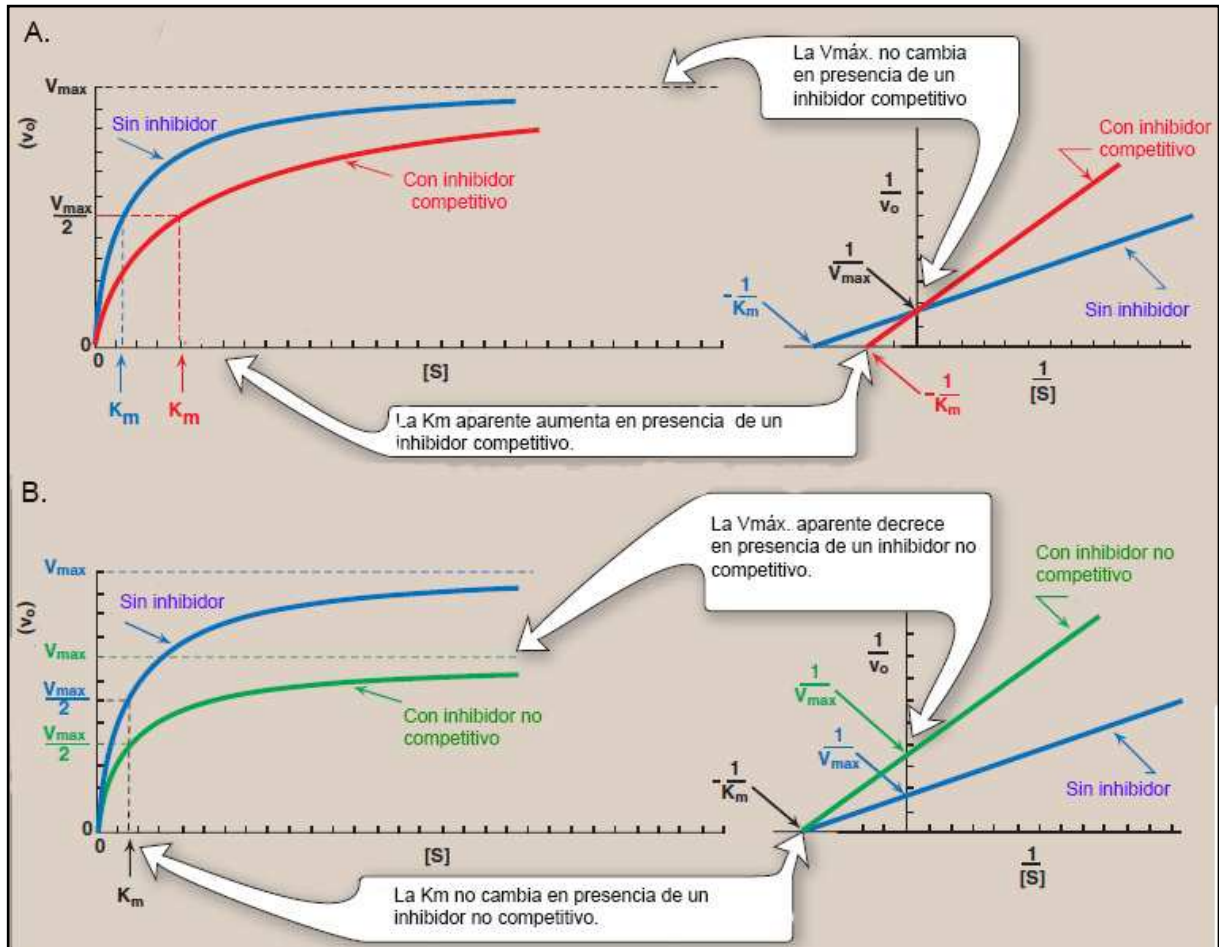
### Inhibidores enzimáticos

Existen agentes químicos que inhiben reversible o irreversiblemente la acción catalítica de las enzimas. En el caso de la inhibición reversible, la misma puede ser de tipo competitiva y no competitiva.

Los **inhibidores competitivos** aumentan el valor de  $K_m$ , pero no modifican la  $V_{m\acute{a}x}$  de la enzima. El inhibidor presenta similitud estructural con el sustrato y ambos compiten por el sitio activo de la enzima.

Los **inhibidores no competitivos** son compuestos que se unen a la enzima en un lugar diferente al sitio activo y provocan una disminución de la  $V_{m\acute{a}x}$  sin modificar el valor de la  $K_m$ .

Para identificar la acción de un inhibidor, es posible representar gráficamente la variación de la  $V_o$  en función de la  $[S]$  y su inversa, la ecuación de Lineweaver-Burk (fig.1.7).



**Figura 1.7.** Influencia de inhibidores competitivo y no competitivo sobre la cinética enzimática. Modificado desde Harvey & Ferrier. Biochemistry (Lippincott Illustrated Reviews Series), 2011.

**PROBLEMAS DE APLICACIÓN**

1) Un investigador descubre una enzima y la purifica por distintos métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

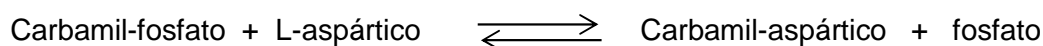
Fracción de la enzima	Volumen (ml)	U/ml	Unidades totales	Proteínas mg/ml	Actividad Específica	Porcentaje de Recuperación	Grado de Purificación
Homogenato crudo	200	100		2,5			
Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 45%	80	200		1,25			
DEAE-celulosa	20	500		1,0			
Electroforesis	5	1500		1,0			
Cristalización	3	2000		0,3			

a) De la información dada en la tabla calcular las unidades totales de enzima, la actividad específica, el porcentaje de recuperación global y el grado de purificación después de cada procedimiento.

b) ¿Cuál de los procedimientos de purificación utilizados con esta enzima es el más efectivo (es decir, produce el máximo incremento en pureza)?

c) ¿Cuál de los procedimientos de purificación es el menos efectivo?

2) La enzima aspartato transcarbamilasa cataliza la primera reacción propia de la biosíntesis de pirimidina:

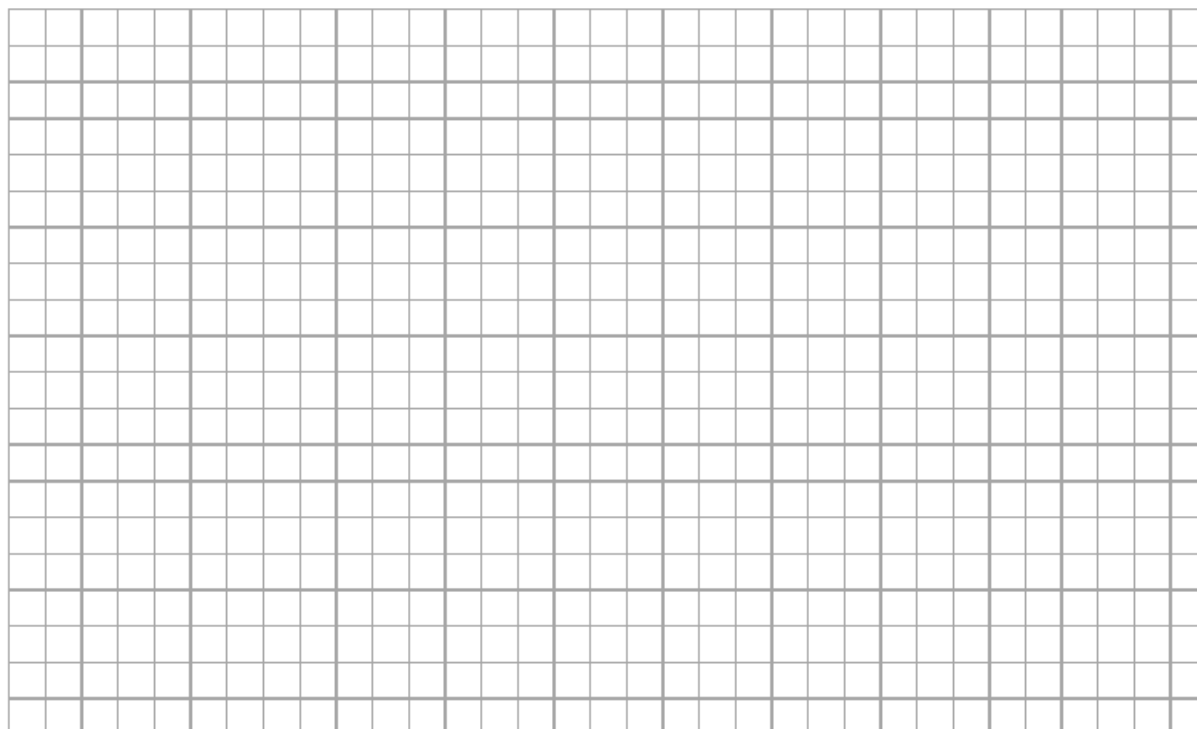


En un estudio cinético sobre esta enzima aislada de *E. Coli* utilizando aspartico como sustrato, en presencia de CTP (citidina trifosfato) 0,5 M y en ausencia del mismo, se obtuvieron los siguientes datos:

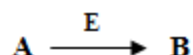


Aspártico (Molar)	v (unidades arbitrarias)	
	Ausencia de CTP	CTP 0,5 M
$1 \times 10^{-3}$	0,45	0,20
$2 \times 10^{-3}$	0,80	0,40
$3 \times 10^{-3}$	1,70	0,70
$4 \times 10^{-3}$	2,90	1,00
$5 \times 10^{-3}$	3,40	1,40
$7 \times 10^{-3}$	4,30	2,40
$9 \times 10^{-3}$	5,10	3,70
$10 \times 10^{-3}$	5,30	4,20
$12 \times 10^{-3}$	5,60	4,80
$15 \times 10^{-3}$	5,80	5,50
$16 \times 10^{-3}$	5,80	5,60
$17 \times 10^{-3}$	5,80	5,60

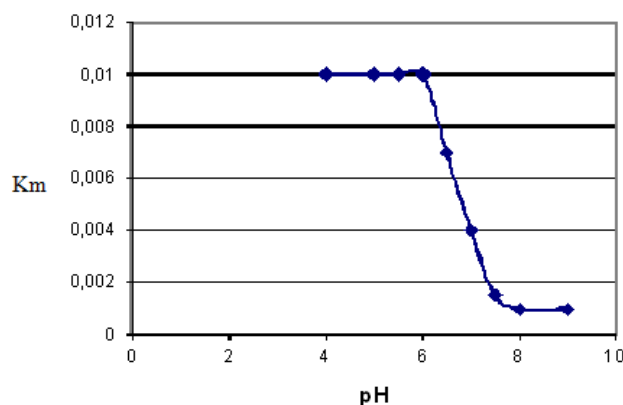
- Sin utilizar ninguna representación gráfica estime el valor de Km.
- Calcule este parámetro utilizando la ecuación de Michaelis Menten. ¿Existe alguna discrepancia entre estas dos determinaciones? Justificar.
- ¿Qué efecto ejerce el CTP sobre el sistema enzimático? Justifíquelo graficando.



3) En un experimento realizado se trabajó con 1  $\mu\text{g}$  de una enzima E y con 0,01 M de sustrato A, ambos implicados en la siguiente reacción enzimática:



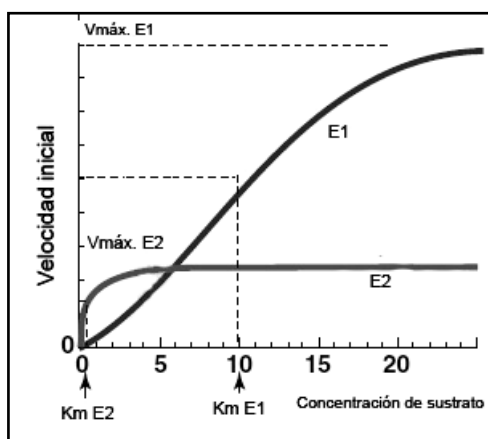
La velocidad máxima de la actividad enzimática fue de 100  $\mu\text{moles}/\text{min}/\mu\text{g}$  de enzima, no habiendo variación de la misma en el rango de pH 5 a 9. El valor de  $K_m$  fue sensible a los cambios de pH, lo cual puede ser observado en la siguiente gráfica:



- Calcule la velocidad inicial de reacción a pH 6,0 y a pH 8,0
- ¿Cuál de los dos valores de pH sería más conveniente para trabajar con esta enzima?  
¿Por qué?
- ¿Cuál sería la concentración de sustrato para que a pH 6,00 la velocidad inicial alcanzada sea igual a la obtenida trabajando a pH 8,00?

4) En la siguiente gráfica se representa la actividad enzimática de las isoenzimas E1 y E2. De acuerdo a la misma responde:

- ¿Cuál de las dos isoenzimas poseen mayor afinidad por el sustrato?
- ¿Cuál de las dos isoenzimas alcanza la  $V_{m\acute{a}x.}$  con una menor concentración de sustrato?



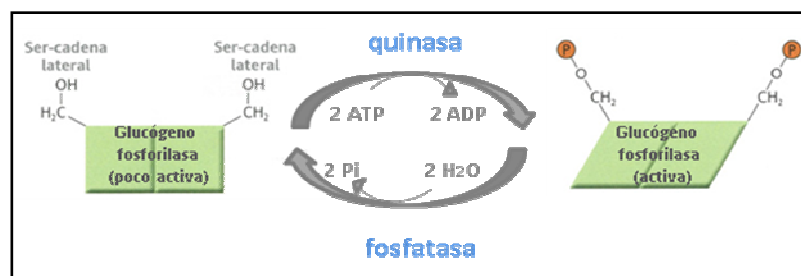
5) Una enzima que cataliza la reacción  $S \longrightarrow P$ , se ensaya con las siguientes concentraciones de sustrato, indicándose también las velocidades iniciales.

Concentración inicial de sustrato [M]	Velocidad inicial [ $\mu\text{mol/l min}$ ]
$1 \times 10^{-2}$	75,0
$1 \times 10^{-3}$	74,9
$1 \times 10^{-4}$	60,0
$7,5 \times 10^{-5}$	56,25
$6,26 \times 10^{-6}$	15,0

- Determinar el valor de la  $K_m$  de la enzima y la  $V_{m\acute{a}x}$  que se pueden conseguir con la concentración de la enzima utilizada.
- ¿Cuál será la velocidad inicial con concentraciones de sustrato tales como:  $2,5 \times 10^{-5}$  M o  $5,0 \times 10^{-5}$  M?
- ¿Cuál sería la velocidad inicial con una concentración inicial de  $[S] 10^{-4}$  si se duplica la concentración de enzima?

6) Las características de la carne, como por ejemplo el color, están asociadas al contenido de glucógeno dentro del músculo. Así, un alto contenido de glucógeno al momento del sacrificio produce un descenso de pH en la misma, obteniéndose cortes de color más claros. La glucógeno fosforilasa es una enzima clave en la degradación del glucógeno, la cual es regulada por modificación covalente.

a) Teniendo en cuenta el gráfico de abajo, indique cuál de las enzimas siguientes debería encontrarse activa con el objeto de obtener carne de buena calidad.



- Identifique los grupos transferidos para modificar la actividad de la glucógeno fosforilasa.
- Mencione otros grupos químicos que son transferidos a las enzimas y son capaces de modificar su actividad.

## GUIA DE ESTUDIO

### Enzimas

Clasificación. Cofactores enzimáticos.

Unidad de Enzima, Actividad Específica e Índice de Cambio.

Ecuación de Michaelis Menten: Determinación gráfica de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ :

- ¿En qué condiciones se alcanza la  $V_{m\acute{a}x}$ . en una reacción enzimática?
- ¿Qué importancia tiene la determinación del  $K_m$  de una enzima?

Ecuación de Lineweaver-Burk. Determinación de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ .

Definición de  $K_m$ . Su importancia. ¿Qué factores modifican su valor?

- Efecto del pH sobre la Actividad Enzimática.
- Efecto de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas.
- Inhibición competitiva y no competitiva.

Representación gráfica de Lineweaver-Burk: diferencia entre un inhibidor competitivo y no competitivo:

- Complejos que se forman en presencia de un inhibidor competitivo y no competitivo.
- ¿Qué modificaciones presenta la pendiente y las intersecciones en cada tipo de inhibición?
- ¿Qué parámetros se modifican cuando actúan los dos tipos de inhibidores?

### Isoenzimas

Propiedades, composición,  $K_m$ , separación electroforética.

### Regulación metabólica

#### 1- Enzimas alostéricas:

- ¿Qué entiende por retroinhibición?
- ¿Qué propiedades tiene una enzima alostérica?
- ¿Cuál es el comportamiento de la enzima alostérica frente a concentraciones crecientes de sustrato?
- ¿Dónde se une el modulador o efector y cómo se modifica la actividad enzimática?

#### 2- Modulación covalente

- ¿Cómo se realiza el proceso de regulación covalente?
- Ejemplifique con la enzima fosforilasa.

### Zimógenos

- ¿Son enzimas activas?
- ¿La activación de los zimógenos es irreversible? Explique por qué.

### BIBLIOGRAFÍA

- **Feduchi, E., Blasco, I., Romero, C.S., & Yáñez, E. (2011).** Bioquímica. Conceptos esenciales. Panamericana.
- **Harvey, R. A. & Ferrier, D. R. (2011).** Biochemistry (Lippincott Illustrated Reviews Series). Biochemistry (Lippincott Illustrated Reviews Series), 40, 30888.
- **Voet, D., Voet, J G. & Pratt, C. W. (2013).** Fundamentos de Bioquímica -4.ed.: La Vida a Nivel Molecular. Ed. Artmed.
- **Maestre-Serrano, R., Guevara-Rozo, E., Colmenares-de Escamilla, I. & Pachón-Muñoz, E. (2008).** Expresión de isoenzimas de L-lactato: NAD<sup>+</sup> Óxido-reductasa (LDH; EC. 1.1.1.27) durante el desarrollo embrionario del pez combatiente siames Betta splendens (REGAN, 1909). Universitas Scientiarum, 13(1), 11-20.

Consultado desde: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-74832008000100002&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832008000100002&lng=en&tlng=es).

**TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº 1**  
**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA INVERTASA**

**Objetivos**

- Determinar la actividad enzimática de la invertasa.
- Calcular la velocidad de reacción catalizada por la invertasa, utilizando una curva de calibración de glucosa.
- Comprobar empíricamente la influencia del pH y la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática.

**Introducción teórica**

La cantidad de una enzima en una disolución determinada o un extracto de tejido, puede determinarse cuantitativamente en relación al efecto catalítico que produce. Para este objeto es necesario conocer:

1. La estequiometría global de la reacción catalizada.
2. La necesidad de cofactores, tales como los iones metálicos o coenzimas.
3. La dependencia de las concentraciones de sustrato o de los cofactores, es decir, el valor de  $K_m$  para el sustrato y para el cofactor.
4. El pH óptimo.
5. Un rango de temperatura en el que la actividad enzimática sea estable y elevada.
6. Un procedimiento analítico sencillo para determinar la desaparición del sustrato o aparición de los productos.

La actividad de una enzima puede determinarse midiendo la cantidad de producto formado, o de sustrato consumido, en un tiempo dado, en una mezcla que contenga todos los factores requeridos para la reacción. A fin de que la determinación guarde relación con la cantidad de enzima presente, es necesario medir la velocidad inicial, es decir, aquella obtenida cuando todavía la cantidad de sustrato consumido es insignificante en relación con el total presente de la mezcla.

Para indicar la actividad de una preparación enzimática se utilizan distintas expresiones. Un modo habitual de indicar la actividad de una enzima es en Unidades Internacionales.

Como ya fuera mencionado anteriormente, en el Trabajo Práctico Aula, la Unidad de cualquier enzima es la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto, bajo condiciones definidas de pH y temperatura.

$$\text{Unidad de enzima} = \frac{\mu\text{mol de sustrato transformado}}{\text{min}}$$

Diversos factores modifican la actividad enzimática, los cuales deben ser tenidos en cuenta para determinar la actividad de enzima presente en una muestra. Entre estos factores, encontramos: concentración de enzima, concentración de sustrato, temperatura, pH, concentración de cofactores y presencia de inhibidores.

### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE INVERTASA DE LEVADURA INFLUENCIA DE pH Y CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO

La invertasa es una enzima clasificada en la clase 3 de las hidrolasas y dentro de éstas en la subclase 3.2 de las glicosidasas, siendo específicamente una  $\beta$ -fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26). El sustrato principal de esta enzima es la sacarosa (disacárido no reductor) y cataliza la siguiente la reacción:



La actividad de la enzima en estudio puede determinarse midiendo la concentración de los productos de hidrólisis (azúcares reductores) mediante el método colorimétrico de Nelson-Somogyi.

#### Obtención de la enzima

La invertasa será obtenida a partir de levadura comercial, mediante lisis celular y suspensión acuosa, quedando en solución. El extracto centrifugado se utiliza sin más purificación.

En un mortero se coloca 5 g de levadura, 0,5 g de fosfato diamónico y 2 ml de tolueno y se disgrega hasta obtener una especie de pasta, perfectamente homogénea. Luego de un reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente, se agrega a la pasta anterior, en pequeñas porciones, 90 ml de agua destilada a 35 °C, procurando deshacer y suspender bien todo el material con el pilón. Nuevamente, dejar reposar durante 15 min., con agitación ocasional. Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 15 min. Decantar

cuidadosamente el sobrenadante que contiene el extracto enzimático. Conservar el sobrenadante del homogenato en hielo hasta su utilización.

### **Determinación de azúcares reductores mediante el método de Nelson y Somogyi**

La cantidad de sustrato transformado en producto (glucosa y fructosa) será determinado mediante un método químico para la determinación de azúcares reductores.

El método de Nelson y Somogyi se basa en la reducción del reactivo cuprotartárico por azúcares reductores dando lugar a la formación de óxido cuproso. Éste último reacciona con el reactivo arsenomolibdico que se reduce a óxidos de molibdeno de color verde azulado, cuya intensidad de absorbancia es proporcional a la cantidad de azúcares reductores presentes.

Para detener la actividad enzimática, una vez cumplido el tiempo de reacción, se separa la enzima por precipitación de todas las proteínas presentes en la muestra. En este caso la desproteización se logra con el agregado de NaOH y  $ZnSO_4$ , el  $Zn(OH)_2$  formado precipita y arrastra a la enzima. Estas muestras se filtran y sobre una alícuota del filtrado se realiza la reacción de color.

### **A) Influencia del pH sobre la actividad de la enzima**

La actividad de la invertasa, como la de todas las enzimas, depende de la composición iónica del medio y muy especialmente del pH. Se estudiará la variación de esa actividad en medios de diferente pH. Para realizar el estudio de la variación de la actividad de una enzima en función de una variable, en este caso el pH, se mantiene constante toda otra variable que afecte la actividad enzimática.

### **Materiales y métodos**

Los reactivos utilizados para determinar el efecto del pH sobre la actividad enzimática son los siguientes:

- Buffer citrato pH = 3,0 -4,5 y 6,0.
- Citrato trisódico 0,1 M, pH = 8,6.
- Sacarosa 0,5 M
- NaOH 0,6 N.
- $ZnSO_4$  0,6 N.
- Reactivo Cuprotartárico.
- Reactivo Arsenomolibdico.



La enzima invertasa será obtenida como se describió previamente, diluida en una relación 1/30, en agua destilada.

**Actividades a desarrollar**

a) En la mesada de trabajo Usted encontrará el material necesario para la experiencia. Ordene y rotule en una gradilla la siguiente serie de tubos de vidrio:

Tubos de reacción	R-1	R-2	R-3	R-4	
Tubos de desproteínizado	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5 (Bco.)
Tubos de filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5

b) Una vez ordenados y rotulados los tubos de vidrio agregar los siguientes reactivos en cada uno de ellos:

Tubo N°	R-1	R-2	R-3	R4
<b>pH aproximado</b>	<b>3,0</b>	<b>4,5</b>	<b>6,0</b>	<b>8,6</b>
Buffer citrato (ml)	5,0	5,0	5,0	-
Citrato trisódico (ml)	-	-	-	5,0
Sacarosa 0.5 M (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0
H <sub>2</sub> O d. (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0
Mezclar y dejar a temperatura ambiente.				
<b>Adicionar a c/tubo con pipeta distinta.</b> Dejando la pipeta en el tubo correspondiente:				
Enzima <b>(1/30)</b> (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
Mezclar.				
Limpiar la pipeta con la mezcla reactiva succionando y liberando el contenido				
Comenzar a contar el tiempo de <b>10 minutos</b>				
<b>Iniciar</b> el protocolo de desproteínizado, en el tiempo de espera.				

c) Para el desproteínizado agregar los reactivos de acuerdo a la siguiente tabla. Una vez realizado el desproteínizado, obtener el filtrado libre de proteínas y realizar la reacción de color final.

Tubos de desproteínizado	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5 (Bco.)
Na(OH) 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<b>Al cabo del tiempo de reacción (10'),</b> extraer 1 ml de mezcla de reacción (con su correspondiente pipeta) y dejarlo caer cerca del fondo de los tubos de desproteínizado D-1, D-2, D-3 y D-4 respectivamente, como se indica a continuación:					
Mezcla reactiva (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	----
ZnSO <sub>4</sub> 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
H <sub>2</sub> O (d) c.s.p. 10 ml.	7,0	7,0	7,0	7,0	8,0
<b>Filtrar</b> Recibiendo en los tubos de filtrado (F), cuyo subíndice debe corresponder al número de tubo del que proviene la mezcla.					
Tubos de Filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5
<b>Tomar 0,5 ml de cada filtrado</b> Trasvasar a los tubos de colorimetría correspondientes, para efectuar la reacción de color.					
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
Filtrado (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Rvo. cuprotartárico (ml)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
<b>Mezclar suavemente</b> <b>Colocar en baño maría hirviente</b> durante 10 min. <b>Enfriar</b> con agua corriente y agregar:					
Rvo. arsenomolibdico (ml)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
H <sub>2</sub> O (d)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Mezclar mediante agitación vigorosa, usando el tapón de goma provisto. Leer absorbancia en espectrofotómetro a 620 nm Utilizar como blanco el tubo N° 5.					

### Resultados y análisis de los resultados obtenidos

Con los datos obtenidos de absorbancia, y utilizando la curva de calibración provista en el anexo de este práctico, completar el siguiente cuadro:

Tubo N°	C-1	C-2	C-3	C-4
pH del medio	3,0	4,5	6,0	7,0
Absorbancia				
μmoles de sacarosa hidrolizada (s h)				
Velocidad inicial (s h ml <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )				

- Graficar velocidad inicial de reacción en función del pH.
- En función de lo graficado determine cuál es el pH óptimo de la enzima. Explícite la razón de su elección, considerando la velocidad de reacción enzimática.

### B) Dependencia de la velocidad de reacción enzimática con la concentración de sustrato

Además del pH del medio, la actividad de la invertasa, es afectada por la disponibilidad de sustrato (sacarosa). Estudiaremos, la variación de la actividad de esta enzima utilizando concentraciones crecientes de sustrato, en un medio buffer acético - acetato de sodio a pH 4,77, y con concentraciones constantes de enzima.

### Materiales y métodos

Los reactivos utilizados para determinar el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática son los siguientes:

- Buffer acético - acetato pH 4,77
- Sacarosa 0,5 M
- Sacarosa 0,05 M
- NaOH 0,6 N
- ZnSO<sub>4</sub> 0,6 N
- Reactivo cuprotartárico
- Reactivo arsenomolibdico

Al igual que en el caso de la experiencia anterior, la enzima invertasa será utilizada diluida en una relación 1/30, en agua destilada.

**Actividades a desarrollar**

a) En la mesada de trabajo Usted encontrará el material necesario para la experiencia. Ordene y rotule en una gradilla la siguiente serie de tubos de vidrio:

Tubos de reacción	R-1	R-2	R-3	
Tubos de desproteínizado	D-1	D-2	D-3	D-4 (Bco.)
Tubos de filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4

b) Una vez ordenados y rotulados los tubos de vidrio, agregar los siguientes reactivos en cada uno de ellos, de acuerdo a la tabla:

Tubo N°	R-1	R-2	R-3
Buffer 0,1M, pH 4,77 (ml)	2,0	2,0	2,0
Sacarosa 0,5 M (ml)	-	-	2,0
Sacarosa 0,05 M (ml)	2,0	4,0	--
H <sub>2</sub> O d. (ml)	5,0	3,0	5,0
Mezclar y dejar a temperatura ambiente.			
<b>Adicionar a c/tubo con pipeta distinta.</b> Dejando la pipeta en el tubo correspondiente:			
Enzima (ml)	1,0	1,0	1,0
Mezclar			
Limpiar la pipeta con la mezcla reactiva succionando y liberando el contenido			
Comenzar a contar el tiempo de <b>10 minutos</b>			
<b>Iniciar</b> el protocolo de desproteínizado, en el tiempo de espera.			

c) Para el desproteínizado agregar los reactivos de acuerdo a la siguiente tabla. Una vez realizado el desproteínizado, obtener el filtrado libre de proteínas y realizar la reacción de color final.

Tubos de desproteínizado	D-1	D-2	D-3	D-4 (Bco.)
Na(OH) 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
<p><b>Al cabo del tiempo de reacción (10'),</b> extraer 1 ml de mezcla de reacción (con su correspondiente pipeta) y descargarlo cerca del fondo de los tubos de desproteínizado D-1, D-2 y D-3 respectivamente, como se indica a continuación:</p>				
Mezcla reactiva (ml)	1,0	1,0	1,0	----
ZnSO <sub>4</sub> 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0
H <sub>2</sub> O (d) c.s.p. 10 ml	7,0	7,0	7,0	7,0
<b>Filtrar</b>				
Recibiendo en los tubos de filtrado (F), cuyo subíndice debe corresponder al número de tubo del que proviene la mezcla				
Tubos de Filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4
<b>Tomar 0,5 ml de cada filtrado</b>				
Trasvasar a los tubos de colorimetría correspondientes, para efectuar la reacción de color.				
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4
Filtrado (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5l
Rvo. cuprotartárico (ml)	0,75	0,75	0,75	0,75
<b>Mezclar suavemente</b>				
<b>Colocar en baño maría hirviente</b> durante 10 min.				
Enfriar bajo agua corriente y agregar:				
Rvo. arsenomolibdico (ml)	0,75	0,75	0,75	0,75
H <sub>2</sub> O (d)	3,0	3,0	3,0	3,0
<b>Mezclar</b>				
<b>Leer absorbancia</b> en espectrofotómetro a 620 nm				
Utilizar como blanco el tubo N° 4.				

### Resultados y análisis de los resultados obtenidos

Con los datos obtenidos de absorbancia, y utilizando la curva de calibración provista en el anexo de este práctico, completar el siguiente cuadro:

Tubo N°	C-1	C-2	C-3	C-4
Concentración de sustrato	0,01 M	0,02 M	0,1 M	0 (blanco)
Absorbancia				
Absorbancia corregida				--
µmoles de sacarosa hidrolizada (s h)				--
Velocidad inicial (s h ml <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )				--

**a)** Graficar los valores de actividad enzimática (V) en función de la concentración de sustrato ([S]).

Estimar el valor aproximado de  $K_m$  a partir de la gráfica.

**b)** Utilizando los valores recíprocos  $1/V$  y  $1/[S]$ , trazar una recta según la ecuación de Lineweaver- Burk.

**c)** Determinar el valor de  $K_m$  a partir de la recta anterior.

### Conclusiones del TPL

A partir de los resultados obtenidos de las experiencias realizadas en el TPL:

- Justifique por qué la enzima posee un valor de pH óptimo para catalizar la reacción química. Investigue cómo y por qué el pH afecta la actividad de las enzimas.
- Mencione la definición de  $K_m$  y especifique por qué es necesario determinar su valor para una enzima determinada, en este caso para la enzima invertasa.
- A partir del valor de  $K_m$  obtenido, ¿qué sucedería con la velocidad de reacción de esta enzima si se utilizaran concentraciones de sustrato por encima o por debajo del valor determinado?

### **Anexo: curva de calibración de glucosa determinada por el método químico de Nelson y Somogyi**

Una curva de calibración es una curva de referencia construida en un sistema de coordenadas a partir de cantidades o concentraciones conocidas de una sustancia que se toma como patrón, estándar, o testigo (eje x), versus un parámetro medible que varía en forma proporcional a esa concentración, por ejemplo: absorbancia (eje y).

Dicha curva se utiliza para determinar la cantidad de una sustancia desconocida presente en una muestra por interpolación a partir del parámetro medido en la muestra. Por ejemplo, es posible determinar la concentración de proteínas en solución, a partir de una curva graficada utilizando como patrón, una solución de concentración conocida de albúmina bovina.

En muchas determinaciones se cumple una relación proporcional entre la magnitud o intensidad de color del producto de una reacción y la cantidad del sustrato presente en la muestra, según la ley de Lambert-Beer.

Si se grafica el valor de absorbancia medido con un espectrofotómetro en función de las concentraciones crecientes de la sustancia patrón se obtiene una recta que permite calcular luego la concentración de dicha sustancia en una muestra determinada.

Los azúcares con propiedades reductoras son aquellos que presentan un grupo cetona o aldehído libre, mediante el cual pueden reaccionar cediendo electrones a otros compuestos. Entre estos azúcares, conocidos en general como "azúcares reductores", se encuentran glucosa, maltosa, lactosa y galactosa. Si se desea determinar la concentración de azúcar reductor en una muestra desconocida, previamente se debe construir una curva de calibración para azúcares reductores utilizando como patrón una solución de glucosa, en concentraciones conocidas y crecientes. Para referir el valor de absorbancia de una muestra desconocida a una curva de calibración, es necesario que en ambas situaciones se utilice el mismo analítico. En el TPL determinaremos la cantidad de azúcares reductores generados luego de la acción enzimática, utilizando el método de Nelson y Somogyi, por lo tanto, la curva de calibración se realizará utilizando los valores de absorbancia de soluciones patrones, determinadas con el mismo método químico.

### **Materiales y métodos**

Sobre una alícuota de solución de glucosa utilizada como patrón (previamente desproteinizadas y filtradas) adicionar el reactivo cuprotartárico, de alcalinidad moderada y mezclar rotando suavemente. Calentar en baño maría hirviendo durante 10 min. Enfriar bajo agua corriente, sin agitación violenta para evitar la reoxidación del  $\text{Cu}_2\text{O}$  por el oxígeno del

aire. En frío agregar el reactivo arsenomolibdico. Leer en espectrofotómetro a 620 nm entre los 15 y 30 minutos después de agregado el reactivo final.

La solución de glucosa que se utiliza como patrón (en cantidades conocidas y crecientes) para realizar la curva de calibración, es tratada con agentes precipitantes de proteínas (NaOH y ZnSO<sub>4</sub>) y luego filtrada. Estos pasos se realizan para igualar las condiciones de reacción con aquellas que se utilizarán en el TPL, para la determinación de la actividad de invertasa.

### Actividades desarrolladas

a) Preparar la siguiente serie de tubos y agregar los reactivos que se indican a continuación:

Tubos Nº	1 (Bco.)	2	3	4	5	6
NaOH 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Glucosa 0,003 M (ml)	-	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ZnSO <sub>4</sub> 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
H <sub>2</sub> O d. (ml)	8,0	7,8	7,6	7,4	7,2	7,0
<b>Mezclar bien y filtrar</b>						
Recibiendo en los tubos de filtrado (F), cuyo subíndice debe corresponder al número de tubo del que proviene la mezcla						
Tubos de filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6
<b>Tomar 0,5 ml de cada filtrado</b>						
Trasvasar a los tubos de colorimetría correspondientes, para efectuar la reacción de color						
Tubos de colorimetría	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Muestra (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Rvo. cuprotartárico	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
<b>Mezclar suavemente</b>						
<b>Colocar en baño maría hirviendo durante 10 min.</b>						
<b>Enfriar con agua corriente y agregar en ml:</b>						
Rvo. arsenomolibdico (ml)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
H <sub>2</sub> O (d)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
<b>Mezclar energicamente</b>						
<b>Leer Absorbancia</b> en espectrofotómetro a <b>620 nm</b> . Utilizar como <b>blanco el tubo Nº 1</b> .						



## Resultados

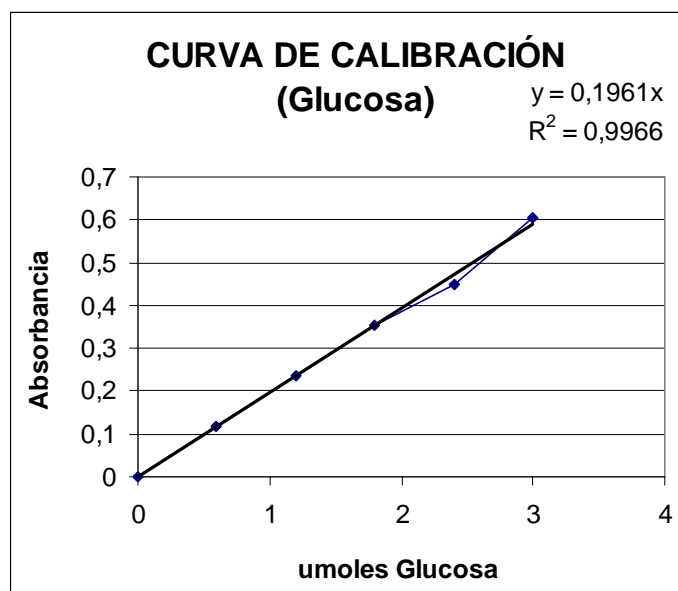
Con los datos obtenidos se grafica **absorbancia** en relación con la **concentración** de glucosa, obteniéndose una recta que pasa por el origen.

Cuando por el efecto de la invertasa sobre sacarosa, se produce una cierta cantidad desconocida de azúcar reductor, ésta puede calcularse por medio de la curva de calibración.

Teniendo en cuenta que las concentraciones finales de glucosa son las siguientes:

Tubo N°	1	2	3	4	5	6
Glucosa ( $\mu$ moles)	0	0,6	1,2	1,8	2,4	3,0
Absorbancia	0	0,117	0,236	0,353	0,448	0,606

Graficamos las lecturas de densidades ópticas versus los  $\mu$ moles de glucosa, obteniendo la siguiente recta con su correspondiente ecuación:



## BIBLIOGRAFÍA

- Nelson, D. & Cox, M. (2008). Lehninger. Principios de Bioquímica. Ed. W. H. Freeman.
- Somogyi M. (1952). Determination of reducing sugars by Nelson-Somogyi method. J. Biol. Chem., 200:245.
- Voet, D., Voet, J G. & Pratt, C. W. (2013). Fundamentos de Bioquímica -4.ed.: La Vida a Nivel Molecular. Ed. Artmed.

## TRABAJO PRÁCTICO DE AULA Nº 2

### TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL. FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

#### Objetivos

- Describir el transporte de electrones a través de aceptores que experimentan cambios reversibles en su estado redox.
- Comprender y explicar los mecanismos de transformación de energía redox en energía química en forma de ATP: fosforilación oxidativa.
- Interpretar la acción de inhibidores y desacoplantes sobre el transporte electrónico.

#### Introducción teórica

En los organismos aeróbicos, las oxidaciones de sustancias provistas por los alimentos constituyen la principal fuente de energía utilizable para efectuar trabajo celular (síntesis químicas, transporte activo a través de membranas, locomoción, etc.).

En los organismos vivos, comúnmente las oxidaciones no se realizan por transferencia directa al oxígeno de los electrones provenientes de los sustratos, sino que se efectúan en etapas sucesivas a través de distintos aceptores de electrones de potencial de reducción creciente. De esta manera, la energía es liberada en forma fraccionada y puede ser captada y utilizada por las células.

Los aceptores de equivalentes de reducción antes mencionados forman complejos con enzimas que catalizan la transferencia de electrones ( $e^-$ ), y se encuentran ubicados en la membrana mitocondrial interna, ordenados en un gradiente de potencial de reducción creciente. Este conjunto de complejos recibe el nombre de *cadena respiratoria* o *cadena de transporte electrónico*.

En las primeras etapas del transporte electrónico se transfieren juntos dos protones y dos electrones del par de hidrógenos cedidos por un sustrato oxidado. Luego los protones quedan en el medio y sólo los electrones continúan su pasaje de un aceptor a otro hasta el aceptor final que es el oxígeno.

En la matriz mitocondrial se encuentran las enzimas deshidrogenasas ligadas a NAD que oxidan sus sustratos generando  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , los equivalentes de reducción ( $\text{H} + e^-$ ) son cedidos por la coenzima a la cadena respiratoria, ésta última integrada por los siguientes componentes (fig. 2.1 y 2.2):

**a) *NADH-ubiquinona reductasa* (complejo I):** contiene flavina mononucleótido (FMN) y 5 a 8 centros ferrosulfurados. Los equivalentes de reducción de NADH son captados por la

coenzima FMN que se convierte en FMNH<sub>2</sub>, a continuación, pasan e<sup>-</sup> sucesivamente por los átomos de Fe<sup>3+</sup> de los centros Fe-S, que captan reversiblemente e<sup>-</sup>. Finalmente, los H<sup>+</sup> y e<sup>-</sup> son cedidos a la coenzima Q. Durante el pasaje sucesivo de los e<sup>-</sup>, se reoxidan el FMNH<sub>2</sub> y los átomos de hierro de las proteínas Fe-S y se reduce la CoQ a CoQH<sub>2</sub>.

**b) Succinato-ubiquinona reductasa** (complejo II): Este complejo utiliza como coenzima flavina adenina dinucleótido (FAD) y posee 3 centros Fe-S. Recibe dos equivalentes de reducción del succinato y los trasfiere a la Coenzima Q.

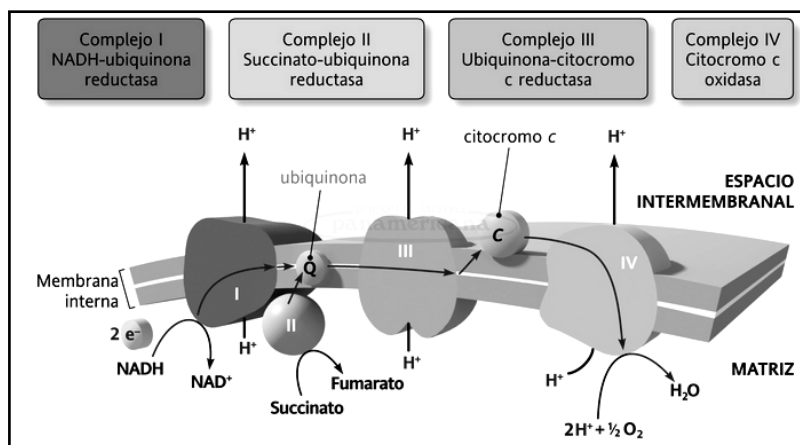
**c) Coenzima Q o ubiquinona:** Este es el único aceptor del sistema de transporte electrónico no unido a proteínas. Su larga cadena isoprenoide hidrófoba, le permite alojarse en la bicapa lipídica de la membrana y actuar en ella como un portador móvil de e<sup>-</sup>. Recibe equivalentes de reducción que proceden tanto de sustratos oxidados por enzimas dependientes de NAD y transferidos a través del complejo NADH-ubiquinona reductasa, como también de sustratos oxidados por enzimas ligadas a FAD. La CoQH<sub>2</sub> cede dos e<sup>-</sup> al complejo ubiquinona-citocromo reductasa y deja dos protones libres en el medio.

**d) Ubiquinona-citocromo c reductasa** (complejo III): contiene los citocromos b<sub>566</sub>, b<sub>562</sub>, c<sub>1</sub> y un centro Fe-S. Los citocromos son hemoproteínas en las cuales el Fe del hemo capta reversiblemente un electrón. Desde la ubiquinona-citocromo reductasa, los e<sup>-</sup> son transferidos al citocromo c.

**e) Citocromo c:** es una hemoproteína ubicada sobre la cara exterior de la membrana interna mitocondrial y entrega electrones al complejo citocromo oxidasa.

**f) Citocromo oxidasa** (complejo IV): posee dos citocromos (a y a<sub>3</sub>) y dos átomos de Cu. Transfiere electrones al O<sub>2</sub>. Una molécula de oxígeno capta 4 e<sup>-</sup> y se activa, uniéndose a 4H<sup>+</sup> para dar dos moléculas de H<sub>2</sub>O.

En la etapa final de la cadena respiratoria, una molécula de oxígeno es reducida totalmente por 4 e<sup>-</sup>, la reducción parcial da lugar a la formación de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) o peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), los cuales son tóxicos. La interacción entre O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> forma radicales hidroxilo (HO<sup>·</sup>), altamente activos. Los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y radicales libres se mantienen muy bajos en los tejidos gracias a sistemas de defensa: enzimas como superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasas (la primera cataliza la eliminación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y las demás de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Además de sistemas enzimáticos existen sustancias antioxidantes como el tocoferol o vitamina E y los carotenos (provitamina A).



**Figura 2.1.** Transporte de electrones a lo largo de la cadena transportadora de electrones. Feduchi y cols. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2011. Ed. Panamericana.

### Fosforilación oxidativa

Una de las funciones principales de las mitocondrias es la de transformar la energía de óxido-reducción que se obtiene al degradar los alimentos, en energía química de enlaces de anhídrido de ácido del ATP. La síntesis de ATP mitocondrial se realiza en condiciones aeróbicas, principalmente durante la oxidación completa de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. Los restos carbonados de estos compuestos ingresan al ciclo de Krebs, principalmente como acetil-CoA y también como otros intermediarios, los cuales al ser oxidados hasta  $CO_2$  y  $H_2O$ , producen a través de deshidrogenasas, equivalentes de reducción (hidrógenos y  $e^-$ ) que son transportados a través de la cadena respiratoria hasta el  $O_2$ , para formar agua.

La *fosforilación oxidativa* es el proceso en el cual se utiliza la energía liberada durante el transporte electrónico para la síntesis de ATP. La hipótesis quimiosmótica explica el mecanismo mediante el cual ocurre este proceso (fig. 2.3): la energía redox del transporte electrónico se utiliza para expulsar  $H^+$  al exterior de la matriz mitocondrial, formándose un gradiente de concentración y eléctrico. Cuando los  $H^+$  retornan a la matriz mitocondrial, solamente lo pueden hacer a través de la fracción  $F_o$  del complejo  $F_1-F_o$  (ATP sintasa), debido a que la membrana mitocondrial interna es impermeable a estos iones. Dos protones ingresan a través de la proteína  $F_o$  que provee un canal iónico a través de la bicapa lipídica y al llegar a la fracción  $F_1$ , se activa la ATP sintasa catalizando la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico ( $P_i$ ).

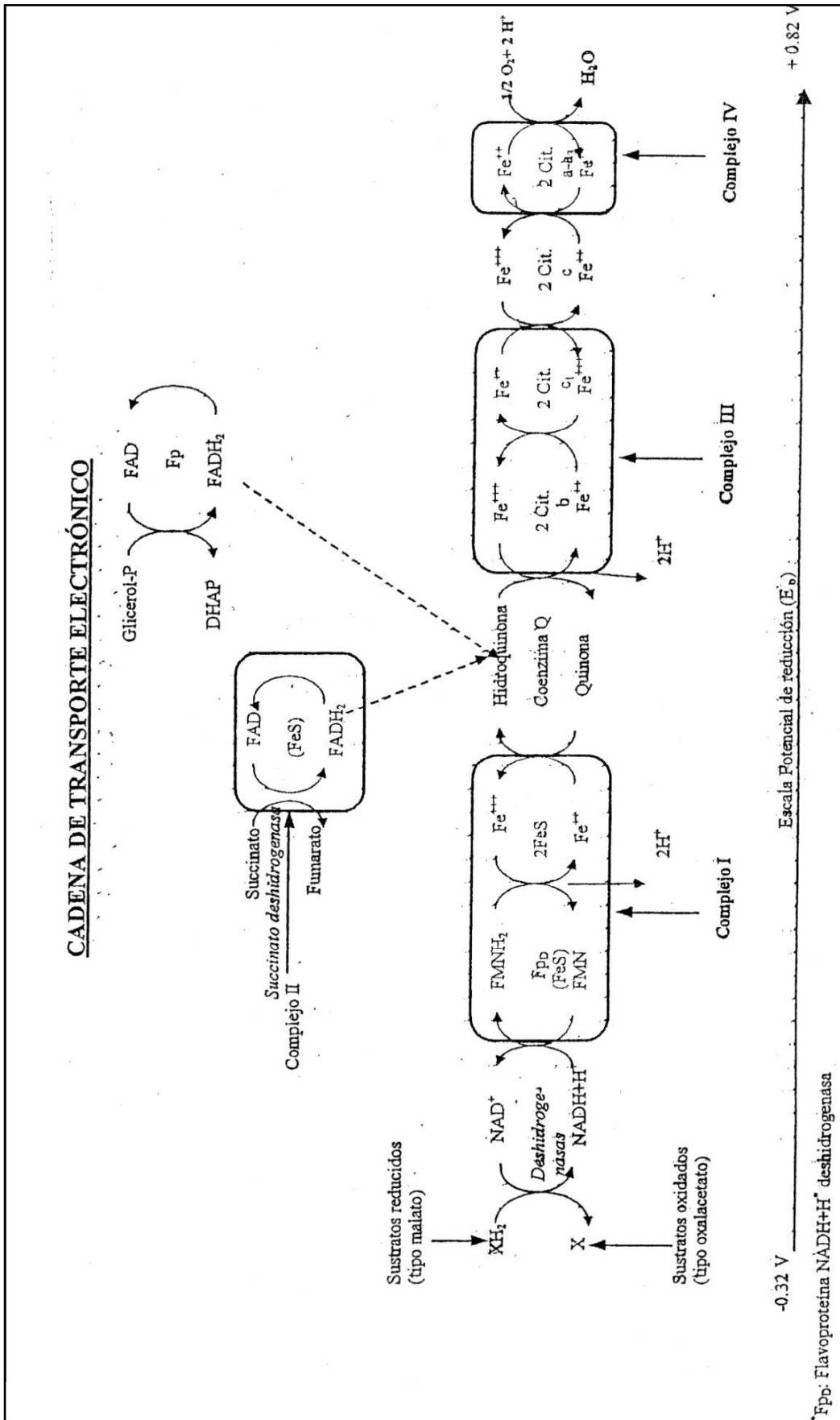
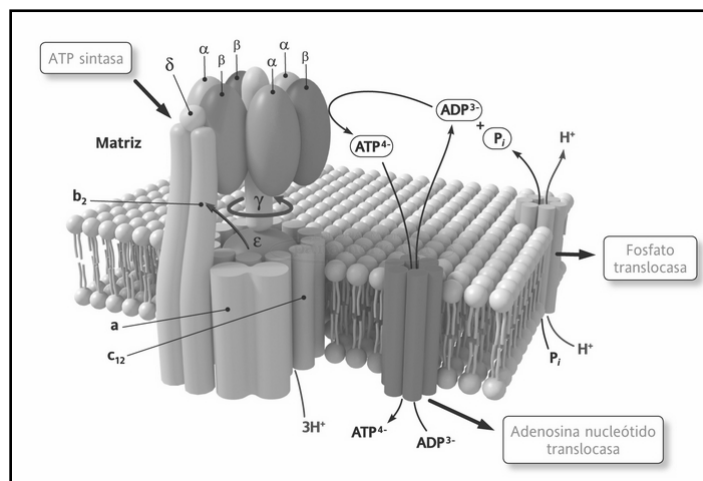


Figura 2.2. Esquema de los componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.



**Figura 2.3.** Estructura de la ATP Sintasa, del translocador ATP/ADP y el simporter  $P_i/H^+$ . Feduchi y cols. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2011. Ed. Panamericana.

### Relación fósforo/oxígeno (P/O)

La relación P/O se refiere al número de moléculas de ATP sintetizadas por moléculas de oxígeno consumido. Esta relación surge a partir de experimentos en los cuales se medía el consumo de oxígeno y fósforo inorgánico ( $P_i$ ) por parte de mitocondrias en presencia de diferentes sustratos oxidables.

Cuando los sustratos utilizados son oxidados por deshidrogenasas NAD dependientes (ej.: malato), se estimó que la relación entre moléculas de fosfato y átomos consumidos (P/O) es igual a tres. Esto indicaría que, por cada par de hidrógenos o electrones transferidos a lo largo de la cadena de transporte de electrones, se unen tres moléculas de  $P_i$  a tres de ADP. En otras palabras, el flujo de un par de electrones permitiría la síntesis de tres moléculas de ATP.

Cuando se utilizaban sustratos oxidables por deshidrogenasas flavina dependientes (ej.: succinato), la relación P/O era igual a dos. La producción de ATP sería de dos moléculas por cada par de electrones transferidos.

Estas observaciones indicaban que uno de los sitios de producción de ATP estaba asociado a la NADH-ubiquinona reductasa, pues cuando los equivalentes de reducción ingresaban por otra vía ( $FAD \longrightarrow CoQ$ ), el rendimiento era menor en un ATP.

### Inhibidores del transporte electrónico y/o de la síntesis de ATP

Algunos agentes actúan inhibiendo la transferencia de electrones y, consecuentemente impidiendo la síntesis de ATP, debido a que el proceso de fosforilación

oxidativo se encuentra acoplado al transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria.

Compuesto	Comentario	Modo de Acción
Rotenona Amital	Insecticida Barbitúrico: induce el sueño	Impiden la transferencia electrónica desde Fe-S a la CoQ
Antimicina A	Antibiótico	Bloquea la transferencia electrónica desde cit. b a cit. c <sub>1</sub>
Cianuro Monóxido de carbono		Inhiben la citocromo oxidasa

A diferencia de los inhibidores del transporte de electrones, otros inhibidores bloquean directamente la fosforilación, pero al estar el sistema fuertemente acoplado, el transporte de electrones eventualmente se bloquea.

Compuesto	Comentario	Modo de acción
Oligomicina	Antibiótico	Bloquea el flujo de protones a través de la subunidad F <sub>0</sub> de la ATP sintasa.

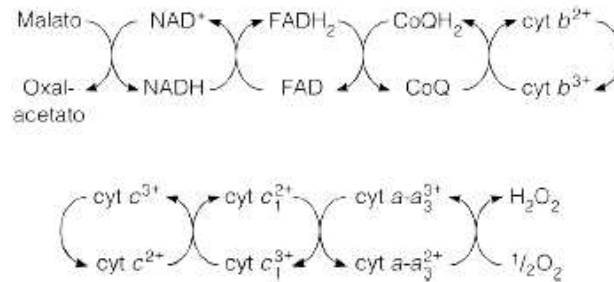
### Desacoplantes

Los desacoplantes son compuestos que desconectan el acoplamiento que existe entre el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa, impidiendo la síntesis de ATP, pero sin inhibir el flujo de electrones hacia el O<sub>2</sub>. Ejemplo: 2,4-dinitrofenol y dicumarol.

Estos agentes son sustancias liposolubles que disminuyen el gradiente de protones formado por el transporte electrónico, haciendo ingresar protones a la matriz mitocondrial a través de la membrana interna, comportándose como ionóforos o transportadores de protones disipando la fuerza motriz - protónica y de esta manera, inhiben la síntesis de ATP.

**PROBLEMAS DE APLICACIÓN**

1) Teniendo en consideración los componentes de la cadena respiratoria y la siguiente representación del transporte electrónico mitocondrial, identifique cuatro errores deliberados. Justifique la corrección sugerida:



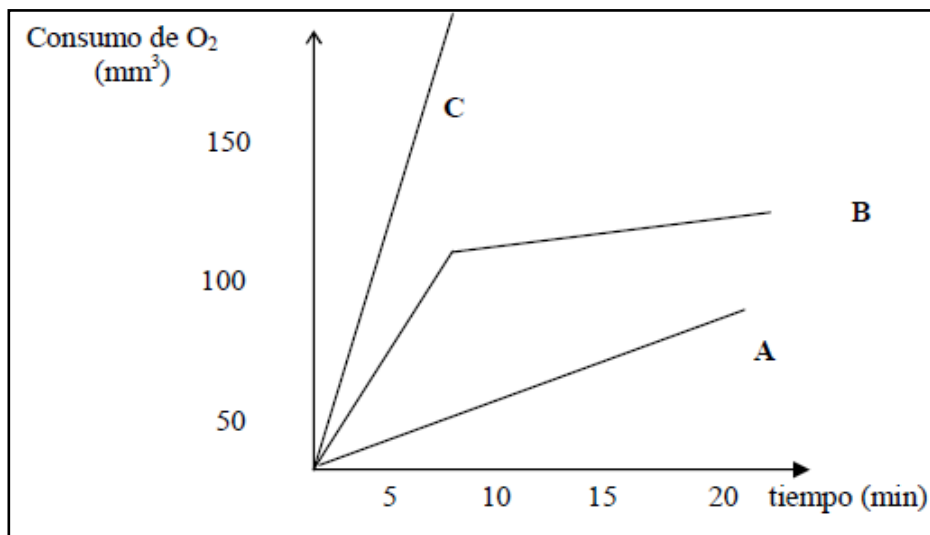
- I)
- II)
- III)
- IV)

2) El consumo de O<sub>2</sub> fue medido en tres vasos de Warburg que contenían lo siguiente:

VASO A	VASO B	VASO C
Mitocondrias de hígado de rata	Ídem A	Ídem A y B
21 μmoles de α-cetoglutarato	+ Hexoquinasa de levadura	+ 2,4-dinitrofenol
30 μmoles de fosfato	+ 35 μmoles de glucosa	
ADP, citocromo c y MgSO <sub>4</sub>		

A partir de las mediciones, se graficaron las siguientes curvas con los resultados indicados. Explique la variación del consumo de O<sub>2</sub> en función del tiempo observada en cada una de las curvas graficadas, de acuerdo a los componentes agregados en cada vaso de Warburg.





3) Un laboratorio farmacéutico envía muestras de dos inhibidores (A y B) para caracterizarlos como posibles antibióticos. Utilizando una preparación de mitocondrias de hígado incubada con piruvato, O<sub>2</sub>, ADP y Pi se observó lo siguiente:

Agregando a la preparación Inhibidor A se bloquea el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa.

Una vez producida la inhibición se agrega a la mezcla el Inhibidor B y se observó que se restablecía el transporte electrónico, pero no la fosforilación oxidativa.

- ¿Cómo clasificaría estos inhibidores teniendo en cuenta su modo de acción en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa?
- Nombre inhibidores conocidos que podrían actuar del mismo modo.

4) Cuatro transportadores: a, b, c y d, cuyas formas reducidas y oxidadas pueden ser distinguidas espectrofotométricamente, se requieren para la respiración en un sistema de transporte de electrones bacteriano. En presencia de sustrato y oxígeno, tres inhibidores diferentes bloquean la respiración, obteniéndose los patrones de los estados de oxidación que aparecen en la Tabla. ¿Cuál es el orden de los transportadores en la cadena desde los sustratos hasta el oxígeno? Considerar que los inhibidores son agregados de manera independiente.

Inhibidor	a	b	c	d
1	+	+	-	+
2	-	-	-	+
3	+	-	-	+

Tabla: Efecto de los inhibidores sobre los niveles de oxidación de los transportadores en una vía hipotética de transporte de electrones (+ y - indican las formas totalmente oxidadas y reducidas, respectivamente).

5) El siguiente gráfico muestra el trazado obtenido en un oxígrafo al incubar partículas submitocondriales a 30°C y a pH 7,5. De acuerdo al mismo, caracterice cada uno de los compuestos agregados secuencialmente (B, C, E, F, G, H). Justifique brevemente el efecto de cada compuesto sobre la velocidad de consumo de O<sub>2</sub> y la fosforilación oxidativa.

**B:** ADP + Pi u Oligomicina

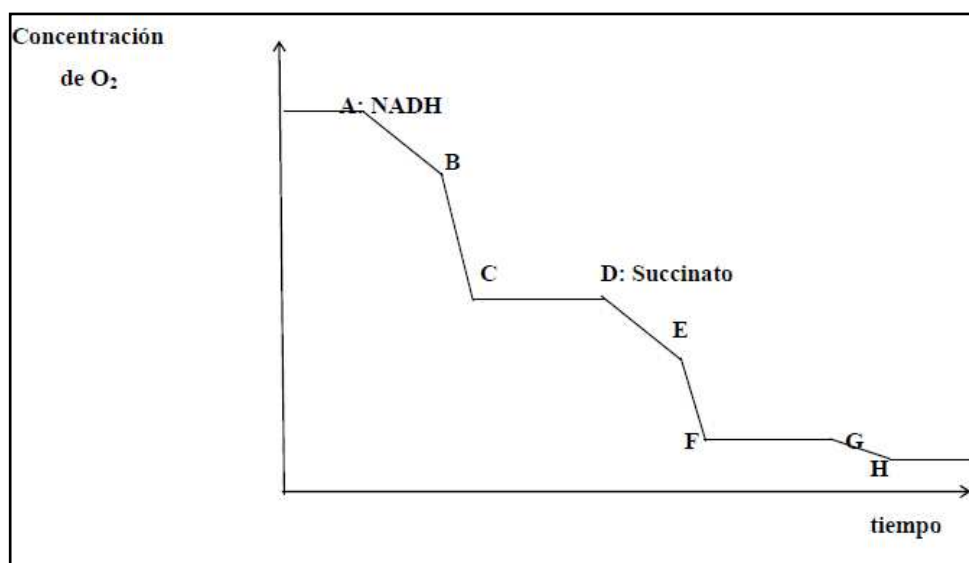
**C:** Rotenona o Antimicina

**H:** CN<sup>-</sup> o Amital

**F:** Malonato o Succinato

**G:** Malonato o Succinato

**E:** 2,4-DNF u Oligomicina



6) Considerando el translocador mitocondrial ADP-ATP y el simporter Pi-H. Explique cómo la actividad de estos dos transportadores afectan el gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial.

## GUÍA DE ESTUDIO

### Transporte electrónico

Localización de las enzimas. Deshidrogenasas piridina-dependientes y flavina-dependientes, ubiquinona, citocromos. Clases de enzimas y transportadores. Complejos.

. ¿Cómo están ubicados respecto al valor de su potencial de reducción? ¿A qué nivel de la cadena actúan los inhibidores? ¿En qué estado redox (oxidado o reducido) se encuentran los intermediarios cuando actúan los inhibidores?

## Centros de conservación de la energía para la fosforilación oxidativa. Fosforilación oxidativa

- ¿Dónde están ubicados los centros proveedores de energía para la fosforilación?
- Hipótesis quimiosmótica.

### Acción de inhibidores y desacoplantes

¿Cómo actúan las sustancias desacoplantes, los inhibidores del transporte y los ionóforos? Ejemplos de cada uno de ellos.

. En presencia de un desacoplante ¿qué ocurriría respecto a: la concentración de Pi, la velocidad de oxidación, transporte de electrones, producción de calor, concentración de ADP mitocondrial, relación P/O?

. Cuando un sustrato es oxidado por una deshidrogenasa que posee FAD como grupo prostético ¿Cómo es la relación P/O en ausencia de inhibidores, en presencia de cada uno de los inhibidores conocidos por separado o en presencia de desacoplantes?

¿Qué ocurriría si en el caso anterior el sustrato es oxidado por una deshidrogenasa que posee NAD como coenzima?

## BIBLIOGRAFÍA

- **Blanco, A. & Blanco, G. (2006)**. Química Biológica. Ed. El Ateneo.
- **Feduchi, E., Blasco, I., Romero, C.S., & Yáñez, E. (2011)**. Bioquímica. Conceptos esenciales. Panamericana.
- **Harvey, R. A. & Ferrier, D. R. (2011)**. Biochemistry (Lippincott Illustrated Reviews Series). Biochemistry (Lippincott Illustrated Reviews Series), 40, 30888.
- **Nelson, D. & Cox, M. (2008)**. Lehninger. Principios de Bioquímica. Ed. W. H. Freeman.
- **Stryer, L. (2013)**. Bioquímica. Ed. Reverté.

**TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº 2**  
**TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL. FOSFORILACIÓN OXIDATIVA**

**Objetivos**

- Demostrar experimentalmente el transporte electrónico mitocondrial en una muestra de tejido animal.
- Comprobar empíricamente la inhibición competitiva de la enzima succinato deshidrogenasa.

**Introducción teórica**

En este trabajo de laboratorio se estudiará el funcionamiento de una porción de la cadena respiratoria, utilizando succinato como sustrato y azul de metileno como indicador. También en esta experiencia se verificará el efecto inhibitorio del malonato sobre la cadena respiratoria.

Existen algunas sustancias orgánicas no fisiológicas como el azul de metileno, que pueden intercalarse en la secuencia de reacciones de la cadena respiratoria, aceptando los electrones provenientes de la oxidación del sustrato. Estas sustancias son de enorme utilidad para estudiar la organización de la cadena respiratoria.

El azul de metileno es una sustancia auto-oxidante, es decir, puede ser oxidada directamente por el oxígeno molecular adquiriendo un color azul intenso. Al reducirse por captación de hidrógeno, el azul de metileno se decolora.

Aprovechando esta característica del azul de metileno, cuyo potencial de óxido reducción ( $E^0$ ) es + 0,01 v, es posible estudiar la oxidación del ácido succínico a ácido fumárico ( $E^0 = - 0,030$ ), reemplazando a la CoQ como aceptor de electrones por el azul de metileno. La velocidad de decoloración del azul de metileno proporciona una indicación de la actividad de la succínico deshidrogenasa (utiliza FAD como grupo prostético) que cataliza la reacción. La acción de inhibidores sobre esta enzima puede estudiarse comparando el tiempo de decoloración del azul de metileno con el tiempo de decoloración habitual, en ausencia del inhibidor.

## Materiales y métodos

### Obtención del extracto enzimático

En este TPL, utilizaremos corazón fresco vacuno para obtener un homogenato en cuyo sobrenadante se encuentran entre otras, las enzimas de la cadena de transporte electrónico. En este sentido, se pesan 16 g del órgano, se corta en trozos pequeños y se homogeneiza en una licuadora fría junto con 40 ml de buffer fosfato, pH 7,4. Este preparado se centrifuga durante 10 min a 4000 r.p.m. y se reserva el sobrenadante en hielo para la realización de la experiencia.

### Demostración del funcionamiento de una porción de la cadena respiratoria

En este trabajo práctico, ensayaremos el transporte electrónico mitocondrial a través de la captación de hidrógenos por el azul de metileno y la inhibición de la succinato deshidrogenasa utilizando Malonato. Para ello, utilizaremos los siguientes reactivos:

- Succinato de sodio 0,1 M
- Azul de metileno 0,001 M (diluido 1/100)
- Buffer fosfato pH 7,4
- Malonato de sodio 0,05 M
- Vaselina líquida

El extracto enzimático, obtenido como se describió más arriba, contiene la enzima succinato deshidrogenasa.

### Actividades a desarrollar

En la mesada de trabajo Usted encontrará todo el material y reactivos necesarios para la experiencia. Ordene y rotule los tubos de acuerdo a la siguiente tabla y agregue los correspondientes reactivos, considerando las instrucciones “antes de agregar la enzima”.

TUBO	1	2	3	4	5
Succinato de sodio (ml)	0,9	-----	0,9	0,9	0,9
Buffer pH 7,4 (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Malonato de sodio (ml)	----	----	0,2	----	----
Agua destilada (ml)	2,1	2,0	0,9	1,1	1,1
Azul de metileno (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Succinato deshidrogenasa (extracto enzimático)	----	1,0	1,0	1,0	1,0

**\*ANTES DE AGREGAR LA ENZIMA LEER LAS SIGUIENTES INSTRUCCIONES**

**Tubo N° 2:** agregar la cantidad de enzima que se indica. Mezclar por inversión y colocar suavemente 1,0 ml de vaselina líquida. Tapar enseguida, con un tapón de goma y dejarlo en reposo. Proceder de la misma forma con el resto de los tubos.

**Tubo N° 5:** agregar la cantidad de enzima que se indica. Mezclar por inversión. **NO se le agrega vaselina ni se lo tapa.** Al decolorarse el tubo N° 5, agítelo y observe.

Después de decolorarse el **tubo N° 4** y habiéndose constatado la inhibición en el **tubo N° 3**, agregar a éste, 0,9 ml de succinato de sodio para comprobar la inhibición competitiva con **malonato de sodio.**

**Resultados y análisis de los resultados**

- a) Registre el tiempo que demora en decolorarse el azul de metileno en cada tubo.
- b) Teniendo en cuenta la decoloración o no del azul de metileno en cada uno de los tubos, fundamente los resultados obtenidos. Considere las recomendaciones “antes de agregar la enzima” para deducir el efecto de cada una de las recomendaciones con los resultados obtenidos.

**Conclusiones del TPL**

-De acuerdo a los resultados obtenidos, cómo ordenaría los componentes de la porción de la cadena de transporte electrónico estudiada, incluyendo el azul de metileno. ¿En qué se basaría para realizar dicho ordenamiento?

-¿Cómo demostró el efecto inhibitorio competitivo de malonato? ¿Qué efectos generales ejercen los inhibidores de la cadena de transporte de electrones sobre el transporte de equivalentes de reducción y la fosforilación oxidativa?

**BIBLIOGRAFÍA**

- **Blanco, A. (2006).** Química Biológica. Ed. El Ateneo.
- **Rodríguez Cavallini, E., Gamboa Coronado, M. M., Hernández Chavarría, F. y García Hidalgo, J. D. (2005).** Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio. Ed. Universidad de Costa Rica.

**TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N°3:  
METABOLISMO. METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO. PARTE I**

**Objetivos**

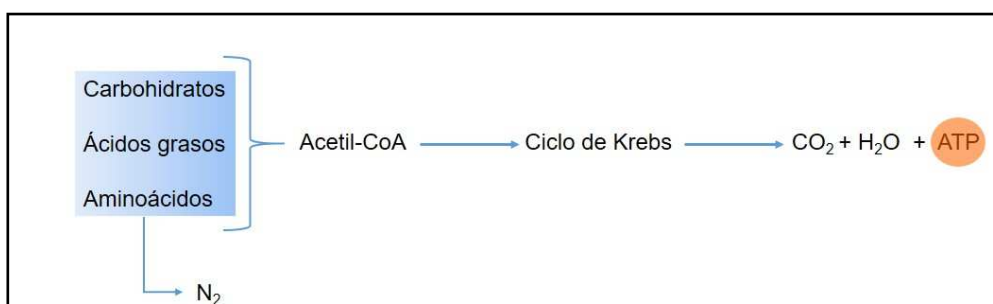
- Analizar y comprender los procesos de catabolismo y anabolismo.
- Conocer las reacciones enzimáticas, mecanismos de regulación, balance energético de la vía glicolítica.
- Analizar el desarrollo de la vía glicolítica en condiciones de presencia de oxígeno y el desarrollo de los procesos de fermentación.

**Introducción teórica**

El metabolismo es el conjunto de todas las reacciones químicas que tienen lugar en las células y tejidos de los seres vivos. Se suele usar el término de “Metabolismo Intermedio” a las transformaciones que ocurren dentro de la célula. Las reacciones del proceso de digestión, previo a la absorción de sustancias en el tracto gastrointestinal, son consideradas reacciones pre-metabólicas.

Se denomina catabolismo a la fase de degradación en la cual las moléculas orgánicas nutrientes se convierten en productos más pequeños y sencillos. Durante el catabolismo se produce energía libre, parte de la cual se conserva como ATP. Es un proceso que tiene naturaleza oxidativa, siendo el NAD el principal agente de transferencia de equivalentes de reducción. En general las vías catabólicas son rutas convergentes, donde a partir de distintos nutrientes se genera un intermediario común que termina oxidándose por completo a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Por ejemplo: los carbohidratos, los ácidos grasos o aminoácidos se convierten en Acetil-CoA y este intermediario es oxidado completamente a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en el ciclo de Krebs, generándose poder reductor que es utilizado para la síntesis de ATP (fosforilación oxidativa).

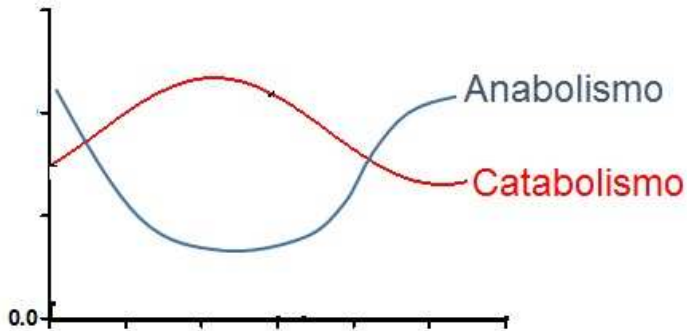
Por otra parte, el anabolismo es la fase de biosíntesis del metabolismo, en la cual



precursores sencillos y pequeños se integran a moléculas más grandes. Un ejemplo es la obtención de polisacáridos a partir de glucosa. Son procesos o transformaciones endergónicas que utilizan ATP y liberan ADP + Pi.

Los procesos metabólicos de degradación (catabolismo) y de síntesis (anabolismo) se encuentran en equilibrio dinámico. En los mamíferos, como el hombre, existe una oscilación diaria entre ambos procesos:

Anabolismo: período de “riqueza”: se almacena glucosa como glucógeno y almidón; ácidos grasos como triglicéridos y lípidos complejos.

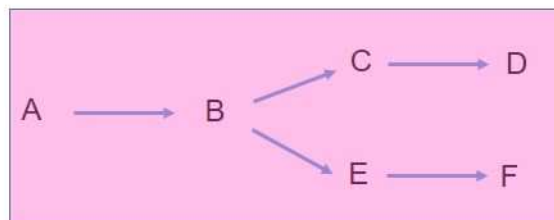


Catabolismo: período de movilización. Degradación de las reservas de carbohidratos o ácidos grasos. Ejemplo: Vía Glicolítica y Ciclo de Krebs (oxidación de la glucosa).

Las rutas metabólicas a veces son lineales, en ellas el sustrato inicial por acción de distintas enzimas se convierte, en reacciones subsiguientes, en un producto final.

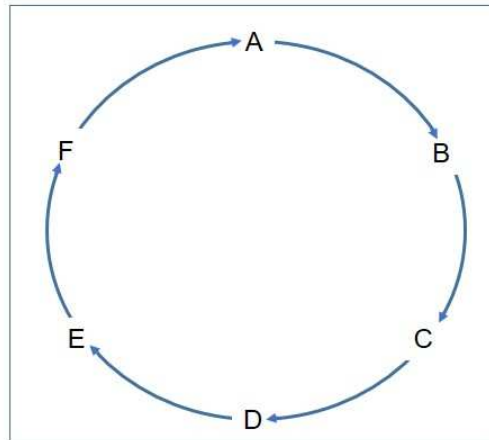


También existen rutas metabólicas **ramificadas**, donde a partir de un sustrato se pueden obtener dos o más productos finales:





Otra clase de ruta metabólica son las rutas cíclicas, donde uno de los componentes iniciales se regenera. Un ejemplo clásico de este tipo de rutas es el ciclo de Krebs.



### Regulación metabólica

Las rutas metabólicas están reguladas a tres niveles:

- La forma de regulación más inmediata es a través de las **enzimas alostéricas**, que pueden cambiar la actividad catalítica en respuesta a moduladores (estimuladores o inhibidores).
- En organismos superiores, las **hormonas** coordinan las actividades metabólicas de diferentes tejidos.
- Las células son capaces de regular la **cantidad** de distintas **enzimas**, modificando el equilibrio entre la velocidad de síntesis y degradación de la misma.

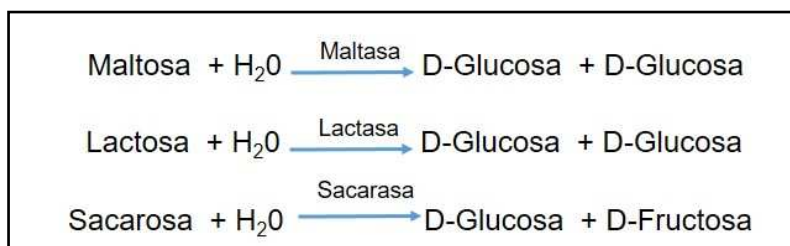
## METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO

### Introducción teórica

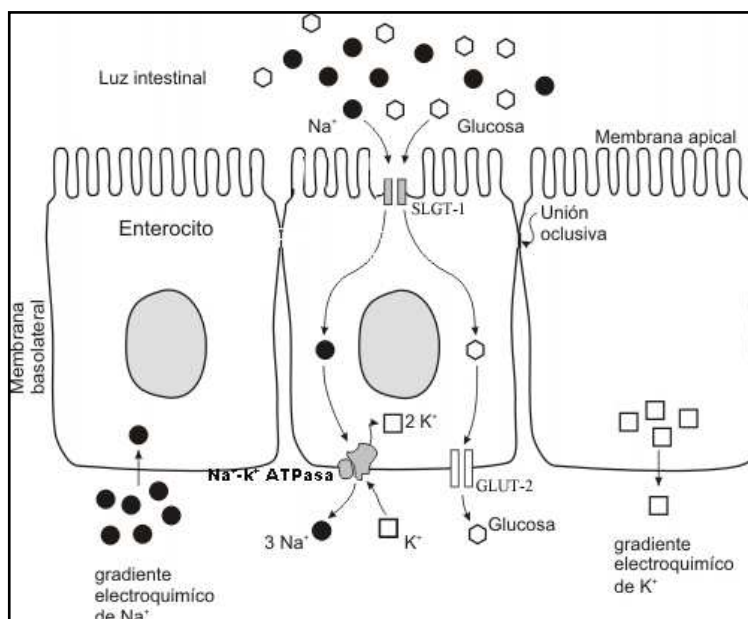
Los hidratos de carbono susceptibles de ser degradados por los microorganismos, plantas y animales, son numerosos y variados. En los microorganismos el almidón y la celulosa no pueden penetrar en la célula y son escindidos por exoenzimas, enzimas hidrolíticas excretadas por los microorganismos al medio. En los vertebrados, los hidratos de carbono más frecuentemente ingeridos con la dieta son glucógeno, almidón, sacarosa, lactosa, glucosa y fructosa.

En los vertebrados, el proceso de digestión de los polisacáridos (etapa pre-metabólica) comienza en la boca por acción de amilasa salival o ptialina, una endoenzima, que actúa hidrolizando las uniones  $\alpha$ -1,4-glicosídicas, separando restos de maltosa. Una vez que el bolo alimenticio llega al estómago, el pH ácido del mismo inactiva la enzima, por lo

que su acción es muy breve. Por acción del jugo gástrico que segrega el estómago, el bolo alimenticio se transforma en quimo (líquido espeso y ácido), que luego llega al duodeno. A través del conducto pancreático, la amilasa pancreática alcanza la luz del intestino y allí cataliza la hidrólisis de las uniones  $\alpha$ -1,4-glicosídicas de los polisacáridos, que son digeridos completamente en presencia de la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa. Los productos finales de la actividad de estas enzimas son maltosas, maltotriosas y dextrinas límites, que a su vez, son hidrolizados hasta glucosa libre por acción de enzimas del borde en cepillo de la mucosa intestinal. Por ejemplo, la isomaltasa cataliza la hidrólisis de uniones  $\alpha$ -1,6 de la dextrina límite y  $\alpha$ -1,4-en maltosa. Sobre los disacáridos actúan disacaridasas: maltasa, sacarasa, lactasa.



Los únicos hidratos de carbono que pueden ser absorbidos por las células de la mucosa intestinal son los monosacáridos. La glucosa y la galactosa comparten el mismo sistema de transporte en la membrana del borde en cepillo. Este sistema es llamado SGLT1, un transportador activo secundario dependiente de Na<sup>+</sup>. El sistema es impulsado por el gradiente de Na<sup>+</sup> creado por la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- ATPasa situada en la membrana basolateral de los enterocitos (fig. 3.1).



**Figura 3.1.** Representación esquemática del mecanismo de co-transporte  $\text{Na}^+$ /glucosa en el epitelio intestinal.

## VÍA GLICOLÍTICA

### Introducción teórica

La glucosa es el principal combustible de la mayor parte de los organismos. Este compuesto tiene la propiedad de ser muy rico en energía y puede ser movilizado rápidamente desde las reservas cuando el organismo sufre demandas de energía.

La vía glicolítica o glucólisis es la ruta principal del catabolismo de la glucosa, y se lleva a cabo no solamente en plantas y animales, sino también en muchos microorganismos. De acuerdo con una de las teorías del inicio de la vida, los organismos vivos surgieron inicialmente en una atmósfera que carecía de  $\text{O}_2$  y la degradación anaeróbica de la glucosa es el tipo de mecanismo biológico más antiguo para obtener energía. Algunas levaduras, microorganismos anaeróbicos, células que carecen mitocondrias (como los eritrocitos) y el músculo en contracción durante el ejercicio intenso, dependen totalmente de esta vía para obtener energía.

Durante la vía glicolítica o Vía de Embden- Meyerhof una molécula de glucosa, que posee seis átomos de carbono, se degrada enzimáticamente a través de una secuencia de reacciones para dar dos moléculas de piruvato, que poseen tres átomos de carbono cada una. Durante esta secuencia de reacciones gran parte de la energía liberada se conserva en forma de ATP (fig. 3.2). La secuencia de reacciones se ha conservado y son similares en

vertebrados, levaduras y vegetales, sólo difiere de una especie a otra en algún detalle de regulación y el destino posterior del piruvato.

La glucólisis se produce en el citoplasma celular. Las cinco primeras reacciones constituyen la fase preparatoria, donde se fosforila la glucosa y se incorporan a la vía las cadenas carbonadas de otros monosacáridos. En la fase de generación de energía o beneficio, se producen etapas de óxido-reducción y se conserva la energía en forma de ATP.

Todos los intermediarios están fosforilados y por consiguiente ionizados a pH 7 lo que les confiere carga negativa. Como las membranas celulares son generalmente impermeables a las moléculas que poseen una carga eléctrica, los intermediarios glicolíticos no pueden salir de la célula. La glucosa puede ingresar a la célula, y el lactato y el piruvato pueden salir de ella, solamente porque en la membrana celular existen sistemas de transporte específicos que permiten estos pasajes. Los grupos fosfatos son compuestos esenciales en la conservación de la energía metabólica, ya que en último término son transferidos al ADP para dar ATP, además estos grupos químicos sirven de unión para el acoplamiento adecuado de los intermediarios glicolíticos a los sitios activos de las enzimas correspondientes. Una característica importante de casi todas las enzimas de la vía glicolítica es que requieren magnesio ( $Mg^{+2}$ ) para ejercer su actividad.

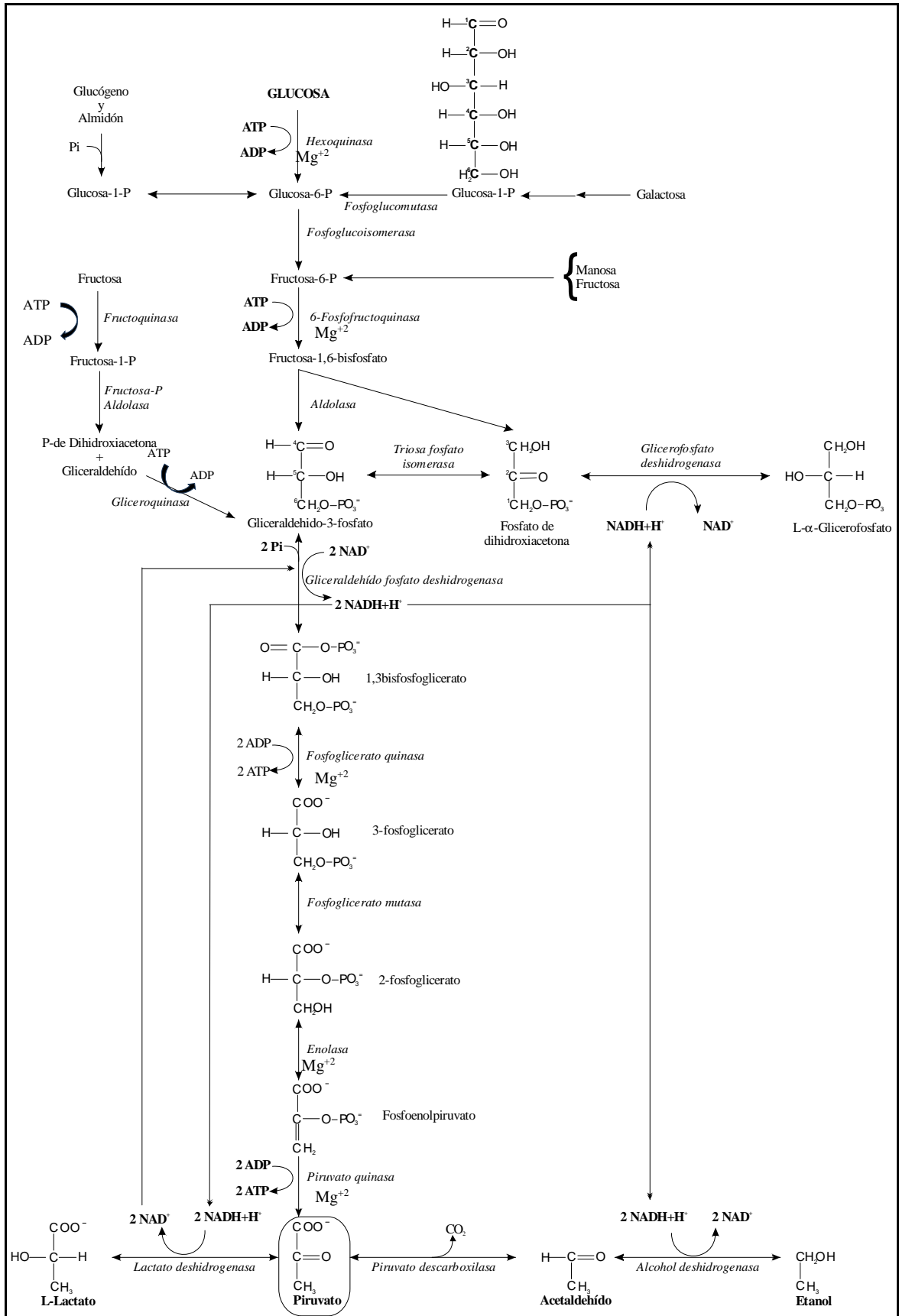
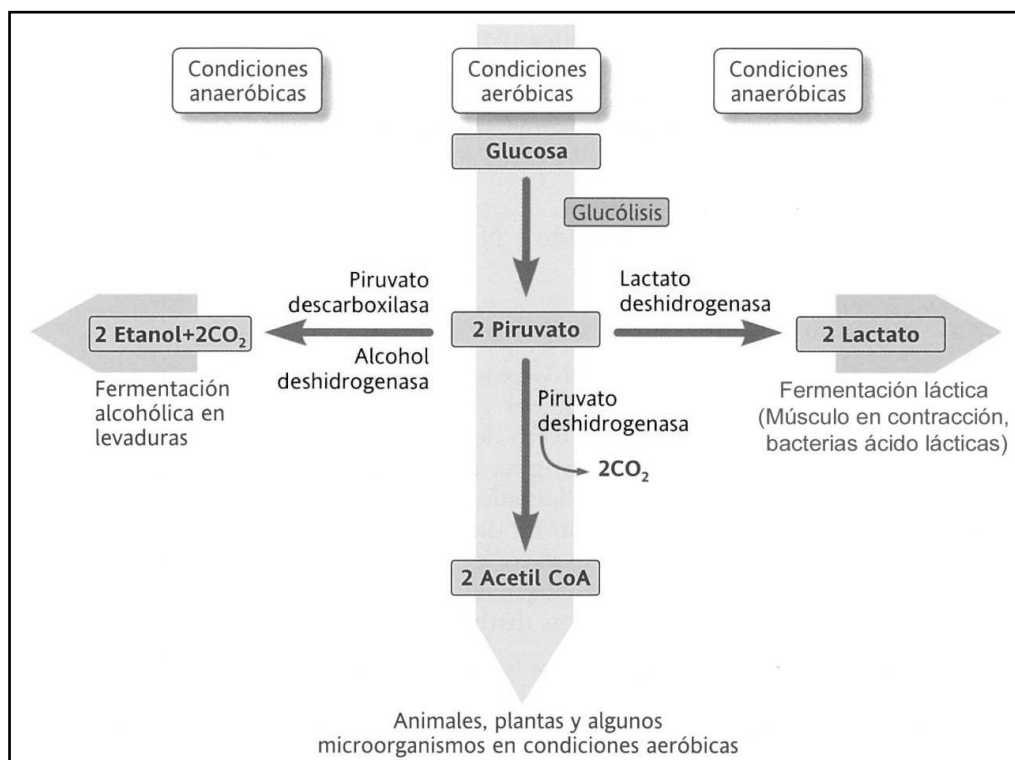


Figura 3.2. Esquema de la vía glicolítica y de los procesos de fermentación de piruvato en condiciones anaeróbicas.

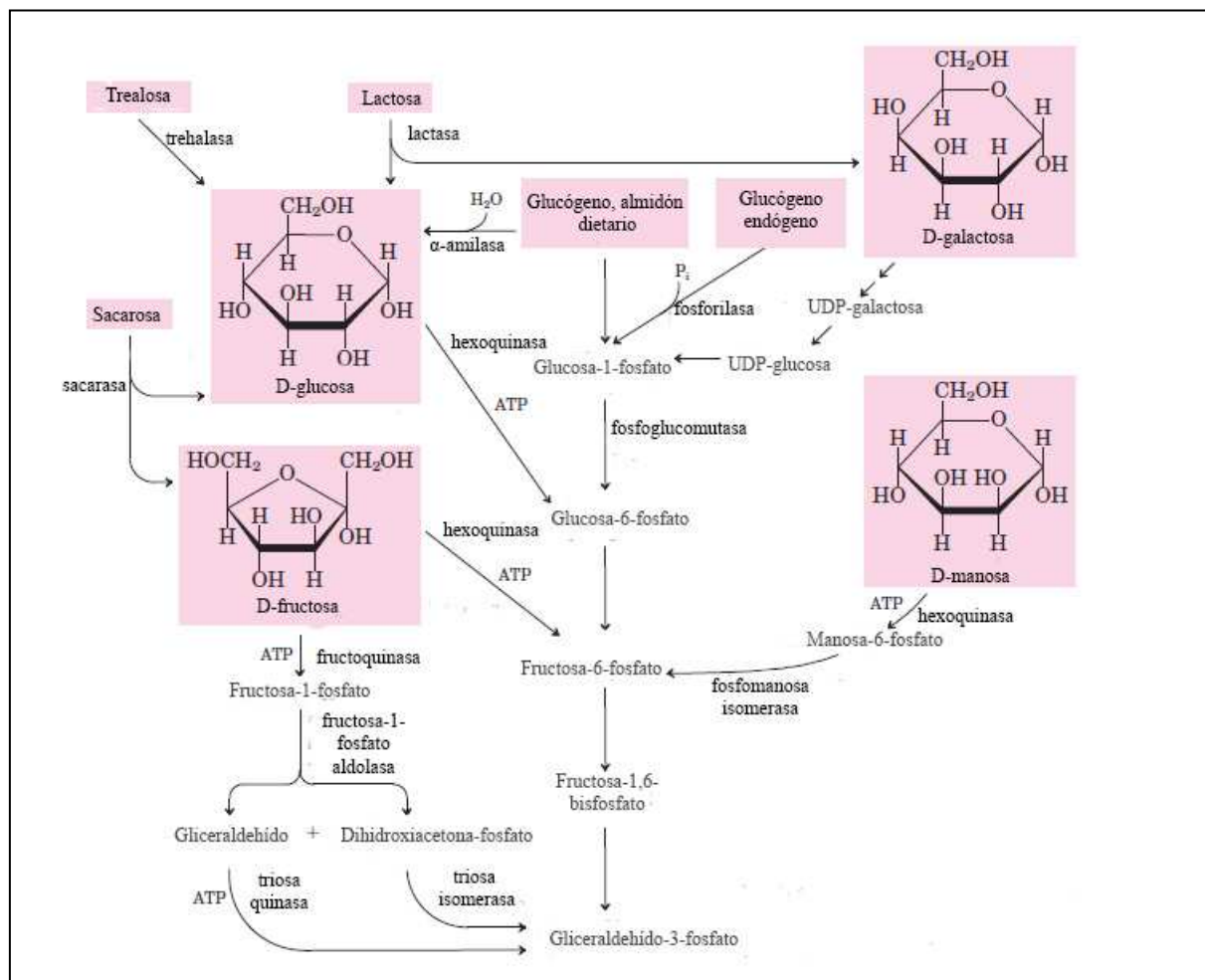
Tres son las rutas importantes que puede seguir el piruvato después de la glucólisis (fig. 3.3). En aerobiosis el piruvato producido ingresa en las mitocondrias siendo oxidado allí en una primera instancia a acetil-CoA, y finalmente a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. En condiciones de anaerobiosis (ausencia de oxígeno) el piruvato puede ser reducido a lactato o etanol, de acuerdo al tipo celular, mediante procesos conocidos en general como fermentaciones.



**Figura 3.3.** Destinos metabólicos del piruvato. Modificado desde Feduchi y cols. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2011. Ed. Panamericana.

### Rutas de "alimentación" que conducen desde glucógeno y otros carbohidratos a la vía glicolítica

Además de la glucosa, muchos carbohidratos se incorporan en último término a la secuencia glicolítica para experimentar degradación que rinde energía. Entre ellos podemos mencionar: fructosa, galactosa, trehalosa y manosa (monosacáridos). Para la incorporación de estos monosacáridos a la vía glicolítica, intervienen diferentes enzimas que en definitiva catalizan reacciones en las que se forman intermediarios de esta vía metabólica (fig. 3.4).



**Figura 3.4.** Esquema de la incorporación de distintos monosacáridos a la vía glicolítica. Modificado desde Nelson & Cox, "Lehninger. Principios de Bioquímica", 2008. Ed. W. H. Freeman.

### Puntos de regulación de la vía glicolítica

Como en todas las rutas metabólicas, la velocidad de la vía glicolítica está sujeta a control, el cual se realiza en tres etapas en las que están implicadas reacciones químicas irreversibles, catalizadas por enzimas alostéricas.

**1° Punto de Control:** a nivel de la hexoquinasa. La actividad de la enzima es regulada por la concentración de su principal producto, la glucosa-6-fosfato, el cual inhibe su actividad.

**2° Punto de Control:** a nivel de la fosfofructoquinasa, regulada por varios efectores. Su actividad es incrementada por ADP, AMP, fructosa 2,6-bisfosfato y es inhibida por ATP, NADH, citrato y ácidos grasos de cadena larga. Este es el principal punto de control de la vía glicolítica.

**3° Punto de Control:** a nivel de la piruvato quinasa. Esta enzima activada por fructosa-1,6- bisfosfato y es inhibida por ATP, ácidos grasos y acetil-CoA.

La regulación de la vía glicolítica explica el llamado “efecto Pasteur”, el cual está basado en la regulación alostérica de las enzimas de la vía, ejercida por los niveles de ciertos metabolitos que reflejan el equilibrio entre la producción y el consumo de ATP, adecuando de este modo la actividad glicolítica a las necesidades energéticas celulares.

### Balance energético de la oxidación de glucosa

Cuando la vía glicolítica tiene lugar en anaerobiosis, por cada molécula de glucosa metabolizada, se consumen 2 moles de ATP en la fase de preparación y se producen por fosforilación a nivel de sustrato 4 moles de ATP en la fase de beneficio. En consecuencia, el balance final (rendimiento neto) es positivo, resultando en la formación neta de dos moles de ATP por cada mol de glucosa oxidada en la vía.

**Tabla 3.1.** Tabla descriptiva del rendimiento energético de la vía glicolítica.

<i>Gasto de ATP (mol de glucosa)</i>		
Glucosa	→ Glucosa-6P	-1 mol de ATP
Fructosa-6P	→ Fructosa-1,6 bifosfato	-1 mol de ATP
<i>Producción de ATP (mol de glucosa)</i>		
1,3-Bifosfoglicerato	→ 3-fosfoglicerato	+ 2 mol de ATP
Fosfoenolpiruvato	→ Piruvato	+ 2 mol de ATP
<b>Balance total</b>		<b>2 mol de ATP</b>



**PROBLEMAS DE APLICACIÓN**

1) A varios medios de cultivo inoculados con levaduras se agregó glucosa en igual concentración. A los 3 min se determinó la glucosa por el método de la glucosa oxidasa y los resultados fueron aproximadamente de 0,8 g/l. Posteriormente se agregó a cada uno, en forma individual, las sustancias que se detallan en la columna A y a los 30 min se determinó glucosa obteniéndose los resultados indicados en la columna B.

Una con una flecha los datos de la columna B con la columna A según lo esperado para el consumo de azúcar en cada condición (explicar modo de acción de cada uno de los compuestos de la columna A). La concentración de glucosa en el tubo testigo a los 30 min fue 0,20 g/l.

<b>COLUMNA A</b>	<b>COLUMNA B (glucosa g/l)</b>
1- Nada (testigo)	0,75
2- $AsO_4^{3-}$	0,20
3- NaF	0,20
4- $AsO_4^{3-} + PO_4^{3-}$	0,75
5- Citrato	0,75
6- Iodoacetato	0,10

2) En dos tubos diferentes se incubaron extractos celulares de músculo de conejo (tubo A) y de levaduras (tubo B) con fosfato y glucosa marcada isotópicamente con  $^{14}C$  en forma uniforme, en un medio anaeróbico con azida sódica ( $NaN_3$ ) a pH= 5 y a 30° C. Las medidas de radiactividad, en alícuotas iguales de medio, antes de agregar las células (t=0) y luego de 1h de incubación se muestran en la siguiente tabla:

<b>t (min)</b>	<b>% de radiactividad</b>	
	<b>tubo A</b>	<b>tubo B</b>
0	100	100
60	98	65

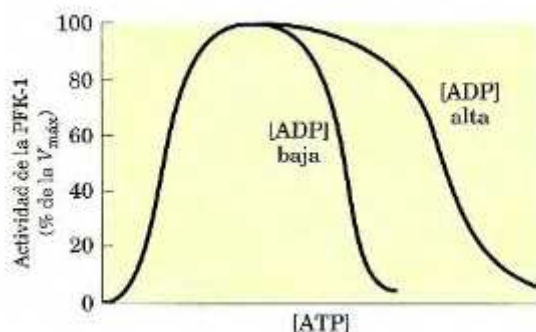
- a) ¿Qué explicación encuentra para estos resultados?
- b) Construya una tabla con los valores teóricos de % de radiactividad que esperaría encontrar si el experimento se realizara en idénticas condiciones, pero con 1-  $^{14}C$  glucosa.

3) En el gráfico siguiente se muestra el efecto del ATP sobre la enzima alostérica fosfofructoquinasa. A una concentración determinada de fructosa-6-fosfato, la actividad de la

fosfofructoquinasa aumenta al aumentar las concentraciones de ATP, pero se alcanza un punto más allá del cual el incremento de ATP produce inhibición de la enzima.

a) Explicar cómo el ATP puede ser sustrato e inhibidor de la fosfofructoquinasa. ¿De qué modo está regulada la glucólisis por los niveles de ATP?

b) Si suponemos que este gráfico corresponde a un ensayo *in vitro*, cuando se agrega ADP exógeno la inhibición de la fosfofructoquinasa por el ATP disminuye. ¿Cómo puede explicarse esta observación?



4) Existen varias alternativas para obtener combustibles mediante tecnologías renovables. Desde el punto de vista biotecnológico, una de las opciones con mayor viabilidad para sustituir o complementar a la nafta es el etanol carburante. El mercado potencial del etanol carburante es enorme y una ventaja adicional a su uso, la constituye el hecho de que es posible obtener etanol a partir de residuos agroindustriales, los cuales se encuentran en abundancia y constituyen una fuente importante de contaminación. Una de las cepas más estudiadas y utilizadas para la producción biotecnológica de etanol es la cepa de *E. coli* KO11. En un intento por mejorar el rendimiento de producción de etanol mediante ingeniería genética se modificó el nivel de expresión de algunas enzimas relacionadas con el metabolismo de los hidratos de carbono, obteniéndose los siguientes resultados:

Modificación genética	Consumo de glucosa	Producción de etanol
Aumento en la expresión y AE de piruvato quinasa	Disminución del 68%	Disminución del 60%
Aumento en la expresión y AE de piruvato quinasa y piruvato descarboxilasa	Aumento del 20%	Aumento del 45%

a) ¿Cómo explica estos resultados?

b) Si usted fuera el investigador del ejemplo, ¿la modificación de qué actividades enzimáticas investigaría? ¿por qué?

## GUÍA DE ESTUDIO

### Vía glicolítica

- Esquema con fórmulas químicas de las reacciones, enzimas y cofactores.
- ¿En qué lugar de la célula se encuentran las enzimas que catalizan las reacciones de la vía glicolítica?
- Acción de la hexoquinasa y de la glucoquinasa: sustrato sobre el cual actúan, producto de la reacción que catalizan. Diferencia en los valores de Km.
- Función de los grupos fosfato en los intermediarios.
- ¿Cuáles son los monosacáridos más comunes que pueden ingresar a la vía glicolítica?
- Balance energético: producción neta de ATP por degradación de glucosa a piruvato.

### Regulación

- Puntos de regulación de la vía glicolítica: enzimas implicadas.
- ¿Qué compuestos activan o inhiben las enzimas que intervienen en la regulación?
- Efecto Pasteur como mecanismo de adaptación celular. Fundamento bioquímico.

### Destino del piruvato

- Fermentación alcohólica y láctica: productos, enzimas y cofactores. Rendimiento energético. Formulación de las reacciones químicas implicadas.

## BIBLIOGRAFÍA

- **Blanco, A. & Blanco, G. (2006).** Química Biológica. Ed. El Ateneo.
- **Feduchi, E., Blasco, I., Romero, C.S., & Yáñez, E. (2011).** Bioquímica. Conceptos esenciales. Panamericana.
- **Harvey, R. A. & Ferrier, D. R. (2011).** Biochemistry (Lippincott Illustrated Reviews Series). Biochemistry (Lippincott Illustrated Reviews Series), 40, 30888.
- **Nelson, D. & Cox, M. (2008).** Lehninger. Principios de Bioquímica. Ed. W. H. Freeman.

**TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 3**  
**METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO:**  
**Vía Glicolítica. Demostración de la fermentación en levaduras**

**Objetivos**

- Comprobar experimentalmente el mecanismo de adaptación del metabolismo de glucosa a las condiciones ambientales.
- Demostrar la producción de productos de la fermentación alcohólica.

**Introducción teórica**

Las células animales, los microorganismos y las plantas utilizan como principal fuente de energía los hidratos de carbono. A partir de su degradación obtienen energía en forma de ATP y otros compuestos de alto contenido energético los cuales son utilizados en los procesos vitales y de biosíntesis.

Los intermediarios metabólicos obtenidos a partir del catabolismo de glucosa dependen de las condiciones ambientales en que se encuentran las células. Así, si la concentración de oxígeno es suficiente, estos intermediarios metabólicos generalmente se degradan totalmente hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Por el contrario, cuando la concentración de oxígeno es escasa, la célula recurre a la fermentación. A través de este proceso se obtienen diferentes tipos de intermediarios metabólicos según el tipo de célula y de los sustratos disponibles: Por ejemplo: una célula muscular y ciertos tipos de lactobacilos acumulan ácido láctico, ciertas levaduras producen alcohol, etc.

En la industria se aprovecha la capacidad de muchos microorganismos para producir metabolitos que son de gran utilidad. Por ejemplo, en la fabricación de pan y de vino se utilizan cepas diferentes de la levadura *Saccharomyces cereviceae*.

**Adaptación del metabolismo de glucosa de acuerdo a la disponibilidad de oxígeno**

Cultivando levaduras, Louis Pasteur observó que el consumo de glucosa en un medio anaeróbico era considerablemente mayor que el observado en cultivos con abundante provisión de oxígeno. Esto se llamó “efecto Pasteur”, el cual es un mecanismo de adaptación de las células, donde la velocidad de utilización de glucosa es ajustada a los requerimientos metabólicos de la misma. Al momento de esta observación no se conocía los mecanismos de regulación de la vía glicolítica que permitieran brindar una explicación. Una

vez dilucidados dichos mecanismos fue posible brindar el **fundamento bioquímico** del “efecto Pasteur”: el rendimiento de ATP de la glucólisis en condiciones anaeróbicas es de 2 ATP, por molécula de glucosa, que es mucho menor que el de la oxidación completa de glucosa a CO<sub>2</sub> en condiciones aeróbicas que corresponden a 36 o 38 ATP por molécula de glucosa. Para conseguir la misma cantidad de ATP se ha de consumir 18 veces más glucosa en condiciones anaeróbicas. La producción de energía celular en presencia de oxígeno, alcanza un nivel tal que el ATP comienza a actuar como inhibidor alostérico de la enzima fosfofructoquinasa. Como consecuencia de dicha inhibición se acumula glucosa-6-fosfato, que inhibe a su vez, la enzima hexoquinasa. El resultado de esta regulación es una inhibición del catabolismo de glucosa a través de la vía glicolítica, y por lo tanto las células cultivadas en estas condiciones de oxígeno consumen menos glucosa, en comparación a si fueran cultivadas en anaerobiosis.

En el presente TPL demostraremos el “efecto Pasteur”, comparando el consumo de glucosa entre un cultivo de levaduras *S. cereviceae* mantenido en condiciones aeróbicas y otro en condiciones anaeróbicas. Además demostraremos el proceso fermentativo llevado a cabo por las levaduras cultivadas en anaerobiosis.

### **Cultivo de *S. cereviceae* en condiciones aeróbicas o anaeróbicas**

#### **Materiales y métodos**

Para el cultivo de las levaduras utilizaremos un medio de cultivo estéril, con la siguiente composición: extracto de levadura 0,01 g; glucosa 1,00 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 0,1 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,04 g; MgCl<sub>2</sub> 0,04 g.; FeSO<sub>4</sub> 0,01 g.; H<sub>2</sub>O d c.s.p. 200 ml.; pH: 4,5-5,00.

Inocularemos 10 ml de una suspensión de levaduras (1 g en 10 ml de H<sub>2</sub>O) en erlenmeyers de 250 ml y 125 ml, conteniendo 100 ml del medio de cultivo cada uno. Posteriormente, se realizará una incubación durante 24 h en las siguientes condiciones: el erlenmeyer de 250 ml en agitador a 100 rpm, mientras que el erlenmeyer de 150 ml será mantenido en reposo, luego de agregar una capa de vaselina líquida.

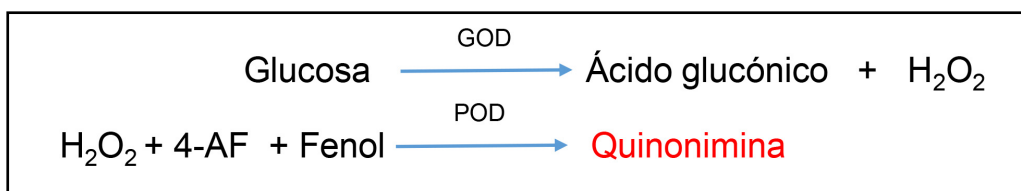
Luego de la incubación determinaremos la concentración de glucosa y la presencia de etanol. Para ello, se tomará una alícuota de 5 ml del cultivo realizado en aerobiosis o anaerobiosis, previamente centrifugado, para evitar interferencias por sustancias en suspensión.

### A) Determinación de la concentración de glucosa

Con el objeto de determinar el consumo diferencial de glucosa por parte de las células de levadura incubadas en aerobiosis o anaerobiosis, realizaremos la determinación de glucosa antes (medio inicial) y luego de las 24 h del cultivo.

Para ello, utilizaremos un método enzimático comercial, constituido por las enzimas glucosa oxidasa (GOD), peroxidasa (POD) y una solución de 4-aminofenazona (4-AF) y fenol. La determinación de glucosa en la muestra se basa en una serie de reacciones acopladas en las que participan los reactivos antes mencionados. Brevemente, la glucosa de la muestra, por acción de la GOD es oxidada a ácido glucónico y  $H_2O_2$ . Luego, el último producto participa de una reacción catalizada por la POD, en la que ocurre la unión oxidativa del fenol con 4-aminofenazona, dando lugar a la formación de un cromógeno rojo (“quinonimina”), con un máximo de absorbancia a 505 nm. La cantidad de quinonimina formada es directamente proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra.

El mencionado fundamento puede resumirse en las siguientes reacciones químicas acopladas:



### Materiales y métodos

Para la determinación de la concentración de glucosa utilizaremos los siguientes reactivos:

- Estándar: solución de glucosa 1g/L.
- Reactivo de trabajo, contiene: GOD/POD (solución de glucosa oxidasa-1000 U/L- y peroxidasa-120 U/L-); 4-AF (solución de 4-aminofenazona 25 mmol/L, en buffer tris), fenol (solución de fenol 55 mmol/L).

En la mesada de trabajo usted encontrará el material y los reactivos necesarios para la experiencia. En este caso se utilizarán micropipetas, asegúrese de utilizar las puntas plásticas (tips) adecuadas y de no forzar estos instrumentos por encima o por debajo del volumen máximo y mínimo, respectivamente.

Organice y rotule los tubos Khan en una gradilla y agregue los componentes de la reacción de acuerdo a la siguiente tabla:

Tubos	Blanco	Estándar	Medio inicial (1)	Cultivo en anaerobiosis (2)	Cultivo en aerobiosis (3)
Muestra (µl)	----	-----	10 (*)	10	10
Testigo (µl)	----	10	-----	-----	-----
Rvo. de trabajo (ml)	1	1	1	1	1
Mezclar e incubar 10 min a 37 °C. Leer a 505 nm.					

(\*) En el medio inicial, la concentración de glucosa es superior al rango lineal de la reacción de color, por ello es que se realiza una dilución de la muestra a la mitad y se toman los 10µl de esta dilución. En el cálculo final multiplicar por dos el resultado obtenido para este tubo.

### Resultados y análisis de resultados

a) Determinar la concentración de glucosa de cada tubo “muestra”, utilizando como referencia la absorbancia corregida del estándar:

**Glucosa (g/L):** Absorbancia de la muestra corregida x f                      f =  $\frac{1,00 \text{ g/L}}{\text{Abs. correg. estándar}}$

b) Teniendo en cuenta la concentración de glucosa sin consumir, compare la cantidad de glucosa remanente entre los tubos 2 y 3.

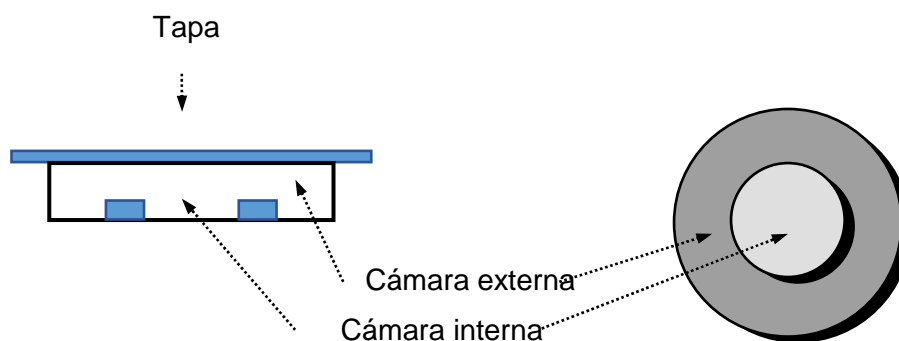
### B) Determinación de etanol

*S. cereviceae* es un microorganismo facultativo, que en condiciones de cultivo anaeróbicas, metaboliza la glucosa por fermentación alcohólica. A continuación, un esquema de las reacciones metabólicas que ocurren en este caso:

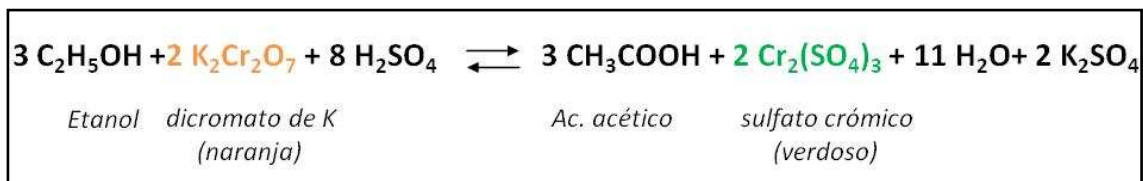


La determinación de la presencia o ausencia de etanol se realizará para demostrar el metabolismo alternativo de la glucosa de acuerdo a las condiciones de oxígeno en las que se realizó el cultivo de la levadura. Para dicha determinación, realizaremos un método de microdifusión en el cual se fundamenta en una reacción de óxido-reducción.

Para el método de microdifusión se utilizan las denominadas celdas de Conway, que constan de una cámara central y otra externa, y cuya representación se muestra a continuación.



En la cámara central se coloca una solución de dicromato de potasio en medio sulfúrico, mientras que en la externa se coloca la muestra a ensayar y una solución saturada de carbonato de potasio. Una vez que se colocan estos reactivos, se sella la celda y se permite que la muestra contacte el carbonato de potasio, el cual deshidrata la muestra y permite la volatilización del etanol. Este último, reacciona con el dicromato de potasio, oxidándose a ácido acético, mientras que el ion dicromato (color naranja) se reduce a crómico (color verde azulado). El cambio de color de la solución de la cámara central, indica la presencia de etanol. La reacción de óxido-reducción que ocurre corresponde a:



### Materiales y métodos

Para determinar la presencia o ausencia de etanol se utilizarán los siguientes reactivos:



- Solución saturada de carbonato de potasio.
- Dicromato de potasio en medio sulfúrico
- Etanol absoluto (4 g/L), será utilizado como control positivo.

Las muestras a ensayar serán los sobrenadantes del cultivo de levaduras, realizados en presencia o ausencia de oxígeno.

a) En la mesada de trabajo usted encontrará el material y los reactivos necesarios para la experiencia. Rotule la tapa de cada una de las celdas de Conway y agregue los componentes de reacción de acuerdo a la siguiente tabla:

Cámara	Reactivos (ml)	Celda 1	Celda 2	Celda testigo
Central	Solución sulfúrica $K_2Cr_2O_7$ (ml)	0,7	0,7	0,7
Externa	Solución saturada $K_2CO_3$ (ml)	0,5	0,5	0,5
	Muestra (ml) (sobrenadante de cultivo)	2,0 (Aeróbico)	2,0 (Anaeróbico)	-----
	Etanol absoluto (ml)	-----	-----	2,0
Tapar perfectamente cada una de las celdas, sellando el bode con vaselina sólida. Incubar en estufa a 37°C durante 15 min aprox.				

### Resultado y análisis de los resultados

Observar el color de la cámara central y determinar en cuál de las muestras ensayadas se determinó la presencia de etanol.

### Conclusiones del TPL

- A partir de los resultados obtenidos complete el siguiente cuadro:

	Medio de cultivo inicial	Sobrenadante cultivo en aerobiosis	Sobrenadante cultivo en anaerobiosis
Concentración de glucosa remanente			
Presencia de Etanol			

- ¿Cómo evidencia que ha sucedido el efecto Pasteur?
- ¿En qué muestra demostró presencia de etanol? ¿Por qué se generó este producto metabólico?
- ¿Cuál es la importancia biológica del proceso de fermentación?

**BIBLIOGRAFÍA**

- **Fennema, O. R. (1996)**. Fennema. Química de los alimentos. Ed. Marcel Dekker Inc.
- **Conway, E.J. (1957)**. Book Microdiffusion analysis and volumetric error, pp. xviii + 465 pp.

**TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 4:**  
**METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO (PARTE II):**  
**VÍA DE LAS PENTOSAS. METABOLISMO DEL GLUCÓGENO.**  
**CICLO DE KREBS**

**Objetivos**

- Conoce vías metabólicas alternativas de la glucosa y su importancia.
- Describir la secuencia de reacciones de la vía de las pentosas fosfato, el destino de los productos (NADPH, ribosa-5-fosfato), interrelaciones con la vía glicolítica y su regulación.
- Conocer el metabolismo de glucógeno. Formular las reacciones de degradación y síntesis de glucógeno.
- Comprender y conocer el ciclo de Krebs: enzimas implicadas, puntos de regulación, balance energético.

**Introducción teórica**

De todos los polisacáridos existentes en la naturaleza, el hombre es capaz de digerir almidón y glucógeno. El glucógeno es similar a la amilopectina del almidón, aunque está más ramificado, y constituye la reserva energética de los organismos animales.

El ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos, es una secuencia de reacciones que constituye la ruta central común para la degradación de los restos carbonados que, en forma de acetil-coenzima A (acetil-CoA), derivan del catabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. Estas secuencias de reacciones enzimáticas tienen lugar únicamente en los organismos aerobios. El ciclo de Krebs se encuentra catalizado por un sistema multienzimático, que acepta como combustible al grupo acetilo de la acetil-CoA, degradándolo hasta  $\text{CO}_2$  y pares de  $\text{H}^+$  y  $e^-$ . Estos últimos, son conducidos a través de una cadena de transportadores hasta el oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ), que actúa como aceptor final en la cadena de transporte electrónico de las células de la mayoría de los organismos, y se reduce para formar  $\text{H}_2\text{O}$ .

## METABOLISMO DE GLUCÓGENO

### Introducción teórica

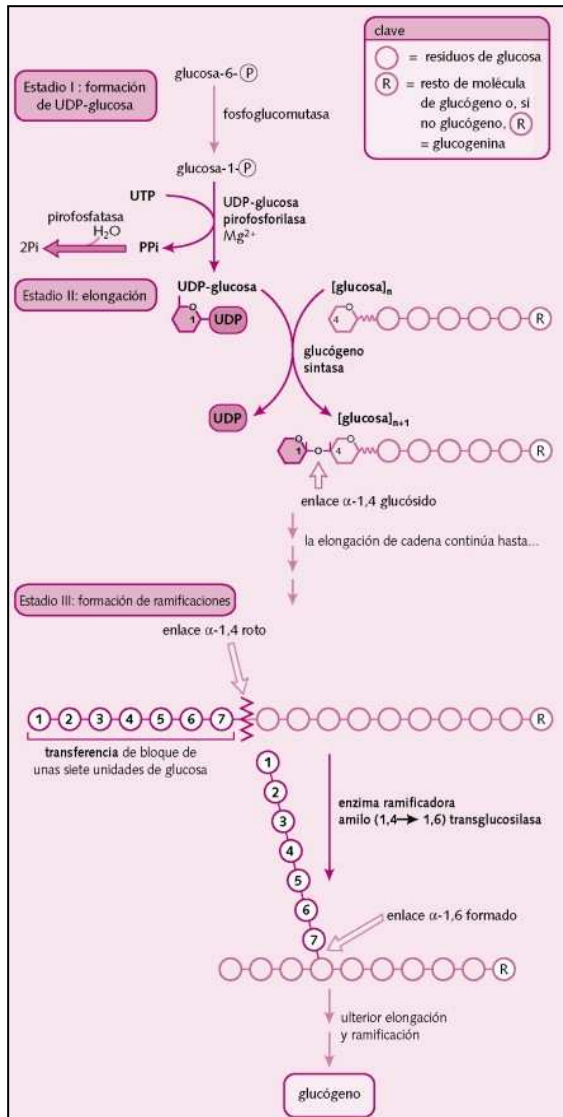
En el hígado, el glucógeno constituye el depósito de glucosa, y durante su degradación secuencial, se libera glucosa que alcanza la circulación general para su distribución a otros tejidos. Por otra parte, en el músculo, el glucógeno se degrada para proporcionar energía en forma de ATP para permitir la contracción muscular.

El metabolismo de glucógeno abarca básicamente, su síntesis (“glucogenogénesis”) y su degradación (“glucogenólisis”).

#### a) Glucogenogénesis (síntesis de glucógeno)

La síntesis de glucógeno a partir de glucosa se realiza en muchos tejidos, principalmente en hígado y músculo. Es un proceso anabólico que requiere energía aportada por el ATP y UTP (uridina trifosfato), y es regulado a través de la enzima glucógeno sintetasa. La glucogenogénesis abarca cinco etapas (fig. 4.1):

- 1- Fosforilación de glucosa en el carbono 6 por acción de hexoquinasas.
- 2- Formación de glucosa-1-fosfato a partir de glucosa 6-fosfato, catalizada por la enzima fosfoglucomutasa.
- 3- Activación de glucosa-1-fosfato a UDP-glucosa (uridina-difosfato-glucosa), reacción catalizada por la enzima uridina-difosfato-glucosa pirofosforilasa o glucosa-1-P-uridiltransferasa.
- 4- Incorporación de glucosa activada a una molécula de glucógeno preexistente, o a la glucogenina (proteína), a través de una unión  $\alpha \rightarrow 1-4$ , reacción catalizada por la glucógeno sintasa.
- 5- Formación de ramificaciones mediante uniones glicosídica  $\alpha \rightarrow 1,6$ , catalizada por la enzima ramificante.



**Figura 4.1.** Etapas de la síntesis de glucógeno. Tomado desde Lim & Roach. “Lo esencial en el metabolismo y nutrición”, 2010. Ed. Mosby.

## b) Degradación del glucógeno (glucogenólisis)

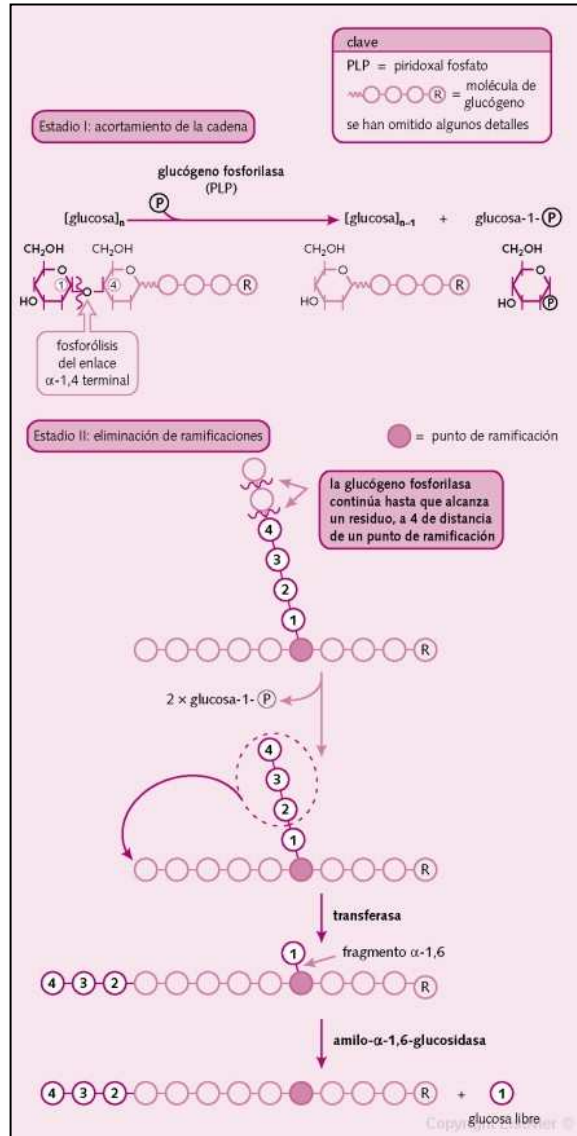
La glucogenólisis o el catabolismo del glucógeno no es un proceso inverso a la síntesis de glucógeno, dado que utiliza enzimas diferentes a la vía anabólica.

Las etapas involucradas son las siguientes (fig. 4.2):

- 1- Liberación de unidades de glucosa-1-fosfato a partir del extremo no reductor, reacción catalizada por la enzima glucógeno fosforilasa. El fosfato utilizado proviene del fosfato inorgánico del medio. Esta etapa no requiere de energía metabólica o gasto de ATP. La acción de la enzima se detiene 4 unidades de glucosa antes de una ramificación  $\alpha \rightarrow 1,6$  glicosídica.
- 2- Transferencia de unidades del trisacárido terminal al extremo de la rama vecina por unión  $\alpha \rightarrow 1,4$ . Esta reacción es catalizada por una transferasa. Reiniciando la etapa 1.
- 3- Hidrólisis de las uniones  $\alpha$ -1,6 glicosídicas. Esta reacción es catalizada por la enzima  $\alpha$ -1,6 glicosidasa con liberación de unidades de glucosa sin fosforilar.

Las enzimas que actúan en las etapas 2 y 3 forman parte de una proteína bifuncional denominada enzima desramificante.

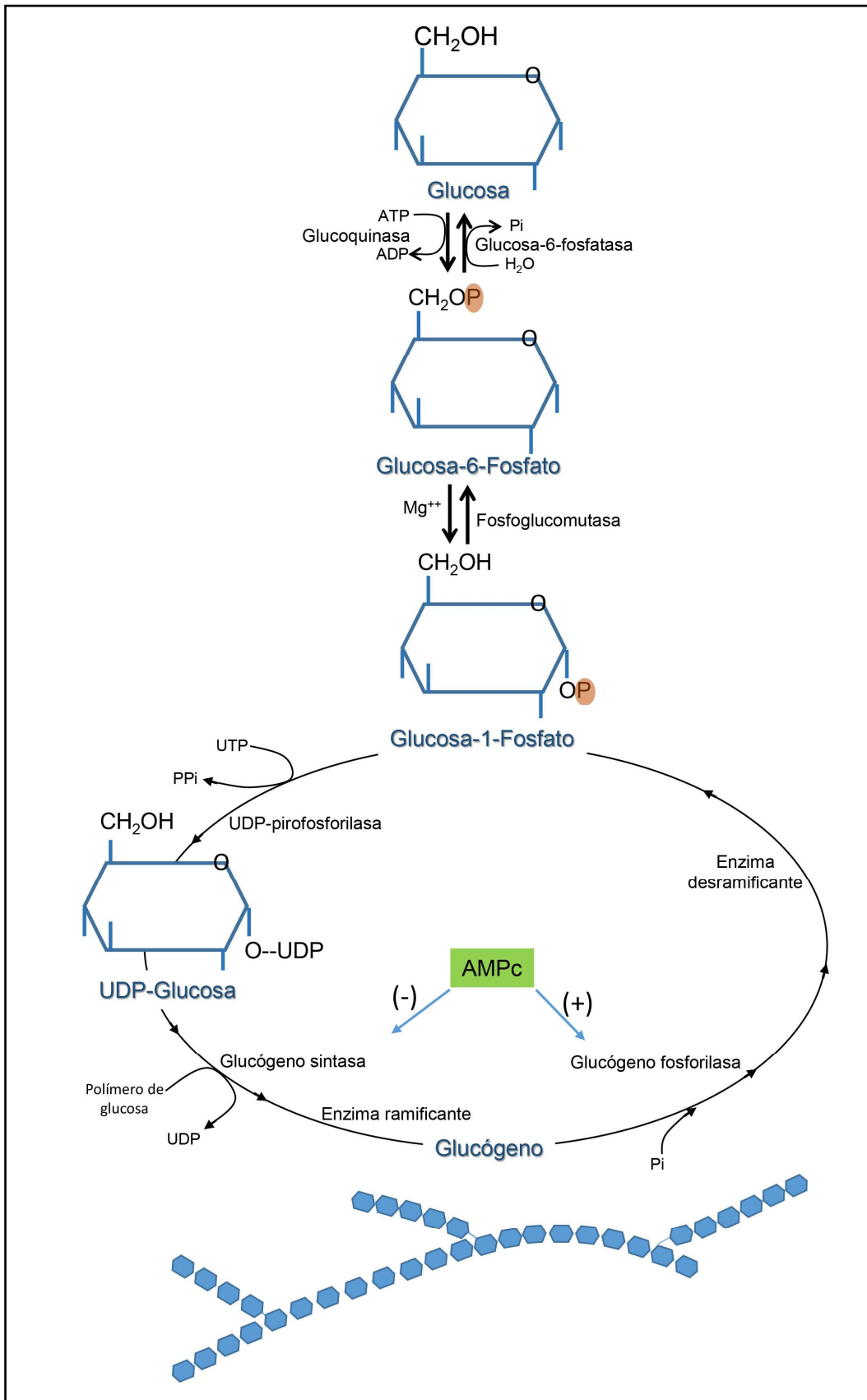
4- Formación de glucosa-6-fosfato a partir de la glucosa-1-fosfato liberada en la etapa 1. Esta reacción de isomerización es catalizada por la enzima fosfoglucomutasa.



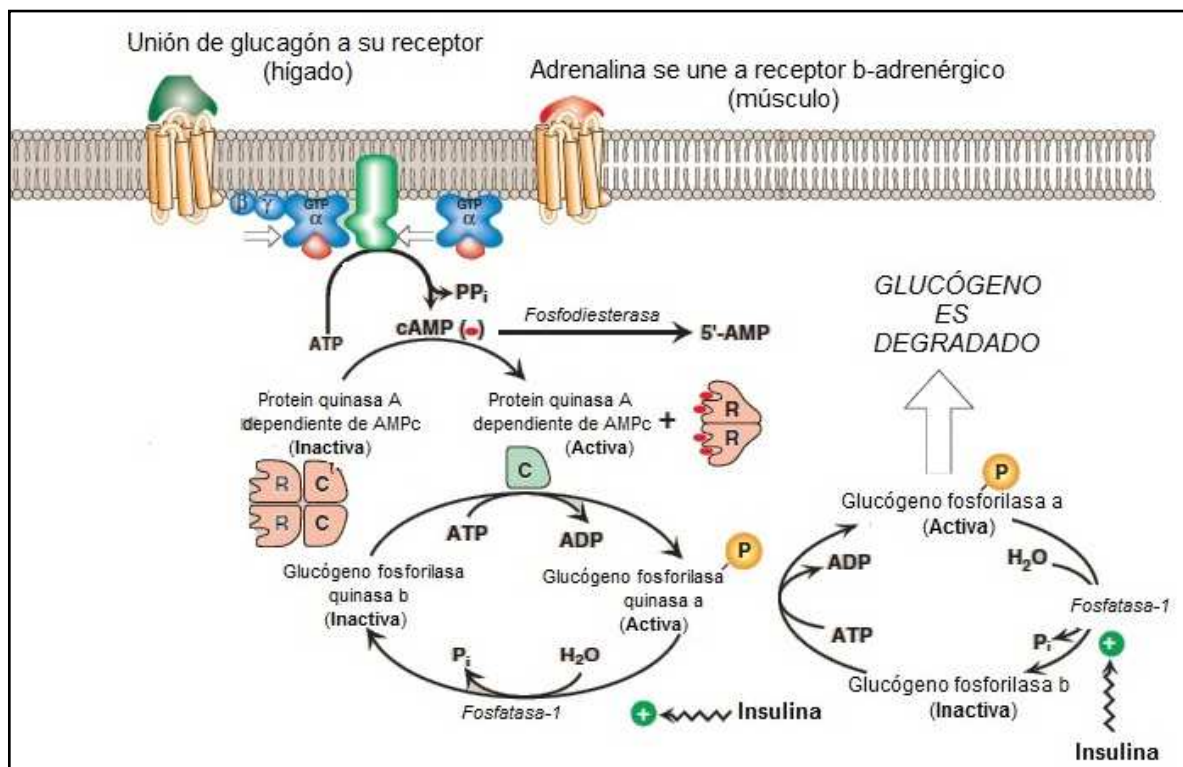
**Figura 4.2.** Etapas de la degradación de glucógeno. Tomado desde Lim & Roach. “Lo esencial en metabolismo y nutrición”, 2010. Ed. Mosby.

### Regulación del metabolismo de glucógeno

El metabolismo de glucógeno es regulado a través de las enzimas glucógeno sintetasa y glucógeno fosforilasa (fig. 4.3). A su vez, ambas enzimas son moduladas por modificación covalente por agregado o sustracción de grupos fosfatos de manera recíproca, es decir cuando se activa una enzima, la correspondiente a la vía opuesta, se inhibe (fig. 4.3 y 4.4).



**Figura 4.3.** Esquema de regulación recíproca entre los procesos de glucogenólisis y glucogenogénesis en una célula hepática. (-) y (+) indican inhibición y activación, respectivamente.



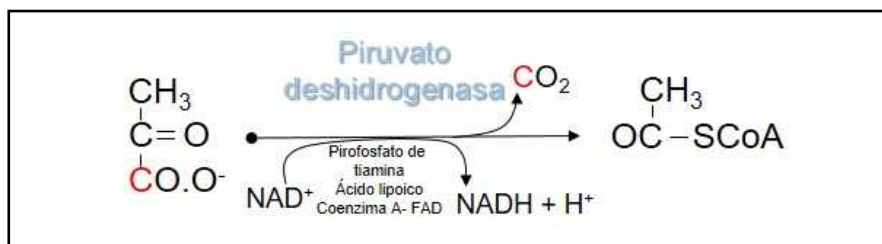
**Figura 4.4.** Regulación hormonal de la degradación de glucógeno. La unión de glucagón (hígado) o adrenalina (músculo), desencadena una cascada de señalización intracelular que modula la degradación de glucógeno. Insulina también regula el metabolismo de glucógeno, pero ejerciendo un rol opuesto al de glucagón y adrenalina. La molécula de la enzima Proteín quinasa A, se encuentra constituida por sitios catalíticos (C) y sitios reguladores (R), activándose una vez que se separan los sitios reguladores. Modificado desde Harvey & Ferrier. Biochemistry (Lippincott Illustrated Reviews Series), 2011.

## DESCARBOXILACIÓN OXIDATIVA DEL PIRUVATO

El piruvato obtenido en la vía glicolítica en el citosol, en condiciones aeróbicas ingresa a la matriz mitocondrial a través de un transportador de la membrana interna de estas organelas, donde será metabolizado a acetil-CoA por el complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa (fig. 4.5). Este complejo está constituido por tres enzimas: piruvato descarboxilasa o E<sub>1</sub>, dihidrolipoil transacetilasa o E<sub>2</sub>, y dihidrolipoil deshidrogenasa o E<sub>3</sub>, y requiere de cinco coenzimas: pirofosfato de tiamina, ácido lipoico, coenzima A, FAD y NAD.

El NADH producido en esta reacción transfiere los electrones a la cadena respiratoria donde se unen a oxígeno para formar agua, en el proceso se obtienen 3 ATP desde ADP.



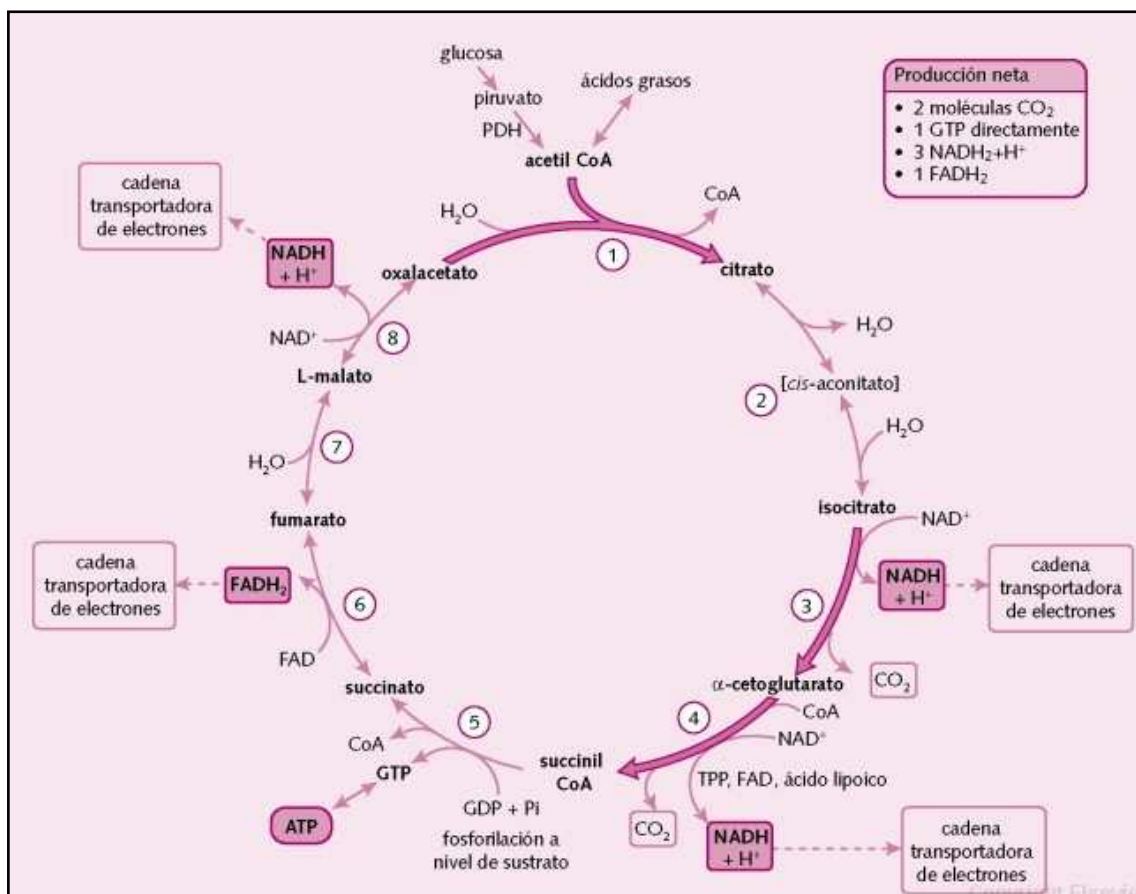


**Figura 4.5.** Reacción de descarboxilación del piruvato para la síntesis de Acetil-coenzima A.

## CICLO DE KREBS

El ciclo de Krebs es una secuencia de reacciones que constituye la ruta central común para la degradación de los restos carbonados que, en forma de acetil-CoA, derivan del catabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos. Estas secuencias de reacciones enzimáticas ocurren en la matriz mitocondrial de organismos aeróbicos, en donde todas las enzimas se encuentran libres, excepto la succinato deshidrogenasa que está unida a la cara interna de la membrana mitocondrial interna.

El ciclo se considera un sistema cerrado donde, a través de una secuencia de ocho reacciones (fig. 4.6), el acetil-CoA se degrada hasta  $\text{CO}_2$ , formándose coenzimas reducidas cuyos equivalentes de reducción ingresan a la cadena respiratoria a nivel de los complejos I y II, con la consecuente síntesis de ATP (fosforilación oxidativa) y  $\text{H}_2\text{O}$ .

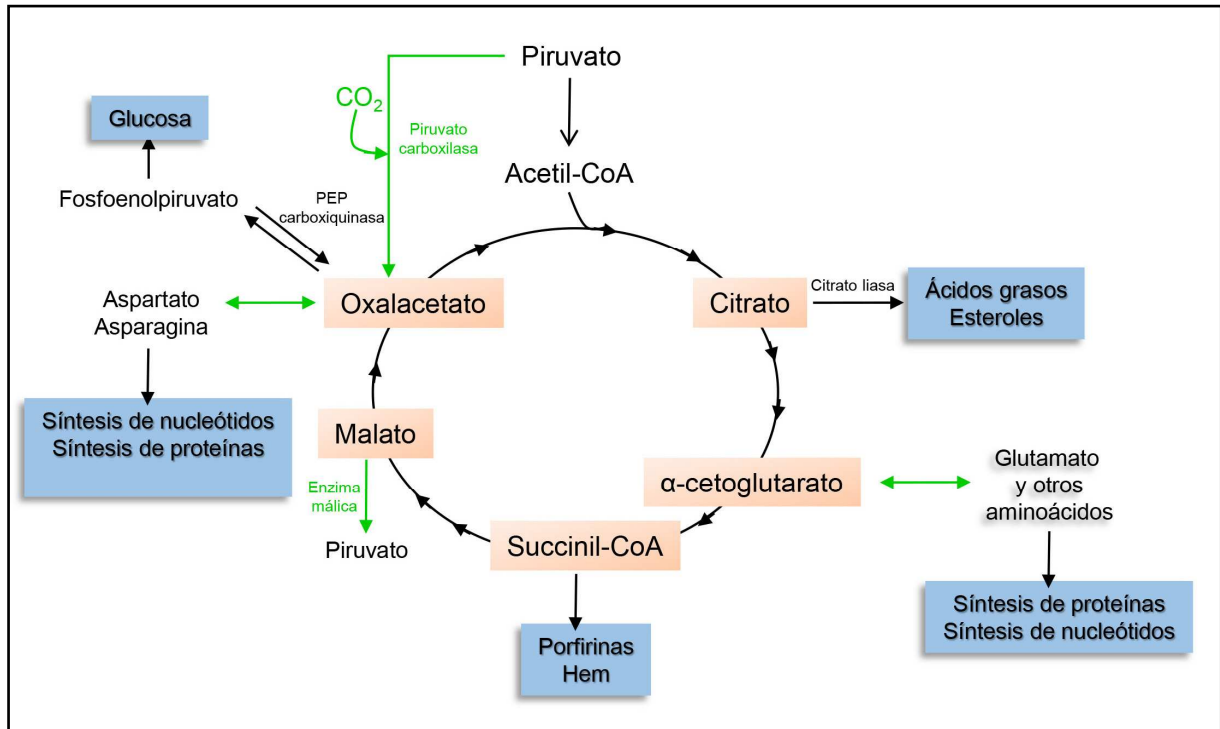


**Figura 4.6.** Esquema de las reacciones involucradas en el ciclo de Krebs. Tomado desde Lim & Roach. “Lo esencial en metabolismo y nutrición”, 2010. Ed. Mosby. 1- Citrato Sintasa. 2- Aconitasa. 3- Isocitrato deshidrogenasa. 4- Alfa-cetoglutarato deshidrogenasa. 5- Succinato tioquinasa. 6- Succinato deshidrogenasa. 7- Fumarasa. 8- Malato deshidrogenasa.

### **Función anaplerótica del ciclo de Krebs**

Si bien el ciclo de Krebs es una vía catabólica donde se oxida acetil-CoA hasta CO<sub>2</sub>, varios de los intermediarios están relacionados con otras vías metabólicas pudiendo ser utilizados en la síntesis de otros compuestos, en este caso el ciclo de Krebs aporta precursores para distintos procesos anabólicos (fig. 4.7). Esta participación del ciclo en ambos procesos, catabólicos y anabólicos, permiten considerarlo como una vía anfibólica.

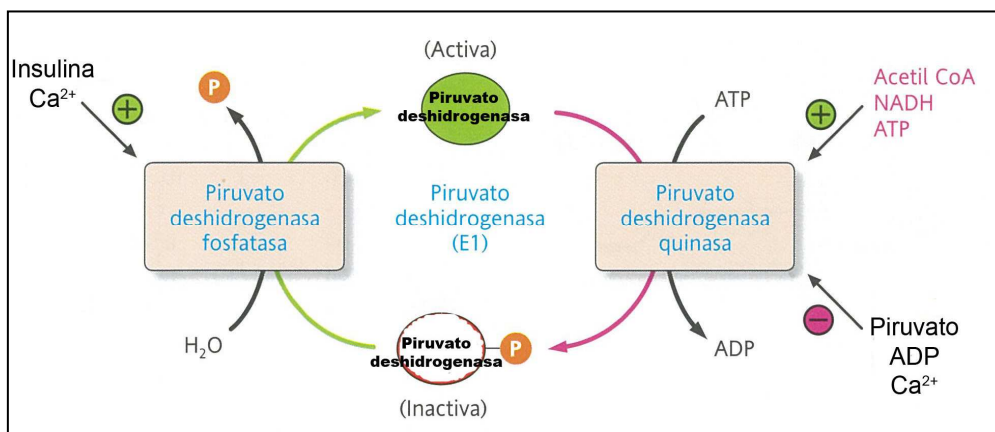
A medida que los intermediarios de este ciclo metabólico son retirados para servir como precursores biosintéticos son a su vez, repuestos mediante reacciones anapleróticas. En circunstancias de homeostasis, las reacciones por las que los intermediarios del ciclo se dirigen hacia otras vías y aquellas que permiten reponerlos se encuentran en equilibrio dinámico. De esta manera, las concentraciones de los intermediarios del ciclo permanecen prácticamente constantes.



**Figura 4.7.** Funciones anapleróticas del ciclo de Krebs. Algunos intermediarios del ciclo de Krebs (indicados en naranja) pueden cumplir la función de precursores de compuestos de diferentes rutas biosintéticas, indicados en color azul. Por otro lado, intermediarios de este ciclo metabólico pueden ser repuestos a través de reacciones anapleróticas señaladas en líneas de color verde.

### Regulación del ciclo de Krebs

El ciclo de Krebs es modulado **indirectamente** por el complejo de la piruvato deshidrogenasa, ya que a través de este complejo enzimático se sintetiza acetil-CoA que ingresa al ciclo. La piruvato deshidrogenasa es regulada por modificación covalente (fosforilación reversible) y por moduladores alostéricos (fig. 4.8). En este sentido, ATP, acetil-CoA y NADH actúan como moduladores negativos, mientras que el complejo es estimulado por insulina y el Ca<sup>++</sup> (este último aumenta en el ejercicio muscular intenso y estimula a una fosfatasa que actúa sobre la piruvato deshidrogenasa).



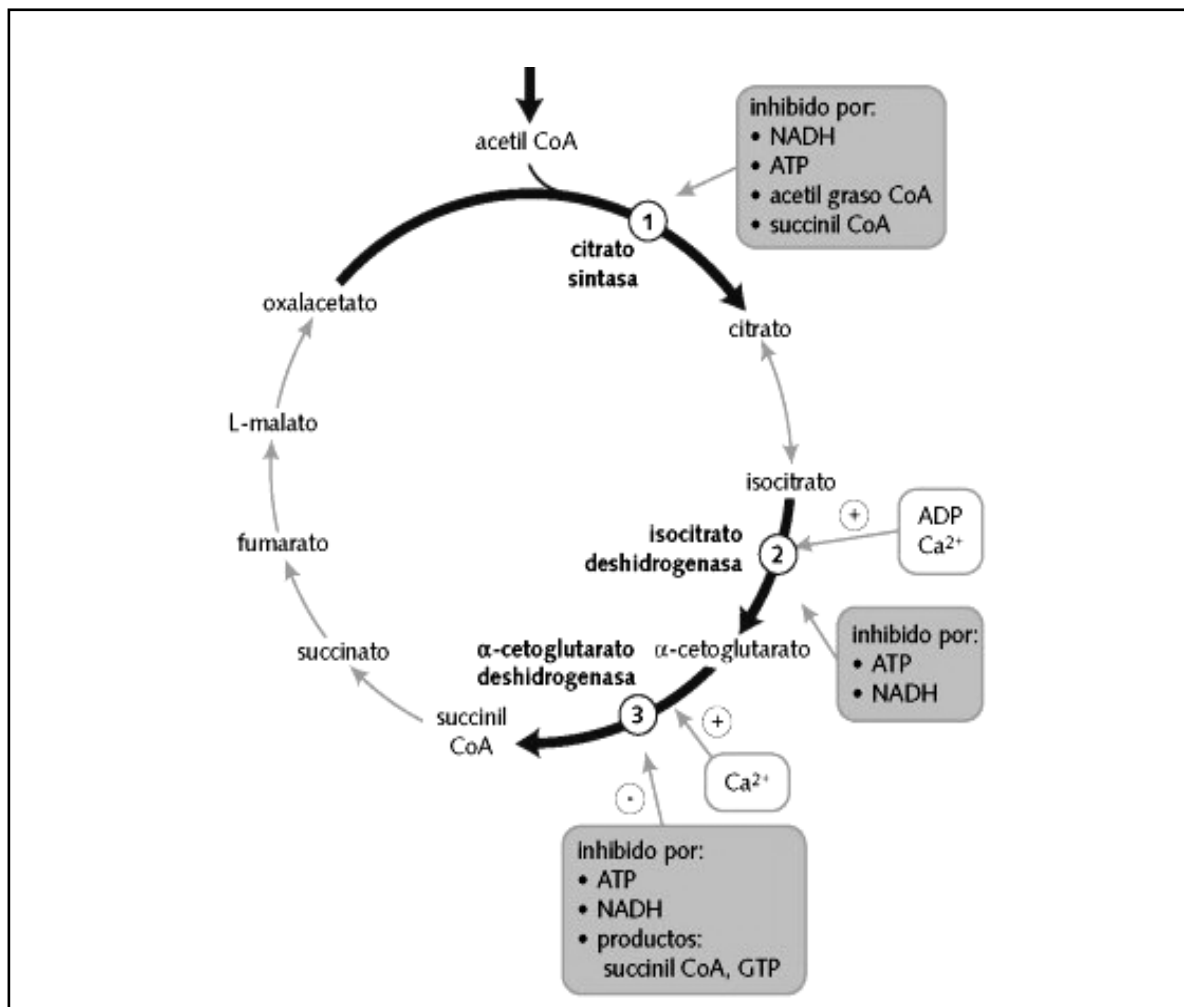
**Figura 4.8.** Esquema de la regulación por modificación covalente del complejo de la piruvato deshidrogenasa. Modificado desde Feduchi y cols. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2011. Ed. Panamericana.

La regulación directa del ciclo de Krebs propiamente dicho, se lleva a cabo en tres puntos principales (fig. 4.9):

**1° Punto de Control:** se encuentra en la reacción catalizada por la enzima citrato sintasa, la cual es una enzima alostérica modulada negativamente por el ATP (aumenta el  $K_m$  de la enzima) y por los ácidos grasos de cadena larga.

**2° Punto de Control:** se produce a nivel de la isocitrato deshidrogenasa. Esta enzima tiene como modulador alostérico positivo el ADP, mientras que NADH y ATP actúan como moduladores negativos.

**3° Punto de Control:** ocurre a nivel de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, enzima regulada de forma análoga al complejo piruvato deshidrogenasa.



**Fig. 4.9.** Regulación directa del ciclo de Krebs, a través de la modulación de las enzimas citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa y α-cetoglutarato deshidrogenasa. Modificado desde Lim & Roach. "Lo esencial en metabolismo y nutrición", 2010. Ed. Mosby.

### VIA DE LAS PENTOSAS FOSFATO

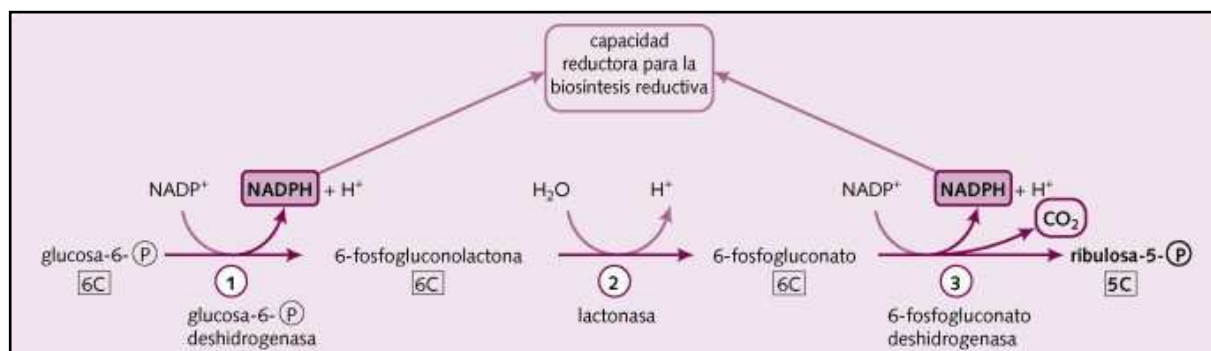
La glucosa-6-fosfato puede ser catabolizada por una ruta alternativa para la metabolización de la glucosa que ocurre en el citoplasma, denominada vía de las pentosas-fosfato. Los objetivos fundamentales de esta vía son: formación de NADPH y síntesis de ribosa-5-fosfato. El NADPH es el principal agente reductor de la célula, utilizado principalmente en procesos de biosíntesis (síntesis de ácidos grasos, colesterol, esteroides, etc.) y detoxificación celular. La ribosa-5-fosfato es necesaria para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos.

Esta vía posibilita la interconversión de varios carbohidratos de 3, 4, 5, 6 y 7 átomos de carbono, algunos de los cuales son también intermediarios de la vía glicolítica. (Por

ejemplo: gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato). Para comprender las reacciones que tienen lugar en esta vía se consideran dos fases: fase oxidativa (reacciones irreversibles) y fase no oxidativa (reacciones reversibles).

- **Fase Oxidativa:**

Esta fase consta de tres reacciones irreversibles (fig. 4.10), dando como resultado la formación de ribulosa-5-P, CO<sub>2</sub>, y dos moléculas de NADPH por molécula de glucosa-6-P que se oxida.

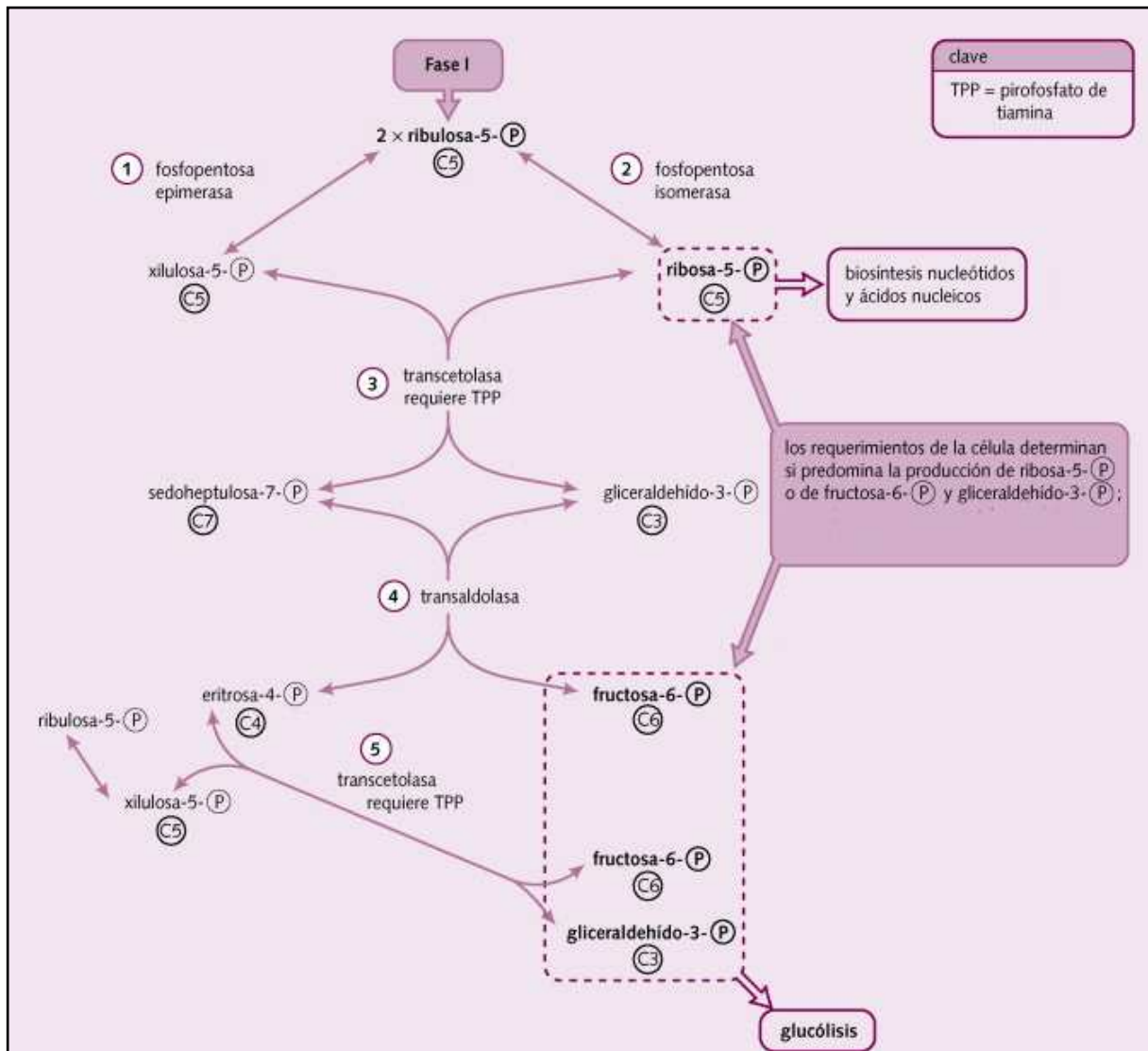


**Figura 4.10.** Fase oxidativa de la vía de las pentosas-fosfato. 1- Oxidación. 2. Hidrólisis. 3. Descarboxilación oxidativa. Modificado desde Lim & Roach. "Lo esencial en metabolismo y nutrición", 2010. Ed. Mosby.

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa son dos enzimas que actúan como oxido-reductasas, utilizando como coenzima el NADP<sup>+</sup> oxidado. Esta coenzima es un derivado de la niacina o vitamina B3. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa es la enzima reguladora de la vía de las pentosas fosfato, siendo inhibida por uno de sus productos: el NADPH. La deficiencia de esta enzima provoca una pérdida o descenso de NADPH que cumple funciones como antioxidante. El descenso de NADPH permite la oxidación de lípidos de la membrana plasmática, lo cual es especialmente importante en los eritrocitos. En esta situación, los mismos sufren fragilidad de la membrana plasmática, favoreciendo su ruptura, lo que causa a su vez anemia hemolítica.

- **Fase no oxidativa**

Esta etapa de la vía de las pentosas-fosfato consta de una serie de cinco reacciones reversibles, en las cuales ocurren interconversiones desde ribulosa-5-P a ribosa-5-P para la síntesis de nucleótidos, o a intermediarios de la glucólisis tales como gliceraldehído-3-P o fructosa-6-P (fig. 4.11).



**Figura 4.11.** Esquema de la fase no oxidativa de la Vía de las Pentosas-Fosfato. Enmarcados con línea punteada se muestran los intermediarios de esta fase, comunes con la vía glicolítica y la ribosa-5-fosfato necesaria para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos. Modificado desde Lim & Roach. "Lo esencial en metabolismo y nutrición", 2010. Ed. Mosby.

En esta fase se producen una heptosa (7 C, pseudoheptulosa-7-P), una hexosa (fructosa-6-P), dos pentosas (ribosa-5-P y xilulosa-5-P), una tetrosa (eritrosa-4-P) y una triosa (gliceraldehído-3-P).

Intervienen dos enzimas que transportan unidades de tres o dos carbonos, la transaldolasa y transcetolasa, respectivamente. Esta última enzima requiere como cofactor pirofosfato de tiamina (PPT), derivado de la vitamina B1 o tiamina.

## PROBLEMAS DE APLICACIÓN

1- A continuación, se brinda una lista de enzimas que están ausentes en el catabolismo de hidratos de carbono y una segunda lista de posibles consecuencias de tales deficiencias. Una con flechas las enzimas de la fila 1 con las consecuencias enumeradas en la fila 2. Justifique la elección de sus respuestas.

### Enzimas ausentes

- a) Fosfofructoquinasa
- b) Fosfoglucomutasa
- c) Triosafosfato isomerasa
- d) UDP-Gal-4- epimerasa
- e) Glucógeno fosforilasa quinasa
- f) Glucógeno fosforilasa fosfatasa

### Consecuencias

- 1) Incapacidad para utilizar galactosa como fuente de energía sin ningún efecto sobre la capacidad para utilizar glucógeno.
  - 2) Incapacidad para utilizar el glucógeno o galactosa como fuente de energía.
  - 3) Capacidad disminuida para obtener energía de los carbohidratos.
  - 4) Evita el uso de la mayor parte de los carbohidratos para la producción de ATP.
  - 5) Una disminución en el nivel del estado estacionario del glucógeno.
  - 6) Incapacidad para utilizar glucógeno como fuente de energía sin ningún efecto sobre la capacidad para utilizar galactosa.
- Ubique cada enzima con la consecuencia más probable (solamente una) de la segunda lista.

2-Señale la posición del carbono isotópico en el ácido cítrico, cuando se incuban los siguientes compuestos marcados isotópicamente:

- a)  $3\text{-}^{14}\text{C}$  –Piruvato      b)  $2\text{-}^{14}\text{C}$ - Piruvato      c)  $5\text{-}^{14}\text{C}$ - Fructosa-6-fosfato



3- ¿Cuál es el rendimiento en ATP cuando cada uno de los siguientes sustratos es oxidado completamente a  $\text{CO}_2$  por un homogenato celular? Suponga que la vía glicolítica, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa son completamente activos.

- a) Piruvato    b) Lactato    c) Fructosa-1,6-bisfosfato

4- Explique el destino metabólico de la glucosa-6-fosfato bajo cada una de las siguientes condiciones:

- a) Cuando las necesidades de NADPH son mayores que las de ribosa-5-fosfato.  
b) Cuando las necesidades de ribosa-5-fosfato son mayores que las de NADPH.

5- Se incubó glucosa-6-fosfato marcada con  $^{14}\text{C}$  en  $\text{C}_6$  con una suspensión de eritrocitos en presencia de un potente inhibidor de la fosfoglucoisomerasa. Al cabo de un tiempo se detectó la presencia de piruvato  $^{14}\text{C}$ .

Esquematice las reacciones que llevan a la producción del mismo, señalando el carbono marcado.

6- Se aislaron eritrocitos de la sangre de un sujeto sano y de un paciente con deficiencia de tiamina. Las células fueron incubadas con buffer conteniendo 1- $^{14}\text{C}$ -glucosa y se determinaron las cantidades de  $^{14}\text{CO}_2$  y  $^{14}\text{C}$ -láctico formados al cabo de 1 hora. Analice los resultados obtenidos que se indican en la tabla y justifique la disminución de  $\text{CO}_2$  para el individuo deficiente.

Productos	% de $^{14}\text{C}$ en productos	
	Sujeto sano	Sujeto con la deficiencia
$\text{CO}_2$	10,4	1,7
Láctico	80,0	98,0

### 7- Integración de las vías metabólicas en mamíferos

En base a los siguientes criterios clave complete el cuadro con las vías indicadas, así logrará tener una visión en conjunto de cada una de ellas.

	GLICÓLISIS	GLUCOGENOLISIS	GLUCOGENOGENESIS	CICLO DE KREBS	VIA DE LAS PENTOSASS
<b>Criterios claves</b> Cuál es la función de la vía. Indique el sustrato, el producto y otros compuestos de interés.					
<b>Localización</b> En particular tejidos o células del organismo					
<b>Compartimentalización</b> Lugar del proceso en el interior de la célula.					
Etapas globales de la vía y principales puntos de control.					
Mencione la relación con otras vías metabólicas.					

### GUÍA DE ESTUDIO

#### Glucogenólisis

- Degradación de glucógeno en el hepatocito: ¿en qué tipo de unión y sobre qué extremo actúa la primera enzima que interviene en la degradación? ¿Cuáles son los productos de dicha reacción?
- ¿Cuáles son las enzimas que actúan sobre el glucógeno para degradarlo a Glucosa-6-fosfato y dextrina límite?

### Ciclo de Krebs

- ¿En qué lugar de la célula se llevan a cabo las reacciones del ciclo de Krebs?
- Formular todas las reacciones del ciclo, nombrando las enzimas y coenzimas.
- En cada una de las reacciones de tipo redox que ocurren en este ciclo metabólico, ¿qué compuesto se oxida y cuál se reduce?
- ¿Cuántos moles de ATP se producen por degradación de: acetil-CoA y piruvato?
- ¿Cuál es el aceptor de electrones en cada reacción de oxidación que ocurre en el ciclo?
- ¿Cuáles son las enzimas que intervienen en la regulación directa del ciclo de Krebs y cuáles regulan esta vía de manera indirecta?
- ¿Qué intermediarios del ciclo pueden servir como precursores de otras vías metabólicas?

### Vía de las pentosas fosfato

- Reacciones, enzimas y cofactores. Formular.
- ¿Cuál es el mecanismo de acción de la transaldolasa y transcetolasa? ¿En qué reacciones actúan estas enzimas? ¿Cuáles son las enzimas de la fase oxidativa? ¿En cuáles reacciones se produce NADPH? ¿Qué vías metabólicas pueden utilizar este producto?
- ¿Qué reacciones catalizan las enzimas epimerasa e isomerasa? ¿Cómo actúa el pirofosfato de tiamina?
- En la reacción de oxidación de glucosa-6-fosfato ¿Cuáles son los productos de reacción?
- ¿Qué intermediarios de la vía glicolítica se producen en esta vía? ¿En qué órganos y tejidos es principalmente activa esta vía?

### BIBLIOGRAFÍA

- **Blanco, A. & Blanco, G. (2006)**. Química Biológica. Ed. El Ateneo.
- **Feduchi, E., Blasco, I., Romero, C.S., & Yáñez, E. (2011)**. Bioquímica. Conceptos esenciales. Panamericana.
- **Nelson, D. & Cox, M. (2008)**. Lehninger. Principios de Bioquímica. Ed. W. H. Freeman.
- **Lim, M.Y. & Roach, J. (2010)**. Lo esencial en el metabolismo y nutrición. Editorial Mosby.

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 4

### DETERMINACIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO

#### Objetivos

- Analizar la conexión y regulación entre el metabolismo de hidratos de carbono y el ciclo de Krebs, mediante la determinación del ácido cítrico generado por un cultivo de *Aspergillus Níger*.
- Demostrar la utilización de ácido cítrico en la industria alimentaria, determinando su presencia en distintos alimentos manufacturados.

#### Introducción teórica

El citrato es un metabolito natural presente en plantas. Industrialmente es obtenido principalmente, a través de procesos que precisan de la intervención de microorganismos productores de ácidos orgánicos dentro de los que se destacan los hongos filamentosos, especialmente de los géneros *Aspergillus Níger* y *Penicillium*.

En cuanto a las aplicaciones, alrededor del 60 % del ácido cítrico producido es utilizado en la industria alimenticia, un 10 % en la industria farmacéutica y un 25 % en la industria química. En la industria alimentaria se adiciona como conservantes y para realzar el sabor. En la industria química como agente anti-espuma, como suavizante y para el tratamiento de textiles, además por ser fácilmente biodegradable también es utilizado en detergentes para reemplazar a los polifosfatos, cuyo uso ha sido prohibido en muchos lugares.

#### Procedimiento general y fundamento bioquímico de la producción de ácido cítrico por la cepa de *Aspergillus níger* NRRL-1419

Para determinar la producción de ácido cítrico en cultivo se utilizará la cepa mutante de *A. níger* NRRL-1419. Esta cepa es seleccionada específicamente por poseer la característica de producir la acumulación de grandes cantidades de ácido cítrico, cuando es cultivada en un medio con alto contenido de sacarosa.

El ciclo de Krebs cumple la función de generar energía en forma de ATP o equivalentes de reducción, acoplándose a la fosforilación oxidativa. En condiciones ambientales que promueven el desarrollo celular, el ciclo funciona en estado estacionario, es decir, que los intermediarios que lo constituyen se mantienen en niveles bajos, sin

acumulación de alguno de ellos en particular. Dicho estado estacionario es conseguido mediante una regulación precisa de las enzimas presentes en las rutas metabólicas que alimentan el ciclo (recordar las vías anapleróticas). Así, resulta evidente que la producción de ácido cítrico por parte de un microorganismo requiere un funcionamiento defectuoso del ciclo de Krebs, lo cual permite la acumulación de este producto y su liberación al exterior celular para ser recuperado en el medio de cultivo.

El catabolismo de hexosas, en condiciones aeróbicas, ocurre fundamentalmente mediante la vía glicolítica, con una pequeña contribución de la vía de las pentosas fosfato. Muchas de las cepas utilizadas en la industria, como el caso de la cepa NRRL-1419 de *A. niger*, poseen mutaciones para los genes que codifican las enzimas citrato sintasa (que generan una variable enzimática que posee una actividad 7-10 veces mayor, comparada con la enzima de una cepa no productora de citrato) y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, la cual no se expresa. Esto último, favorece el proceso de producción de ácido cítrico. Sin embargo, se debe considerar que también es necesario bloquear los equilibrios que existen entre citrato e isocitrato, a través de cis-aconitato. Para bloquear los mencionados equilibrios, se reduce al mínimo la actividad de la aconitasa, mediante la ausencia de  $\text{Fe}^{2+}$  en el cultivo.

Ante la ruptura del ciclo, se interrumpe la síntesis del resto de los intermediarios, los cuales son repuestos por las reacciones anapleróticas. De estas reacciones, la más importante es la catalizada por la piruvato carboxilasa.

El citrato así acumulado, sale al citosol utilizando la lanzadera de citrato. Una vez en este compartimento celular, el citrato produciría una inhibición de la fosfofructoquinasa, principal punto de regulación de la vía glicolítica. Por lo tanto, para asegurar un continuo catabolismo de hexosas, es necesario insensibilizar a la fosfofructoquinasa de la acción moduladora del citrato. La sensibilidad de esta enzima al citrato, se anula en presencia de  $\text{NH}_4^+$ , en concentraciones superiores a las fisiológicamente usuales. La alta concentración de este ion se consigue por ausencia de  $\text{Mn}^{2+}$  en el medio de cultivo. Esta deficiencia, induce la síntesis de una proteasa, que provoca un aumento en el recambio de proteínas y una elevación del nivel de  $\text{NH}_4^+$  en la célula.

### **Cultivo de *Aspergillus niger* NRRL-1419**

#### **Materiales y métodos**

Para el crecimiento de la cepa de *A. niger* productora de ácido cítrico, se inocula 10 ml de una suspensión del hongo en un erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 100 ml de un medio de cultivo específico estéril (contiene sacarosa como fuente de carbonos, extracto de

levadura que aporta nitrógeno, vitaminas y determinados minerales como  $Mg^{+2}$ ,  $K^+$  y  $Cu^{+2}$ ) e incuba en condiciones aeróbicas, mediante agitación a 100 r.p.m., a 28° C durante 5 días.

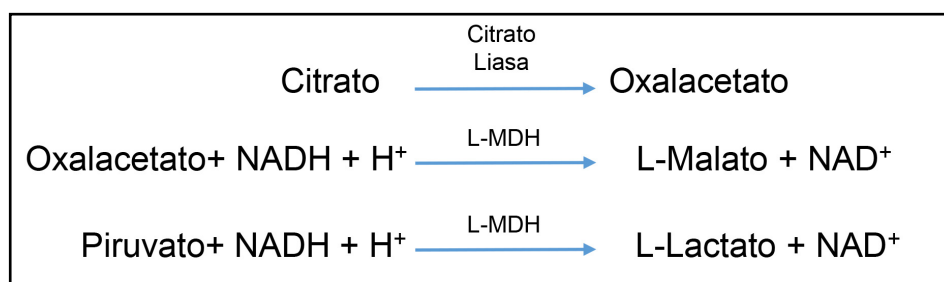
Luego de este período de incubación, se tomará una alícuota de 5 ml de medio de cultivo de *A. Níger* y se centrifugará a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos. A partir del sobrenadante de esta alícuota, se determinará la concentración de ácido cítrico (M1).

Realizaremos la comparación del ácido cítrico producido por la cepa de *A. níger* y la contenida en productos alimenticios manufacturados (M2 y M3):

- Jugo de manzana (marca comercial). En estas bebidas el ácido cítrico se utiliza como acidulante y realzante del sabor. La muestra de jugo de manzana será diluida 1:5 en agua destilada, previo a la determinación de ácido cítrico.
- Vino blanco de mesa. En esta muestra no se emplea como agregado especial en la industria vitivinícola, es posible encontrarlo en los vinos como un producto secundario a la fermentación alcohólica y en muy baja concentración. Una alícuota de vino sin diluir será empleada en el ensayo.

#### Determinación de ácido cítrico: actividades a desarrollar

La determinación de ácido cítrico en las muestras antes mencionadas (M1, M2 y M3) se realizará utilizando un equipo comercial, el cual se fundamenta en una serie de reacciones acopladas, con la determinación del consumo de NADH. En una primera etapa el ácido cítrico (citrato) es transformado en oxalacetato, gracias a la reacción catalizada por la enzima citrato liasa. En presencia de la enzima L-malato deshidrogenasa (L-MDH) y de L-lactado deshidrogenasa (L-LDH), el oxalacetato y su producto de descarboxilación, piruvato, se reducen a L-malato y L-lactato respectivamente, utilizando como coenzima NADH.



La cantidad de NADH oxidado en las reacciones anteriores, es estequiométrico con la cantidad de citrato presente en la muestra analizada. Para evaluar la cantidad de NADH consumido, se realiza la determinación de la absorbancia a 334 nm.

El equipo comercial utilizado incluye tres recipientes, que contienen:  
Recipiente 1: buffer glicil-glicina; pH 7,8; L-malato deshidrogenasa, aprox. 136 U; L-lactato deshidrogenasa, aprox. 280 U; NADH.

Recipiente 2: 50 mg de citrato liasa liofilizada, aprox. 12 U.

Recipiente 3: Solución estándar de ácido cítrico para control del ensayo.

En la mesada de trabajo usted encontrará el material y los reactivos necesarios para la experiencia. En este caso se utilizarán micropipetas, asegúrese de utilizar las puntas plásticas (tips) adecuadas y de no forzar estos instrumentos por encima o por debajo del volumen máximo y mínimo, respectivamente.

Ordene y rotule los tubos en una gradilla, y luego continúe con las instrucciones detalladas en la siguiente tabla:

	<b>Blanco</b>	<b>Muestra</b>
Solución 1 (µl)	250	250
Muestra (µ)	-----	50
Agua bidestilada (µl)	500	500
Mezclar. Esperar aproximadamente 5 minutos y leer la absorbancia a 334 nm (Absorbancia 1). Luego agregar:		
Solución 2 (µl)	5	5
Mezclar. Esperar aproximadamente 5 minutos y leer la absorbancia a 334 nm. (Absorbancia 2).		

**Resultados y análisis de los resultados**

**a)** Para determinar la cantidad de NADH consumido y estimar la absorbancia inespecífica, calcular la diferencia de absorbancias (A1-A2) para el blanco y las muestras mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta A = (A1-A2)_{\text{muestra}} - (A1-A2)_{\text{blanco}}$$

Finalmente para conocer la concentración de ácido cítrico en cada una de las muestras ensayadas utilizar la siguiente ecuación general:

$c = \frac{V \times PM}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \text{ (g/l)}$
--

V = volumen final (ml) (0,755 ml)

v = volumen de muestra (ml) (0,05 ml)

PM = peso molecular de la sustancia a ensayar (g/mol) (192,21 g/mol)

d = paso de luz (cm) (1 cm)

$\epsilon$  = coeficiente de extinción del NADH a 340nm:  $6,3 \times 10^{-3}(\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$  ( $6,3 \text{ mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ).

**b)** A partir de los cálculos anteriores, completar la siguiente tabla:

Muestras	[Ácido cítrico]
M1	
M2	
M3	

### Conclusiones del TPL

- Compare los resultados obtenidos a partir de las tres muestras ensayadas.
- Teniendo en cuenta las aplicaciones industriales, ¿qué conclusiones puede decir respecto a la comparación de la concentración de ácido cítrico entre los productos comerciales ensayados?
- ¿Considera que ocurrió una producción adecuada de ácido cítrico por parte de la cepa de *A. niger* utilizada? ¿Por qué?

### BIBLIOGRAFÍA

- **Nelson, D. & Cox, M. (2008)**. Lehninger. Principios de Bioquímica. Ed. W. H. Freeman.
- **Fennema, O. R. (1996)**. Fennema. Química de los alimentos, 3<sup>er</sup> Edición. Marcel Dekker Inc.
- Método UV para la determinación de ácido cítrico en alimentos y otros materiales. Roche, inserto-BOEHRINGER MANNHEIM / R-BIOPHARM. Enzymatic BioAnalysis/Food Analysis



**TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N°5**  
**METABOLISMO DE LÍPIDOS: BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS**  
**DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS**  
**CICLO DEL GLIOXILATO**

**Objetivos**

- Comprender las rutas metabólicas de la  $\beta$ -oxidación que permiten a los organismos utilizar los ácidos grasos como fuente de energía y poder reductor.
- Conocer las etapas de la síntesis de ácidos grasos.
- Interrelacionar las vías del metabolismo de lípidos con otras rutas metabólicas.
- Comprender los mecanismos de regulación del metabolismo de ácidos grasos.
- Comprender la secuencia de reacciones y la importancia metabólica del ciclo de glioxilato en los vegetales y microorganismos.

**Introducción teórica**

Los lípidos del organismo, al igual que los hidratos de carbono, se hallan en un estado metabólico dinámico, ya que sufren constantemente cambios en las diversas células del cuerpo. Los lípidos comprenden una amplia variedad de sustancias químicas, tales como triglicéridos, ácidos grasos y derivados, fosfolípidos, glucolípidos, etc. Constituyen más del 10 % del peso corporal de un individuo adulto y aproximadamente el 40 % de las calorías de la alimentación diaria. Los lípidos cumplen importantes funciones, entre las que podemos mencionar:

- Fuente de energía.
- Manto térmico. Su presencia en el tejido subcutáneo aísla al cuerpo evitando la pérdida de calor.
- Estructura de las membranas celulares.
- Estructura de hormonas que determinan caracteres sexuales secundarios.
- Aportan ácidos grasos esenciales y vitaminas.
- Son precursores de varios derivados lipídicos como por ejemplo las sales biliares, hormonas esteroideas, etc.

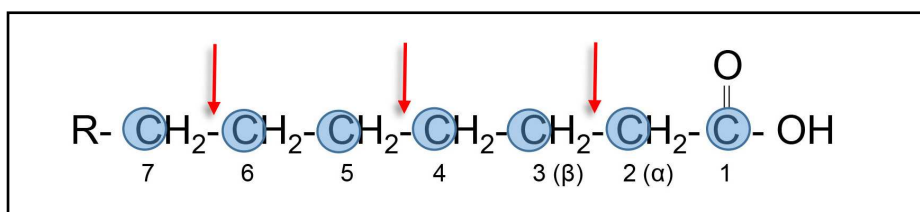
Las grasas producen por oxidación el doble de energía (9 kcal/g) que los hidratos de carbono o las proteínas (4 kcal/g), por lo que representan una importante fuente de energía para los animales superiores.

Los lípidos de la dieta, además de ser una fuente importante de energía, proporcionan sensación de saciedad, contribuyen a la palatabilidad de los alimentos y favorecen la absorción intestinal y el transporte de las vitaminas liposolubles A, D, E y K. Para que los lípidos de la dieta puedan ser utilizados por el organismo, deben ser digeridos y absorbidos en el tracto intestinal para luego ser distribuidos a través del torrente sanguíneo a las células de los distintos tejidos (principalmente hígado y tejido adiposo).

La mayor parte de los lípidos son transportados en la sangre, unidos a proteínas plasmáticas formando complejos denominados "lipoproteínas". Los triglicéridos unidos a las lipoproteínas son hidrolizados a nivel del endotelio de los vasos sanguíneos a glicerol y ácidos grasos. El glicerol es transportado al hígado y los ácidos grasos ingresan a las células donde serán almacenados, en forma de triglicéridos, o se degradarán para proveer energía.

### DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

En los mamíferos, el centro principal de acumulación de triglicéridos es el citoplasma de las células del tejido adiposo (adipocitos). El primer paso en la utilización de las grasas almacenadas en adipocitos es la hidrólisis de los triglicéridos por acción de lipasas reguladas por hormonas. Los ácidos grasos liberados de los triglicéridos deben ser activados previamente a la degradación en el citosol. Luego son transportados a través de la membrana mitocondrial interna, conjugados con carnitina, hasta la matriz mitocondrial donde se produce la oxidación. Los ácidos grasos de cadena larga se oxidan a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en la matriz mitocondrial de casi todos los tejidos de vertebrados. El músculo cardíaco obtiene la mayor parte de su energía de la oxidación de los ácidos grasos. Los ácidos grasos se degradan por eliminación oxidativa sucesiva de dos carbonos a partir del carbono beta del extremo carboxílico en un proceso denominado  $\beta$ -oxidación (fig. 5.1).



**Figura 5.1.** Esquema de un ácido graso. Se indican los carbonos alfa y beta, respectivamente y los enlaces químicos que sufren ruptura (flechas de color rojo) durante un proceso de  $\beta$ -oxidación general.

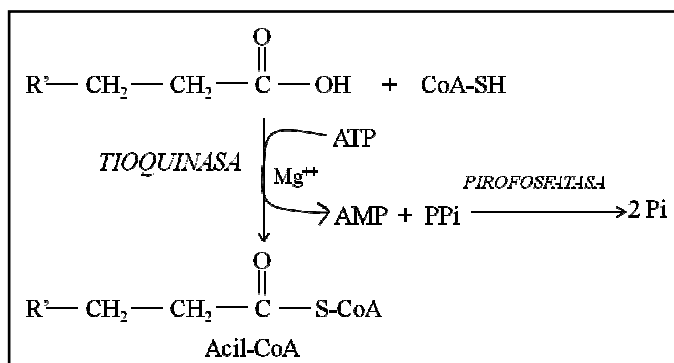
Las moléculas de acetil-CoA liberadas durante la  $\beta$ -oxidación se condensan con oxalacetato, ingresando de esa manera al ciclo de Krebs oxidándose totalmente a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . A continuación, desarrollaremos en forma detallada los procesos que conducen a la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos.

### Activación y transporte

Las moléculas de ácidos grasos, obtenidas por degradación de triglicéridos, son activadas en el citosol por la acción de tioquinasas o acil-CoA sintetasas (fig. 5.2), que catalizan la síntesis de acil-CoA. Existen tres enzimas diferentes siendo cada una de ellas específica para un intervalo de longitud de cadena del ácido graso:

- 1- Activadoras de ácidos grasos de cadena corta: acético, propiónico.
- 2- Activadoras de ácidos grasos de cadena intermedia (entre 4 y 12 átomos de carbono).
- 3- Activadoras de ácidos grasos de cadena larga (más de 12 átomos de carbono), por ej.: ácido palmítico, ácido oleico, ácido esteárico.

Las dos últimas activan tanto ácidos grasos saturados como insaturados. Las tres enzimas tienen idéntico mecanismo de reacción.

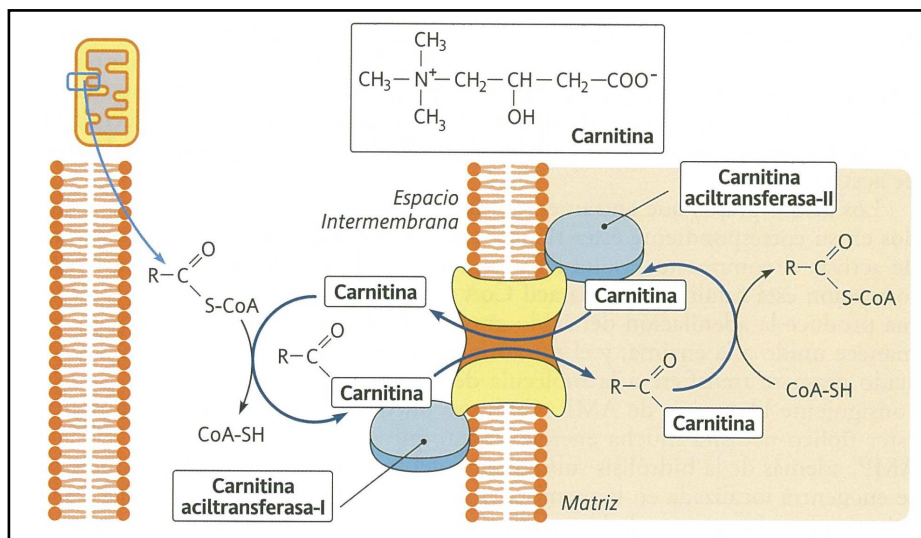


**Figura 5.2.** Esquema de las reacciones involucradas en la activación de ácidos grasos, previo al proceso de  $\beta$ -oxidación.

La reacción de activación de ácidos grasos es irreversible, debido a que la hidrólisis del pirofosfato (PPI) asegura que el equilibrio se desplace hacia la formación de acil-CoA. En esta reacción está implicado un intermediario unido a la enzima, que es un anhídrido mixto: acil-AMP o acil adenilato que le permite generar después una unión tioéster de elevada energía. El efecto neto es la utilización o consumo de 2 enlaces ricos en energía del ATP para activar una molécula de ácido graso.

Los ácidos grasos activados de 12 o menos carbonos (presentes en algunos alimentos tales como leche materna y leche de cabra) ingresan en la mitocondria sin la ayuda de transportadores de membrana. Los ácidos grasos de 14 o más carbonos, que constituyen la mayoría de los obtenidos en la dieta o liberados del tejido adiposo, no pueden

atravesar directamente las membranas mitocondriales. Así, existe un sistema de transporte que permite transferir el grupo acilo hacia la matriz mitocondrial, que es impermeable a los ácidos grasos y a sus derivados CoA. El sistema de transferencia es la lanzadera de la carnitina (fig. 5.3) que comprende un contra-transportador carnitina/acilcarnitina y dos enzimas: carnitina-acil transferasa I, ubicada en la cara externa de la membrana interna de la mitocondria y carnitina acil transferasa II, localizada en la faz de la membrana que da a la matriz. La molécula transportadora es la carnitina, sintetizada en humanos en hígado y riñón a partir del aminoácido lisina.

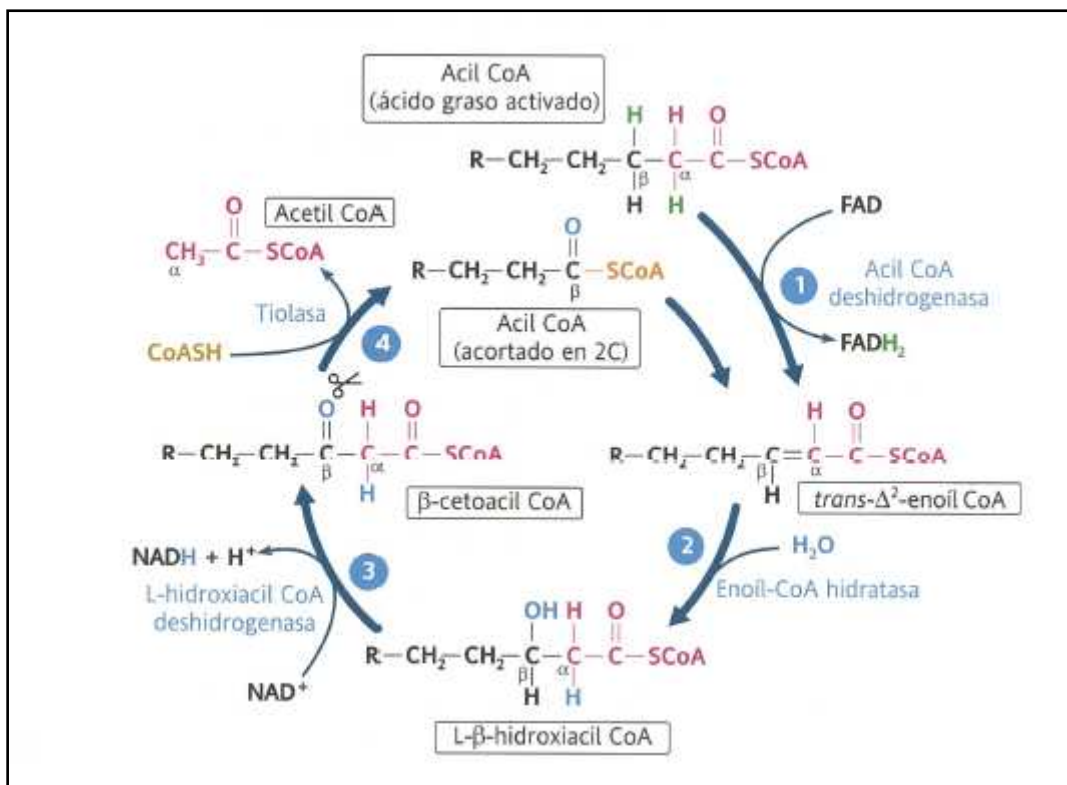


**Figura 5.3.** Sistema de transporte de ácidos grasos "lanzadera de carnitina", que permite el transporte de ácidos grasos desde el citosol hacia la matriz mitocondrial. Tomado desde Feduchi y cols. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2011. Ed. Panamericana.

### Oxidación de ácidos grasos saturados

Dentro de la matriz mitocondrial las moléculas de acil-CoA sufren el proceso de  $\beta$ -oxidación (fig. 5.4), el cual consiste en una secuencia cíclica de cuatro reacciones: oxidación, hidratación, oxidación y ruptura de la cadena con liberación de acetil-CoA. En cada ciclo de  $\beta$ -oxidación, los productos formados son acetil-CoA y un acil-CoA cuya cadena carbonada posee dos carbonos menos que el inicial.

El ciclo de oxidación se repite hasta la completa degradación del acil-CoA y liberación de acetatos activos. Estos últimos, ingresan al ciclo del Krebs para su oxidación final a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ .



**Figura 5.4.** Representación esquemática de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. Tomado desde Feduchi y cols. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2011. Ed. Panamericana.

### Balance energético de la oxidación total del ácido palmítico (16 C)

Durante un ciclo de  $\beta$ -oxidación hay dos etapas en las cuales se transfieren equivalentes de reducción, transferidos por  $\text{FADH}_2$  y  $\text{NADH}$  a la cadena respiratoria. Como consecuencia el rendimiento total es de 5 moléculas de ATP por ciclo. A su vez, en cada etapa se libera una molécula de acetil-CoA que se incorpora al ciclo de Krebs para producir 12 ATP. Por lo tanto, el rendimiento neto de la oxidación de un ácido graso de por ejemplo dieciséis carbonos, como el ácido palmítico será:

Producción de ATP en la beta-oxidación. Siete ciclos (5x7)	+ 35
Producción de ATP por oxidación en el ciclo de Krebs (8 acetil Coa) (12x8)	+ 96
Consumo para activación inicial	- 2
<b>Producción neta de ATP</b>	<b>129</b>

A partir del cálculo anterior, comprendemos que a partir de un mol de ácido palmítico se generan 129 moles de ATP. El 40% de la energía libre estándar de la oxidación de palmítico se recupera en forma de fosfato de alta energía.

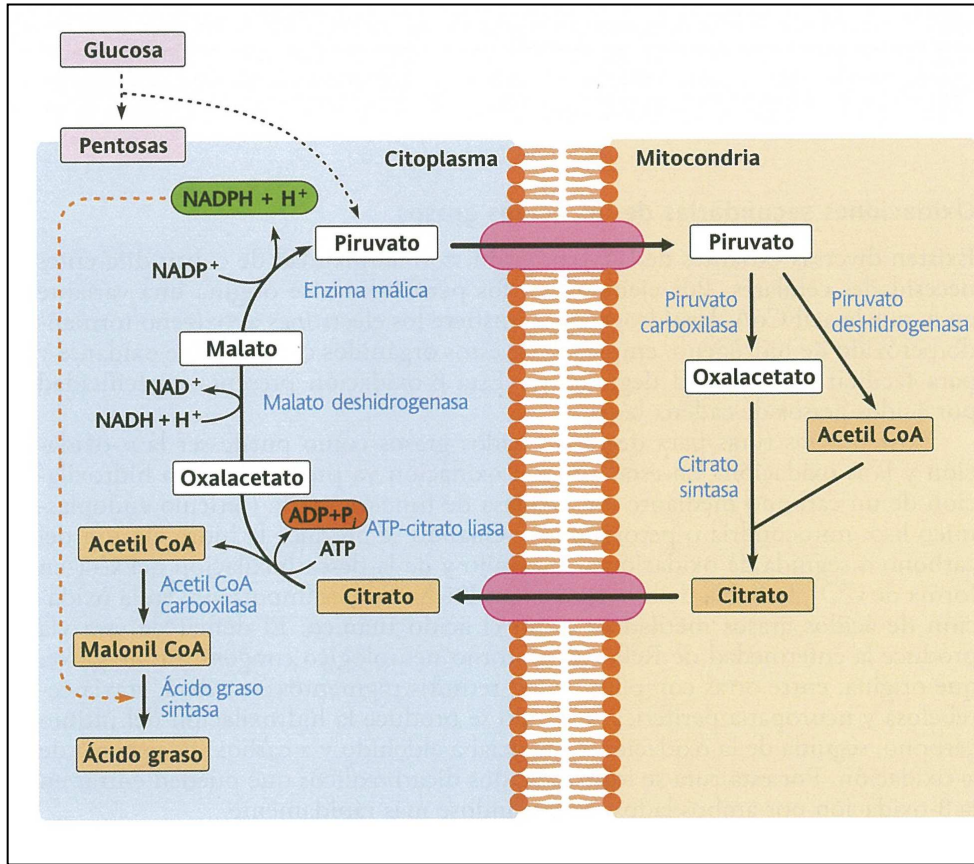
## BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS SATURADOS

La síntesis de ácidos grasos, o lipogénesis, consiste en una serie de reacciones cíclicas en las que se construye una molécula de ácido graso mediante la adición secuencial de unidades de dos carbonos derivadas de acetil-CoA. Esta síntesis predomina en órganos y tejidos como hígado, tejido adiposo, glándula mamaria en períodos de lactancia, riñón y pulmón. Es un proceso muy activo cuando la dieta supera las necesidades calóricas, siendo en ese caso el exceso de acetil-CoA derivado hacia la síntesis de ácidos grasos. Los precursores de este proceso de biosíntesis son: acetil-CoA y malonil-CoA. El poder reductor para la síntesis es provisto por NADPH, generado en la vía de las pentosas-fosfato o el ciclo citrato-piruvato (vía de la enzima málica), y el principal producto formado es el palmitato libre.

La síntesis completa de ácidos grasos saturados a partir de acetato activo (acetil-CoA), ocurre en el citosol y es catalizado por un complejo multienzimático llamado ácido graso sintasa. Este complejo está formado por dos subunidades idénticas que funcionan en estrecha asociación. A su vez, cada subunidad presenta siete sitios catalíticos y la proteína portadora de restos acilo, denominada “proteína transportadora de acilos” (PTA) o ACP (del inglés: *acyl carrier protein*). La ACP es una proteína termoestable a la que permanecen unidos los intermediarios que se forman durante la biosíntesis. El grupo acilo en crecimiento es transportado de enzima en enzima, como en un montaje en serie, fijado al ACP tioéster.

En bacterias como la *E. coli*, las enzimas del complejo se encuentran asociadas alrededor de una molécula central de ACP y se pueden separar conservando su actividad.

Dado que los ácidos grasos se sintetizan en el citosol a partir de acetil-CoA y que estos restos de dos carbonos se producen en la matriz mitocondrial, es necesario que los sean transferidos al exterior de las mitocondrias. La membrana interna no es permeable a acetil-CoA y el sistema transportador de la carnitina funciona preferentemente con acilos de cadena larga. En este caso, este transporte de los ácidos grasos hacia el citosol ocurre gracias al denominado “ciclo del citrato” (fig. 5.5). Las moléculas de acetil-CoA reaccionan con oxalacetato formando citrato, de esta manera abandonan la mitocondria y son liberados para la síntesis de ácidos grasos, el citrato es escindido en reacción catalizada por citrato liasa citosólica, con la participación de coenzima A y ATP. El oxalacetato sufre una serie de reacciones a través de las cuales se transforma en malato o en piruvato, que disponen de transportadores en la membrana mitocondrial. El oxalacetato es reducido a malato por malato deshidrogenasa citosólica y luego descarboxilado a piruvato por la enzima málica, ligada a NADP.

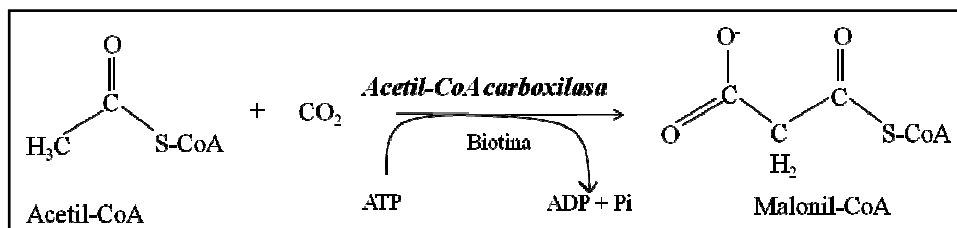


**Figura 5.5.** Ciclo del citrato: Origen del citrato y actuación de la acetil-CoA carboxilasa. Tomado desde Feduchi y cols. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2011. Ed. Panamericana.

### Formación de malonil-CoA

Una molécula de acetil-CoA reacciona con  $\text{CO}_2$  para formar malonil-CoA por acción de la acetil-CoA carboxilasa que utiliza biotina (Vitamina del complejo B) como coenzima, la cual actúa como transportador de  $\text{CO}_2$  (fig. 5.6).

Esta etapa es irreversible y es limitante de la velocidad en la biosíntesis de ácidos grasos. La enzima acetil CoA carboxilasa es alostérica, estimulada por citrato e inhibida por ácidos grasos libres y por acil-CoA de cadena larga como palmitoil-CoA. Su actividad está también regulada por hormonas y por la dieta.



**Figura 5.6.** Reacción catalizada por la acetil-CoA carboxilasa para la síntesis de malonil-CoA.

Reacciones de síntesis de ácidos grasos

A continuación, se encuentra un esquema de las reacciones que conducen a la síntesis de palmitato en los organismos superiores y bacterias.

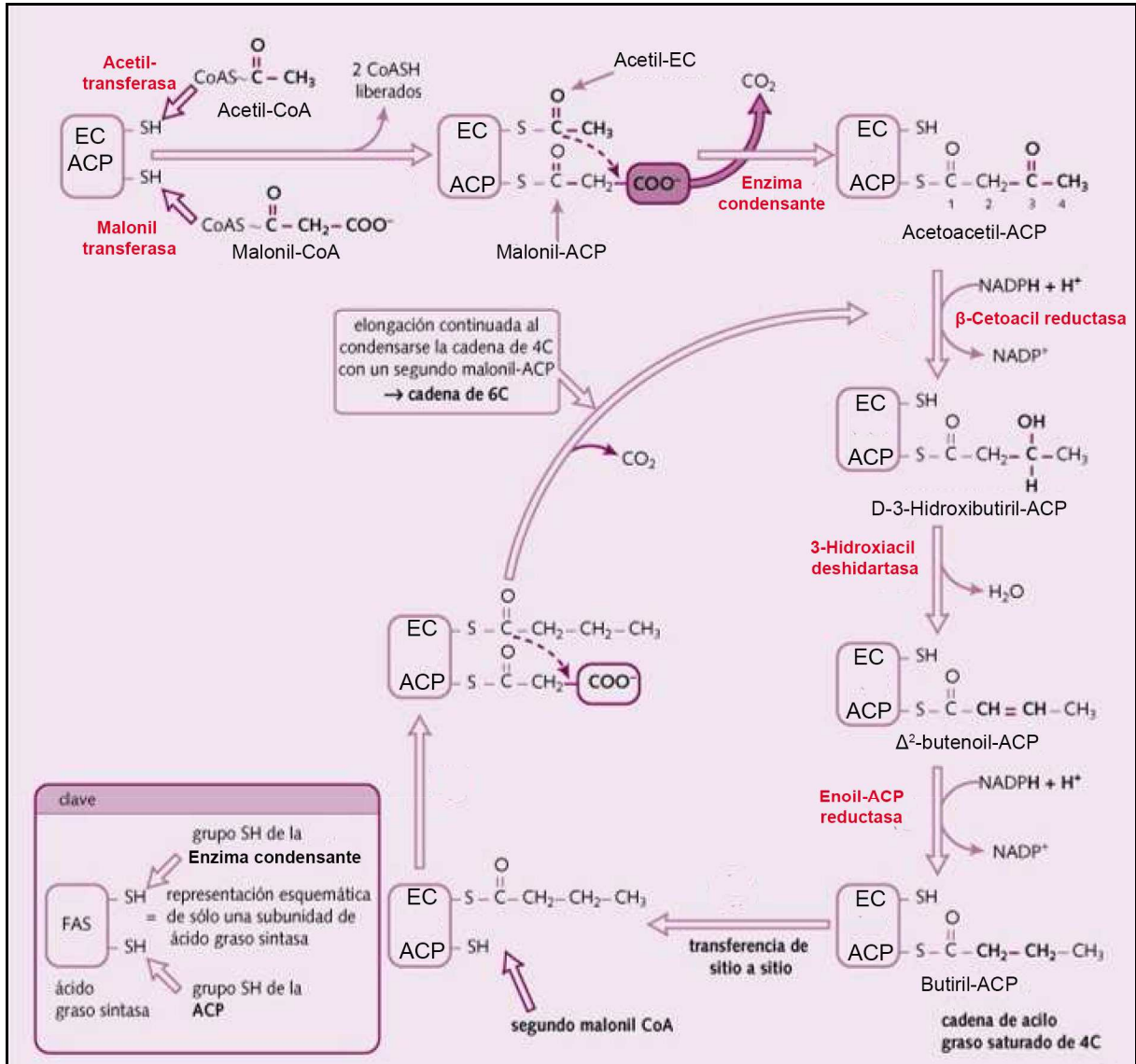


Figura 5.7. Reacciones involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos. Modificado desde Benyon, S. "Metabolismo y Nutrición", 2010. Ed. Harcourt Brace.

El producto de esta secuencia de reacciones es butiril-ACP, así se completa el primer ciclo de elongación. En el segundo ciclo el butiril es transferido desde la ACP a la enzima condensante (EC) formándose butiril-EC, éste se condensa con otra molécula de malonil-ACP y se repite el ciclo para formar un hexil-ACP. Los ciclos de elongación continúan hasta llegar a palmitoil-ACP, el cual se hidroliza por acción de una esterasa para producir palmitato y ACP. Para la síntesis de ácido palmítico se consumen 7 moléculas de ATP y 14 NADPH.



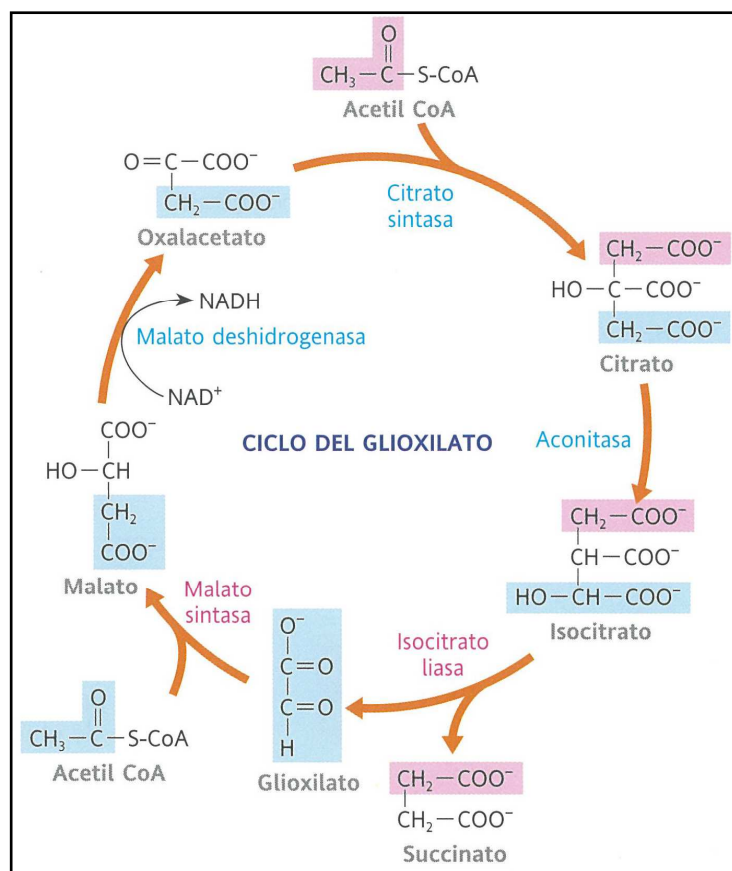
**COMPARACIÓN ENTRE LA SÍNTESIS Y LA DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS**

	<b>SÍNTESIS</b>	<b>DEGRADACIÓN</b>
Activa	Tras comidas, situación post-prandial	Ayuno y ejercicio prolongado
Principales tejidos implicados	Hígado y tejido adiposo	Músculo e hígado
Compartimento celular	Citosol	Mitocondria
Donante/ productor de 2C	Acetil-CoA/ Malonil-CoA	Acetil-CoA
Transportador de ácido graso activo	Unido a ACP	Unido a CoA
Enzimas	Complejo multienzimático: ácido graso sintasa	Probablemente no asociadas.
Oxidante / reductor	NADPH	NAD <sup>+</sup> y FAD
Control alostérico	El citrato activa la acetil-CoA carboxilasa, el palmitoil-CoA la inhibe	Malonil-CoA inhibe la carnitina-acil-transferasa I
Control hormonal	La insulina activa la acetil-CoA carboxilasa, la adrenalina y el glucagón la inhiben.	La adrenalina y el glucagón activan la lipasa, la insulina la inhibe
Producto final de la vía	Palmitato.	Acetil CoA

### CICLO DEL GLIOXILATO

Los vertebrados no pueden utilizar los ácidos grasos o el acetato derivado de ellos como material de partida para sintetizar glucosa mediante gluconeogénesis. Sin embargo, en las plantas, ciertos invertebrados y algunos microorganismos, el acetato puede ser utilizado como fuente de fosfoenolpiruvato para la síntesis de glúcidos. En estos organismos las enzimas del ciclo del glioxilato (fig. 5.8) catalizan la conversión neta de acetato en succinato u otro intermediario de cuatro átomos de carbono del ciclo de Krebs.

Al igual que ocurre en el ciclo de Krebs, en el ciclo del glioxilato el acetyl-CoA se condensa con el oxalacetato para dar citrato que luego es convertido en isocitrato. En este caso, sobre el isocitrato actúa la isocitrato liasa formando succinato y glioxilato. El glioxilato se condensa con una segunda molécula de acetyl-CoA para dar malato en una reacción catalizada por malato sintasa. Las enzimas isocitrato liasa y malato sintasa son específicas del ciclo del glioxilato, mientras que las enzimas restantes son comunes a las enzimas del ciclo de Krebs (son isoenzimas).



**Figura 5.8.** Reacciones químicas involucradas en el ciclo del glioxilato. Tomado desde Feduchi y cols. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2011. Ed. Panamericana.

En cada vuelta del ciclo del glioxilato, se consumen dos moléculas de acetil-CoA, mientras que se produce una molécula de succinato, disponible para fines biosintéticos. El succinato puede convertirse a través de fumarato y malato en oxalacetato, el cual a su vez, puede transformarse en fosfoenolpiruvato y producir glucosa mediante gluconeogénesis.

## PROBLEMAS DE APLICACIÓN

### Degradación de ácidos grasos

1- a) Se oxida palmitato (9-C<sup>14</sup>) en condiciones de funcionamiento del ciclo de Krebs. ¿Cuál será la localización del <sup>14</sup>C en los siguientes compuestos?:

- Acetil-CoA.
- Citrato. Considere tan solo una vuelta al ciclo de Krebs.
- Butiril-CoA.

b) Si el ácido palmítico sólo estuviera marcado en posición de 15-C y 16-C al degradarse por beta-oxidación la unidad de acetil-CoA marcada sería la producida:

- a partir de la ruptura tiolítica del beta-cetopalmitoil-CoA
- a partir de la ruptura tiolítica de acetoacetil-CoA

2- Con respecto a la  $\beta$ -oxidación del ácido esteárico (18 C), responda:

- ¿Cuántos ciclos son necesarios para oxidarlo hasta acetil-CoA cuántos se producen?
- ¿Cuántos ATP se generan? Considere el proceso de activación.
- Calcule el rendimiento de ATP cuando el ácido es oxidado completamente hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O.

3- Suponga que tuviera que subsistir con una dieta consistente en grasa de ballena y foca, sin prácticamente ningún aporte de glúcidos.

- ¿Cuál sería el efecto de la privación de glúcidos sobre la utilización de grasas para la obtención de energía?
- Si la dieta no contiene glúcidos en absoluto, ¿sería mejor consumir ácidos grasos de cadena par o impar?

### Biosíntesis de ácidos grasos

4- Suponiendo que se incubaba homogenato de tejido que posee todas las enzimas necesarias para la síntesis de ácidos grasos y también NADPH, ATP, CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> y 2-<sup>14</sup>C-piruvato ¿Cuáles serán los átomos de carbono que resultarán marcados en el ácido palmítico?

5- ¿Cuál de los siguientes compuestos puede servir para la síntesis neta de ácidos grasos en el organismo de rata? ¿Cuántos átomos de carbono de cada uno de ellos pueden ser convertidos en carbonos de ácidos grasos?

a- Fructosa

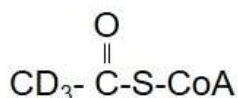
b- Sacarosa

c- Bicarbonato de sodio

6- Cuántas moléculas de glucosa se convierten en ribulosa-5-P cuando una molécula de ácido palmítico se sintetiza a partir de acetil-CoA? Considere que los carbonos del oxalacetato producido por el clivaje del citrato, regresan a la mitocondria a través de malato y no por el piruvato que podría obtenerse por acción de la enzima málica.

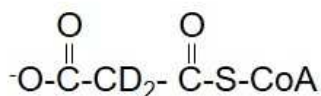
7- Considere una preparación que contiene todas las enzimas y los cofactores necesarios para la biosíntesis de los ácidos grasos a partir de acetil-CoA y malonil-CoA que se han añadido.

a) Si la molécula de acetil CoA marcada con deuterio (isótopo pesado del hidrógeno) y un exceso de malonil-CoA se añaden como sustrato:



- ¿Cuántos átomos de deuterio se incorporarán a cada molécula de palmitato?
- ¿Cuáles son las localizaciones de estos átomos de deuterio? Explicar.

b) Si se añaden como sustratos acetil CoA sin marcar y malonil CoA marcada con deuterio:



- ¿Cuántos átomos de deuterio se incorporarán a cada molécula de palmitato?
- ¿Cuáles serán sus localizaciones? Explicar.

### Ciclo del glioxilato

8- Se ha observado que durante el crecimiento de varios hongos patógenos de plantas hay una elevada expresión de la enzima isocitrato liasa. Estos hongos ven favorecido su desarrollo, con respecto a otras especies, en condiciones de baja concentración de glucosa, baja tensión de oxígeno y altos niveles de acetato.

a) ¿Cómo explica que una mayor expresión de isocitrato liasa favorezca el desarrollo de estos hongos en las condiciones mencionadas?

El ciclo del glioxilato también es llevado a cabo en semillas en germinación.

- b) ¿Cuál sería la principal fuente de carbonos en ese caso?
- c) ¿Qué organelas estarían implicadas?

d) Explique el sentido general de ciclo del glioxilato. ¿Considera que se trata de una vía anabólica o catabólica?

## GUIA DE ESTUDIO

### Degradación de ácidos grasos

- Esquematice la primera secuencia de reacciones de la degradación de palmitoil-CoA, mencionando las enzimas que intervienen.
- ¿Qué enzima interviene en el proceso de activación de un ácido graso? ¿Cuántas uniones de alta energía se gastan en este proceso? Formular la reacción.
- ¿Cómo se transporta el ácido graso desde el citosol a la mitocondria?
- ¿Cuáles son las coenzimas que intervienen en el proceso de  $\beta$ -oxidación?
- ¿En qué lugar de la célula ocurre el proceso de degradación de los ácidos grasos?
- ¿Cuáles son los productos de la degradación de un ácido graso de número impar de átomos de carbono?
- ¿Cuántos ATP y cuántas moléculas de acetil-CoA se producen por degradación de un ácido graso de 12 átomos de carbono hasta acetil-CoA? Ídem hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ ?
- ¿En qué procesos metabólicos pueden utilizarse los carbonos provenientes de la degradación de los ácidos grasos?

### Ciclo del glioxilato

- ¿En qué tipo de organismos ocurre y cuál es su objetivo?
- Localización celular. Esquema de las reacciones implicadas.
- Diferencias con el ciclo de Krebs.

### Biosíntesis de ácidos grasos

- Esquematizar las etapas de la síntesis de ácidos grasos indicando las enzimas correspondientes.
- ¿Cuál es el intermediario del Ciclo de Krebs que transporta los grupos acetatos desde la mitocondria al citosol?
- ¿Cuál es la etapa limitante de la velocidad de reacción y cuáles son los moduladores de la enzima?
- ¿Cuáles son los precursores de la síntesis de ácidos grasos?

- ¿Cuántas moléculas de NADPH y ATP se requieren para sintetizar palmitoil-ACP?
- ¿De dónde proviene el NADPH?

### BIBLIOGRAFÍA

- **Benyon, S. (2010)**. Lo esencial en metabolismo y nutrición”. Editorial Harcourt Brace.
- **Feduchi, E., Blasco, I., Romero, C.S., & Yáñez, E. (2011)**. Bioquímica. Conceptos esenciales. Editorial Panamericana.
- **Nelson, D. & Cox, M. (2008)**. Lehninger. Principios de Bioquímica. Ed. W. H. Freeman.
- **Lim, M.Y. & Roach, J. (2010)**. Lo esencial en el metabolismo y nutrición. Editorial Mosby.

**TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 6**  
**METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS Y NUCLEÓTIDOS. DEGRADACION DE**  
**AMINOACIDOS**

**METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS**

**Objetivos**

- Comprender el proceso de degradación de los aminoácidos como fuente de energía para los organismos.
- Comprender la vía de eliminación del amoníaco a través del ciclo de la urea, las reacciones y enzimas involucradas, regulación, origen de los precursores, localización intracelular, balance energético.
- Interrelacionar el metabolismo de los aminoácidos con otras vías metabólicas.
- Entender la importancia de los aminoácidos por sus funciones precursoras y valorar su papel fisiológico en los organismos.

**Introducción teórica**

La función fundamental de las proteínas en la dieta es la de proporcionar nitrógeno aminoacídico para la síntesis de nuevas proteínas y otros compuestos nitrogenados no proteicos. En los mamíferos, las proteínas de los alimentos son digeridas por enzimas proteolíticas del tracto intestinal, a péptidos pequeños o aminoácidos libres.

Entre las enzimas proteolíticas podemos mencionar: la pepsina presente en el jugo gástrico, proteasas segregadas como zimógenos por el páncreas (tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas A y B, elastasa) y por las células de la mucosa intestinal (aminopeptidasas, dipeptidasas).

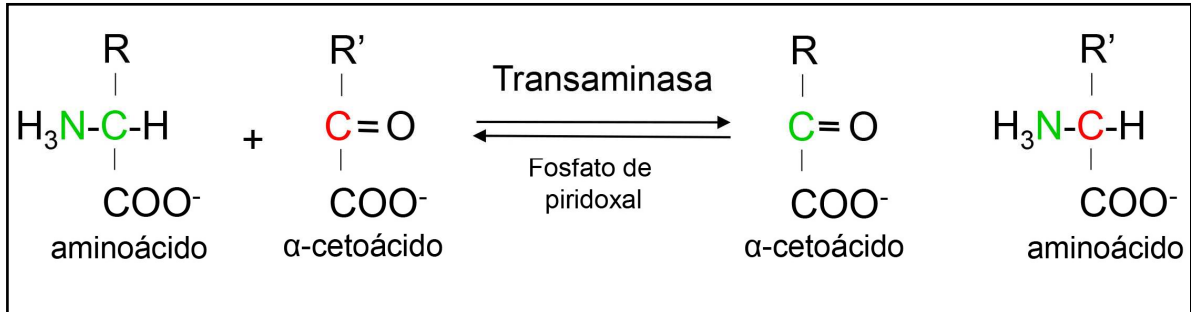
Los aminoácidos libres y los péptidos pequeños se absorben a través de las células de la mucosa intestinal. Existen mecanismos específicos de absorción, que incluyen transportadores de membrana para aminoácidos ácidos, básicos y neutros. Los péptidos absorbidos son hidrolizados a aminoácidos en el interior de la célula intestinal, los cuales pasan luego a la vena porta para su transporte al hígado u otros tejidos.

Además de su rol primario en la síntesis de proteínas tisulares, los aminoácidos pueden ser convertidos en otros metabolitos esenciales o ser degradados a sus esqueletos carbonados tras la eliminación del grupo amino. Los restos carbonados pueden convertirse en otros metabolitos (glucosa, cuerpos cetónicos, etc.) u oxidarse mediante el ciclo de

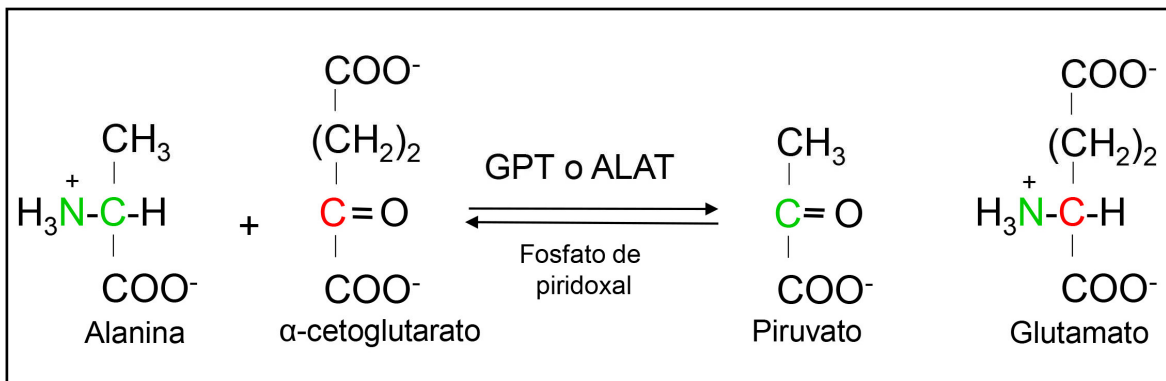


Krebs, para producir CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y ATP. La pérdida del grupo amino ocurre por dos rutas principales: transaminación y desaminación oxidativa.

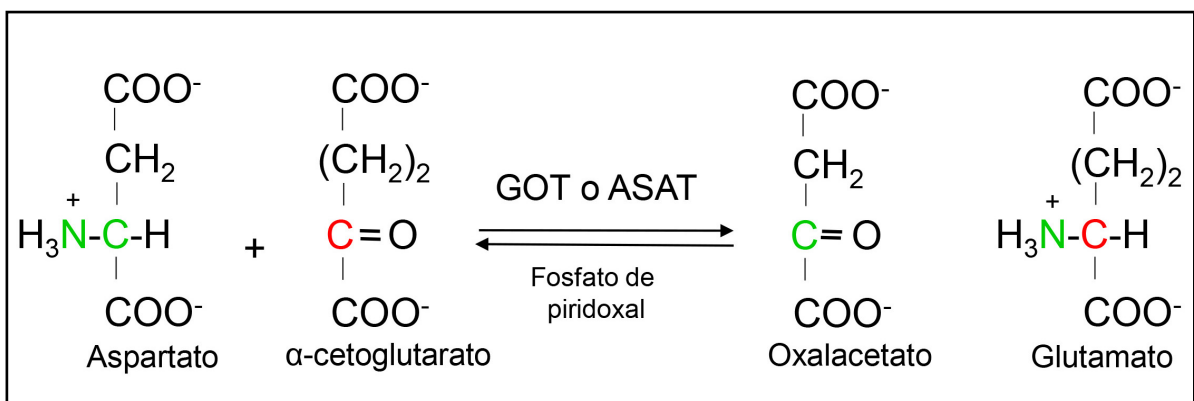
La ecuación química general de transaminación puede representarse:



Uno de los α-cetoácidos implicados con mayor frecuencia en las reacciones de transaminación es el α-cetoglutarato. Cuando éste recibe el grupo amino cedido por alanina la reacción es catalizada por la enzima alanina-amino transferasa (ALAT) también conocida como glutámico-pirúvico transaminasa (GPT).

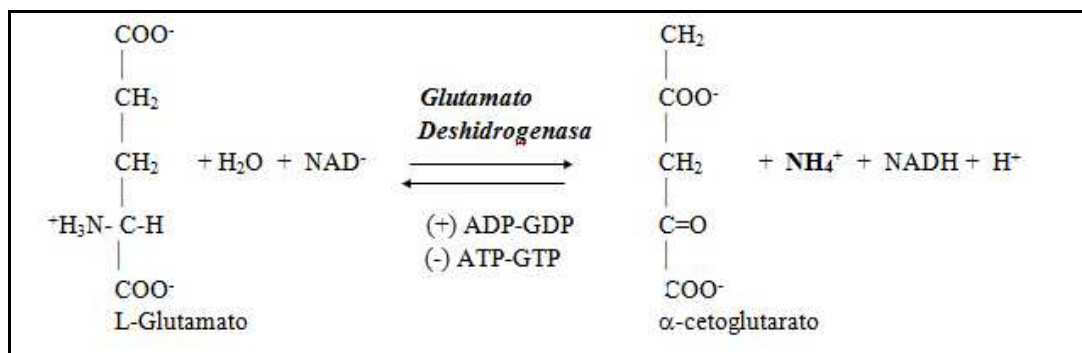


Cuando el proceso de transaminación ocurre entre α-cetoglutarato y aspartato, la enzima que cataliza esta reacción es la aspartato-amino transferasa (ASAT), también conocida como glutámico-oxalacético transaminasa (GOT).



A diferencia de las reacciones de transaminación, en las cuales sólo hay una transferencia del grupo amino de los aminoácidos hacia un alfa-cetoácido, uno de los procesos de pérdida del grupo amino ocurre a través de la reacción de desaminación oxidativa (fig. 6.1). La reacción de desaminación oxidativa es catalizada por la enzima mitocondrial glutamato deshidrogenasa, la cual cataliza reversiblemente la separación del grupo amino del glutamato. El amoníaco liberado puede unirse al  $\alpha$ -cetoglutarato para generar L-glutamato, por lo tanto, sirve también como una vía de síntesis. La enzima utiliza como coenzima al NAD y al NADP. En la reacción directa generalmente participa el  $\text{NAD}^+$  y se forma  $\alpha$ -cetoglutarato y amoníaco. Esta es una enzima alostérica siendo sus moduladores positivos ADP y GDP, mientras que ATP y GTP son moduladores negativos.

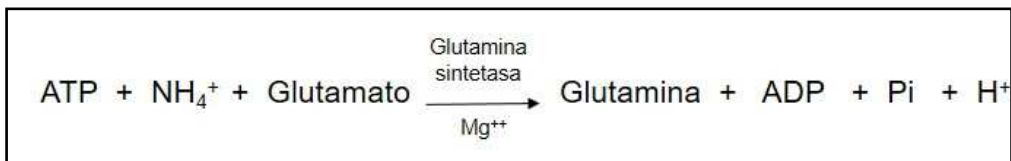
El amoníaco a pH fisiológico capta un protón y se convierte en ion amonio; ambos compuestos nitrogenados son altamente tóxicos, sobre todo a nivel de cerebro. Una de las posibles razones de su toxicidad se debería a que, al aumentar los niveles de amoníaco en las mitocondrias, se invierte la reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa hacia la formación de L-glutamato. El  $\alpha$ -cetoglutarato, un intermediario del ciclo de Krebs, va desapareciendo y, por consiguiente, se deprime esta vía de oxidación y la formación de ATP, indispensable para el cerebro.



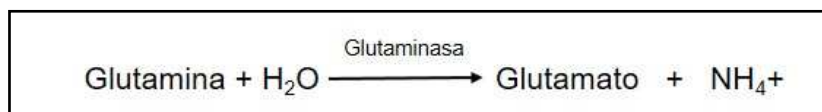
**Figura 6.1.** Ecuación química del proceso de desaminación oxidativa. La actividad de la glutamato deshidrogenasa es regulada por moduladores alostéricos positivos (+) o negativos (-).

En la mayoría de los vertebrados terrestres, el  $\text{NH}_4^+$  generado por desaminación oxidativa, es transformado en urea, metabolito no tóxico que es excretado. Sin embargo, esta transformación ocurre en hígado, por lo tanto, el amoníaco de tejidos periférico debe ser transportado hasta este órgano, o bien, hacia riñón, en donde se excreta como tal. Como el amoníaco es tóxico, es transformado primero en glutamina, compuesto no tóxico, y bajo esa forma es transportado hacia hígado y riñón (fig. 6.2).

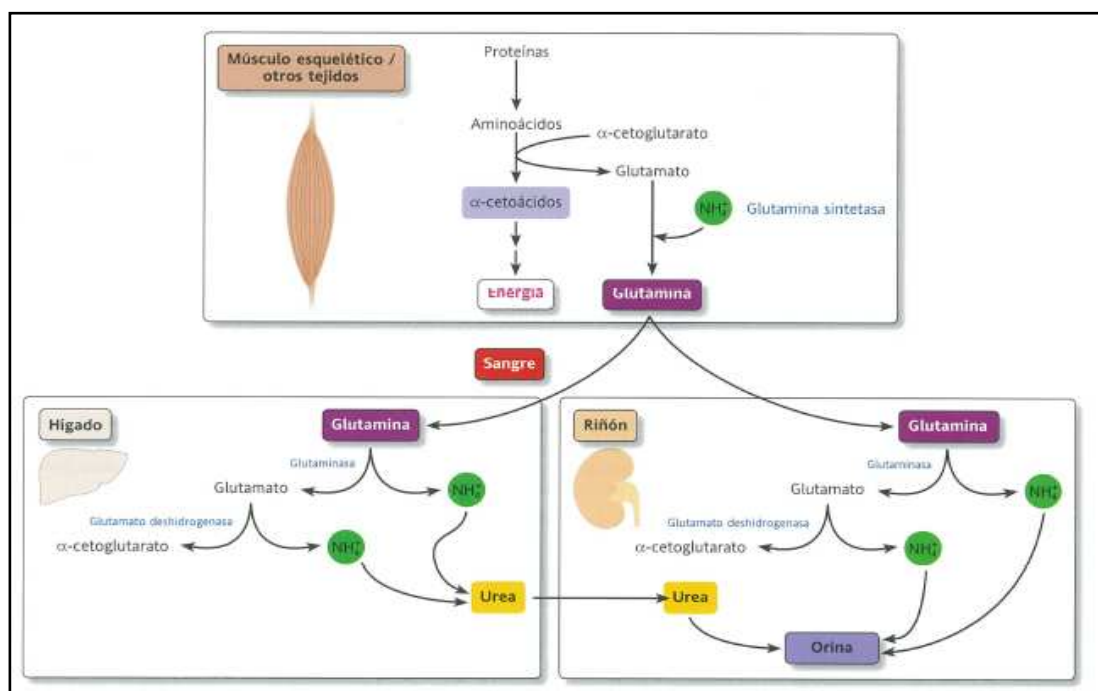
La síntesis de glutamina tiene lugar por acción de la enzima glutamina sintetasa que cataliza la siguiente reacción:



En la mayor parte de los animales, la glutamina es transportada por vía sanguínea hasta el hígado en donde se transforma en glutamato y amoníaco por acción de la enzima glutaminasa. Esta enzima también se encuentra en los túbulos renales.



En la mayoría de los vertebrados terrestres, el  $\text{NH}_4^+$  así formado se convierte en urea en el hígado, a través del ciclo de la urea, y luego ésta es excretada con la orina.

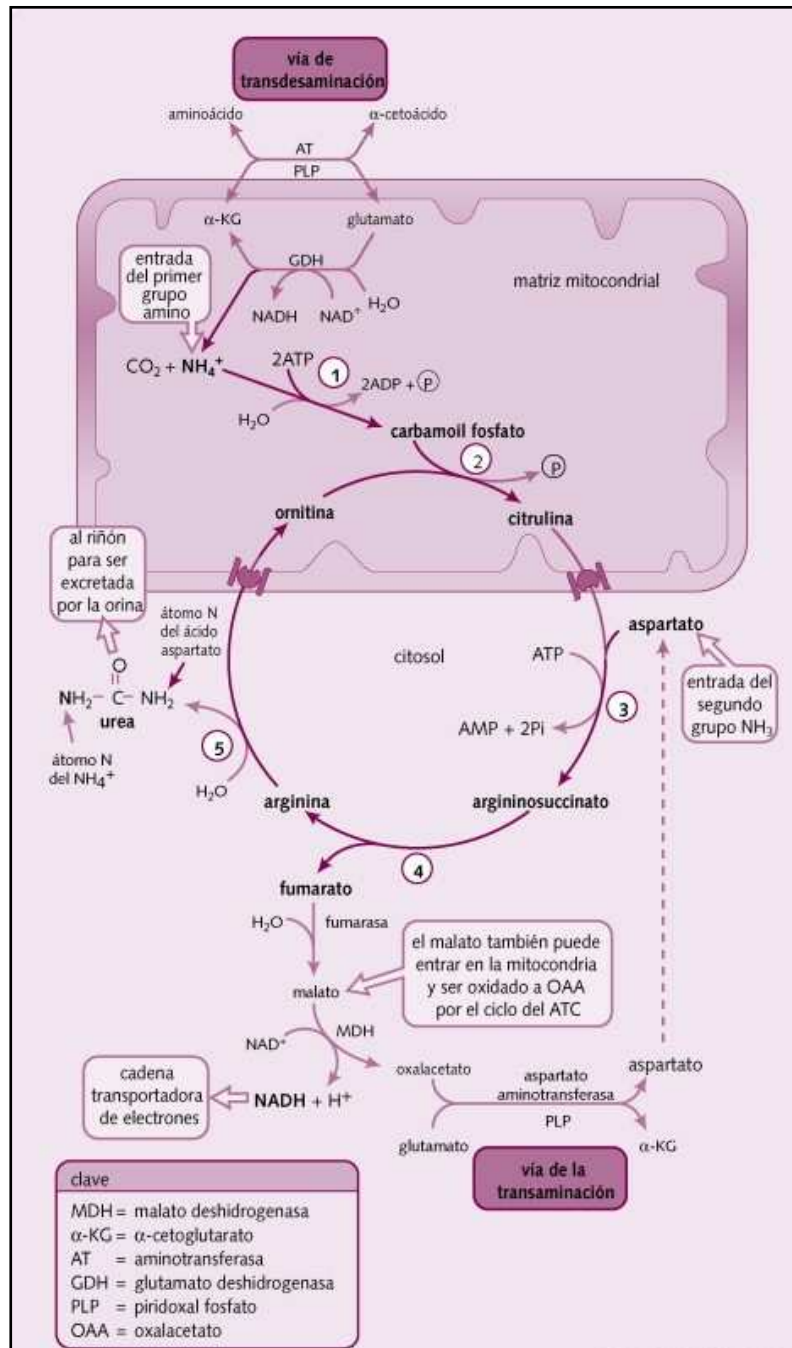


**Figura 6.2.** Transporte de Nitrógeno al hígado y al riñón. Feduchi y cols. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2011. Ed. Panamericana.

### Ciclo de la urea

Los átomos de nitrógeno de los grupos alfa amino, separados de los aminoácidos durante su degradación oxidativa, son excretados por orina en forma de urea, amoníaco o ácido úrico, según la especie.

La formación de urea tiene lugar en el hígado y es catalizada por una secuencia de reacciones enzimáticas que se denomina ciclo de la urea (fig. 6.3). En este ciclo se utiliza el amoníaco que proviene de las reacciones de la enzima glutaminasa o desde la desaminación oxidativa y  $\text{CO}_2$ , y se incorpora luego otro resto amino proveniente del aspartato. La urea es transportada por la sangre a los riñones y se elimina por orina (fig. 6.2).



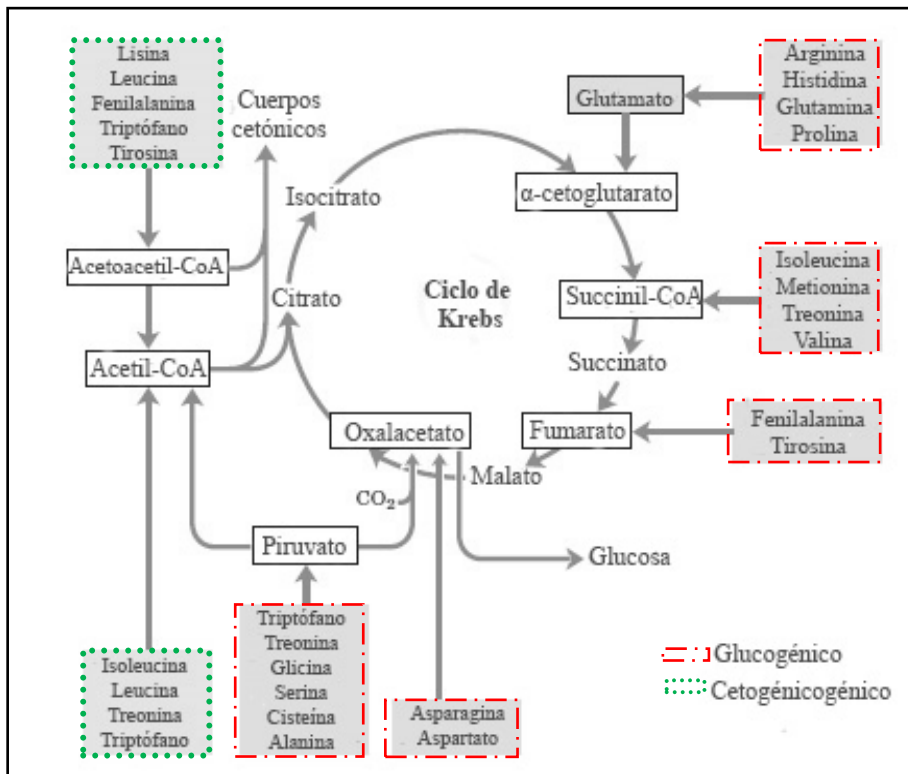
**Figura 6.3.** Representación esquemática de las reacciones químicas implicadas en el ciclo de la urea. 1: carbamil fosfato sintetasa. 2: ornitina transcarbamilasa. 3: argininosuccinato sintetasa. 4: argininosuccinasa. 5: arginasa. Modificado desde Benyon, S. "Metabolismo y Nutrición", 2010. Ed. Harcourt Brace.

**Destino del esqueleto carbonado de los aminoácidos**

Para la degradación de nutrientes, existen secuencias multienzimáticas que convergen finalmente en unas pocas rutas terminales que conducen a piruvato, acetil-CoA o a los intermediarios del ciclo de Krebs, de acuerdo al esquema de la figura 6.4.

De acuerdo con el mencionado esquema, los aminoácidos pueden ser clasificados como:

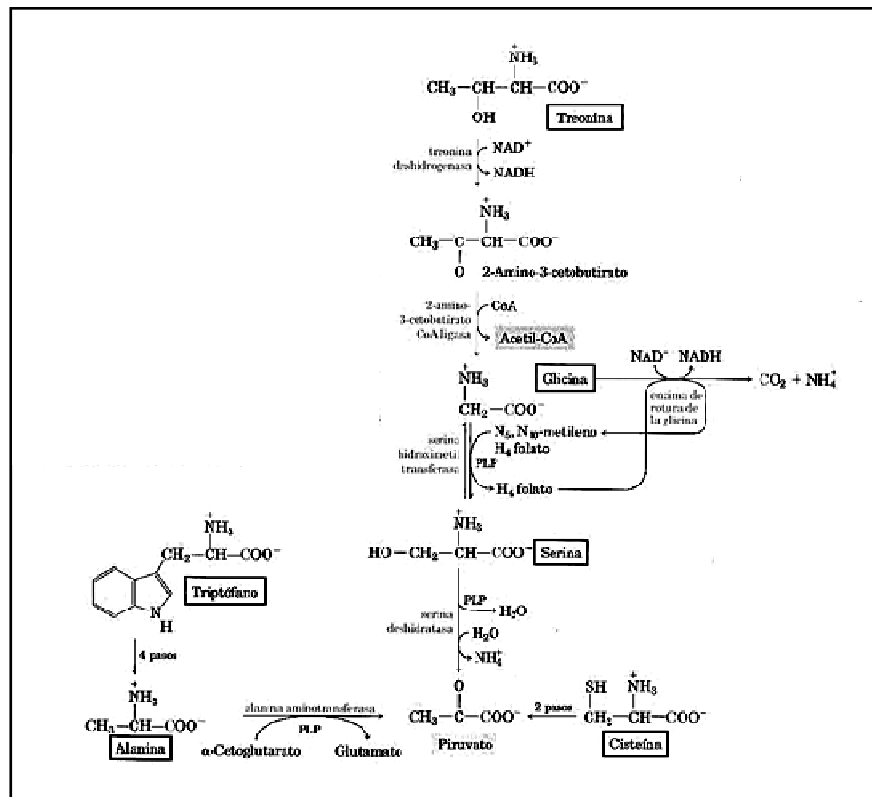
- 1- Aminoácidos que se catabolizan transformándose en **piruvato**: alanina, cisteína, glicina, serina y treonina.
- 2- Aminoácidos que se catabolizan transformándose en **acetoacetil-CoA**: fenilalanina, tirosina, lisina, leucina y triptófano.
- 3- Aminoácidos que se catabolizan transformándose en **oxalacetato**: asparagina y ácido aspártico.
- 4- Aminoácidos que se catabolizan transformándose en **succinil-CoA**: isoleucina, metionina y valina.
- 5- Aminoácidos que se catabolizan transformándose en  **$\alpha$ -cetoglutarato**: ácido glutámico, glutamina, histidina, arginina y prolina.
- 6- La ruta del **fumarato** es seguida por algunos átomos de carbono de la tirosina y la fenilalanina



**Figura 6.4.** Destino del esqueleto carbonado de los diferentes aminoácidos. Modificado desde Feduchi y cols. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2011. Ed. Panamericana.

**Degradación de aminoácidos a piruvato**

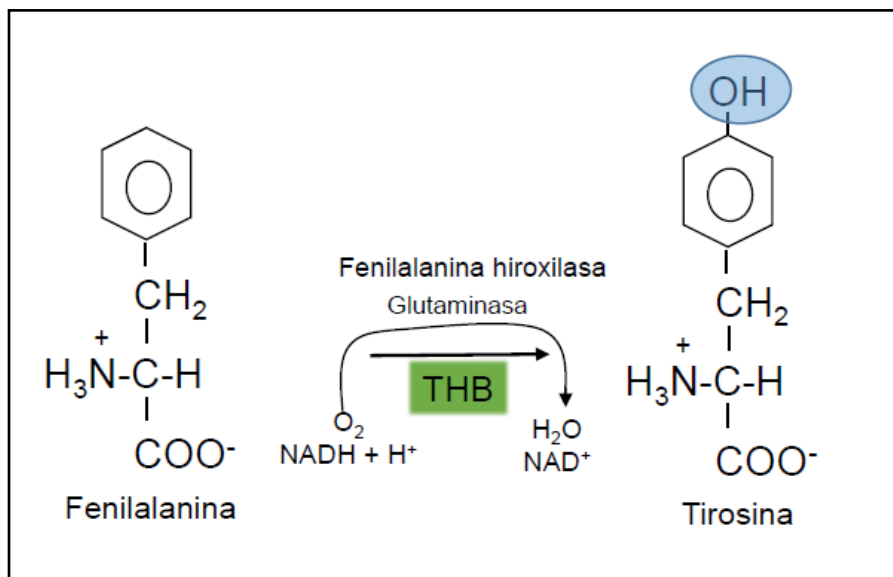
El esqueleto carbonado de seis aminoácidos es convertido en parte, o totalmente en piruvato (fig. 6.4). El piruvato luego puede ser transformado en acetil-CoA y eventualmente, ser oxidado en el ciclo de Krebs, o bien, en oxalacetato y desviado a gluconeogénesis. Los aminoácidos que pueden ser transformados en piruvato son alanina, triptófano, cisteína, serina, glicina y treonina (fig. 6.5). Alanina es convertida en piruvato, por transaminación directa con  $\alpha$ -cetoglutarato, y la cadena lateral de triptófano es clivada para originar alanina, y a su vez, piruvato. Cisteína es convertida en piruvato luego de dos pasos; en el primero se remueve el átomo de azufre, y en el otro ocurre una reacción de transaminación. Serina es transformada en piruvato mediante la acción de una serina deshidratasa, reacción en la cual piridoxal fosfato actúa como coenzima. El aminoácido glicina es degradado a través de tres vías diferentes, de las cuales una permite la obtención de piruvato. Así, glicina se convierte en serina mediante la adición enzimática del grupo hidroximetilo. En este caso, interviene una hidroximetil transferasa que requiere fosfato de piridoxal y tetrahidrofolato como coenzimas. Serina, es metabolizada a piruvato como ya fue descrito más arriba. En la segunda vía de degradación de glicina, que predomina en animales, este aminoácido es clivado oxidativamente a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_4$  y un grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ).



**Figura 6.5. Reacciones catabólicas** de triptófano, alanina, cisteína, glicina, serina y treonina para generar piruvato. Modificado desde Nelson & Cox. "Lehninger. Principios de Bioquímica", 2008. Ed. W. H. Freeman.

### Catabolismo de aminoácidos aromáticos: fenilalanina y tirosina

El aminoácido fenilalanina es un aminoácido esencial para los humanos y se convierte en tirosina mediante una reacción irreversible catalizada por la enzima fenilalanina hidroxilasa, que utiliza tetrahidrobiopterina como cofactor (fig. 6.6).



**Figura 6.6.** Síntesis del aminoácido tirosina a partir de fenilalanina. THB: tetrahidrobiopterina.

En la enfermedad hereditaria denominada fenilcetonuria, existe un déficit o ausencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa. Como consecuencia, la fenilalanina se acumula y resulta tóxica para el sistema nervioso central, ocasionando daño cerebral. En esta situación, fenilalanina prosigue una vía metabólica alternativa, originando por transaminación el cetoácido fenil-piruvato. Este compuesto origina a su vez, fenil-acetato y fenil-lactato, los cuales son excretados en grandes cantidades por los pacientes que padecen esta patología. Por prevención es obligatorio el diagnóstico de esta deficiencia enzimática en todos los recién nacidos, ya que la falta de un tratamiento adecuado y a tiempo, conduce a afectación del sistema nervioso y la consecuente alteración de las funciones intelectuales.

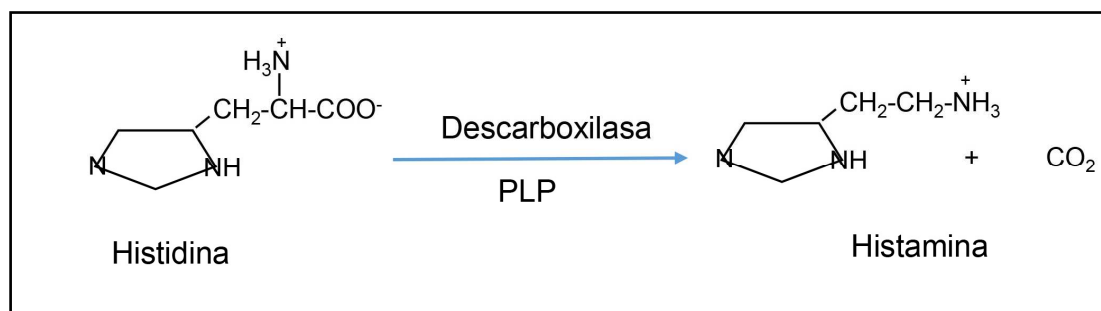
### Funciones precursoras de los aminoácidos: conversión a productos especializados

Desde un punto de vista cuantitativo, la síntesis proteica es la función anabólica principal de los aminoácidos, pero además sirven como precursores de otros compuestos nitrogenados. Los compuestos derivados de aminoácidos, fisiológicamente importantes, constituyen los llamados péptidos bioactivos que incluyen al hemo, purinas, pirimidinas,

hormonas y neurotransmisores. A continuación se mencionan algunos aminoácidos con función de precursores para la síntesis de los compuestos nitrogenados mencionados.

**Glicina:** la molécula entera de glicina es utilizada para la síntesis de purinas. El carbono alfa y el nitrógeno se emplean en la síntesis del hemo. Este aminoácido también es precursor de la síntesis de glutatión, un tripéptido con funciones antioxidantes.

**Histidina:** es precursor de la amina idazólica histamina, involucrada en las respuestas locales del sistema inmunitario (reclutamiento de eosinófilos, entre otras), en las funciones convencionales en el estómago (estimula la secreción de HCl y pepsina) y actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central. Esta amina es sintetizada por descarboxilación a partir del aminoácido histidina (fig. 6.7). En los tejidos de mamíferos esta reacción es catalizada por una descarboxilasa (L-aminoácido aromático descarboxilasa) que también cataliza la descarboxilación de fenilalanina, tirosina, triptófano y dihidroxifenilalanina (DOPA). La mencionada enzima emplea fosfato de piridoxal como coenzima.



**Figura 6.7.** Síntesis de histamina por descarboxilación del aminoácido histidina. PLP: piridoxal fosfato.

**Tirosina y triptófano:** a partir de estos aminoácidos por descarboxilación se obtiene tiramina y triptamina respectivamente, ambas aminas con acción vasoconstrictora.

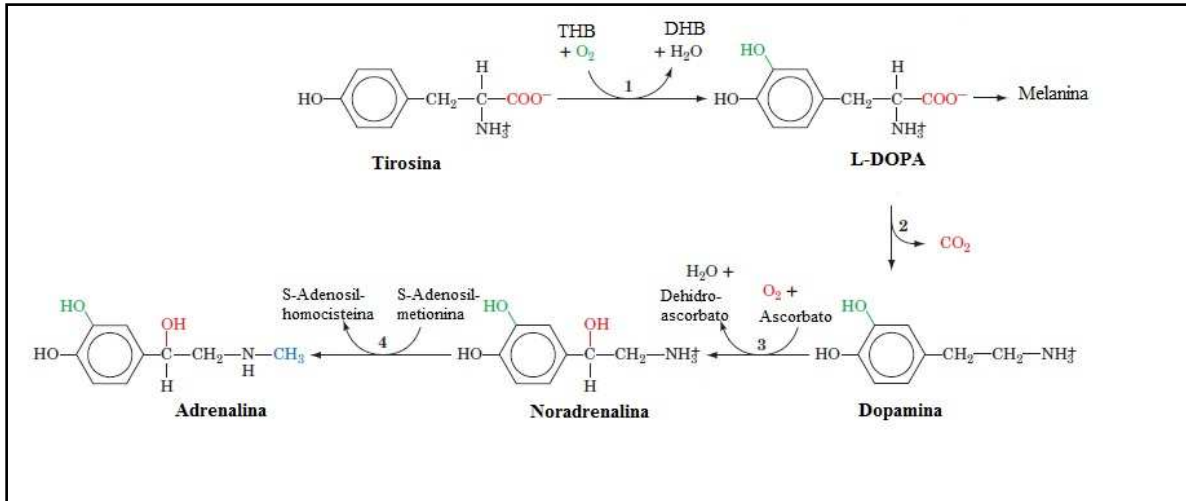
Triptófano además es precursor de muchos compuestos de fundamental importancia para el hombre. Una de las vías que puede seguir este aminoácido comprende su hidroxilación en el carbono 5, formando así 5-hidroxitriptófano, el cual en una segunda etapa se descarboxila y forma 5-hidroxitriptamina, también llamada serotonina, un poderoso vasoconstrictor y estimulante de la contracción del músculo liso.

**Ácido glutámico:** por descarboxilación de este aminoácido, se forma el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). La enzima que cataliza esta reacción se encuentra preferentemente en la sustancia gris del sistema nervioso central. El GABA es un intermediario químico regulador de la actividad neuronal. Actúa como inhibidor de la transmisión del impulso



nervioso. Su deficiencia provoca cuadros de epilepsia. Farmacológicamente el GABA se utiliza para el tratamiento de epilepsia y de hipertensión.

**Fenilalanina y tirosina:** pueden seguir una vía metabólica que conduce a la síntesis de sustancias de gran actividad fisiológica (fig. 6.8), llegando a la formación de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina). Tirosina también es precursor de melanina, pigmento que da color a la piel y el pelo, y de las hormonas tiroideas: triiodotironina ( $T_3$ ) y tiroxina ( $T_4$ ).



**Figura 6.8.** Síntesis de catecolaminas a partir del aminoácido tirosina. 1: Tirosina hidroxilasa. 2: Aminoácido aromático descarboxilasa. 3: Dopamina β-hidroxilasa. 4: Feniletanolamina N-metiltransferasa. THB: tetrahidrobiopterina. DHB: dihidrobiopterina. Modificado desde Voet y cols. "Fundamentos de bioquímica. La vida a nivel molecular", 2013. Ed. John Wiley & Sons.

**PROBLEMAS DE APLICACIÓN**

**1)** Nombrar los  $\alpha$ -cetoácidos que se forman por transaminación de los siguientes aminoácidos:

- a- Aspartato      b-Glutamato      c- Alanina      d- Fenilalanina

**2)** Dos grupos de ratas fueron alimentadas con  $^{15}\text{N}$ -aspartato. Un grupo fue también alimentado con fluoracetato (el cual es convertido en fluorcitrato, que es un inhibidor de la aconitasa). Después de tres días, los animales fueron sacrificados, las proteínas hepáticas hidrolizadas, y el glutamato se determinó por la presencia del  $^{15}\text{N}$ . Se obtuvieron los siguientes resultados:

	Grupo con $^{15}\text{N}$ -aspartato	Grupo con $^{15}\text{N}$ -aspartato y fluoracetato
Glutamato aislado % de $^{15}\text{N}$	0,65	0,12

Explicar la disminución de la incorporación de  $^{15}\text{N}$  en el glutamato del segundo grupo.

**3)** Los tres carbonos del lactato y de la alanina poseen estados de oxidación idénticos, y los animales pueden utilizar cualquiera de ellos como fuente carbonada para combustible metabólico. Compare el rendimiento neto en ATP (moles de ATP por mol de sustrato) para la oxidación completa (a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ ) del lactato frente a la alanina cuando se incluye la excreción de nitrógeno en forma de urea.

**4)** Se realizó un cultivo de hepatocitos de rata, durante 20 min a  $37^\circ\text{C}$ , y se colocaron diferentes compuestos, determinando a su vez, la producción de arginina y malato. Los compuestos agregados, y las concentraciones de arginina o malato obtenidas, se resumen en la siguiente tabla 6.1.

La mezcla de incubación fue la siguiente: ATP  $4\ \mu\text{M}$ , sulfato de magnesio  $13\ \mu\text{M}$  y buffer fosfato pH 7,5. La arginina se estimó como urea debido a la acción de la enzima arginasa.

¿Qué conclusiones puede obtener de estos datos?

Tabla 6.1. Anexo de datos para el ejercicio N° 4.

Sustancia agregada					Sustancia aislada	
L-aspartato 20 $\mu$ M	Glutamato 20 $\mu$ M	Oxalacetato 30 $\mu$ M	Citrulina 20 $\mu$ M	Fosfoenol piruvato	Arginina	Malato
+	-	-	+	+	14,4	14,5
+	-	-	-	+	0,0	0,0
+	-	-	+	-	0,9	1,0
-	+	+	+	+	7,0	6,8
-	+	-	+	+	0,0	0,0
-	+	+	-	+	0,0	0,1
-	-	+	+	+	0,0	0,2

## GUIA DE ESTUDIO

### Degradación de aminoácidos

- Formule las dos reacciones mediante las cuales los aminoácidos pierden su grupo amino.
- ¿En qué lugar de la célula se encuentran las enzimas que catalizan estas reacciones?
- ¿Cuáles son los inhibidores y activadores alostéricos de la enzima glutamato deshidrogenasa?
- Formule las reacciones de transaminación catalizadas por GOT Y GPT.
- ¿Cuál es el cofactor que utilizan las transaminasas y cómo actúa?
- ¿Cómo se sintetiza glutamina? Formule la reacción completa. ¿Mediante qué reacciones la glutamina se transforma en un intermediario del ciclo de Krebs?
- Esquematice la reacción de fenilalanina a tirosina indicando enzima y cofactor.
- ¿En qué vías metabólicas pueden utilizarse los productos de degradación de los aminoácidos?
- ¿Qué intermediarios del ciclo de Krebs se forman por degradación de cada uno de los aminoácidos? ¿Cuáles son los aminoácidos glucogénicos y cetogénicos?

### Ciclo de la urea

- ¿En qué órganos se lleva a cabo el ciclo de la urea? ¿En qué lugar de la célula ocurren las diferentes reacciones del ciclo y qué funciones cumple?

- ¿Cuáles son las dos reacciones que permiten la eliminación del grupo amino de los aminoácidos y su entrada al ciclo de la urea como ion amonio?
- ¿De cuáles aminoácidos provienen los nitrógenos de la urea?
- ¿De qué reacción proviene el primer grupo amino que entra en el ciclo de la urea en forma de amoníaco libre?
- ¿Cuáles son las reacciones que consumen energía y cuántos enlaces ricos en energía se consumen en cada una de ellas?
- ¿Qué productos de deshecho se eliminan por el ciclo de la urea?

### BIBLIOGRAFÍA

- **Blanco, A. & Blanco, G. (2006).** Química Biológica. Ed. El Ateneo.
- **Feduchi, E., Blasco, I., Romero, C.S., & Yáñez, E. (2011).** Bioquímica. Conceptos esenciales. Panamericana.
- **Nelson, D. & Cox, M. (2008).** Lehninger. Principios de Bioquímica. Ed. W. H. Freeman.
- **Lim, M.Y. & Roach, J. (2010).** Lo esencial en el metabolismo y nutrición. Editorial Mosby.
- **Voet, D., Voet, J G. & Pratt, C. W. (2013).** Fundamentos de Bioquímica -4.ed.: La Vida a Nivel Molecular. Ed. Artmed.

## BIOSÍNTESIS DE NUCLEÓTIDOS

### Objetivos

- Comprender los fundamentos de la síntesis de las bases nitrogenadas y de los nucleótidos y desoxinucleótidos, como precursores de ácidos nucleicos.
- Reconocer los precursores de la síntesis del núcleo de purina y pirimidina.
- Interrelacionar el metabolismo de los nucleótidos con otras vías metabólicas.
- Comprender los mecanismos de regulación de la síntesis de nucleótidos.
- Conocer y comparar la degradación de los nucleótidos púricos y pirimidínicos en diversos organismos.

### Introducción teórica

La biosíntesis de los desoxirribonucleótidos y de los ribonucleótidos, constituye un proceso fundamental en todas las células, puesto que los nucleótidos son los precursores directos del DNA y del RNA, y además muchos participan en el metabolismo como coenzimas. Un aspecto importante de la biosíntesis de los nucleótidos lo constituye la ruta de formación de sus bases: las pirimidinas y las purinas.

Tanto los nucleótidos como sus bases nitrogenadas se emplean con economía, en la mayoría de los organismos y no se utilizan como fuente de energía.

Los ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos son sintetizados a partir de compuestos sencillos y en la mayor parte de los organismos siguen la misma vía (solamente algunas bacterias requieren bases púricas o pirimidínicas preformadas).

Estas vías de biosíntesis de los nucleótidos están sometidas a estrictos mecanismos de control a través de enzimas alostéricas. Dado que los cuatro desoxirribonucleótidos principales y los cuatro ribonucleótidos fundamentales son los sillares del DNA y el RNA, respectivamente, y éstos se encuentran en relaciones molares específicas, existen mecanismos reguladores adecuados que permiten lograr una proporción de nucleótidos conveniente para cada tipo de ácido nucleico y para cada tipo de célula.

Tanto el DNA como el RNA son polinucleótidos constituidos cada uno por:

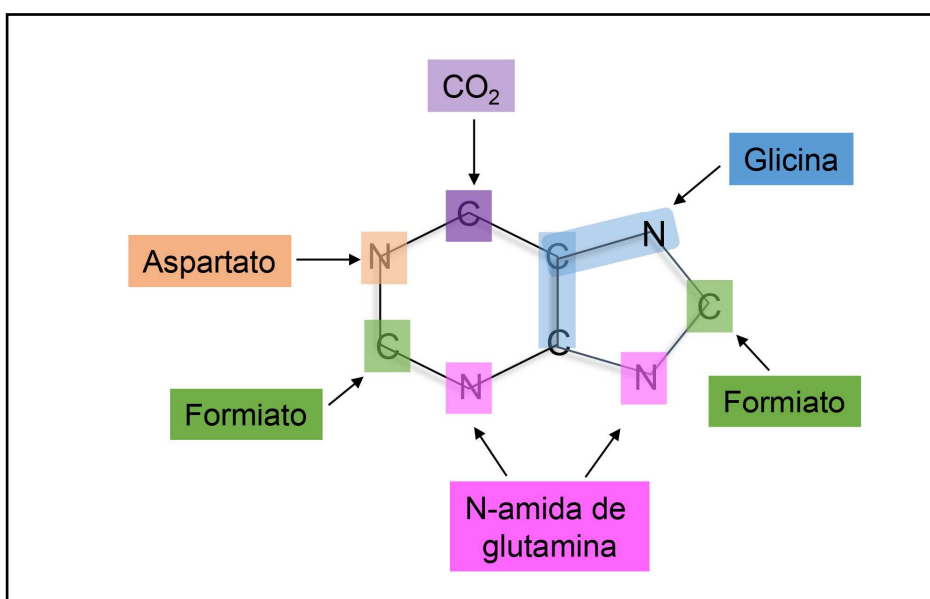
- una base nitrogenada
- un grupo fosfato
- una pentosa

En el DNA la pentosa es la 2-D-desoxirribosa, las bases nitrogenadas derivadas de la purina son adenina y guanina y las derivadas de la pirimidina son timina y citosina.

En el RNA la pentosa es la D-ribosa, las bases nitrogenadas derivadas de la purina son adenina y guanina y las derivadas de la pirimidina son uracilo y citosina.

### Biosíntesis de ribonucleótidos púricos

En la actualidad se conoce el origen de cada uno de los carbonos y nitrógenos que constituyen el núcleo de la purina (fig. 6.9). Así, los compuestos precursores son los aminoácidos aspartato, glicina y glutamina, como también el CO<sub>2</sub> y el formiato.



**Figura 6.9.** Origen de los átomos de carbono y nitrógeno que constituyen el anillo de purina. Ilustración propia. Modificado desde Nelson & Cox. "Lehninger. Principios de Bioquímica", 2008. Ed. W. H. Freeman.

Aunque podría esperarse que se sintetizase el anillo de purina en primer lugar y se uniese después la porción de fosfato de ribosa, la biosíntesis de los ribonucleótidos púricos comienza con la ribosa-5-fosfato y sobre él, se construye el anillo de purina en etapas sucesivas (fig. 6.10).

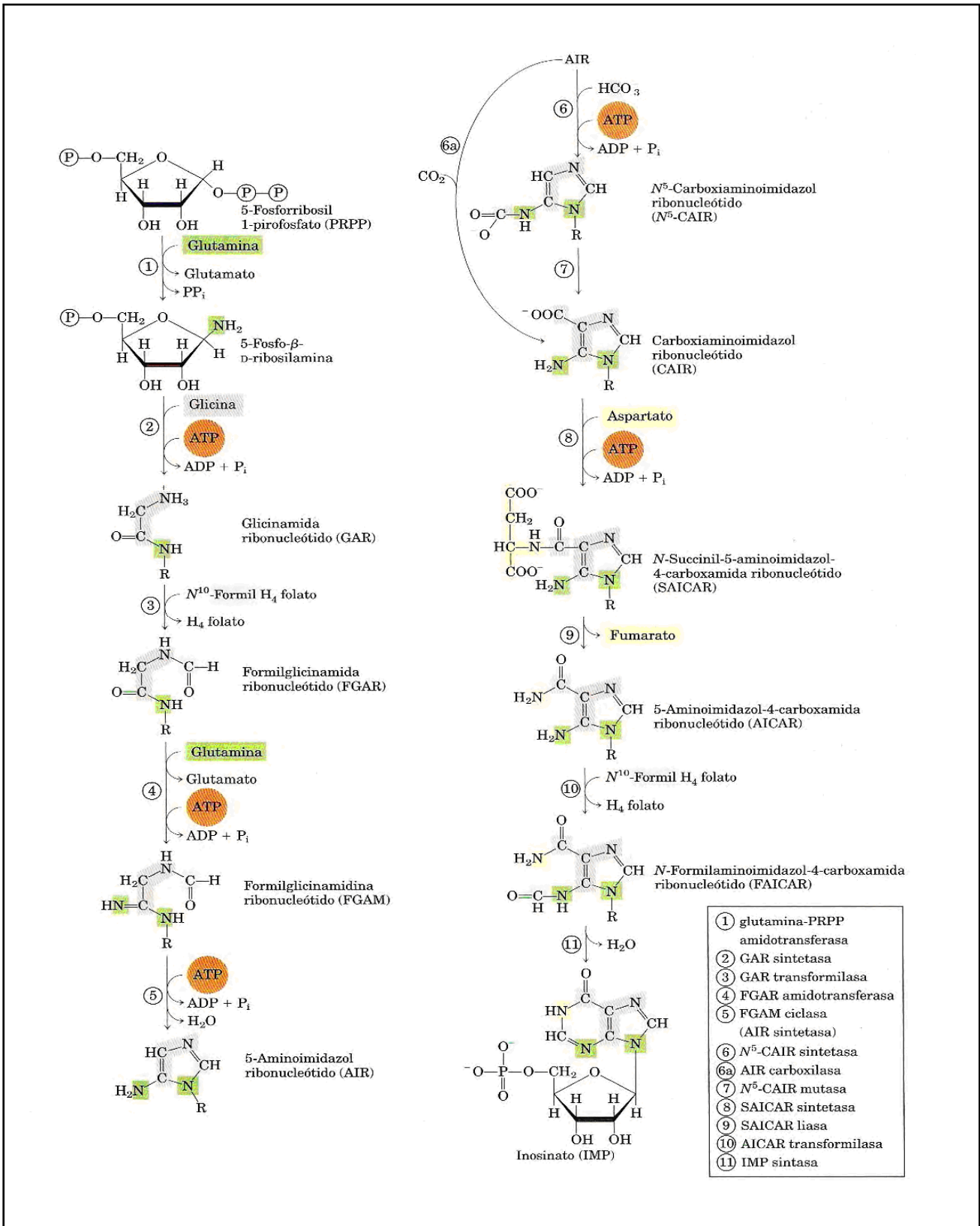
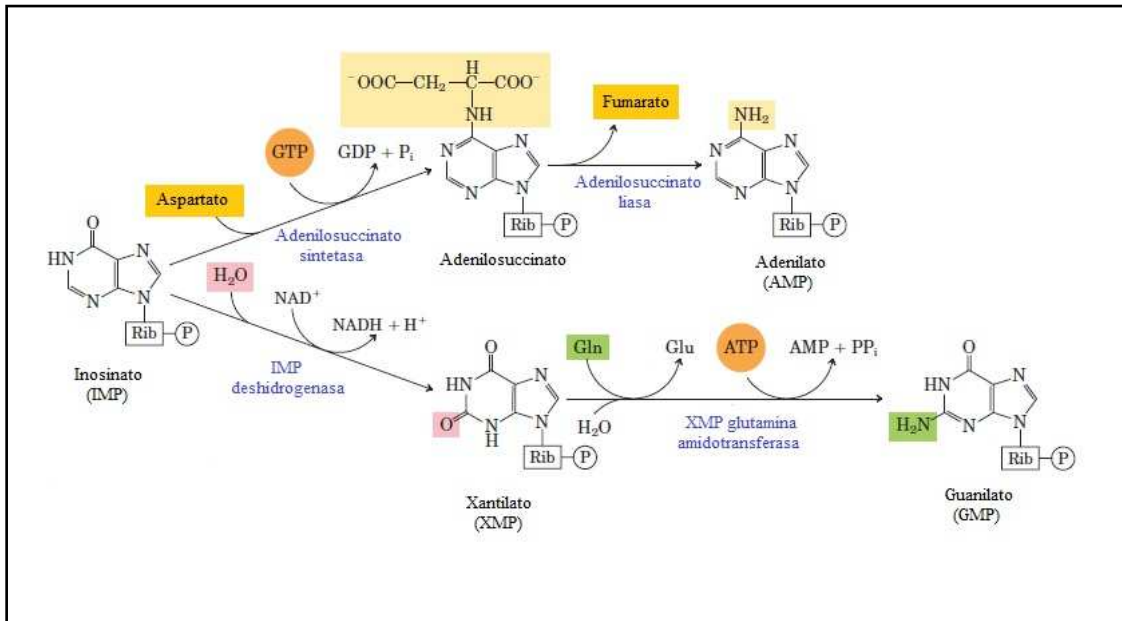


Figura 6.10. Nucleótidos púricos: Síntesis de ácido inosínico (IMP). Nelson & Cox, "Lehninger. Principios de Bioquímica", 2008. Ed. W. H. Freeman.

De acuerdo al esquema anterior, se observa que se obtiene como producto de la vía el monofosfato de inosina (IMP), a partir del cual derivan los nucleótidos de purina monofosfato de adenosina (AMP) o monofosfato de guanosina (GMP) (fig. 6.11).



**Figura 6.11.** Conversión de ácido inosínico en AMP y GMP. Nelson & Cox, “Lehninger. Principios de Bioquímica”, 2008. Ed. W. H. Freeman.

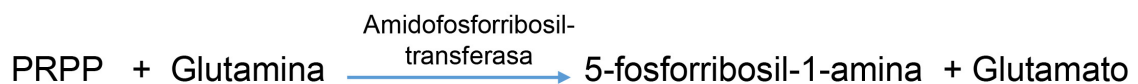
### Regulación de la síntesis de purinas

La síntesis de nucleótidos púricos es regulada por retroalimentación en varios niveles (fig. 6.12):

a) Formación de PRPP (5 fosforribosil-1-pirofosfato) catalizada por la enzima PRPP-sintetasa.

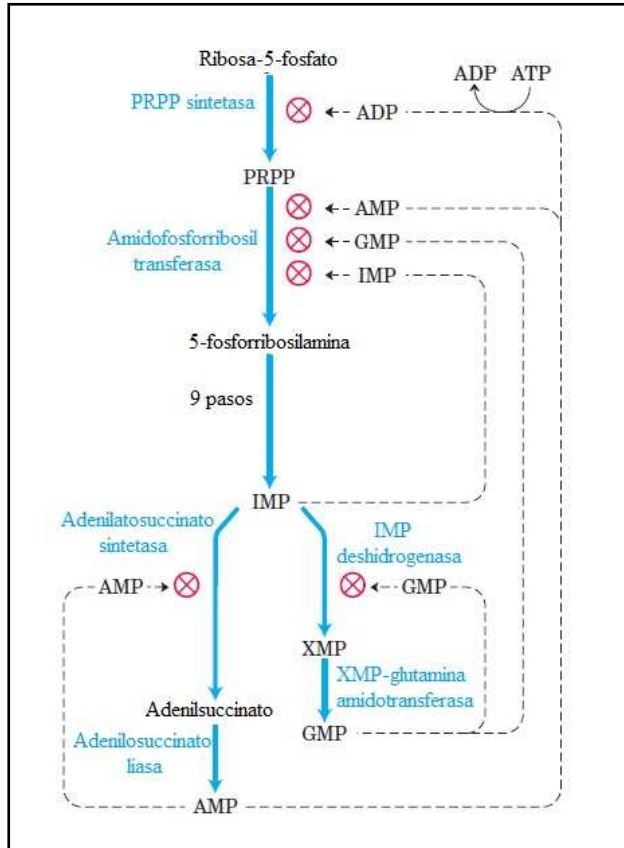


b) Etapa desde PRPP a fosforribosilamina catalizado por la enzima amidofosforribosiltransferasa, que es el principal sitio de control. Los nucleótidos AMP, ADP, ATP, GMP, GDP y GTP actúan como inhibidores. Esta enzima también es inhibida por IDP e ITP.





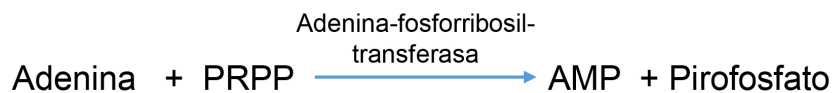
c) En la vía de bifurcación del IMP para la formación de ATP y GTP. El GTP es utilizado en la síntesis de AMP, mientras que el ATP se utiliza en la síntesis de GMP. Esto lleva que haya un equilibrio en la síntesis de los ribonucleótidos de adenina y guanina. Cuando se acumula GTP se activa la enzima adenilosuccinato sintetasa produciéndose más ATP. Cuando se acumula ATP se activa la enzima GMP-sintetasa aumentando los niveles de GTP.



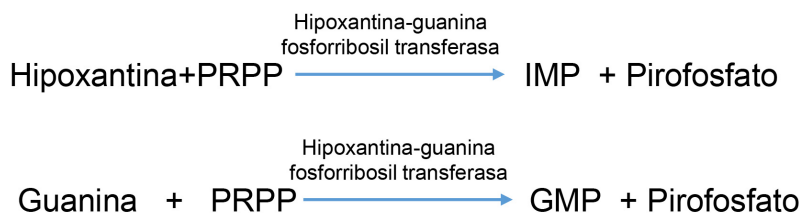
**Figura 6.12.** Regulación de la síntesis de nucleótidos de purina. Tomado desde Nelson & Cox. "Lehninger. Principios de bioquímica", 2008. Ed. W. H. Freeman.

### Vía de Recuperación de purinas

Las bases púricas libres, ya sean que procedan de la alimentación o del catabolismo de los ácidos nucleicos, pueden ser recicladas en AMP o GMP. El mecanismo principal reside en la reacción de la adenina-fosforribosil-transferasa:

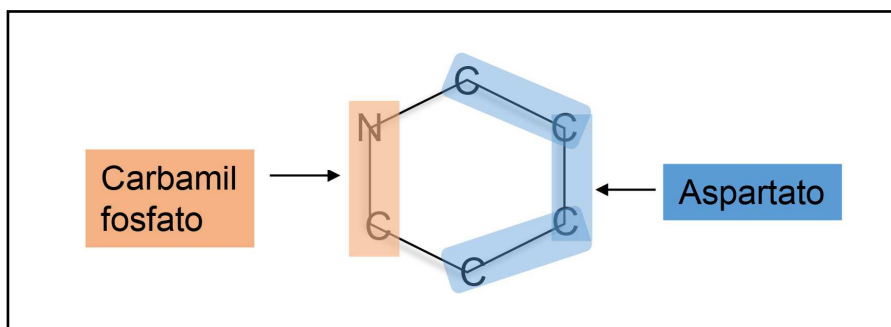


En una reacción semejante, la hipoxantina y la guanina son transformadas en los nucleótidos correspondientes por acción de la hipoxantina-guanina fosforribosil-



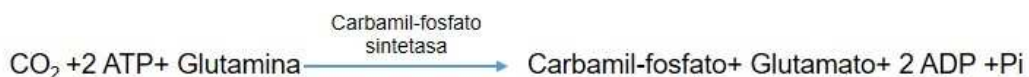
### Biosíntesis de nucleótidos pirimídicos

La biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina transcurre de una manera algo diferente de la de los nucleótidos de purina. En este caso el anillo de pirimidina se sintetiza primero y luego se une al fosfato de ribosa (fig. 6.13). Los precursores para la síntesis de este anillo son el carbamil fosfato y aspartato.

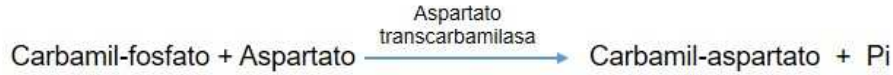


**Fig. 6.13.** Origen de los átomos de carbono y nitrógeno que constituyen el anillo de pirimidina. Modificado desde Feduchi y cols. "Bioquímica. Conceptos esenciales", 2011. Ed. Panamericana.

El primer paso de la síntesis de los nucleótidos pirimidínicos, es la formación de carbamil-fosfato. El grupo amino de este producto, procede de la desaminación de glutamina y la reacción es catalizada por la enzima carbamil fosfato sintetasa:



Una vez formado el carbamil-fosfato, éste se combina con aspartato para formar carbamil-aspartato. La reacción es catalizada por la aspartato transcarbamilasa (ATC).



Después de tres pasos se obtiene el primer nucleótido de pirimidina (UMP) el cual se convierte posteriormente en UTP y CTP (fig. 6.14).

La biosíntesis de los nucleótidos pirimidínicos está regulada a nivel de la enzima alostérica *aspartato transcarbamilasa*, la cual es inhibida por retroalimentación por el CTP (citidín trifosfato), producto final de la vía.

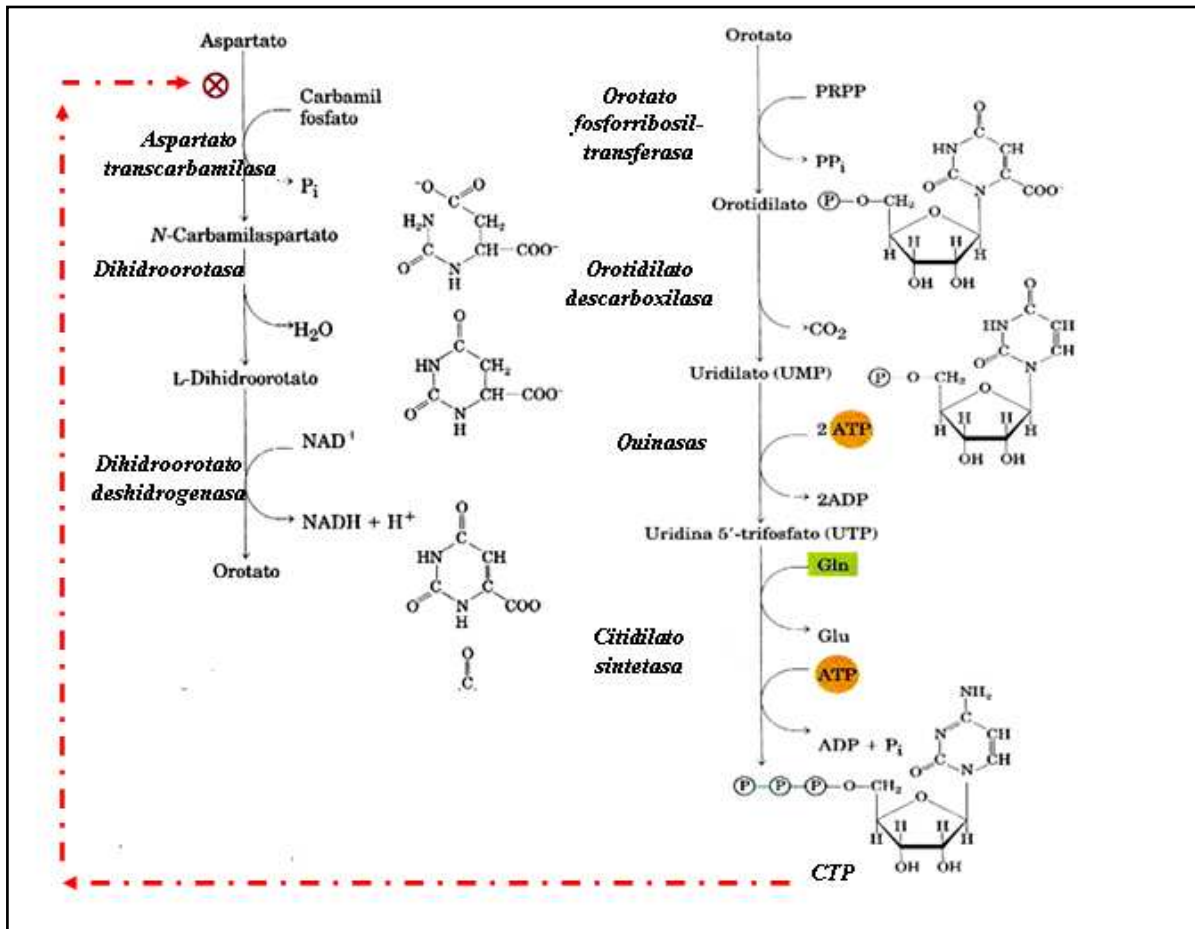
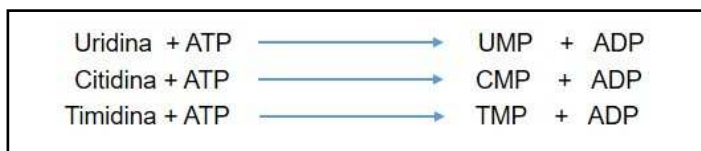


Fig. 6.14. Reacciones involucradas en la biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos. Nelson & Cox. "Lehninger. Principios de Bioquímica", 2008. Ed. H. W. Freeman.

### Vía de recuperación de bases pirimidínicas

Las células de mamíferos carecen de mecanismos para recuperar nucleótidos a partir de bases libres. Las vías de recuperación permiten convertir nucleósidos (uridina, citidina y timidina) en los nucleótidos correspondientes.

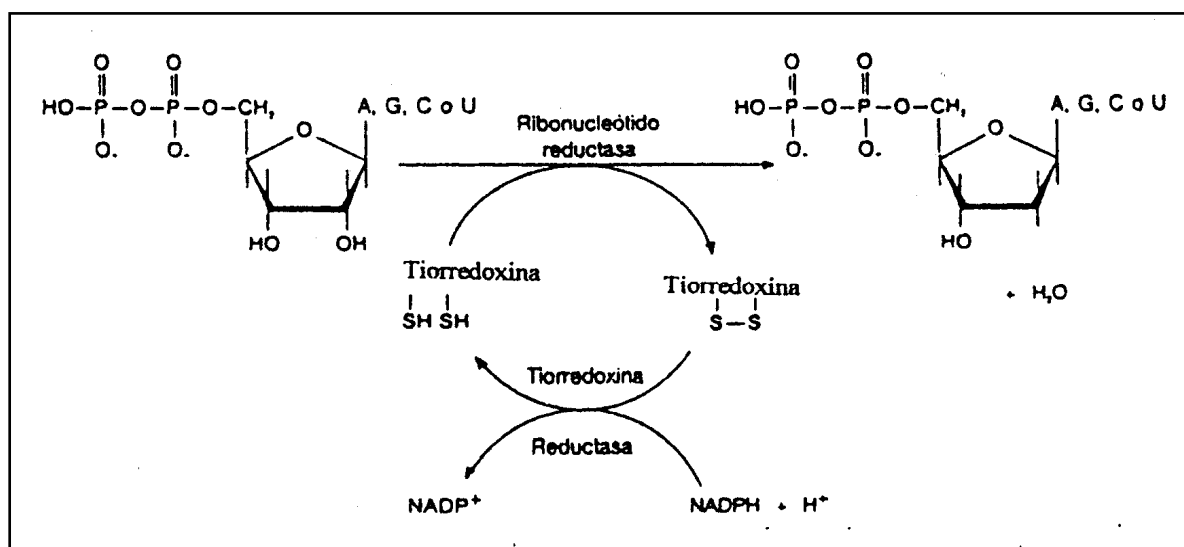


## Biosíntesis de desoxirribonucleótidos

Normalmente los desoxirribonucleótidos no se sintetizan a partir de la desoxirribosa como elemento de construcción, sino que se forman por reducción directa del carbono 2' de los correspondientes ribonucleótidos (fig. 6.15).

Esta vía ha sido muy estudiada en *E. coli*, donde los cuatro ribonucleósidos difosfatos (ADP, GDP, UDP, CDP) son directamente reducidos a los correspondientes desoxi-análogos (dADP, d-GDP, dUDP, dCDP). La reacción es catalizada por la ribonucleósido difosfato reductasa, enzima que requiere NADPH y tiorredoxina como coenzimas.

En el siguiente esquema se muestra la reducción en general de los nucleósidos difosfatos en los correspondientes desoxi-nucleósidos difosfatos:



**Figura 6.15.** Reacciones involucradas en la biosíntesis de desoxirribonucleótidos. A: adenina; G: guanina; C: citosina; U: uracilo.

El control alostérico de la síntesis de desoxirribonucleótidos se realiza a nivel de la enzima ribonucleótido reductasa o ribonucleósido difosfato reductasa. El dATP actúa como inhibidor general de la síntesis de todos los ribonucleósidos-5'-difosfatos.

## Síntesis de ácido desoxitimidílico

El DNA contiene la base timina en lugar de uracilo. Sin embargo, en la síntesis *de novo* solo se sintetiza el desoxirribonucleótido de uracilo, la base pirimidina del ARN. La síntesis de timina utiliza como precursor es el dUMP a través de una reacción catalizada por la timidilato sintasa (fig. 6.16). Una unidad monocarbonada es transferida desde el N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-

metileno tetrahidrofolato hasta el dUMP y luego, reducida para formar un grupo metilo. La reducción tiene lugar a expensas de la oxidación del tetrahidrofolato a dihidrofolato. La regeneración del tetrahidrofolato se logra por acción de una reductasa con la participación del NADPH.

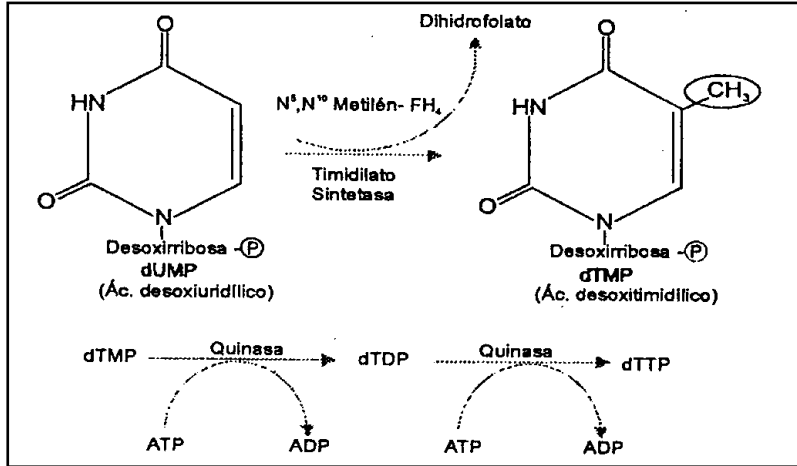
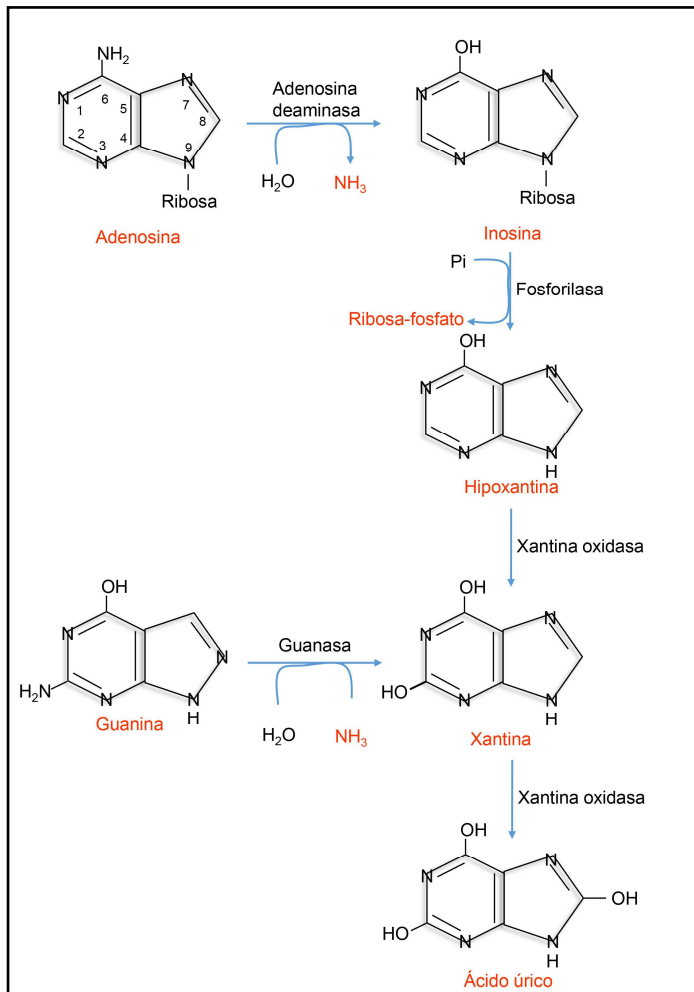


Figura 6.16. Reacciones involucradas en la biosíntesis de ácido desoxitimidílico (dTMP).

### Catabolismo de purinas



Si las bases libres no son recuperadas y reutilizadas, son degradadas y sus productos finales excretados. Las principales purinas, adenina y guanina, se convierten en xantina, la cual es oxidada a ácido úrico por la acción de la enzima xantina oxidasa (fig. 6.17).

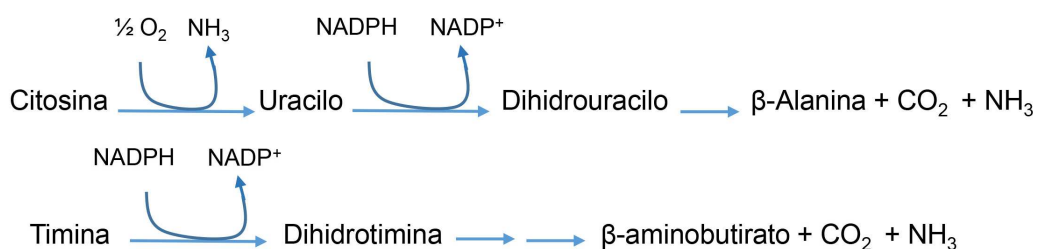
Figura 6.17. Esquema de las reacciones involucradas en el catabolismo de purinas: formación de ácido úrico. Modificado desde Blanco, A. "Química Biológica" (2006). Ed. El Ateneo.

### Catabolismo de pirimidinas

El catabolismo de las pirimidinas ocurre principalmente en el hígado y da por resultado la producción de una serie de productos finales altamente solubles. Esto es opuesto a lo que ocurre en el catabolismo de las purinas donde se producen compuestos escasamente solubles: ácido úrico y urato de sodio

El desprendimiento de CO<sub>2</sub> respiratorio a partir del C2 del núcleo pirimidínico, representa una vía importante para el catabolismo de uracilo, citosina y timina. La β-alanina (aminoácido cuyo grupo amino se encuentra unido a su carbono beta) y el ácido β-aminoisobutírico son los principales productos finales del catabolismo de estas bases.

En pacientes leucémicos y en los sometidos a tratamientos con rayos X se produce un aumento en la eliminación de β-aminoisobutírico, como índice de la degradación exagerada del ADN.

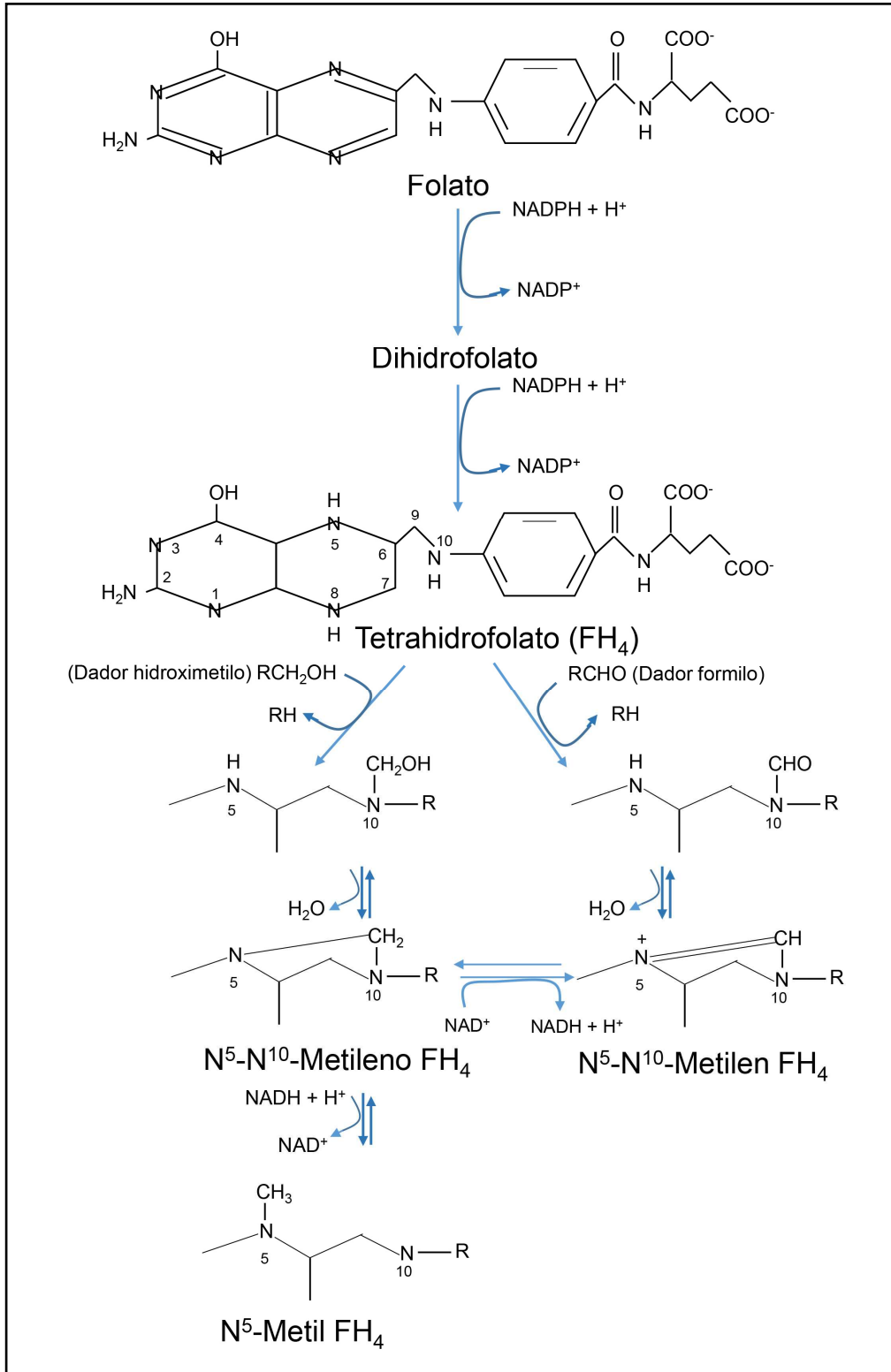


### Origen del tetrahidrofolato y sus transformaciones a derivados transportadores de un carbono

El ácido fólico es un compuesto ampliamente distribuido en las plantas. Su deficiencia en mamíferos provoca una disminución del crecimiento y aparición de diversas formas de anemias. La molécula de ácido fólico está constituida por tres sillares característicos: una pteridina, sustituida, ácido p-aminobenzoico, ácido glutámico.

El efecto bioquímico más sobresaliente de la deficiencia de ácido fólico es el impedimento de la biosíntesis de purinas y de la timina (pirimidina). La forma coenzimática del ácido fólico actúa en la transferencia de ciertos fragmentos monocarbonados utilizados en ésta y otras rutas biosintéticas.

El ácido tetrahidrofolico (FH<sub>4</sub>) actúa como transportador intermediario de grupos hidroximetilo, formilo y metilo, en numerosas reacciones enzimáticas. En la siguiente figura (fig. 6.18) se puede observar las reacciones de reducción y transformación del ácido fólico.



**Figura 6.18.** Transformación del ácido fólico para generar las formas metabólicamente activas. Modificado desde Nelson & Cox. "Lehninger. Principios de Bioquímica", 2008. Ed. H. W. Freeman.

## PROBLEMAS DE APLICACIÓN

1) Indicar la(s) posición(es) en el anillo purínico que se marcará(n) isotópicamente durante la síntesis en las células expuestas a:

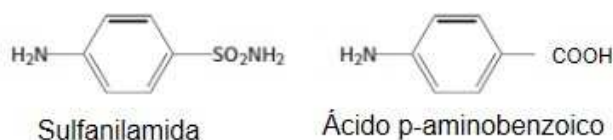
a)  $^{15}\text{N}$ -aspartato    b)  $^{14}\text{C}$ -serina (grupo OH-CH<sub>3</sub> marcado)    c)  $^3\text{H}$ -Oxalacetato (marcado uniformemente)

2) Algunas bacterias necesitan la inclusión de ácido p-aminobenzoico en el medio de cultivo para crecer con normalidad. El crecimiento de tales bacterias está inhibido severamente por la adición de sulfanilamida, una de las primeras drogas con propiedades antibacterianas. Además, en presencia de ella se acumula 5'-fosforribosil-4-carboxamida-5-aminoimidazol en el medio de cultivo. Ambos efectos se invierten por adición del exceso de ácido p-aminobenzoico.

a) ¿Cuál es el papel del Ácido p-aminobenzoico?

b) ¿Por qué se acumula el compuesto mencionado en presencia de sulfanilamida?

c) ¿Por qué se invierten la inhibición y la acumulación por la adición de exceso de ácido p-aminobenzoico?



3) El alopurinol, un inhibidor de la xantina oxidasa, se emplea en el tratamiento de la gota crónica. Explique la base bioquímica de este tratamiento. Los pacientes tratados con alopurinol desarrollan, en ocasiones cálculos de xantina, aunque la incidencia de lesiones renales es mucho menor que la gota sin tratar. Explique esta observación a la luz de las solubilidades siguientes en la orina: Ácido úrico: 0,15 g/l; xantina: 0,05 g/l; hipoxantina: 1,4 g/l.

4) Se marcan los siguientes compuestos:

a) adenosina en el átomo de N del grupo NH<sub>2</sub>.

b) adenosina en el átomo de C 5.

c) guanina en el átomo de N del grupo NH<sub>2</sub>.

Mencione donde quedaría la marca en los productos de degradación de purinas en el hombre: ácido úrico y NH<sub>3</sub>.



## GUIA DE ESTUDIO

### Metabolismo de nucleótidos

- En la biosíntesis del fosforribosil pirofosfato ¿qué compuestos se requieren?
- ¿Qué compuestos o intermediarios son comunes en la biosíntesis de los nucleótidos púricos y pirimidínicos?

### Nucleótidos púricos:

- Mencione las dos bases púricas que obtiene a partir del IMP.
- ¿De qué sustancia proviene cada uno de los átomos que conforman el anillo de purina?
- ¿Cuáles son los compuestos necesarios para su biosíntesis?
- ¿A nivel de qué enzimas está regulada su biosíntesis?
- En la vía de recuperación de bases púricas ¿qué enzima interviene en cada una de las reacciones?
- Degradación de purinas: producción de ácido úrico en el hombre.

### Nucleótidos pirimidínicos:

- ¿Cuáles son las bases pirimidínicas que conoce?
- ¿De qué compuesto proviene cada uno de los átomos que conforman el anillo pirimidínico?
- Formule la primera reacción de la biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos.
- ¿Qué enzima interviene en su regulación y cuál es el compuesto que la inhibe?
- Esquematice la síntesis de desoxitimidilato monofosfato indicando enzimas y cofactores.
- Degradación de bases pirimidínicas: comparación con el catabolismo de bases púricas.

### Desoxirribonucleótidos:

- En la biosíntesis de los desoxirribonucleótidos ¿qué átomo de carbono se reduce y cuál es la enzima que cataliza la reacción?
- Mencione los desoxirribonucleótidos que conoce.
- Esquematice la síntesis de desoxitimidilato monofosfato indicando enzima y cofactores.

## BIBLIOGRAFÍA

- **Blanco, A. & Blanco, G. (2006).** Química Biológica. Ed. El Ateneo.
- **Nelson, D. & Cox, M. (2008).** Lehninger. Principios de Bioquímica. Ed. W. H. Freeman.
- **Voet, D., Voet, J G. & Pratt, C. W. (2013).** Fundamentos de Bioquímica -4.ed.: La Vida a Nivel Molecular. Ed. Artmed.