

# Guía de Trabajos Prácticos : Química Biológica

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia-UNSL



MATERIAL DIDÁCTICO  
PARA ESTUDIANTES  
2024

# SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

## Guía de Trabajos Prácticos **Química Biológica**

**Curso de Grado**

Licenciatura en Biología Molecular

Autores

Dra. Patricia STAGNITTA

Dra. Ana Cecilia ANZULOVICH

Dra. Ethelina CARGNELUTTI



FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2024

## RESPONSABLES DE LA PUBLICACIÓN

Decano

*Dra. Sebastián ANDUJAR*

*Secretaria Académica*

*Dra. Mónica OLIVELLA*

*Comisión de la Serie Didáctica:  
Material Didáctico para Estudiantes*

Coordinadora

*Dra. Yamina DÁVILA*

Integrantes

Departamento de Biología

Mg. Karina Ethel MARCHEVSKY

Dra. María Beatriz NÚÑEZ

Departamento de Bioquímica

*Dra. Verónica FILIPPA*

*Dra. Ethelina CARNELUTTI*

Departamento de Farmacia

*Dra. Cecilia PERALTA*

*Dra. Ana VICARIO*

Departamento de Química

*Dr. José A. BOMBASARO*

*Dra. Cinthya A. MAGALLANES NOGUERA*

Edición

*Secretaría de Investigación, Vinculación y Extensión*

## 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 estudio 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 acordes 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/mde.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.

El curso de Química Biológica se desarrolla para los y las estudiantes de tercer año de la carrera de Lic. En Biología Molecular. El objeto de estudio de la Química Biológica es el metabolismo y para su abordaje se requiere de los conocimientos de las estructuras químicas y celulares construidos en las asignaturas Química Orgánica, Química de Biomoléculas y Biología Celular. Durante este año académico, la enseñanza de los conocimientos del curso de Química Biológica se abordará a través de clases teóricas explicativas-interactivas (donde trabajamos con distintas rutinas de pensamiento, entre ellas "*Pensar, Inquietar, Explora*" para una primera interacción de los y las estudiantes con los conceptos propios del curso), que preceden el desarrollo y la realización de trabajos prácticos (TPs) de laboratorio y aula (donde se ponen en juego los desempeños y la aplicación del conocimiento). Así, en los TPs de laboratorio los estudiantes comprueban experimentalmente algunos conceptos claves discutidos en las clases teóricas, aprenden el uso de materiales biológicos necesarios para demostrar los distintos procesos metabólicos y adquieren destreza en el manejo de técnicas e instrumental de laboratorio. Durante los TPs de aula se propone la resolución de problemas y ejercicios para permitir a los y las 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 TPs de aula y de laboratorio.

ÍNDICE

<i>REGLAMENTO DE TRABAJOS PRÁCTICOS - APROBACIÓN DE PARCIALES</i> .....	VI
<i>NORMAS DE BIOSEGURIDAD PARA TRABAJAR EN EL LABORATORIO</i> .....	VIII
<i>TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 1: ENZIMAS, PROPIEDADES y REGULACIÓN</i> .....	- 10 -
Introducción Teórica .....	- 10 -
PROBLEMAS DE APLICACIÓN .....	- 20 -
GUIA DE ESTUDIO .....	- 25 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 26 -
<i>TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 1: ANÁLISIS DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA</i> .....	- 27 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 39 -
<i>TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 2: TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL. FOSFORILACIÓN OXIDATIVA</i> .....	- 40 -
Introducción teórica.....	- 40 -
PROBLEMAS DE APLICACIÓN .....	- 47 -
GUÍA DE ESTUDIO .....	- 50 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 50 -
<i>TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 2: TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL</i> .....	- 52 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 54 -
<i>TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N°3: METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO: VÍA GLICOLÍTICA. CICLO DE KREBS</i> .....	- 55 -
METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO. DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE CARBOHIDRATOS ..	- 55 -
Introducción teórica.....	- 55 -
VÍA GLICOLÍTICA.....	- 59 -
Introducción teórica.....	- 59 -
DESCARBOXILACIÓN OXIDATIVA DEL PIRUVATO.....	- 66 -
CICLO DE KREBS .....	- 67 -
PROBLEMAS DE APLICACIÓN .....	- 72 -
GUÍA DE ESTUDIO .....	- 74 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 75 -
<i>TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 3: METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO. Vía Glicolítica. Demostración de la fermentación en levaduras</i> .....	- 76 -
Introducción teórica.....	- 76 -
a) Determinación de la concentración de glucosa.....	- 78 -
b) Determinación de etanol.....	- 79 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 82 -

<i>TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 4: METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO. VÍA DE LAS PENTOSAS FOSFATO. METABOLISMO DEL GLUCÓGENO. GLUCONEOGÉNESIS</i> .....	- 83 -
METABOLISMO DE GLUCÓGENO .....	- 83 -
Introducción teórica.....	- 83 -
Glucogenogénesis .....	- 83 -
Glucogenólisis .....	- 85 -
VIA DE LAS PENTOSAS FOSFATO .....	- 88 -
GLUCONEOGÉNESIS .....	- 91 -
Introducción teórica.....	- 91 -
PROBLEMAS DE APLICACIÓN .....	- 95 -
GUÍA DE ESTUDIO .....	- 97 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 98 -
<i>TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 5: METABOLISMO DE LÍPIDOS: BIOSÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS</i> .....	- 100 -
Introducción teórica.....	- 100 -
DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS .....	- 102 -
BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS SATURADOS .....	- 106 -
PROBLEMAS DE APLICACIÓN .....	- 111 -
GUIA DE ESTUDIO .....	- 112 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 113 -
<i>TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 4: METABOLISMO DE LÍPIDOS. Determinación de Triglicéridos – Separación de Macromoléculas por Electroforesis en Gel de Agarosa: Lipidograma</i> .....	- 114 -
Introducción teórica.....	- 114 -
A) Determinación de triglicéridos .....	- 115 -
B) Lipidograma electroforético .....	- 117 -
<i>TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 6. METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS. DEGRADACION DE AMINOÁCIDOS</i> .....	- 121 -
Introducción teórica.....	- 121 -
Ciclo de la urea.....	- 125 -
PROBLEMAS DE APLICACIÓN .....	- 133 -
GUIA DE ESTUDIO .....	- 134 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 135 -
METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS.....	- 136 -
Introducción teórica.....	- 136 -
PROBLEMAS DE APLICACIÓN .....	- 148 -
GUIA DE ESTUDIO .....	- 149 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 149 -

**Guía de Trabajos Prácticos de Química Biológica para Lic. En Biología Molecular**

*TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 7. INTERRELACIONES METABÓLICAS* ..... - 150 -  
ACTIVIDADES..... - 150 -

**REGLAMENTO DE TRABAJOS PRÁCTICOS - APROBACIÓN DE PARCIALES**

**ESTUDIANTES REGULARES**

1. De acuerdo al Plan de carrera 15/14, para el cursado de la asignatura en condición regular, el/la estudiante deberá contar con los cursos del primer año de la carrera aprobados, y encontrarse en condición regular en los siguientes cursos: Química de Biomoléculas, Biología Celular y Anatomofisiología Humana.
2. Al comenzar el cuatrimestre, los y las estudiantes conocerán las fechas y los temas de los trabajos prácticos de aula y de laboratorio, como así también las fechas de las evaluaciones parciales. Todo lo mencionado será informado mediante un cronograma enviado a las direcciones de correo electrónico proporcionadas en el formulario de inscripción de la asignatura.
3. La fundamentación teórica de los trabajos prácticos se encontrará desarrollada en las clases teóricas y en la guía de trabajos prácticos.
4. La bibliografía de cada uno de los temas a desarrollar, estará a disposición de los y las estudiantes en el Área de Química Biológica y se les dará a conocer la que se encuentra para consulta en Biblioteca.
5. Los TPA consistirán en jornadas en las que se resolverán los ejercicios de aplicación que abarcan los diferentes temas a enseñar durante la cursada, y se realizará una puesta en común de las resoluciones de los mismos.
6. Para el caso de la evaluación de los TPL, se utilizará una lista de control para registrar la expresión o adquisición práctica, así como también, la presentación de un informe final de laboratorio.
7. Para acceder a la instancia de evaluación parcial, los y las estudiantes deberán tener aprobado el ciento por ciento (100%) de los trabajos prácticos cuyo contenido se evalúa en la misma.
8. Considerando la Ord. N° 32/14, para regularizar la asignatura se deberá aprobar el 100% de las Evaluaciones Parciales. Cada Parcial tendrá dos (2) recuperaciones. En la primera instancia de evaluación, los y las estudiantes aprobarán con el 65 % del puntaje total. La primera recuperación se llevará a cabo en no menos de 48 horas de publicado el resultado del Parcial. La segunda recuperación se realizará a lo largo del cuatrimestre. Ambas instancias de recuperación se aprobarán con el 75 % del puntaje total.

## ESTUDIANTES CON PROMOCION SIN EXAMEN FINAL

El Curso de Química Biológica considera la posibilidad de aprobación mediante la modalidad Promoción sin examen final. Para acceder a dicha condición, son necesarios cumplir los siguientes requisitos:

1. Al momento de inscripción al curso, cumplir con las exigencias de correlatividades establecidas en el plan de estudio para rendir el examen final de esta asignatura.
2. Asistencia al 80% de las clases teóricas.
3. Aprobar los trabajos prácticos de laboratorio y aula con igual exigencia que los y las estudiantes regulares.
4. Aprobar cada evaluación parcial con el 70% del puntaje total.
5. Aprobar una evaluación adicional, de modalidad oral, sobre el tema de Integración Metabólica, y aquellos temas no evaluados en los parciales.
6. Los y las estudiantes que opten por la Promoción sin examen final, tendrán solo una (1) recuperación para todas las evaluaciones parciales. La misma se aprobará alcanzando una calificación del 80% del puntaje total.

## NORMAS DE BIOSEGURIDAD PARA TRABAJAR EN EL LABORATORIO

### 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 salud, 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 y guantes de látex es obligatorio dentro del laboratorio. El uso de 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, utilizar papel absorbente provisto por las/los docentes.
- 6) Al comenzar el trabajo práctico, revise que el material de vidrio se encuentre 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 compañeras/os. 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, debe considerarlo material infecto contagioso.
- 9) Las puntas plásticas 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 pipetear ácidos, álcalis, o cualquier otra solución con la boca. Utilice a tal efecto 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 se realizan bajo la campana extractora sin excepción.

13) 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.

14) 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 compañera/o o hacia 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.

15) 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.

16) Al finalizar el trabajo práctico de laboratorio, coloque el material de vidrio en los contenedores indicados a tal fin por las/los docentes.

17) Las bromas en su trabajo pueden causar accidentes, no las haga, trabaje con seriedad pensando que está próximo a desempeñarse como profesional. En el laboratorio no corra, camine.

## TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 1: ENZIMAS, PROPIEDADES y REGULACIÓN

### Objetivos de Aprendizaje

- Describir las características generales de las enzimas.
- Calcular matemáticamente el rendimiento y pureza de las enzimas, luego de la utilización de procesos de purificación.
- Analizar el comportamiento cinético de las enzimas michaelianas y alostéricas, utilizando registros gráficos de actividad enzimática y determinar parámetros cinéticos.
- Interpretar la acción de los distintos factores que afectan la actividad enzimática, considerando las propiedades generales de las enzimas.

### 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 purificación es un paso clave que debe realizarse para comprender la función de una enzima específica. Las enzimas no solo se purifican para aislarlas de los contaminantes, sino también para aumentar su actividad, estabilidad, vida útil, comprender la relación estructura-función y hacer diferentes formulaciones para fines industriales y medicinales. 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.

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

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 la enzima se encuentra en 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.

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

Existen diferentes métodos que permiten la purificación de una enzima de interés, a partir de una solución de proteínas. Para evaluar si un método de purificación es adecuado, es necesario calcular la recuperación y el grado de purificación alcanzados.

Considerando las unidades enzimáticas totales de la etapa inicial como el 100% puede calcularse el porcentaje de recuperación de cada etapa, refiriendo a las unidades totales de cada paso a las iniciales.

Para calcular el grado de purificación, debe obtenerse primero el valor de actividad específica alcanzado en cada paso. Si se considera la actividad específica inicial como unidad de purificación, el grado de purificación de cada etapa se calcula haciendo el cociente entre la actividad específica de dicha etapa y la del primer paso.

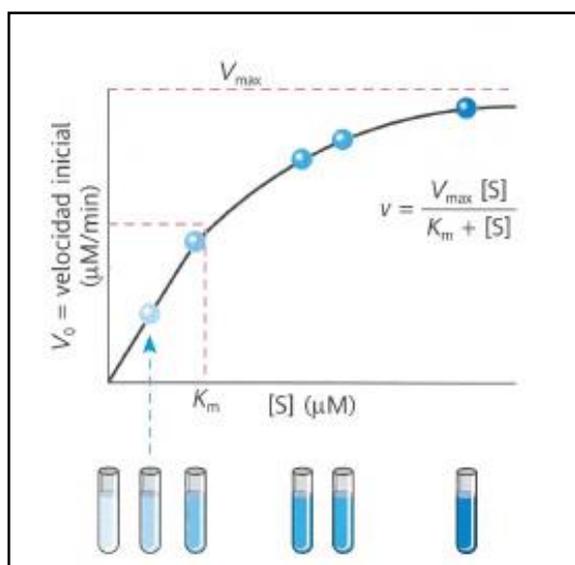
Diversos factores modifican la actividad enzimática, por lo tanto, deben ser considerados al momento de determinar la actividad de enzima presente en una muestra. Entre dichos factores se encuentran:

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

En cuanto a la concentración de sustrato, el comportamiento cinético de una enzima michaeliana es como se observa en la figura 1.1. Al utilizar concentraciones de sustrato bajas, la actividad enzimática aumenta rápidamente con los incrementos en la concentración de sustrato. Sin embargo, a niveles más elevados, 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.

**Figura 1.1**

*Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de una reacción enzimática.*



*Nota:*  $V_0$ : velocidad inicial.  $K_m$ : constante de Michaelis-Menten.  $V_{\text{máx}}$ : velocidad máxima.  $[S]$ : concentración de sustrato. Adaptado de Bioquímica. Conceptos esenciales” (p 143), por Feduchi y cols., 2020, 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

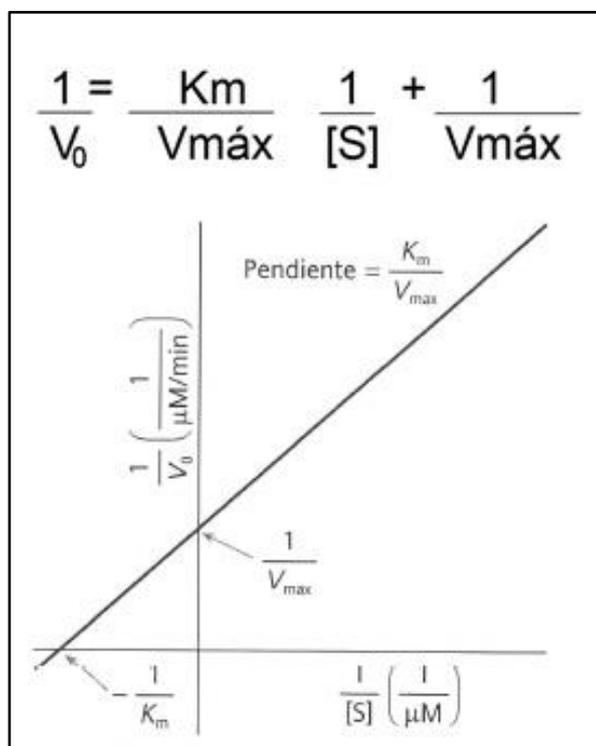
Menten), y dedujeron que la hipérbola que corresponde a la curva de saturación de una enzima por su sustrato, puede expresarse con la siguiente ecuación:

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

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 es un parámetro que permite caracterizar a cada enzima. La ecuación de Michaelis-Menten puede ser transformada algebraicamente en ecuaciones equivalentes utilizables para la determinación práctica del valor de  $K_m$ . La ecuación de Lineweaver-Burk (figura 1.2), que es la recíproca de la ecuación de Michaelis-Menten, se corresponde a la ecuación de una recta que no pasa por el origen.

**Figura 1.2.**

*Representación gráfica de la ecuación de Lineweaver-Burk.*



*Nota:* La representación gráfica de la ecuación de Lineweaver-Burk permite obtener los valores de  $V_{\text{máx.}}$  y de  $K_m$ .  $[S]$ : concentración de sustrato;  $v_0$ : velocidad enzimática;  $K_m$ : constante de Michaelis-Menten;  $V_{\text{máx}}$ : velocidad máxima. Adaptado desde Bioquímica. Conceptos esenciales (p 147), por Feduchi y cols., 2020, 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 localización tisular y 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

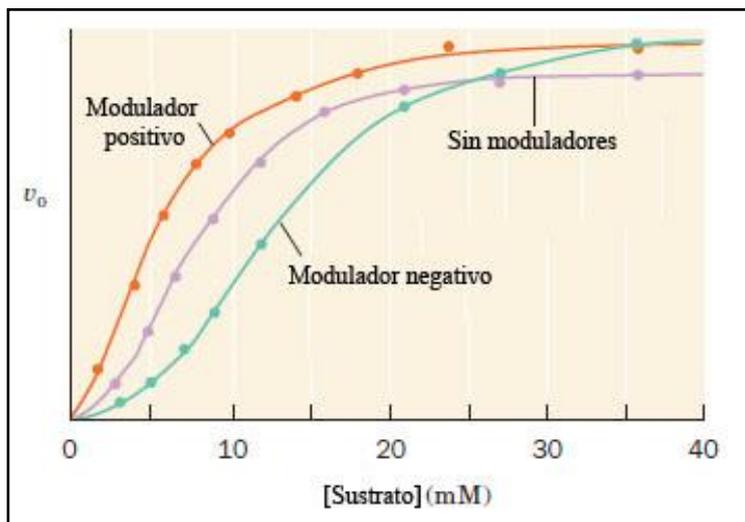
### ***Enzimas Alostéricas***

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 en la estructura molecular de las enzimas alostéricas. Estas enzimas poseen, además del sitio catalítico, 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, de manera tal que al unirse un modulador positivo o negativo, ocurre un cambio de conformación que se transmite a las otras subunidades, favoreciendo o impidiendo la unión del sustrato al sitio activo, respectivamente. En la figura 1.3 se observa el efecto de la unión de los moduladores sobre la velocidad inicial de una enzima alostérica.

**Figura 1.3.**

*Velocidad de reacción de una enzima alostérica en presencia y ausencia de moduladores.*



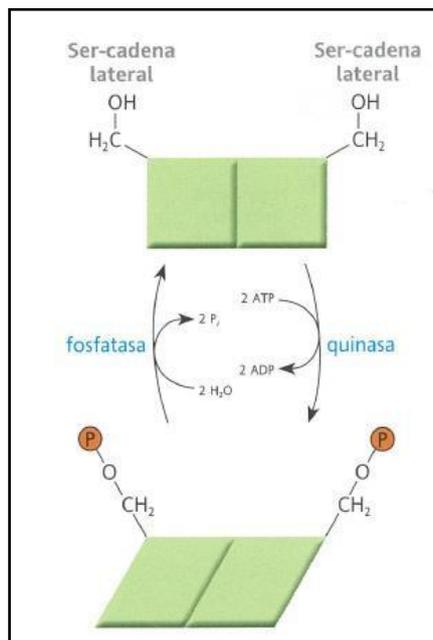
*Nota:* la velocidad de reacción de una enzima alostérica aumenta en presencia de moduladores positivos (naranja) y disminuye ante la presencia de moduladores negativos (celeste). Modificado de Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular (p 377), por Voet y cols., 2016, Artmed.

### ***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 (figura 1.4). 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.

**Figura 1.4.**

*Regulación de la actividad enzimática mediante modificación covalente.*



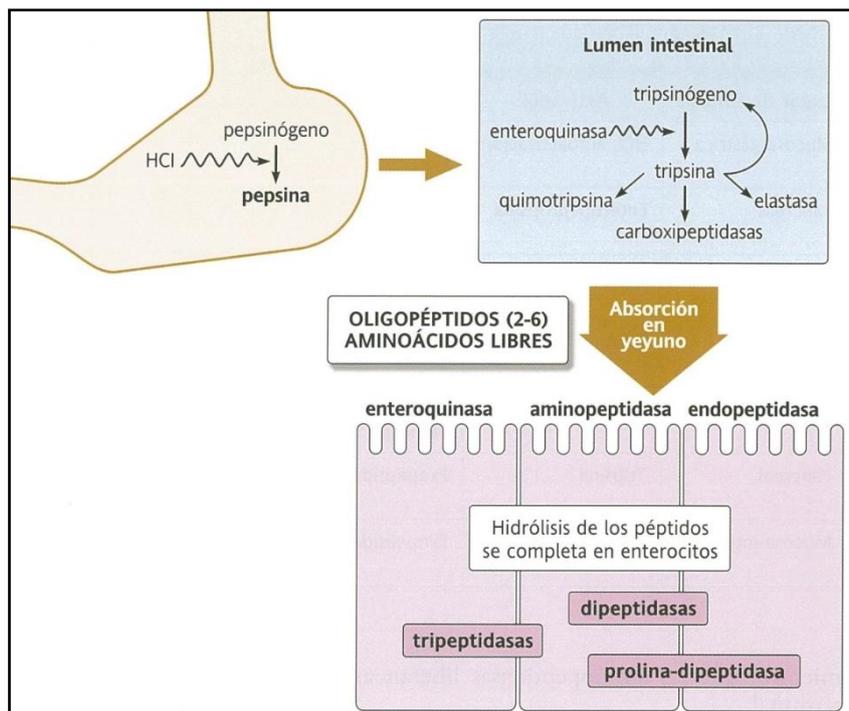
*Nota:* La unión reversible de grupos químicos a la molécula de enzima ocasiona el aumento o la disminución de su actividad. En la figura se representa la unión y eliminación enzimática de grupos fosfatos. Tomado de Bioquímica. Conceptos esenciales (p 154), por Feduchi y cols., 2020, Panamericana.

### **Enzimas Reguladas por Modificación Proteolítica: Zimógenos**

Ciertas enzimas son sintetizadas 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 la enzima activa mediante un proceso de hidrólisis. Ejemplos de zimógenos son algunos componentes de los jugos digestivos (figura 1.5), los cuales se activan al llegar a la luz intestinal.

**Figura 1.5.**

*Esquema del proceso de activación zimógenos gastrointestinales.*



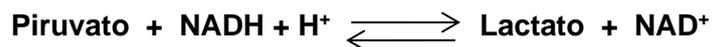
*Nota:* el pepsinógeno en presencia de la acidez del estómago se convierte en pepsina, la enzima activa; el tripsinógeno, secretado por el páncreas, es hidrolizado por la enteroquinasa a tripsina, enzimáticamente activa. Tomado de Bioquímica. Conceptos esenciales (p. 281), por Feduchi y cols., 2020, Panamericana.

### **Enzimas Reguladas por Localización Tisular o 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:



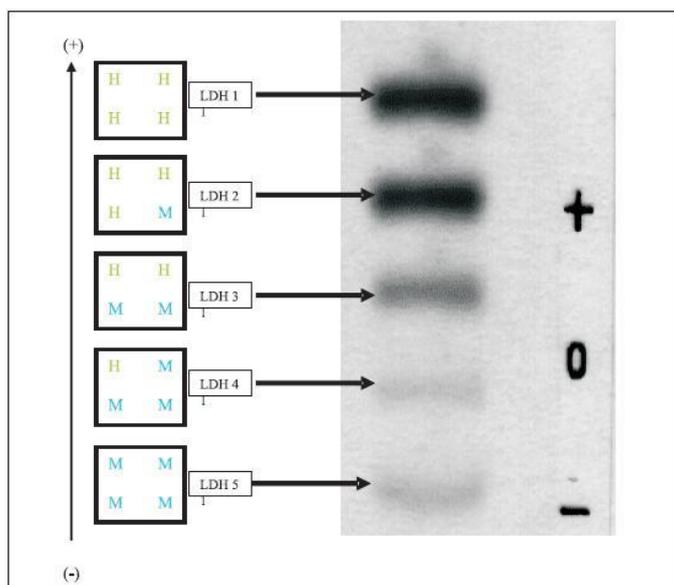
Debido a que poseen diferente estructura aminoacídica, por lo tanto, distinto peso molecular (PM) y/o carga, las isoenzimas se pueden separar mediante electroforesis en gel. En este sentido, una de las mejores estudiadas es la "lactato deshidrogenasa", que presenta cinco isoenzimas, cada una con una 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 (figura 1.6) 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).*



*Nota:* Adaptado de “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*” (p. 11-20), por Maestre-Serrano y cols. Universitas Scientiarum, 2008, Universitas Scientiarum 13(1).

**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.

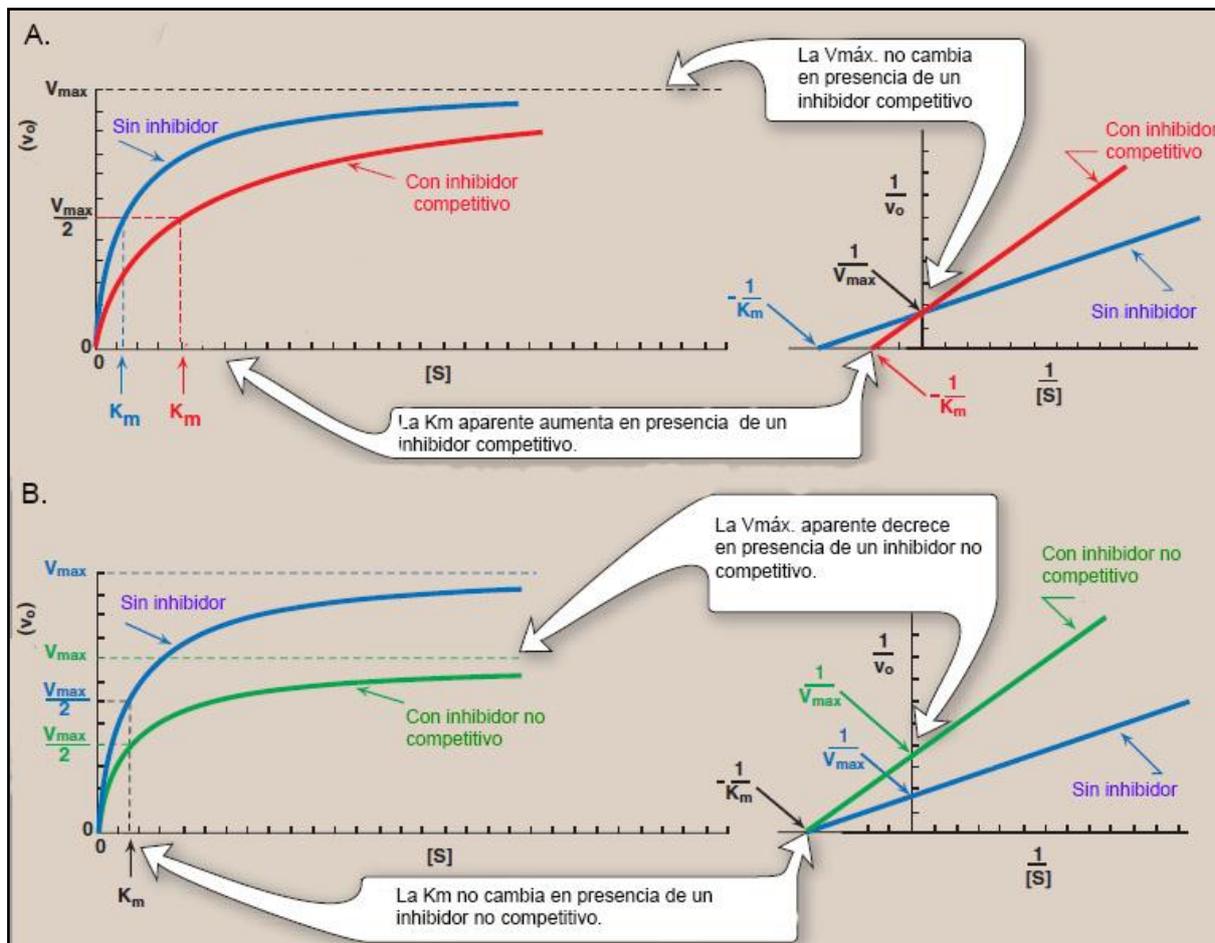
Los inhibidores competitivos aumentan el valor de Km, pero no modifican la Vmáx de la enzima. El inhibidor presenta similitud estructural con el sustrato y ambos compiten por el sitio activo de la enzima.

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 Vmáx sin modificar el valor de la Km.

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 (figura 1.7).

**Figura 1.7.**

*Influencia de inhibidores reversibles competitivo y no competitivo sobre la cinética enzimática.*



*Nota.* Un inhibidor competitivo provoca un aumento de la  $K_m$  de una enzima michaeliana, sin modificar su  $V_{m\acute{a}x.}$  Sin embargo, la presencia de un inhibidor disminuye la  $V_{m\acute{a}x.}$  de una enzima michaeliana, sin modificar el  $K_m$ . Modificado de Biochemistry (p. 60-61), por Harvey & Ferrier, 2011, Lippincott Illustrated Reviews Series.

## PROBLEMAS DE APLICACIÓN

1) Un investigador trabaja intentando purificar una enzima de interés a partir de tejido de rata, utilizando diversos procedimientos consecutivos. Los datos obtenidos se reportan en la Tabla 1.1, pero se omitieron algunos datos útiles.

**Tabla 1.1.**

*Actividad total y concentración de proteínas determinadas luego de diferentes procesos de purificación.*

Paso de Purificación	Actividad Total (mU)*	Proteína Total (mg)	Actividad específica (mU/mg)	Recuperación global (%)	Grado de purificación
Homogenizado crudo de tejido fresco	100000	10000			
Sobrenadante del homogeneizado	98999	8000			
Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	90000	1500			
DEAE-celulosa	60000	250			
Concentración y diálisis	58000	29			
Sephadex-G200	52000	20			
Cellex-P (intercambio catiónico)	41800	19			
DEAE-sephadex	50000	12			
Cromatografía de afinidad	49000	10			

\*mU= milienzima; milimoles de sustrato que cambian por minuto.

a) Complete la tabla agregando, además, las columnas de grado de purificación y porcentaje de recuperación.

b) En función de la necesidad de obtener la mayor cantidad de la enzima en forma pura, analice los valores obtenidos, y sugiera qué método/s no contribuye/n con el objetivo anterior, y por lo tanto debería/n ser eliminados de la secuencia de procedimientos.

2) Las prostaglandinas son un tipo de eicosanoides que poseen una variedad de efectos muy potentes en los tejidos de los vertebrados. Estos compuestos, son responsables de la generación de fiebre e inflamación y el dolor asociado. La síntesis de prostaglandinas ocurre a partir de ácido araquidónico, en una reacción catalizada por la prostaglandina endoperóxido sintasa (PES). Esta enzima, una ciclooxigenasa, utiliza oxígeno para convertir el ácido araquidónico en PGG<sub>2</sub>, precursor inmediato de diferentes prostaglandinas y otros

compuestos. Sin embargo, el ibuprofeno es un medicamento que afecta la síntesis de prostaglandinas, ya que inhibe la actividad de la enzima PES. Mediante su efecto, el ibuprofeno reduce la inflamación y el dolor. Teniendo en consideración lo anterior, se determinó el tipo de efecto inhibitorio de esta droga. Para ello, se realizó la medición de la velocidad inicial de formación de PGG<sub>2</sub> en presencia y ausencia de ibuprofeno, y con concentraciones crecientes del sustrato de la enzima. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.2.

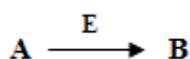
**Tabla 1.2.**

*Velocidad inicial de formación de PGG<sub>2</sub> en ausencia y presencia de ibuprofeno.*

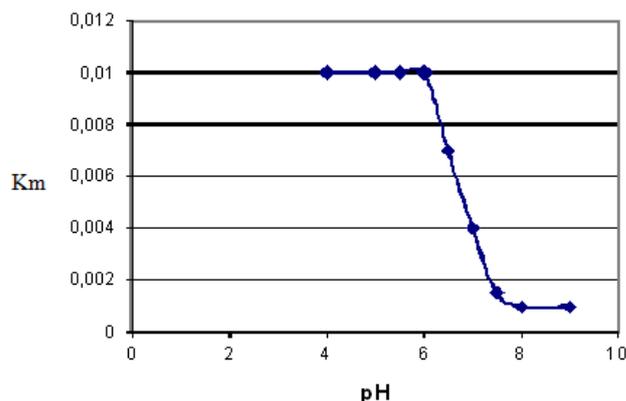
[Ácido araquidónico] (mM)	Velocidad de formación de PGG <sub>2</sub> (mM/min)	Velocidad de formación de PGG <sub>2</sub> con 10 mg/ml de ibuprofeno (mM/min)
0,25	13,5	6,7
0,5	22,5	16,67
1,0	32,2	25,25
1,5	36,9	30,49
2,5	41,8	37,04
3,5	44,0	39,9
4	44,3	41
4,5	44,5	42

- Considerando los datos anteriores, ¿Cuál es el valor de V<sub>máx</sub> y de K<sub>m</sub> de la enzima PES?
- Realice una representación gráfica de la cinética de la PES, en presencia y ausencia de ibuprofeno. De acuerdo a la misma, ¿qué tipo de inhibición ejerce el ibuprofeno sobre la actividad de la enzima?, ¿qué parámetros cinéticos de la enzima se ven afectados en presencia del medicamento?

**3)** En un experimento realizado se trabajó con 1 µg 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 µmoles/min/ µg de enzima, no habiendo variación de la misma en el rango de pH 5 a 9. El valor de K<sub>m</sub> 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) Una enzima que cataliza la reacción  $S \longrightarrow P$ , se ensaya con las concentraciones de sustrato indicadas en la tabla 1.3, obteniéndose diferentes valores de velocidad inicial.

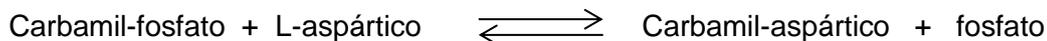
**Tabla 1.3.**

*Variación de la velocidad inicial de una enzima, en función de concentraciones crecientes de su sustrato.*

Concentración inicial de sustrato [M]	Velocidad inicial [μmol/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 Km de la enzima y la Vmáx 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?

5) 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 aspártico como sustrato, en presencia de CTP (citidina trifosfato) 0,5 M y en ausencia del mismo, se obtuvieron los datos de velocidad inicial indicados en la tabla 1.4.

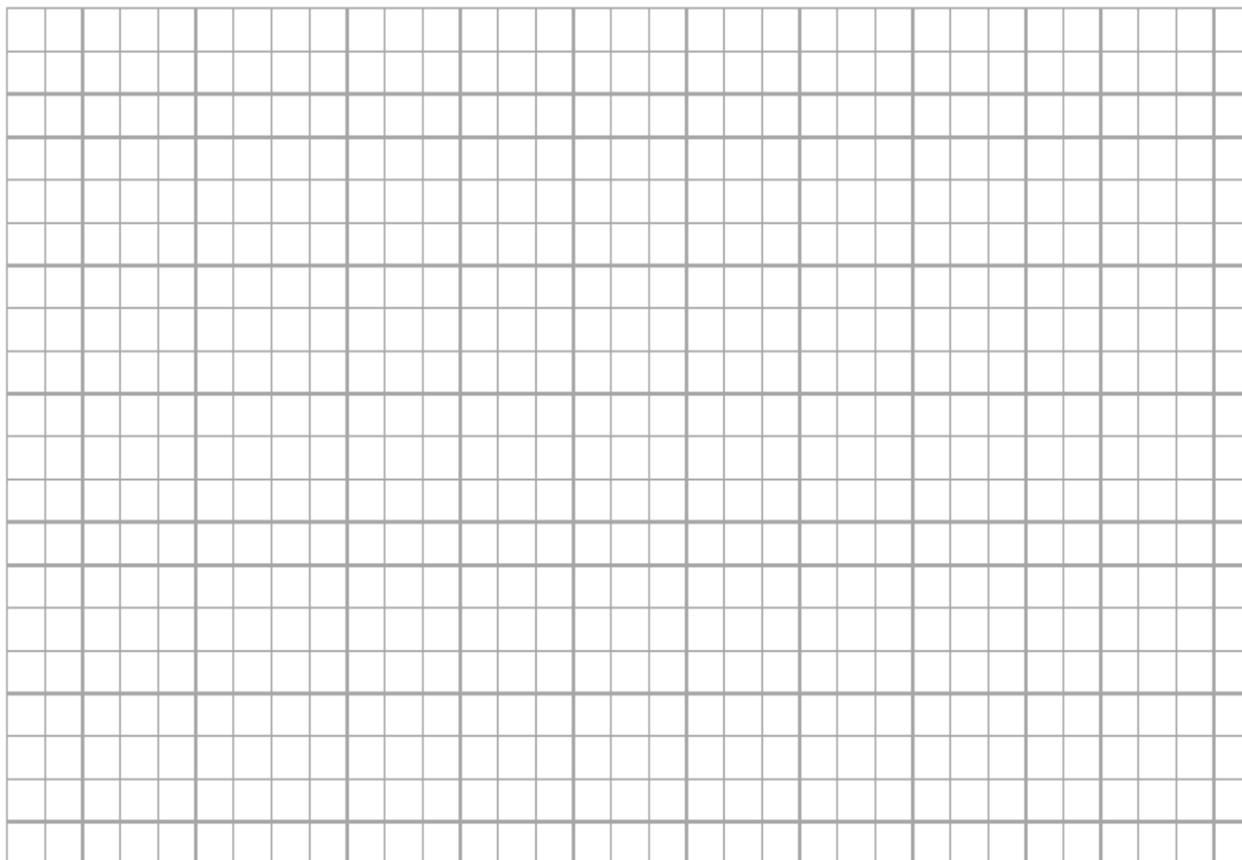
**Tabla 1.4.**

*Variación de la velocidad inicial de la enzima aspartato transcarbamilasa, en función de concentraciones crecientes de su sustrato.*

Aspártico (Molar)	v (unidades arbitrarias)	
	Ausencia de CTP	CTP 0,5 M
1 x 10 <sup>-3</sup>	0,45	0,20
2 x 10 <sup>-3</sup>	0,80	0,40
3 x 10 <sup>-3</sup>	1,70	0,70
4 x 10 <sup>-3</sup>	2,90	1,00
5 x 10 <sup>-3</sup>	3,40	1,40
7 x 10 <sup>-3</sup>	4,30	2,40
9 x 10 <sup>-3</sup>	5,10	3,70
10 x 10 <sup>-3</sup>	5,30	4,20
12 x 10 <sup>-3</sup>	5,60	4,80
15 x 10 <sup>-3</sup>	5,80	5,50
16 x 10 <sup>-3</sup>	5,80	5,60
17 x 10 <sup>-3</sup>	5,80	5,60

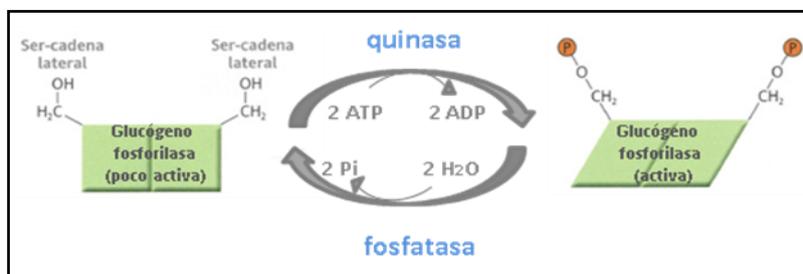
- Sin utilizar ninguna representación gráfica estime el valor de Km.
- Calcule este parámetro utilizando la ecuación de Michaelis Menten. ¿Existe alguna discrepancia entre estas dos determinaciones? Justificar.

c) ¿Qué efecto ejerce el CTP sobre el sistema enzimático? Justifíquelo graficando.



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 la figura de abajo, indique cuál de las siguientes enzimas debería encontrarse activa con el objeto de obtener carne de buena calidad.



b) Identifique los grupos transferidos para modificar la actividad de la glucógeno fosforilasa.

c) 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  $V_{m\acute{a}x}$ . de 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 Canosa, E., Romero Magdalena, C., Yáñez, E. & García Hoz Jiménez, C. (2020). Bioquímica. Conceptos esenciales. Ed. Panamericana.
- Rodwell, V. W. (2018). Harper: bioquímica ilustrada, 31<sup>o</sup> Edición. Ed. McGraw-Hill Intereamericana.
- 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. (2016). Fundamentos de Bioquímica -4 ta. Edición: 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: ANÁLISIS DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

### Objetivos de aprendizaje

- Calcular la actividad de la enzima invertasa a partir de un extracto de levadura, utilizando la determinación de azúcares reductores por el método de Nelson-Somogyi.
- Determinar el efecto del pH y de la temperatura sobre la actividad enzimática, a partir de la comparación de la actividad de la invertasa obtenida en diferentes condiciones.

### Introducción teórica

La cantidad de una enzima en una solución o en un extracto de tejido, puede determinarse cuantitativamente en relación al efecto catalítico que produce, es decir, en relación a la velocidad con la que cataliza la transformación de los reactivos en productos. Para este fin, 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 la aparición de los productos.

Para determinar la actividad de una enzima es posible medir la cantidad de producto formado, o bien, la de sustrato consumido, en un tiempo dado, en una mezcla que contenga todos los factores requeridos para la reacción. Para que la determinación guarde relación con la cantidad de enzima presente, se determina la velocidad de reacción enzimática inicial, que es aquella obtenida cuando la cantidad de sustrato consumido es insignificante en relación con el total presente de la mezcla.

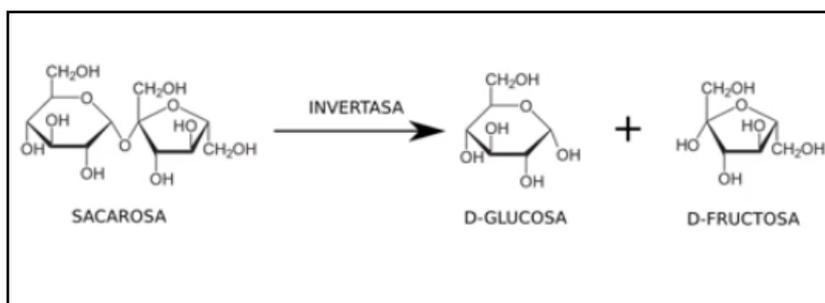
Para indicar la actividad de una preparación enzimática se utilizan distintas expresiones. Un modo habitual de indicar la actividad de una enzima es en Unidades Internacionales (UI). Como ya fuera mencionado anteriormente, en el TPA, la Unidad de cualquier enzima es la cantidad de enzima que cataliza 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 y han de ser considerados para determinar la actividad de enzima presente en una muestra. Entre estos factores, es posible mencionar: 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 TEMPERATURA

La invertasa o sacarasa 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 la reacción enzimática se puede esquematizar de la siguiente manera:



Es posible ensayar la actividad de la enzima en estudio determinando la concentración de los productos de hidrólisis (azúcares reductores) mediante diferentes métodos analíticos. En el caso particular de este TPL, se utilizará 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, 2 ml de tolueno y se disgrega hasta obtener una especie de pasta, perfectamente homogénea. Luego de un reposo durante 15 min. 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 un pilón. Nuevamente, dejar reposar 15 min. con agitación ocasional. Centrifugar 15 min. a 3000 r.p.m. 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 desproteínización se logra con el agregado de NaOH y ZnSO<sub>4</sub> y la consiguiente formación de Zn(OH)<sub>2</sub> que 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 trisódico 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<sub>4</sub> 0,6 N.

• Reactivo Cuprotartárico.

Para la preparación de este reactivo en el momento de usar se mezclan un volumen de la solución A y cuatro volúmenes de la solución B. Cada una de las soluciones contiene:

Solución A: Sulfato de cobre al 2 %  
Sulfato de sodio anhidro al 12 %.

Solución B: Carbonato de sodio anhidro a 3 %  
Bicarbonato de sodio al 2%  
Tartrato de sodio y potasio al 1.5 %  
Sulfato de sodio anhidro al 12 %

• Reactivo Arsenomolibdico.

Este reactivo se prepara a partir de las siguientes soluciones:

Solución A: Molibdato de amonio 25 g  
Ácido sulfúrico concentrado 21 ml  
H<sub>2</sub>O destilada 450 ml

Solución B: Arseniato disódico.7 H<sub>2</sub>O 3 g  
H<sub>2</sub>O destilada 25 ml

Mezclar y mantener a 37 °C durante 24 hs. Guardar en frasco color caramelo.

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

**Actividades a desarrollar**

- a) Prepare el reactivo cuprotartárico de acuerdo a las especificaciones descriptas en materiales y métodos (Volumen final/comisión= 20 ml)  
b) En la mesada de trabajo Usted encontrará el resto del material y los reactivos necesarios 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 desproteinizado	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
pH aproximado	3,0	4,5	6,0	8,6
Buffer citrato de pH x (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. Adicionar a c/tubo con pipeta distinta, dejando la pipeta en el tubo correspondiente:				
Enzima (1/20) (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 10 minutos Iniciar el protocolo de desproteinado, en el tiempo de espera.				

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

Tubos de desproteinado	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
Al cabo del tiempo de reacción (10'), extraer 1 ml de mezcla de reacción (con su correspondiente pipeta) y dejarlo caer cerca del fondo de los tubos de desproteinado 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
Filtrar 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
Tomar 1 ml de cada filtrado 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)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Rvo. cuprotartárico (ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Mezclar suavemente Colocar en baño maría hirviendo durante 10 min. Enfriar con agua corriente y agregar:					
Rvo. arsenomolibdico (ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
H <sub>2</sub> O (d)	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
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	8,6
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.
- De acuerdo a lo graficado y considerando la velocidad de reacción enzimática, explique cuál es el pH óptimo de la enzima.

## B) Influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática

Entre otros factores a los que se ha hecho mención en esta guía de trabajos prácticos, la actividad de las enzimas depende de la temperatura en la que se lleva a cabo la reacción enzimática.

El ascenso de la temperatura conlleva a un incremento de la energía cinética de las moléculas que participan en una reacción química, aumentando la velocidad de dicha reacción. Dentro de ciertos rangos de temperatura, las reacciones enzimáticas siguen ese comportamiento. Sin embargo, por encima de un valor de temperatura óptimo (temperatura en la que se alcanza el máximo de actividad catalítica), la actividad enzimática decae bruscamente, llegando incluso a no detectarse. Este efecto inactivante de la temperatura se explica debido a la acción del calor sobre la estructura molecular de las enzimas.

En este TPL se estudiará la variación de la actividad de la invertasa de acuerdo a diferentes temperaturas del medio de reacción. Para llevar adelante este estudio, se mantendrán constantes todas las otras variables que afecten la actividad enzimática.

### Materiales y métodos

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

- Buffer citrato pH = 4,5
- Sacarosa 0,5 M
- NaOH 0,6 N
- ZnSO<sub>4</sub> 0,6 N
- Reactivo Cuprotartárico (preparado en la sección anterior).
- 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:

**Guía de Trabajos Prácticos de Química Biológica para Lic. En Biología Molecular**

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:

<b>Tubo N°</b>	<b>R-1</b>	<b>R-2</b>	<b>R-3</b>	<b>R4</b>
Temperatura de incubación (°C)	4	20	55	75
Buffer citrato (ml)	5,0	5,0	5,0	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 colocar a las temperaturas indicadas unos minutos para termostatar. Adicionar a c/tubo con pipeta distinta, dejando la pipeta en el tubo correspondiente:				
Enzima (1/20) (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 10 minutos Iniciar 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.

<b>Tubos de desproteínizado</b>	<b>D-1</b>	<b>D-2</b>	<b>D-3</b>	<b>D-4</b>	<b>D-5 (Bco.)</b>
Na(OH) 0,6 N (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Al cabo del tiempo de reacción (10'), 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

Filtrar					
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
Tomar 1,0 ml de cada filtrado					
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)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Rvo. cuprotartárico (ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Mezclar suavemente					
Colocar en baño maría hirviendo durante 10 min.					
Enfriar con agua corriente y agregar:					
Rvo. arsenomolibdico (ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
H <sub>2</sub> O (d)	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
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
Temperatura del medio (°C)	12	21	45	60
Absorbancia				
µmoles de sacarosa hidrolizada (s h)				
Velocidad inicial (s h ml <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )				

- c) Graficar velocidad inicial de reacción en función de la temperatura del medio.
- d) De acuerdo a lo graficado y considerando la velocidad de reacción enzimática, explique cuál es el pH óptimo de la enzima.

### **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. Por ejemplo, es posible determinar la concentración de proteínas en solución, a partir de una curva graficada utilizando como patrón una solución de albúmina bovina.

Según la ley de Lambert-Beer, 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.

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 luego permite calcular 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 método analítico. Debido a que en el TPL determinaremos la cantidad de azúcares reductores generados luego de la acción enzimática mediante el método de Nelson y Somogyi, la curva de calibración se construye 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) se adicionó el reactivo cuprotartárico, de alcalinidad moderada y se llevó a baño maría hirviente durante 10 min. Luego de enfriar la solución bajo agua corriente, sin agitación violenta para evitar la reoxidación del  $\text{Cu}_2\text{O}$  por el

oxígeno del aire, se agregó el reactivo arsenomolibdico y se determinaron los valores de absorbancia a 620 nm.

Si bien la solución de glucosa que se utiliza como patrón (en cantidades conocidas y crecientes) para realizar la curva de calibración, no contiene cantidades significantes de proteínas, se trató con agentes precipitantes de proteínas (NaOH y ZnSO<sub>4</sub>) y luego fue filtrada. Estos pasos se realizaron para igualar las condiciones de reacción con aquellas que se utilizarán en el TPL en la determinación de la actividad de invertasa.

### Actividades desarrolladas

a) Se prepararon la siguiente serie de tubos y se agregaron los reactivos que se indican a continuación:

Tubos N°	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
Se mezclaron y filtraron las soluciones de cada tubo, recibiendo el filtrado en el correspondiente tubo de filtrado (F).						
Tubos de filtrado	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6
Se tomaron 0,5 ml de cada filtrado. Cada alícuota de filtrado se colocó en 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
Se mezcló suavemente y se colocó en baño maría hirviendo durante 10 min. Los tubos de colorimetría fueron enfriados con agua corriente y se agregaron los siguientes volúmenes de arsenomolibdico (ml):						
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
Se mezclaron enérgicamente los volúmenes de los tubos de colorimetría y se determinó la absorbancia a 620 nm del complejo formado, utilizando como blanco el tubo N° 1.						

## Resultados

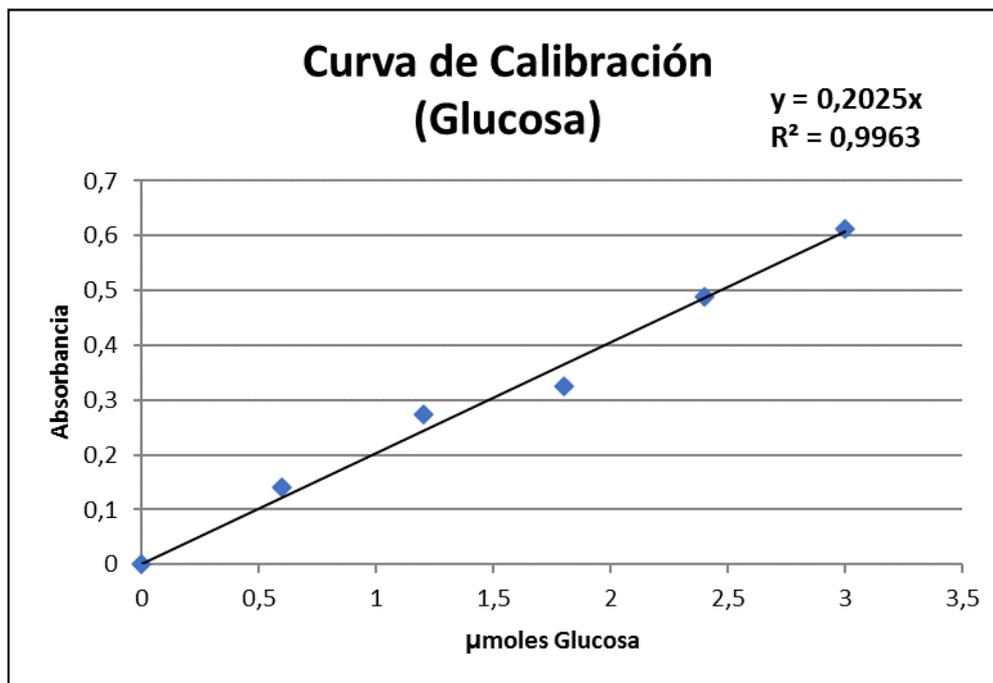
Con los datos obtenidos se graficó la absorbancia determinada en relación con la concentración de glucosa utilizada, obteniéndose una recta que pasa por el origen.

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

Teniendo en cuenta las concentraciones finales de glucosa agregada y los valores de absorbancia obtenidos, se confeccionó la siguiente tabla:

Tubo Nº	1	2	3	4	5	6
Glucosa (µmoles)	0	0,6	1,2	1,8	2,4	3,0
Absorbancia	0	0,141	0,274	0,324	0,489	0,613

En función de graficar los datos de la tabla anterior, se obtiene la siguiente recta con su correspondiente ecuación:



## BIBLIOGRAFÍA

- Blanco, A. & Blanco, G. (2011). Química Biológica. 9º Edición. Ed. El Ateneo.
- Nelson, D. & Cox, M. (2018). Lehninger. Principios de Bioquímica-7º Edición. Ed. W. H. Freeman.
- Voet, D., Voet, J G. & Pratt, C. W. (2016). Fundamentos de Bioquímica -4º Edición: La Vida a Nivel Molecular. Ed. Artmed.

## TRABAJO PRÁCTICO DE AULA Nº 2: TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL. FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

### Objetivos de aprendizaje

- Describir el transporte de electrones a través de aceptores que experimentan cambios reversibles en su estado redox.
- 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:

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.

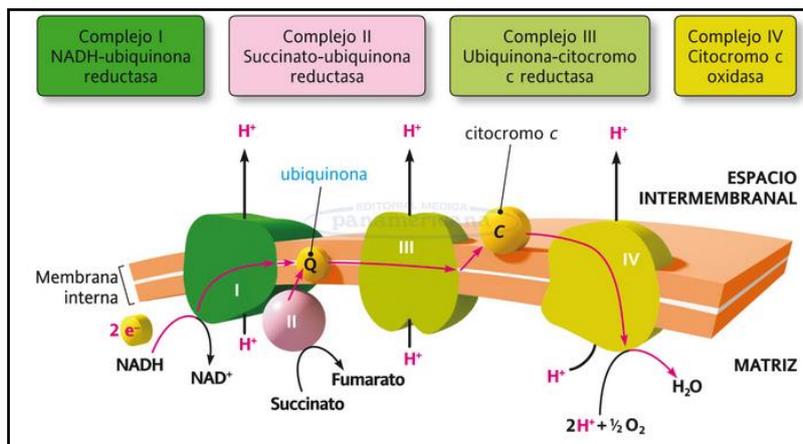
f) *Citocromo oxidasa* (complejo IV): posee dos citocromos (a y a<sub>3</sub>) y dos átomos de Cu. Transfiere electrones al O<sub>2</sub>. Una molécula de oxígeno capta 4 e<sup>-</sup> y se activa, uniéndose a 4H<sup>+</sup> para dar dos moléculas de H<sub>2</sub>O.

En las figuras 2.1 y 2.2, se ilustran los componentes de la cadena de la cadena respiratoria.

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 respiratoria mitocondrial.*



*Nota.* Dependiendo de la deshidrogenasa, los electrones ingresan a la cadena respiratoria por el complejo I o el II, para luego ser transportados secuencialmente por la CoQ, el complejo III, el citocromo c y el complejo IV, hasta el aceptor final, el oxígeno. Tomado de Bioquímica. Conceptos esenciales (p. 246), por Feduchi y cols., 2020, Panamericana.

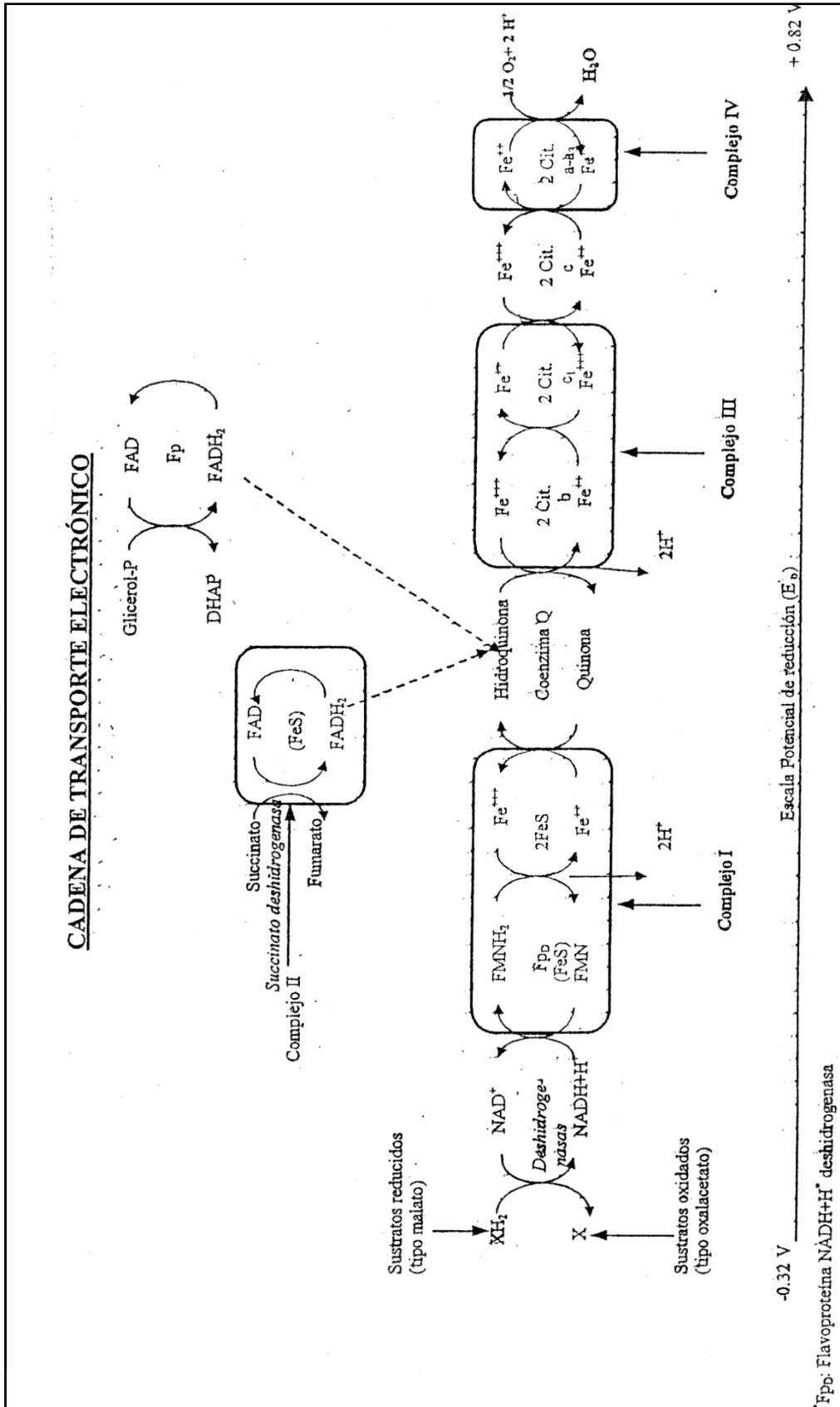
### Fosforilación oxidativa

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 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, que 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.

En la fosforilación oxidativa se utiliza la energía liberada durante el transporte electrónico para la síntesis de ATP. En la figura 2.3, se presenta un esquema de la denominada "hipótesis quimiosmótica" que explica el mecanismo mediante el cual ocurre este proceso: la energía 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 (Pi).

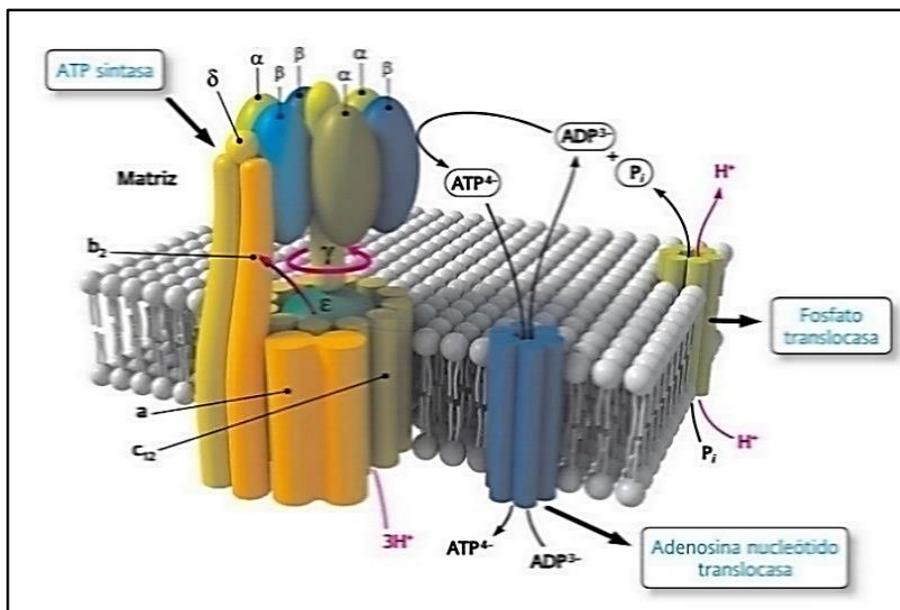
Figura 2.2.

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  $P_i/H^+$ .*



*Nota.* La síntesis de ATP es enzimáticamente catalizada por la ATP sintasa, que necesita de los sustratos que ingresan a la matriz mitocondrial gracias a simporter  $P_i/H^+$  y al translocador ATP/ADP. Tomado de Bioquímica. Conceptos esenciales (p. 249), por Feduchi y cols., 2020, 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 oxidativa se encuentra acoplado al transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria. En la tabla 2.1 se brindan algunos ejemplos y el modo de acción de este tipo de sustancias.

**Tabla 2.1.**

*Inhibidores del transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria*

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

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.

**Tabla 2.2.**

*Inhibidores de la síntesis de ATP.*

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.

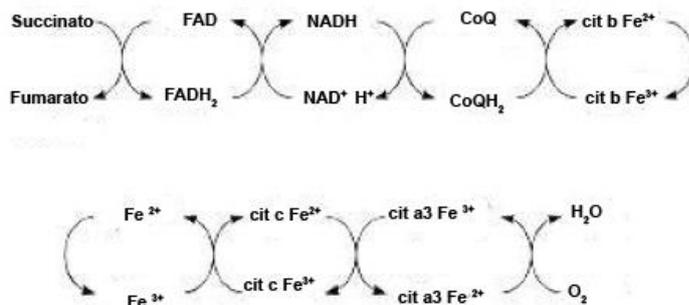
## Desacoplantes

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  $O_2$ . Ejemplo: 2,4-dinitrofenol.

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)

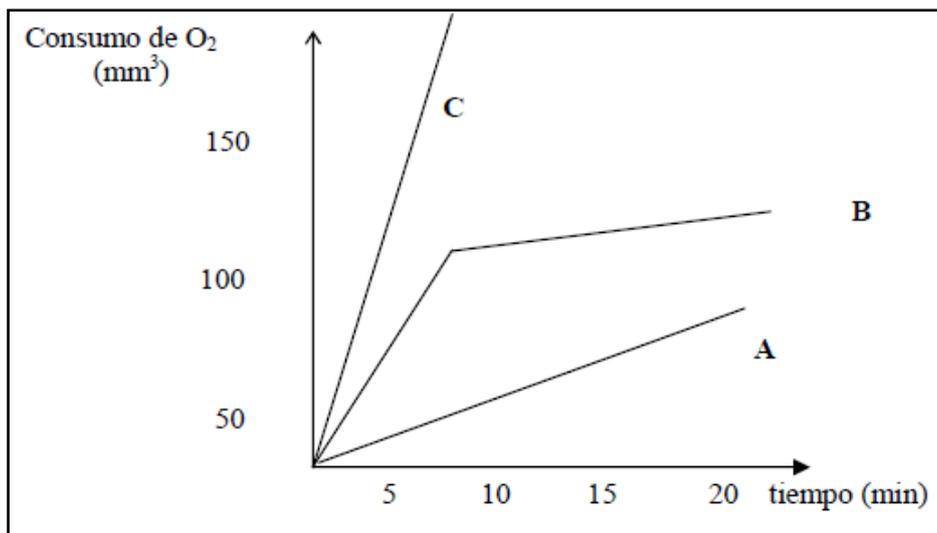
2) El consumo de O<sub>2</sub> fue medido en tres vasos de Warburg que contenían los compuestos indicados en la Tabla 2.3.

**Tabla 2.3.**

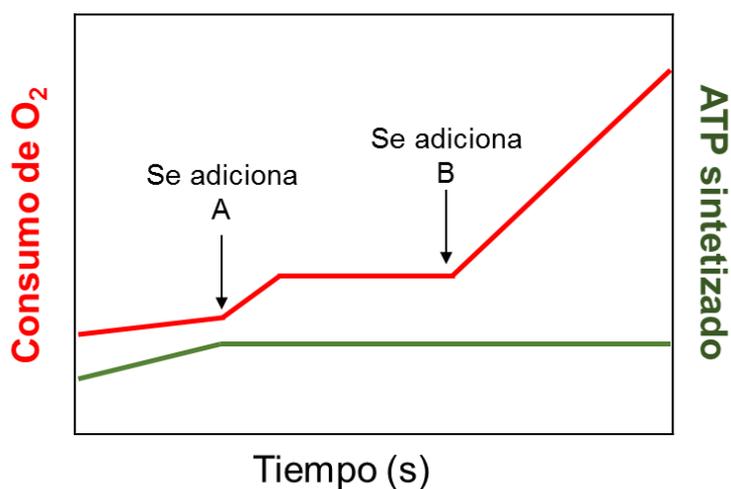
*Componentes agregados en el vaso de Warburg para la experiencia de interés*

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 dos compuestos (A y B) para caracterizarlos. Para ello, se utiliza una suspensión de mitocondrias de hígado incubadas en un oxímetro con piruvato, ADP y Pi. Además, se determina la concentración de ATP sintetizado. Los resultados obtenidos se grafican a continuación:



a) Describa los resultados obtenidos cuando se agrega A y luego el compuesto B.  
 b) ¿Cómo clasificaría estos compuestos teniendo en cuenta su modo de acción en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa?

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.

**Tabla 2.4.**

*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).*

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

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

6) 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

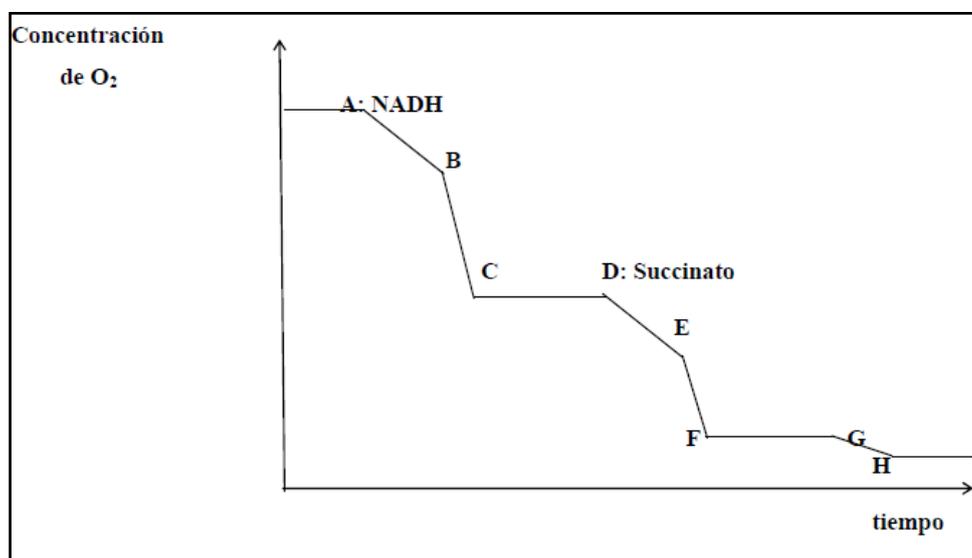
C: Rotenona o Antimicina

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

F: Malonato o Succinato

G: Malonato o Succinato

E: 2,4-DNF o CN<sup>-</sup>



## GUÍA DE ESTUDIO

### Transporte electrónico

Localización de las enzimas. Deshidrogenasas nicotinamida-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  $P_i$ , 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. (2011). Química Biológica. 9na. Ed. Ed. El Ateneo.
- Feduchi, E., Romero Magdalena, C., Yáñez, E. & García Hoz Jiménez, C. (2020). Bioquímica. Conceptos esenciales. Ed. Panamericana.
- Harvey, R. A. & Ferrier, D. R. (2011). Biochemistry (Lippincott Illustrated Reviews Series). Biochemistry (Lippincott Illustrated Reviews Series), 40, 30888.

## Guía de Trabajos Prácticos de Química Biológica para Lic. En Biología Molecular

- Nelson, D. & Cox, M. (2018). Lehninger. Principios de Bioquímica. Ed. W. H. Freeman.
- Stryer, L. (2013). Bioquímica. Ed. Reverté.

## TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº 2: TRANSPORTE ELECTRÓNICO MITOCONDRIAL

### Objetivos de aprendizaje

- Demostrar experimentalmente el transporte electrónico en una muestra de tejido animal, utilizando un aceptor/dador de electrones artificial, de potencial de óxido-reducción conocido.
- 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 una porción de 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 han sido 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, en este caso, 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 enzima 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 32 g del órgano, se corta en trozos pequeños y se homogeniza en una licuadora fría junto con 80 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***

Para demostrar el funcionamiento de una porción de la cadena respiratoria, 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 de sodio. 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 0,03 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”.

<b>TUBO</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
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)	----	----	0,3	----	----
Agua destilada (ml)	2,1	2,0	0,8	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 obtenidos**

- 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 estas sugerencias 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. (2011). Química Biológica. 9º Edición. 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 DE HIDRATOS DE CARBONO: VÍA GLICOLÍTICA. CICLO DE KREBS

### Objetivos de aprendizaje

- Diferenciar y describir los procesos de digestión, absorción y metabolización de carbohidratos en vertebrados.
- Describir y analizar las reacciones enzimáticas implicadas en la vía glicolítica.
- Identificar y explicar los mecanismos que regulan la velocidad de la glucólisis.
- Analizar las reacciones enzimáticas que ocurren en el ciclo de Krebs y la regulación de este ciclo metabólico.
- Identificar las conexiones del ciclo de Krebs con otras rutas metabólicas.

## METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO. DIGESTIÓN Y ABSORCIÓN DE CARBOHIDRATOS

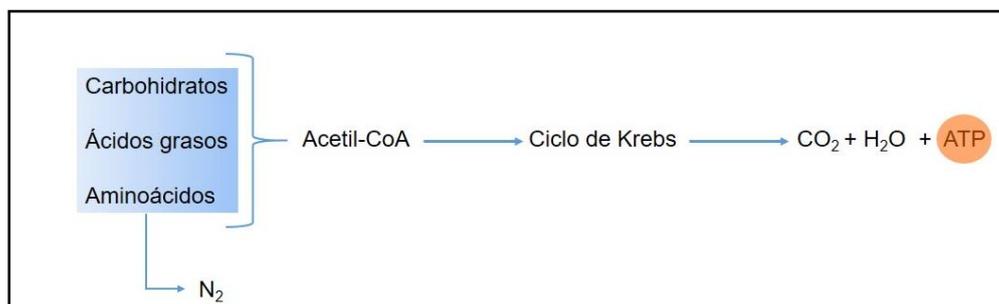
### Introducción teórica

El metabolismo es el conjunto de todas las reacciones químicas que tienen lugar en las células y tejidos de los seres vivos. Las reacciones del proceso de digestión, previo a la absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal, son consideradas reacciones pre-metabólicas.

Para su estudio y comprensión, es posible dividir el metabolismo celular en procesos catabólicos y anabólicos. Los procesos catabólicos o el catabolismo, constituyen la fase de degradación del metabolismo, 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  $\text{NAD}^+$  (NAD oxidado) el principal agente aceptor de equivalentes de reducción. En general, las vías catabólicas son rutas enzimáticas convergentes, donde a partir de distintos nutrientes se genera un intermediario común que termina oxidándose por completo a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Un ejemplo de lo mencionado se observa en la figura 3.1, en la que se indica que los carbohidratos, los ácidos grasos o los 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).

**Figura 3.1.**

*Esquema de procesos catabólicos.*



*Nota.* Distintos macronutrientes orgánicos son degradados mediante reacciones enzimáticas (vías catabólicas), que convergen para formar un producto común que luego es oxidado completamente a dióxido de carbono y agua. Durante estas reacciones se generan coenzimas oxidadas que permiten la síntesis de ATP.

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 en forma de glucógeno (animales) o almidón (vegetales); ácidos grasos como triglicéridos y lípidos complejos.

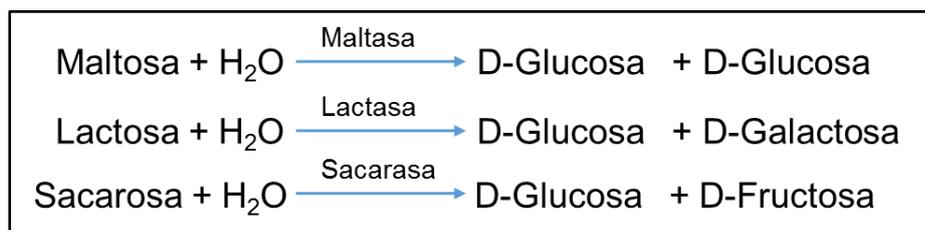
**Catabolismo:** período de movilización. Degradación de las reservas de carbohidratos o ácidos grasos. Ejemplo: vía glicolítica y ciclo de Krebs (oxidación de la glucosa).

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. 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-glicosidasa. 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 diferentes disacaridasas (figura 3.2): maltasa, sacarasa, lactasa.

**Figura 3.2.**

*Esquema de las reacciones catalizadas por disacaridasas intestinales.*

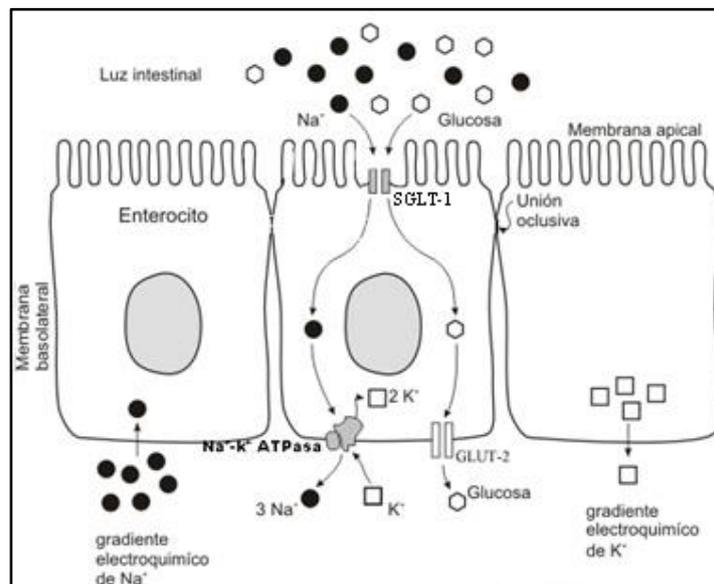


*Nota.* Las disacaridasas son enzimas que se encuentran en las células del borde de cepillo y catalizan la hidrólisis de los disacáridos como maltosa, lactosa y sacarosa, para originar como productos los correspondientes monosacáridos.

Los únicos carbohidratos 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>. Este sistema, esquematizado en la figura 3.3, 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.

**Figura 3.3.**

*Mecanismo de absorción de glucosa en células del epitelio intestinal.*



Una vez que los monosacáridos son absorbidos en la mucosa intestinal, a través de la circulación portal alcanzan primero al hígado, y finalmente, se distribuyen a través de la circulación general hacia el resto de los órganos y tejidos. Todos los tejidos reciben un aporte continuo de glucosa que es metabolizada a través de diferentes vías. La entrada de los monosacáridos al interior de las células de los diferentes tejidos ocurre mediante difusión facilitada, gracias a la presencia de transportadores.

Los transportadores celulares de glucosa, constituyen una superfamilia de proteínas integrales de membrana que se designan con las siglas GLUT (del inglés: *glucose transporters*). Los GLUTs poseen una distribución tisular selectiva (tabla 3.1), aunque algunos tejidos poseen más de una clase de ellos. Por otra parte, los diferentes GLUTs poseen una afinidad diferencial por la glucosa. Por lo anterior, de acuerdo a su afinidad por la glucosa, es posible ordenar los cinco primeros transportadores de la siguiente manera: GLUT-4 > GLUT-3 > GLUT-1 > GLUT-2.

**Tabla 3.1.**

*Distribución tisular de algunos de los glucotransportadores.*

Transportador	Localización tisular	Función
GLUT-1	Presentes en las membranas plasmáticas de casi todas las células fetales. En adultos se encuentran en eritrocitos, fibroblastos, cerebro, tejido adiposo, etc.	Transporte basal de glucosa a las células con una velocidad relativamente constante.
GLUT-2	Membrana basolateral de células intestinales y renales. Hígado y células $\beta$ del páncreas.	Es el transportador con menor afinidad por glucosa. Sólo están activos cuando los niveles de glucosa son elevados. También permiten el transporte de galactosa y fructosa.
GLUT-3	Cerebro y nervios periféricos	Tiene elevada afinidad por glucosa, de manera que asegura una provisión continua de glucosa, sin ser afectado por las variaciones de la glucemia.
GLUT-4	Músculo esquelético, cardíaco y tejido adiposo	Transportador de mayor afinidad por glucosa y su expresión en la membrana celular es dependiente de insulina. De este modo, insulina estimula la captación de glucosa por el músculo y células del tejido adiposo.
GLUT-5	Membrana apical y basolateral de enterocitos. Bajos niveles de este transportador también se encuentran en eritrocitos, riñón, espermatozoides, músculo esquelético y tejido adiposo.	Permite la absorción de fructosa a nivel intestinal.

## VÍA GLICOLÍTICA

### Introducción teórica

La glucosa es el principal combustible de la mayor parte de los organismos. Es un compuesto rico en energía y puede ser movilizado rápidamente desde las reservas (almidón o glucógeno) 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 en plantas, animales y en la mayoría de los microorganismos. Este mecanismo metabólico proveedor de energía es evolutivamente el más antiguo. Algunas levaduras, microorganismos anaeróbicos, células que carecen mitocondrias (como los eritrocitos) y el

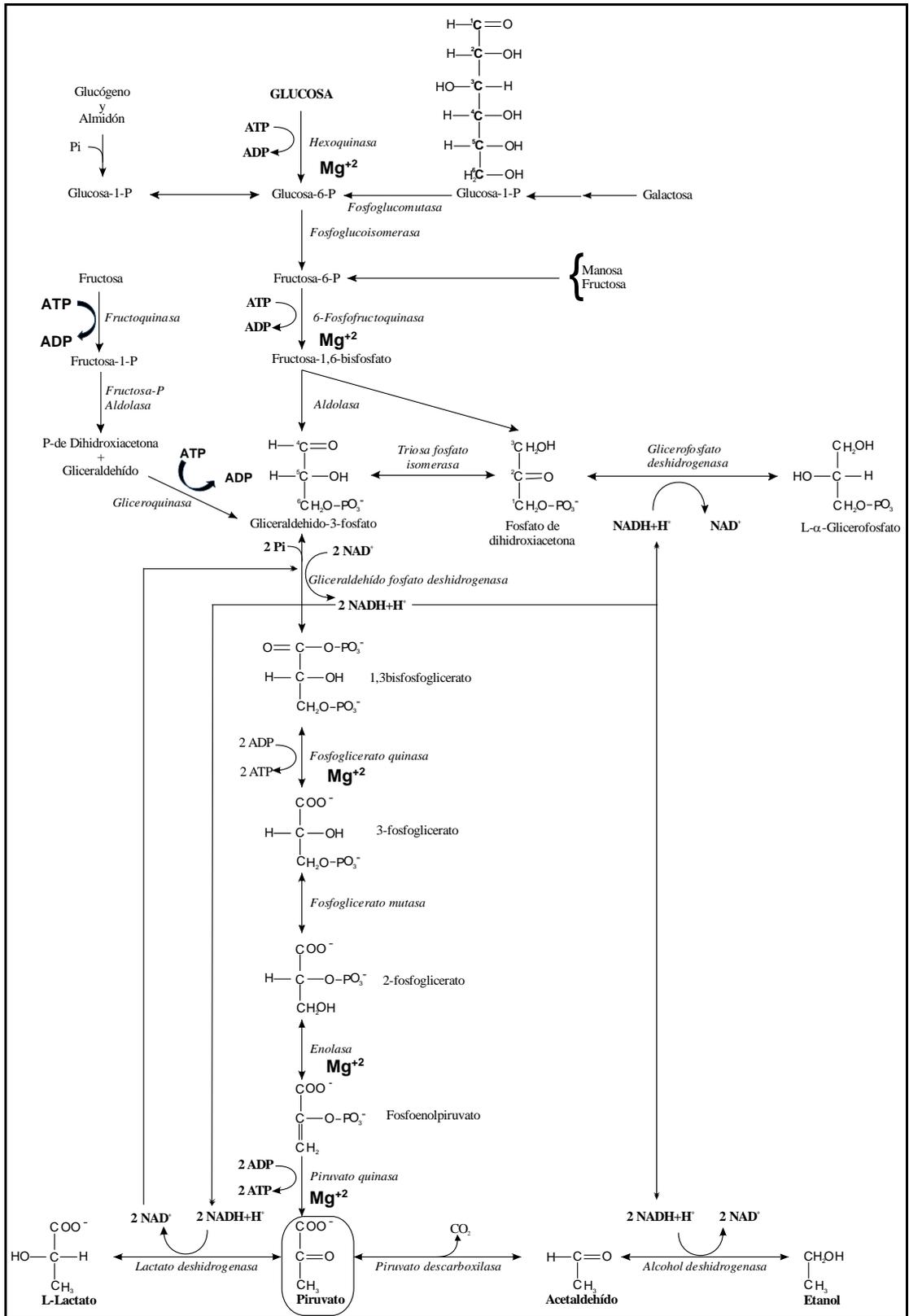
músculo en contracción durante el ejercicio intenso, dependen totalmente de esta vía para obtener energía.

Durante la glucólisis, una molécula de glucosa de seis átomos de carbono, se degrada enzimáticamente a través de una secuencia de reacciones para dar dos moléculas de piruvato, con tres átomos de carbono cada una. Durante estas reacciones enzimáticas, gran parte de la energía liberada se conserva en forma de ATP (figura 3.4). 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 con 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, gracias a 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 esta vía es que requieren magnesio ( $Mg^{+2}$ ) para su actividad.

Figura 3.4.

Reacciones enzimáticas implicadas en la vía glicolítica y en el ingreso de diferentes carbohidratos a esta vía metabólica.

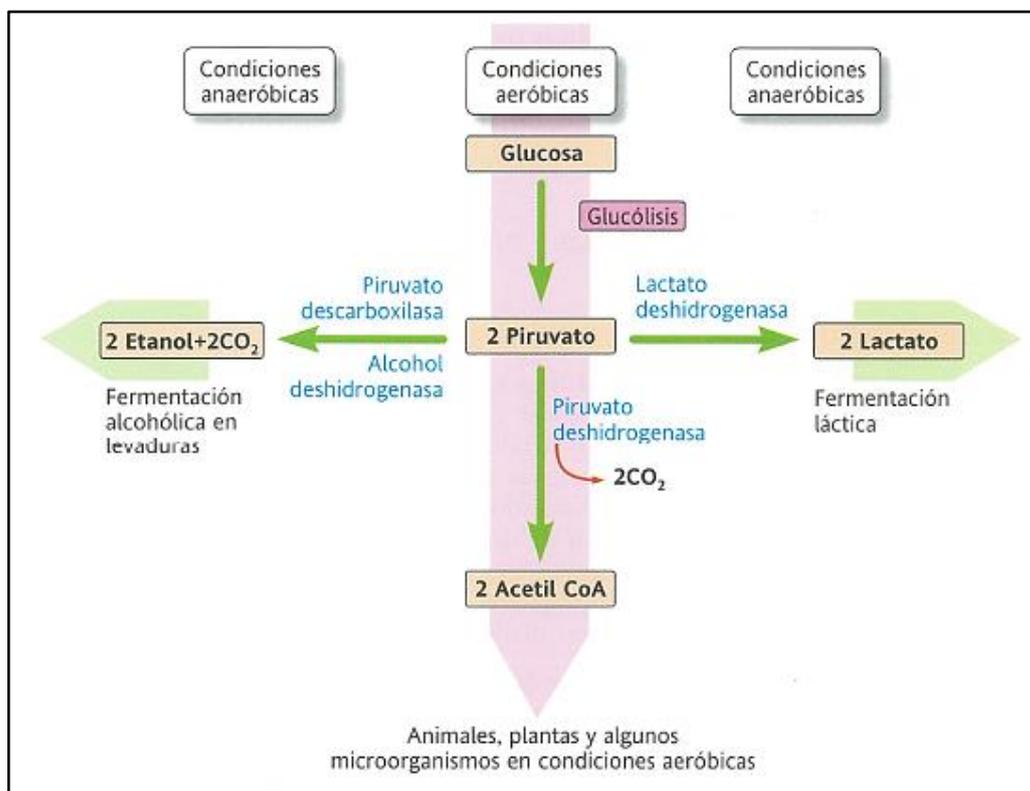


### Destino del piruvato y del NADH producido en la vía glicolítica

El piruvato generado como producto final de la glucólisis es destinado a tres rutas importantes, dependiendo de las condiciones de oxígeno en el medio y del tipo celular en el cual ocurre esta vía metabólica (figura 3.5). En aerobiosis (presencia de oxígeno), el piruvato ingresa en las mitocondrias siendo oxidado allí en una primera instancia a acetil-CoA (descarboxilación oxidativa del piruvato), y finalmente a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (ciclo de Krebs). En condiciones de anaerobiosis (ausencia de oxígeno) y dependiendo del tipo celular, el piruvato es reducido a lactato (músculo esquelético, bacterias ácido lácticas, eritrocitos) o etanol (levaduras), mediante procesos conocidos como fermentaciones.

**Figura 3.5.**

*Destinos metabólicos del piruvato.*



*Nota.* Adaptado de Bioquímica. Conceptos esenciales (p. 227), por Feduchi y cols., 2020, Panamericana.

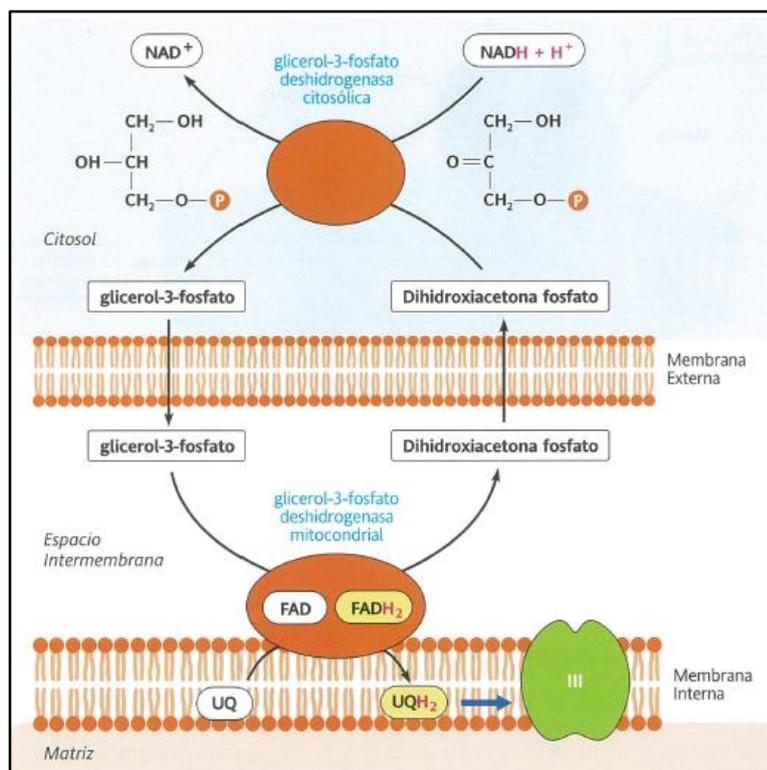
En condiciones aeróbicas, los equivalentes de reducción del  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , que se generan en el citosol a partir de la glicólisis, son translocados al interior de las mitocondrias para reoxidar el NADH, lo cual permite que la vía pueda proseguir, y también, ceder dichos equivalentes a la cadena de transporte electrónico para obtener energía en forma de ATP

(fosforilación oxidativa). La impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna al  $\text{NADH}$  exige que la translocación de equivalentes de reducción desde el citosol a la cadena de transporte electrónico sea llevada a cabo por sistemas conmutadores localizados en la membrana interna de las mitocondrias. Existen dos sistemas de translocación principales: la lanzadera del glicerol-fosfato, abundante en músculo esquelético y cerebro, y la lanzadera de malato-aspartato, muy activo en hígado, riñón y corazón.

En la lanzadera del glicerol-fosfato (figura 3.6), participa un intermediario de la vía glicolítica, la dihidroxiacetona fosfato. Este intermediario metabólico recibe los equivalentes de reducción desde el  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , y se transforma en glicerol-3-fosfato, que ingresa al espacio intermembrana mitocondrial. Allí, es oxidado por la acción de una enzima que utiliza  $\text{FADH}_2$  como cofactor. Posteriormente, el  $\text{FADH}_2$ , cederá equivalentes de reducción a la cadena respiratoria.

**Figura 3.6.**

Lanzadera del glicerol-fosfato.

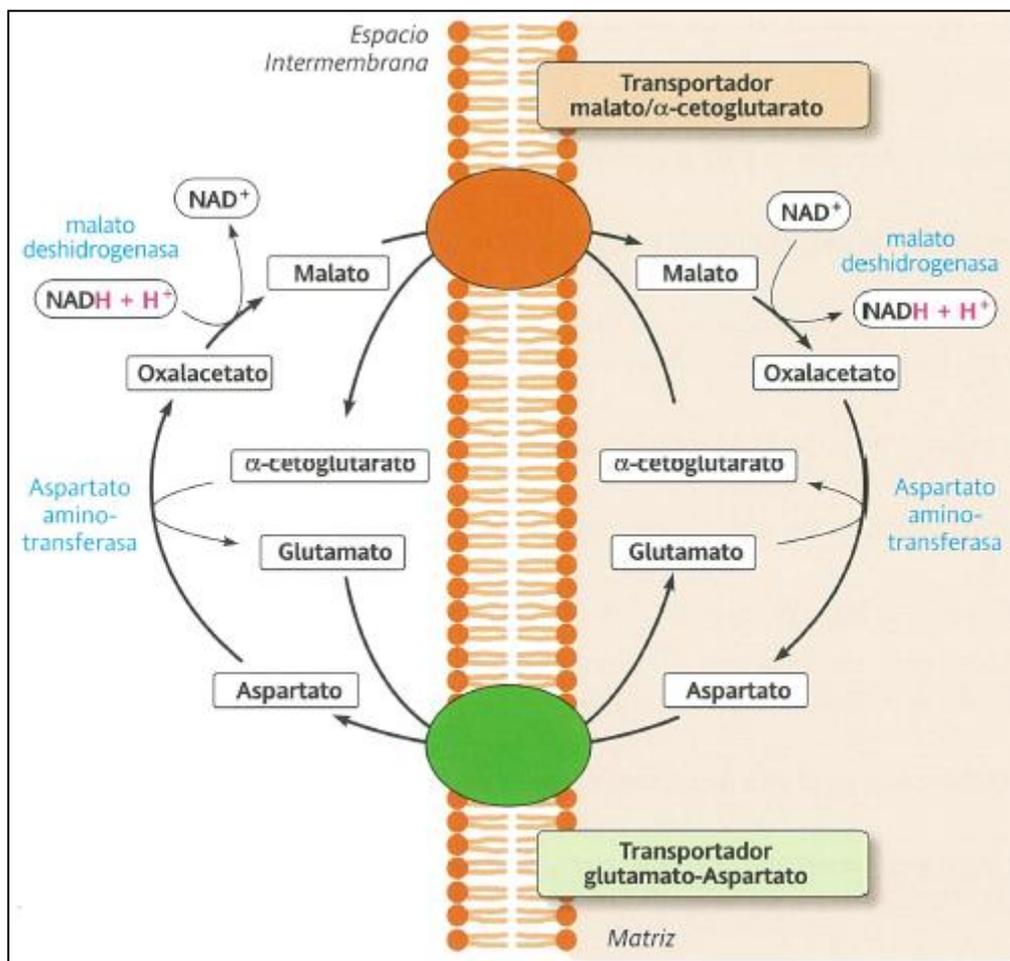


*Nota.* Tomado de Bioquímica. Conceptos esenciales (p. 250), por Feduchi y cols., 2020, Panamericana.

La lanzadera de malato aspartato es más compleja que la del glicerol-fosfato (figura 3.7). En este caso, ocurre un intercambio de aminoácidos e intermediarios del ciclo de Krebs entre el citoplasma y la mitocondria, con una transferencia neta de los equivalentes de reducción del  $\text{NADH} + \text{H}^+$  citosólico a una molécula de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  mitocondrial.

Figura 3.7.

Lanzadera de malato-aspartato.



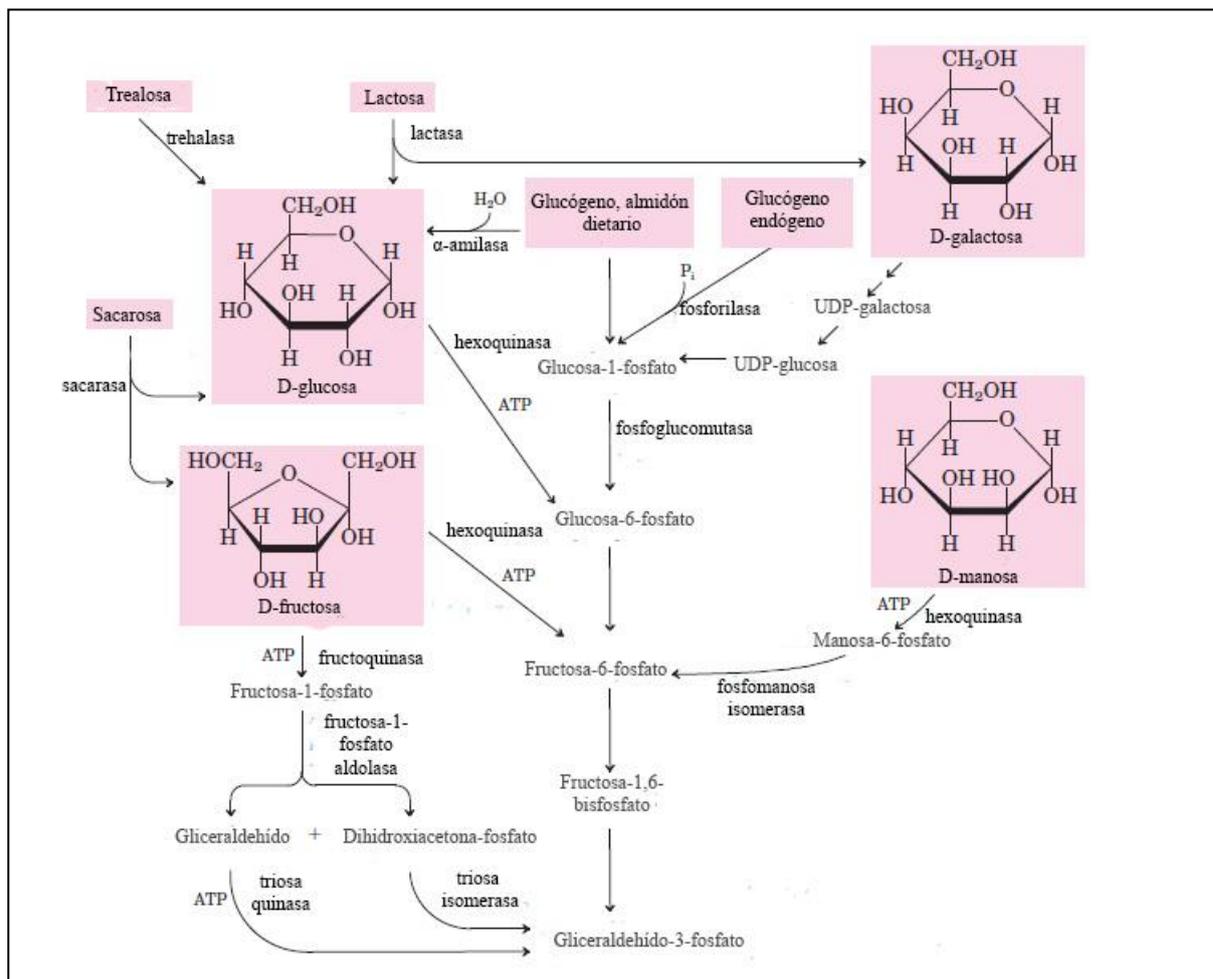
Nota. Adaptado de Bioquímica. Conceptos esenciales, por Feduchi y cols. (p. 251), 2020, Panamericana.

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

Además de la glucosa, otros carbohidratos se incorporan en último término a la vía glicolítica para experimentar degradación que rinde energía. Entre ellos, es posible mencionar: fructosa, galactosa, trehalosa y manosa. Para la incorporación de estos monosacáridos a la glicólisis, intervienen diferentes enzimas que catalizan reacciones en las que se forman intermediarios de esta vía metabólica (figura 3.8). Así, a partir de fructosa se genera fructosa-6-fosfato (músculo) o gliceraldehído-3-fosfato (hígado); galactosa se incorpora a la vía glicolítica como glucosa-1-fosfato, mientras que trehalosa y manosa, lo realizan como glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato, respectivamente.

Figura 3.8.

Incorporación de distintos monosacáridos a la vía glicolítica.



Nota. Adaptado de Lehninger. Principios de Bioquímica, por Nelson & Cox (p. 543), 2018, Omega.

### 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 modula negativamente 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 (sólo en hígado) y es

reducida por ATP, NADH+H<sup>+</sup>, 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 enzima piruvato quinasa. Esta enzima posee como modulador positivo a la fructosa-1,6- bisfosfato, mientras que ATP, ácidos grasos y acetil-CoA actúan como moduladores negativos.

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 de dos moles de ATP por cada mol de glucosa oxidada en la vía.

**Tabla 3.2.**

*Rendimiento energético de la vía glicolítica*

Gasto de ATP (mol de glucosa metabolizada)		
Glucosa	→	Glucosa-6-P - 1 mol ATP
Fructosa-6-P	→	Fructosa-1,6-bisP - 1 mol ATP
Producción de ATP (mol de glucosa)		
1,3-Bisfosfoglicerato	→	3-fosfoglicerato 2 mol ATP
Fosfoenolpiruvato	→	Piruvato 2 mol ATP
Balance Total		2 mol de ATP

### DESCARBOXILACIÓN OXIDATIVA DEL PIRUVATO

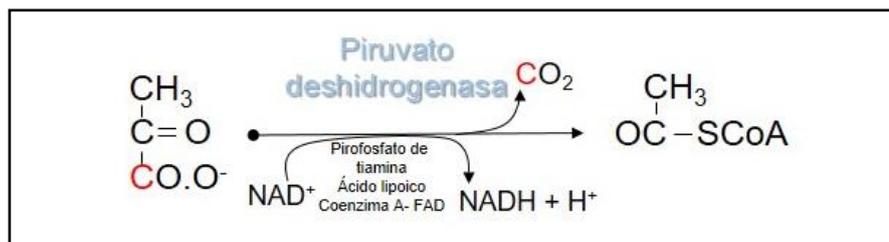
El piruvato obtenido en la vía glicolítica en el citosol, en condiciones aeróbicas ingresa a la matriz mitocondrial a través de un transportador de la membrana interna de estas organelas, donde será metabolizado a acetil-CoA por el complejo multienzimático denominado piruvato deshidrogenasa (figura 3.9). 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+H<sup>+</sup> generado en esta reacción, transfiere los electrones a la cadena respiratoria donde se reducen el oxígeno para formar agua. Acoplado a este proceso, se obtienen 3 moles de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, mediante fosforilación oxidativa.

**Figura 3.9.**

*Reacción de descarboxilación del piruvato para la síntesis de acetyl-coenzima A.*



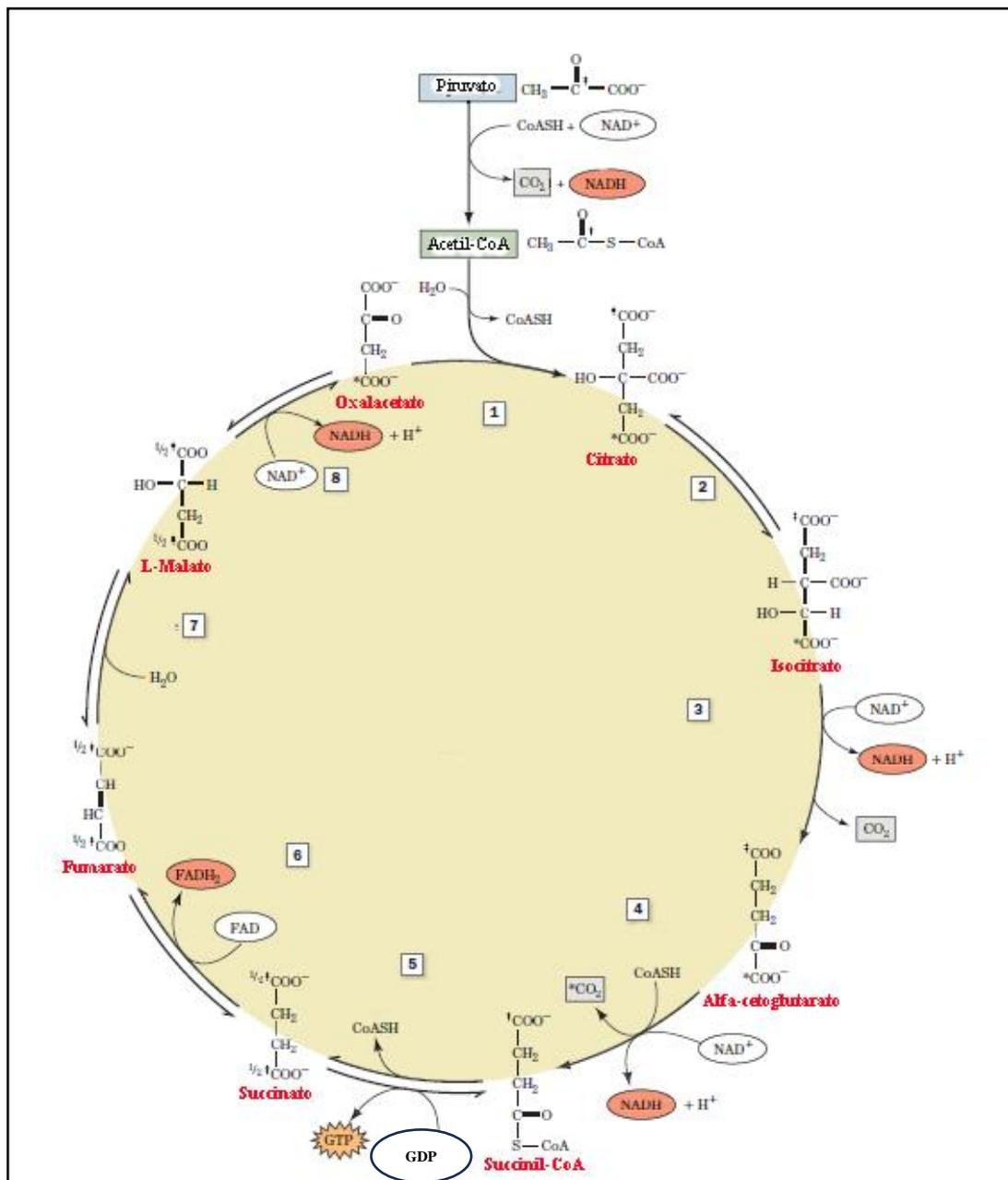
## CICLO DE KREBS

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 acetyl-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 (figura 3.10), el acetyl-CoA que ingresa, se degrada hasta  $\text{CO}_2$ . A partir de estas reacciones enzimáticas se generan coenzimas reducidas cuyos equivalentes de reducción son cedidos a la cadena respiratoria a nivel de los complejos I ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ ) o II ( $\text{FADH}_2$ ), con la consecuente síntesis de ATP (fosforilación oxidativa) y  $\text{H}_2\text{O}$ .

Figura 3.10.

Reacciones enzimáticas implicadas en el ciclo de Krebs.



Nota. Los números designan las enzimas que catalizan las respectivas reacciones: 1= Citrato Sintasa; 2= Aconitasa; 3= Isocitrato deshidrogenasa; 4= Alfa-cetoglutarato deshidrogenasa; 5= Succinato tioquinasa; 6= Succinato deshidrogenasa; 7= Fumarasa; 8= Malato deshidrogenasa. Adaptado de Fundamentos de bioquímica. La vida a nivel molecular (p. 553), por Voet y cols., 2016, John Wiley & Sons.

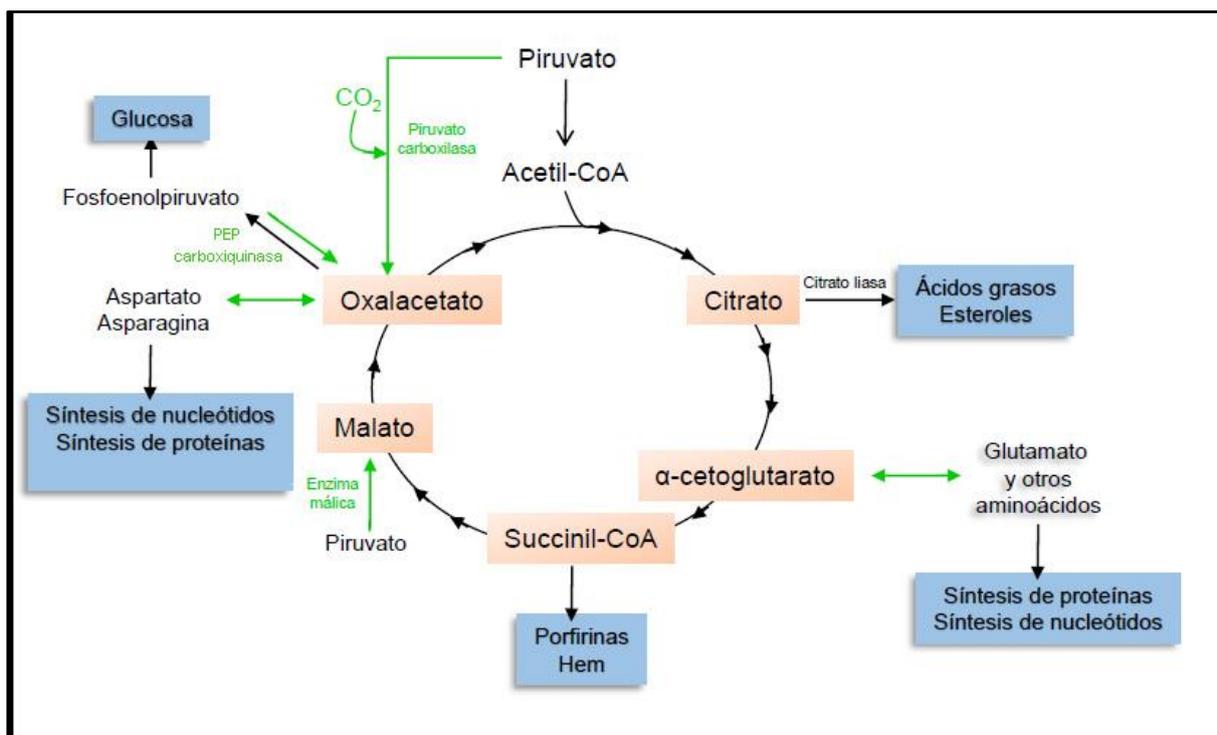
### Función anfibólica del ciclo de Krebs

Si bien el ciclo de Krebs es una vía catabólica donde se oxida acetil- CoA hasta  $\text{CO}_2$ , 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 (figura 3.11). 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 3.11.**

*Funciones anfibólicas del ciclo de Krebs.*



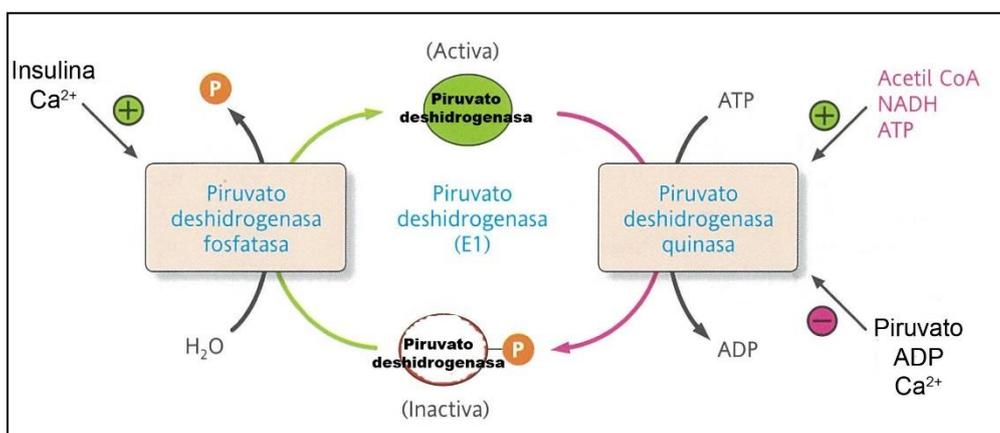
*Nota.* Algunos intermediarios del ciclo de Krebs (indicados en naranja) pueden cumplir la función de precursores de compuestos de diferentes rutas biosintéticas, indicados en color azul. Por otro lado, intermediarios de este ciclo metabólico pueden ser repuestos a través de reacciones anapleróticas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

### Regulación del ciclo de Krebs

El ciclo de Krebs es modulado indirectamente por el complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa, ya que gracias a su actividad, se sintetiza acetil-CoA que ingresa al ciclo. La piruvato deshidrogenasa es regulada por modificación covalente (fosforilación reversible) y por moduladores alostéricos (figura 3.12). En este sentido, ATP, acetil-CoA y NADH actúan como moduladores negativos, mientras que el complejo es estimulado por insulina y el  $\text{Ca}^{2+}$  (este último aumenta en el ejercicio muscular intenso y estimula a una fosfatasa que actúa sobre la piruvato deshidrogenasa).

**Figura 3.12.**

*Regulación del complejo de la piruvato deshidrogenasa.*

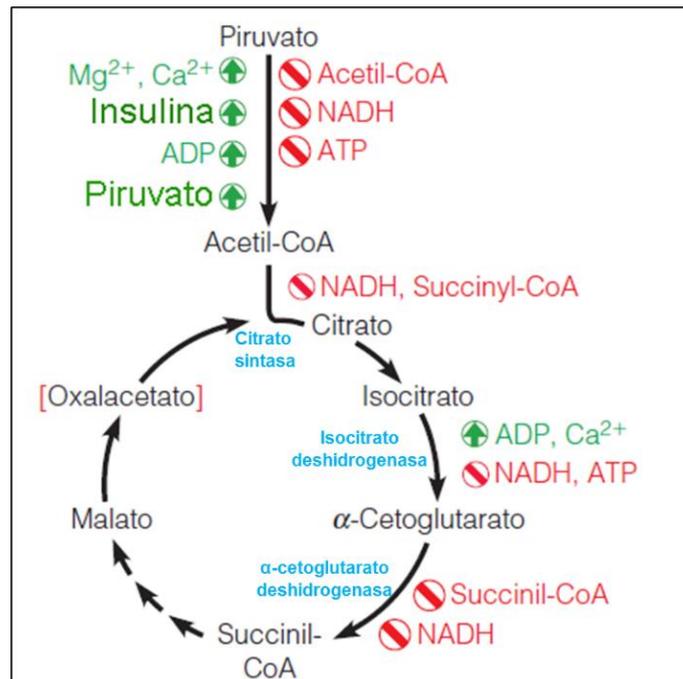


*Nota.* Modificado de Bioquímica. Conceptos esenciales (p. 229), por Feduchi y cols., 2020, Panamericana.

La modulación directa del ciclo de Krebs se lleva a cabo mediante regulación alostérica de tres enzimas (figura 3.13):

- Citrato sintasa, modulada negativamente por el ATP (aumenta el valor de la  $K_m$  de la enzima).
- Isocitrato deshidrogenasa. Activada por ADP, mientras que NADH y ATP actúan como moduladores negativos.
- Alfa-cetoglutarato deshidrogenasa, enzima regulada de forma análoga al complejo piruvato deshidrogenasa.

**Figura 3.13.**  
Regulación del ciclo de Krebs.



Nota. El ciclo de Krebs es regulado indirectamente por la disponibilidad de sustrato (piruvato) y directamente, a través de la modulación alostérica de las enzimas citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa. Modificado de Biochemistry: Concepts and Connections, por Appling y cols. (p. 465), 2016, Global edition.

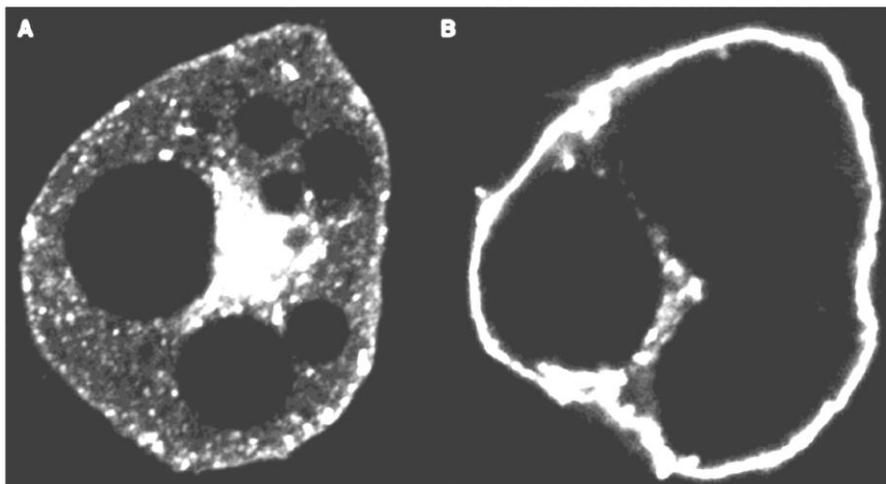
## PROBLEMAS DE APLICACIÓN

1) El gen del SGLT-1 se denomina SLC5-A1 y fue aislado a partir de librerías de ADNc de intestino delgado de conejo. Su transcrito es una proteína de 664 aminoácidos y 73KDa con una estructura secundaria formada por 14  $\alpha$ -hélices cuyos extremos amino y carboxilo terminales se encuentran en el espacio extracelular. En el ser humano este transportador se expresa primariamente a nivel del íleon.

Considerando el mecanismo de absorción de monosacáridos, responda:

- ¿Cómo actúa el transportador SGLT-1 y la absorción de qué monosacáridos permite?
- ¿Qué otros transportadores de monosacáridos conocen y en qué células/tejidos humanos predominan?

2) La siguiente imagen corresponde a micrografías por fluorescencia con anticuerpos contra un transportador de monosacáridos de un adipocito antes (A) y después (B) de la estimulación con insulina.



- Describa el comportamiento del transportador de monosacáridos cuando el adipocito es estimulado con insulina y cuál es la consecuencia de dicho comportamiento.
- ¿En qué situaciones fisiológicas ocurriría este comportamiento?

3) Se incubó un cultivo primario de células hepáticas con glucosa marcada en el  $^{14}\text{C}$ 1 con las enzimas glucolíticas y los cofactores y sustratos necesarios. ¿Cuál es la distribución de  $^{14}\text{C}$  en el piruvato? Realice el mismo seguimiento con glucosa marcada en C2, C3, C4, C5 y C6.

4) 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.

COLUMNA A	COLUMNA B (glucosa g/l)
1- Nada (testigo)	0,75
2- $\text{AsO}_4^{3-}$	0,20
3- NaF	0,20
4- $\text{AsO}_4^{3-} + \text{PO}_4^{3-}$	0,75
5- Citrato	0,75
6- Iodoacetato	0,10

4) 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  $^{14}\text{C}$  en forma uniforme, en un medio anaeróbico con azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) a pH= 5 y a  $30^\circ\text{C}$ . 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:

t (min)	% de radiactividad	
	Tubo A	Tubo B
0	100	100
60	98	65

a) ¿Qué explicación encuentra para estos resultados?

b) Construya una tabla con los valores teóricos de porcentaje de radiactividad que esperaría encontrar si el experimento se realizara en idénticas condiciones, pero con 1-  $^{14}\text{C}$  glucosa.

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

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

6) ¿Cuál es el rendimiento en ATP cuando cada uno de los siguientes sustratos es oxidado completamente a CO<sub>2</sub> 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

## GUÍA DE ESTUDIO

### Metabolismo de carbohidratos- Digestión y Absorción

- Digestión de carbohidratos: principales formas de consumos de carbohidratos, órganos y enzimas digestivas implicadas.
- Absorción de monosacáridos en el tracto digestivo. Mecanismos de absorción.
- Difusión facilitada: entrada de glucosa a las células del tejido muscular, adiposo, hígado, eritrocitos, cerebro. Familia de transportadores de glucosa.

### Vía glicolítica

- Esquema con ecuaciones 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 (isoenzimas I, II y III) y de la glucoquinasa (isoenzima IV). Diferencia en la afinidad por la glucosa (valores de Km y Vm). Estudio o análisis de cada una de las reacciones.
- Acción de inhibidores: iodoacetato, fluoruro, arseniato.
- De acuerdo a las necesidades metabólicas y energéticas de célula ¿Cuál es el destino de la glucosa-6-fosfato?
- Producto final de la glicólisis anaeróbica (en levaduras y músculo en contracción vigorosa), y en aerobiosis. Efecto Pasteur. Rendimiento energético.
- Importancia de la regeneración de NAD<sup>+</sup> en la reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa. Lanzadera del glicerol-fosfato.
- Balance energético de la glicólisis anaeróbica.

### Destino del piruvato

- Descarboxilación oxidativa del piruvato: complejo de la piruvato deshidrogenasa y regulación de la misma.

### 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?

### BIBLIOGRAFÍA

- Appling, D. R.; Anthony-Cahill, S. J. & Mathews, C. K. (2016). Biochemistry: Concepts and Connections, Global edition, 2<sup>nd</sup> Edition. Ed. Pearson.
- Blanco, A. & Blanco, G. (2011). Química Biológica. Ed. El Ateneo.
- Feduchi, E., Romero Magdalena, C., Yáñez, E. & García Hoz Jiménez, C. (2020). Bioquímica. Conceptos esenciales. Ed. Panamericana.
- Harvey, R. A. & Ferrier, D. R. (2011). Biochemistry (Lippincott Illustrated Reviews Series). Biochemistry (Lippincott Illustrated Reviews Series), 40, 30888.
- Nelson, D. & Cox, M. (2018). Lehninger. Principios de Bioquímica. 7<sup>o</sup> Edición. Ed. Omega.
- Voet, D., Voet, J G. & Pratt, C. W. (2016). Fundamentos de Bioquímica -4<sup>o</sup> Edición: La Vida a Nivel Molecular. Ed. Artmed.

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

### Objetivos de aprendizaje

- Comprobar experimentalmente el mecanismo de adaptación del metabolismo de glucosa a las condiciones ambientales, a partir de la determinación del consumo de este carbohidrato.
- Demostrar la producción de productos de la fermentación alcohólica, utilizando una técnica de microdifusión.

### 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.

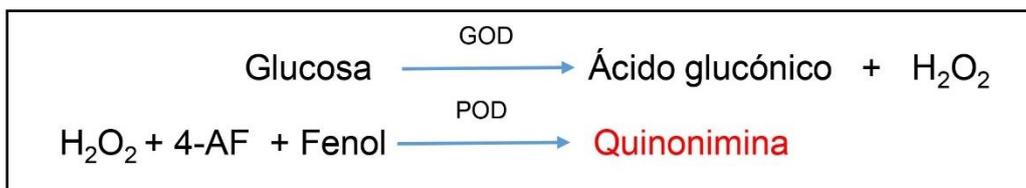
Luego de la incubación determinaremos la concentración de glucosa y la presencia de etanol. Para ello, se tomará una alícuota de 5 ml del cultivo realizado en aerobiosis o anaerobiosis, previamente centrifugado, para evitar interferencias por sustancias en suspensión.

### 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. Enfriar la solución y 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.

### Cálculo 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 corregida de la muestra x f*

$$f = \frac{1,00 \text{ (g/L)}}{\text{Absorbancia corregida estándar}}$$

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

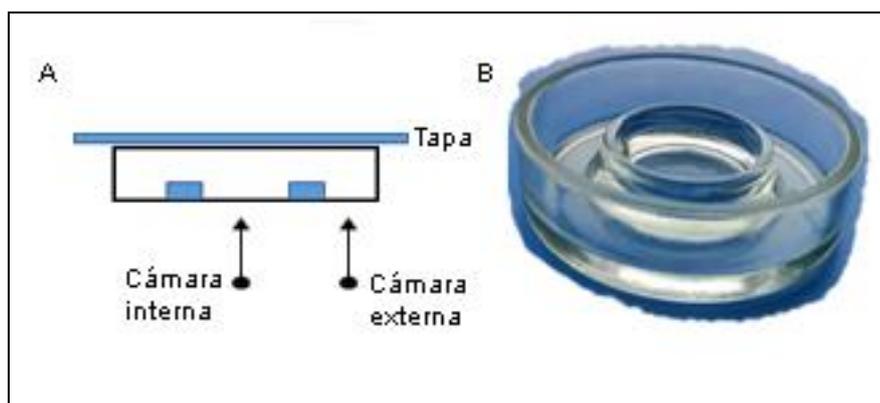
*S. cereviceae* es un microorganismo facultativo, que, en condiciones de cultivo anaeróbicas, metaboliza la glucosa por fermentación alcohólica. A continuación, un esquema de las reacciones metabólicas que ocurren en este caso:



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 el cual se fundamenta en una reacción de óxido-reducción (ver más abajo). Para el método de microdifusión se utilizan las denominadas celdas de Conway (figura 1), que constan de una cámara central y otra externa.

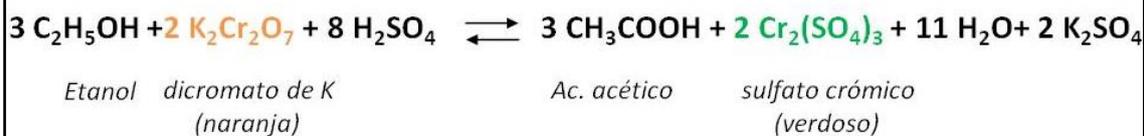
### Figura 1.

*Celda de Conway para microdifusión.*



*Nota.* A. Esquema de un corte transversal de una celda de Conway con su tapa, en el que se indica la disposición de las cámaras interna y externa, respectivamente. B. Foto de una celda de Conway.

En la cámara central de la celda, 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 los 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 <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (ml)	0,7	0,7	0,7
Externa	Solución saturada K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (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:

	<b>Medio de cultivo inicial</b>	<b>Sobrenadante cultivo en aerobiosis</b>	<b>Sobrenadante cultivo en anaerobiosis</b>
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. VÍA DE LAS PENTOSAS FOSFATO. METABOLISMO DEL GLUCÓGENO. GLUCONEOGÉNESIS

### Objetivos de aprendizaje

- Conocer las reacciones enzimáticas implicadas en la síntesis y degradación de glucógeno, así como también los tejidos en los cuales se llevan a cabo.
- Identificar las situaciones fisiológicas en las que ocurren la glucogenólisis y la glucogenogénesis y conocer la regulación recíproca entre ambas vías metabólicas.
- Conocer las reacciones enzimáticas de la gluconeogénesis, las situaciones fisiológicas en las que se activa y su regulación.
- Diferenciar las fases de la vía de las pentosas fosfato y los tejidos en los que ocurren.
- Conocer la regulación de la vía de las pentosas fosfato y las situaciones fisiológicas que requieren sus productos finales.

### METABOLISMO DE GLUCÓGENO

#### Introducción teórica

De todos los polisacáridos naturales, el humano es capaz de digerir almidón y glucógeno. El glucógeno es similar a la amilopectina del almidón, aunque más ramificado, y constituye la reserva energética de los organismos animales. En el hígado, el glucógeno constituye el depósito de glucosa, y durante su degradación secuencial, se libera glucosa hacia la circulación general para su distribución a otros tejidos. Por otra parte, en el músculo, el glucógeno se degrada para proporcionar ATP y permitir la contracción muscular.

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

#### Glucogenogénesis

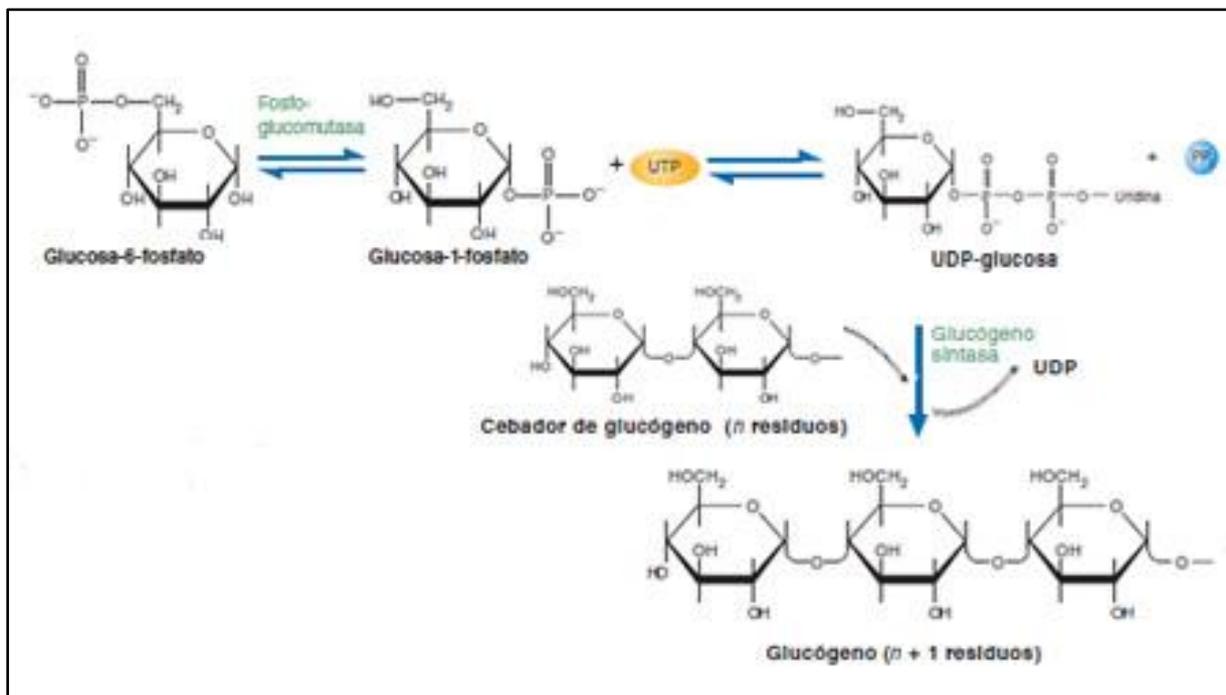
La síntesis de glucógeno se realiza principalmente en hígado y en músculo. Es un proceso anabólico que requiere energía aportada por el ATP y el UTP (uridina trifosfato), y es

regulado a través de la enzima glucógeno sintasa. La glucogenogénesis abarca cinco etapas catalizadas enzimáticamente (figura 4.1 y figura 4.2).

- 1- Primero ocurre la fosforilación de glucosa en el carbono 6 por acción de hexoquinasas.
- 2- Luego, la enzima fosfoglucomutasa cataliza la formación de glucosa-1-fosfato.
- 3- La uridina-difosfato-glucosa pirofosforilasa o glucosa-1-P-uridiltransferasa cataliza la activación de glucosa-1-fosfato a UDP-glucosa (uridina-difosfato-glucosa).
- 4- La glucosa activada es incorporada por acción de la glucógeno sintasa a una molécula de glucógeno preexistente o a la glucogenina (proteína). La unión de la glucosa activada con los residuos ya existentes es de tipo  $\alpha \rightarrow 1,4$ .
- 5- Se generan ramificaciones mediante uniones glicosídica  $\alpha \rightarrow 1,6$  (figura 4.2).

**Figura 4.1.**

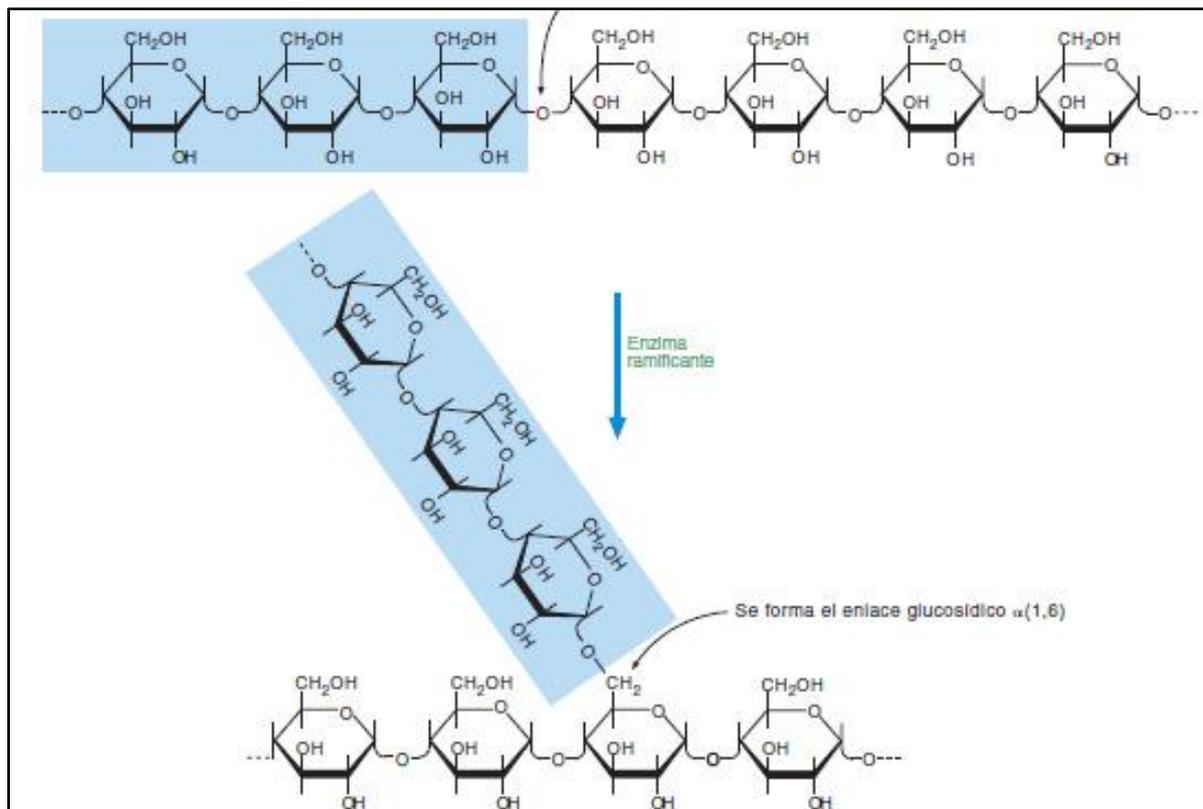
*Etapas de la síntesis de la molécula lineal de glucógeno.*



*Nota.* Modificado de Bioquímica. Las bases moleculares de la vida (p. 287), por Mc Kee & Mc Kee, 2013, Mc. Graw Hill Education.

**Figura 4.2.**

*Formación de ramificaciones en la molécula de glucógeno.*



*Nota.* Modificado de Bioquímica. Las bases moleculares de la vida (p. 287), por Mc Kee & Mc Kee, 2013, Mc. Graw Hill Education.

## Glucogenólisis

La glucogenólisis no es el proceso inverso a la glucogenogénesis, debido a la participación de enzimas diferentes. Las etapas involucradas en esta vía, son las siguientes (figura 4.3):

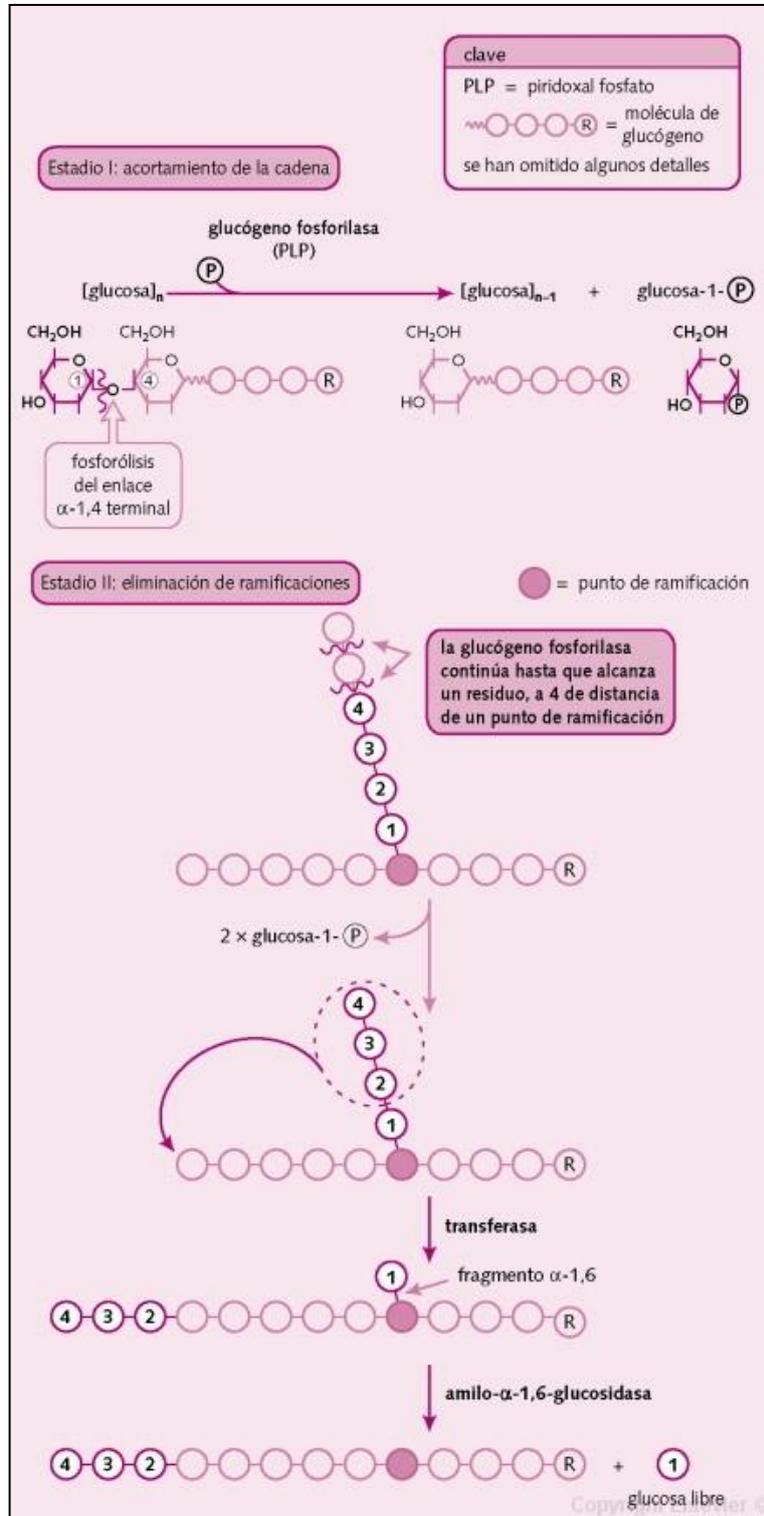
- 1- Liberación de unidades de glucosa-1-fosfato a partir del extremo no reductor de la molécula de glucógeno. Esta reacción es catalizada por la enzima glucógeno fosforilasa, y el fosfato utilizado proviene del fosfato inorgánico del medio. La acción de la enzima se detiene 4 unidades de glucosa antes 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, catalizada por la  $\alpha-1,6$  glicosidasa con liberación de glucosa sin fosforilar.

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

4- Isomerización de glucosa-1-fosfato a glucosa-6-fosfato catalizada por la fosfoglucomutasa.

Figura 4.3.

Etapas de la degradación de glucógeno.



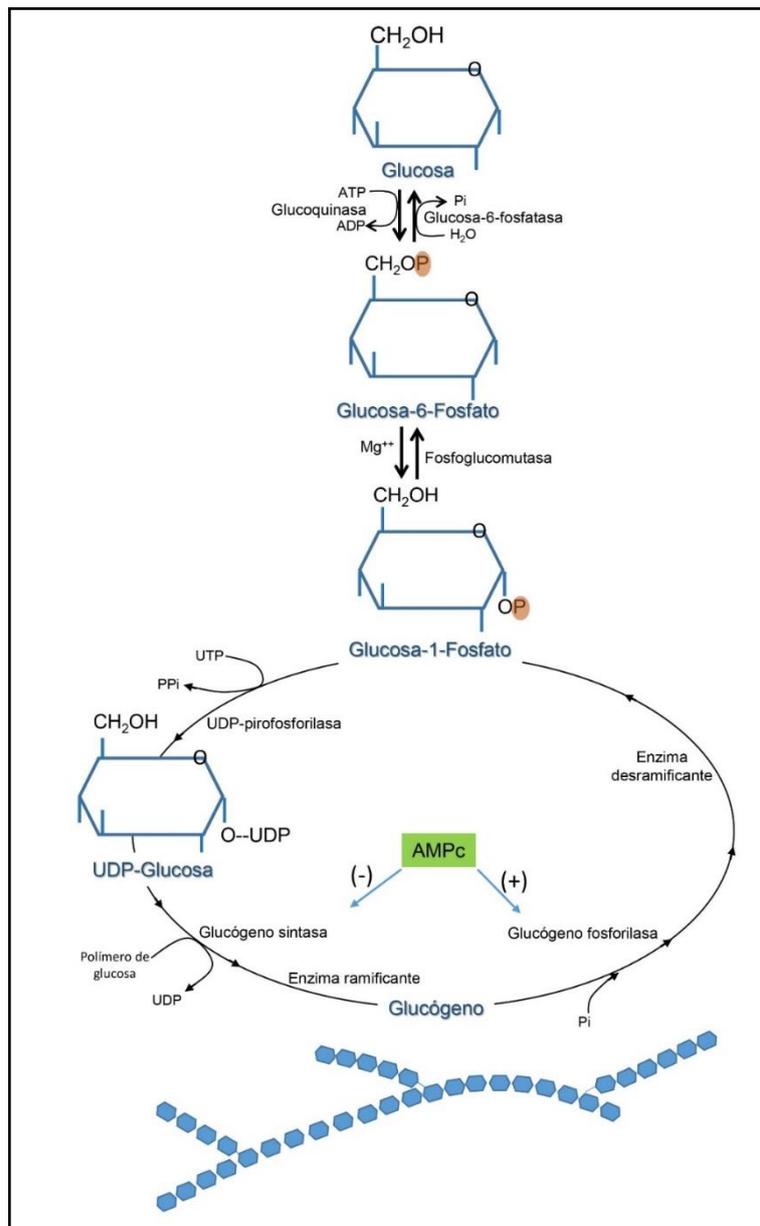
Nota. Tomado de Lo esencial en metabolismo y nutrición, por Lim & Roach (p.33), 2010, Mosby.

## Regulación del metabolismo de glucógeno

El metabolismo de glucógeno es regulado a través de las enzimas glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa. 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 inactiva (figura 4.4 y 4.5).

**Figura 4.4.**

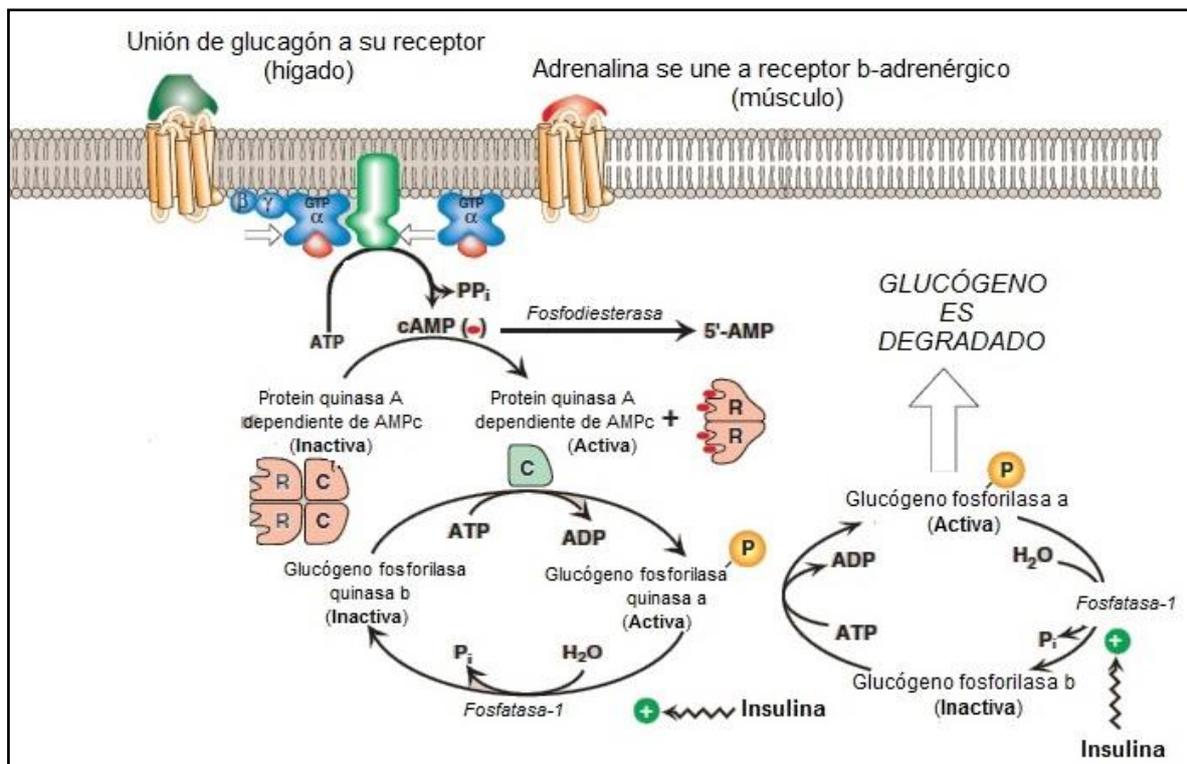
*Regulación recíproca de glucogenólisis y glucogenogénesis en una célula hepática.*



*Nota.* Los signos (-) y (+) indican disminución y activación de la actividad enzimática, respectivamente.

**Figura 4.5.**

*Regulación hormonal de la degradación de glucógeno.*



*Nota.* 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 de Biochemistry (p. 131), por Harvey & Ferrier, 2011, Lippincott Illustrated Reviews Series.

### 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 productos finales principales de esta vía son el NADPH y la 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 metabólica 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

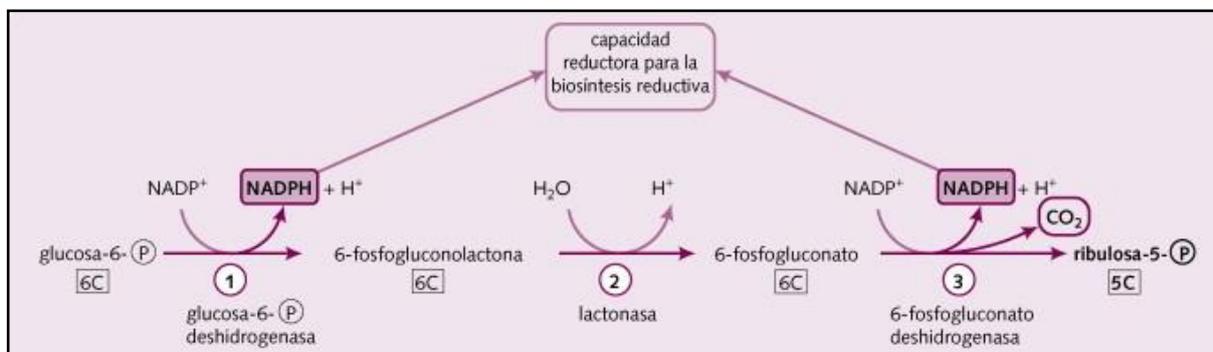
(por ejemplo: gliceraldehído-3-fosfato y fructosa-6-fosfato). Para el estudio y comprensión de las reacciones enzimáticas que tienen lugar en esta vía, se consideran dos fases: fase oxidativa (reacciones irreversibles) y fase no oxidativa (reacciones reversibles).

### Fase Oxidativa:

Esta fase consta de tres reacciones irreversibles (figura 4.6), dando como resultado la formación de ribulosa-5-P,  $\text{CO}_2$ , y dos moléculas de NADPH por molécula de glucosa-6-P que se oxida.

**Figura 4.6.**

*Fase oxidativa de la vía de las pentosas-fosfato.*



*Nota.* 1- Oxidación. 2. Hidrólisis. 3. Descarboxilación oxidativa. Modificado de Lo esencial en metabolismo y nutrición, (p. 45), por Lim & Roach, 2010, Mosby.

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa son dos enzimas que actúan como oxido-reductasas, utilizando como coenzima el  $\text{NADP}^+$  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 NADPH y  $\text{NADP}^+$ , los moduladores positivos y negativos, respectivamente.

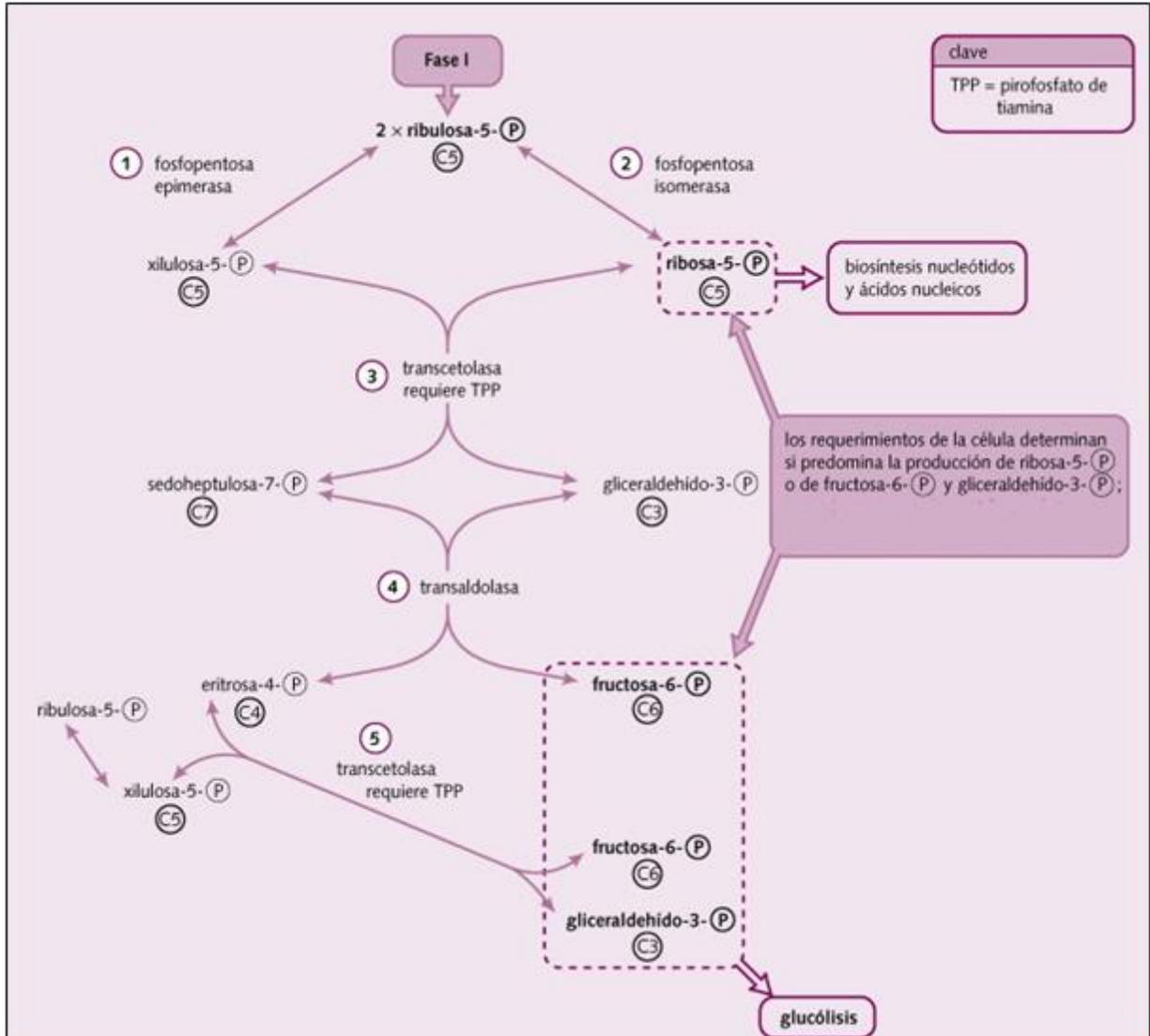
### Fase no oxidativa

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 (figura 4.7). 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.

**Figura 4.7.**

*Esquema de la fase no oxidativa de la vía de las pentosas-fosfato.*



*Nota.* 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 de Lo esencial en metabolismo y nutrición (p. 46), por Lim & Roach, 2010, Mosby.

## GLUCONEOGÉNESIS

### Introducción teórica

La gluconeogénesis es una vía metabólica que ocurre principalmente en el hígado y permite la síntesis de glucosa a partir de precursores no glucídicos, tales como lactato, piruvato, glicerol y ciertos  $\alpha$ -cetoácidos (moléculas que derivan de los aminoácidos). En determinadas situaciones (p. ej., acidosis metabólica o inanición) el riñón puede producir pequeñas cantidades de glucosa. Entre las comidas se mantienen concentraciones sanguíneas adecuadas de glucosa por medio de la hidrólisis del glucógeno hepático. Cuando se agota este glucógeno (por ej., por un ayuno prolongado o por ejercicio vigoroso), la vía de la gluconeogénesis proporciona al organismo la cantidad de glucosa adecuada, ya que órganos como el cerebro, o células como los eritrocitos, dependen exclusivamente de la glucosa como fuente de energía.

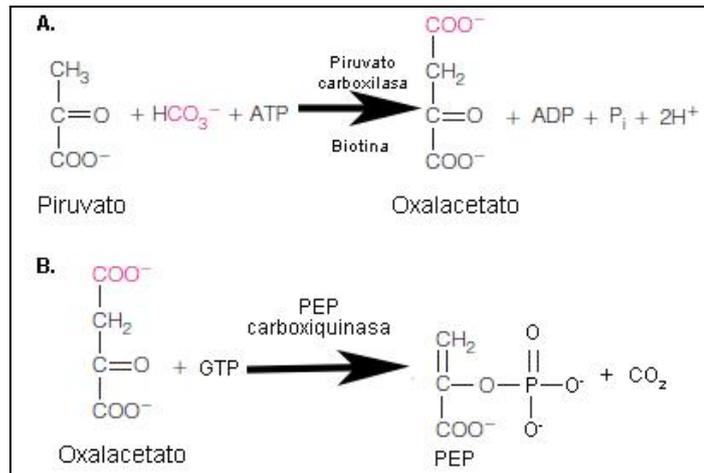
La gluconeogénesis no es simplemente el camino inverso de la glucólisis, pues las reacciones irreversibles, no permiten regresar por el camino inverso. Para evitar estos obstáculos, ocurren reacciones alternativas o de desvío, catalizadas mediante enzimas diferentes. Las tres reacciones de desvío a las que se hace referencia son las siguientes:

- Síntesis de fosfoenolpiruvato (PEP). La síntesis de PEP a partir de piruvato requiere de las enzimas piruvato carboxilasa y PEP carboxiquinasa (figura 4.8). La piruvato carboxilasa es una enzima mitocondrial que cataliza la conversión de piruvato en oxalacetato. Esta enzima utiliza biotina como grupo prostético y ATP, como fuente de energía para la formación del enlace C-C. El oxalacetato se descarboxila y fosforila gracias a la actividad de la PEP carboxiquinasa, reacción impulsada por la hidrólisis de GTP (guanosina trifosfato). En algunas especies, la PEP carboxiquinasa es una enzima mitocondrial, mientras que, en otras, la enzima se localiza en el citoplasma. En los humanos, la actividad de la enzima se encuentra en ambos compartimentos celulares. Debido a que la membrana mitocondrial interna es impermeable al oxalacetato, las células que carecen de PEP carboxiquinasa mitocondrial, transfieren el oxalacetato al citoplasma utilizando un transportador, como el caso de la lanzadera de malato-aspartato. En este proceso, el oxalacetato se convierte en malato por la isoenzima mitocondrial malato deshidrogenasa. Luego del transporte de malato al citoplasma, la isoenzima citoplasmática de la malato deshidrogenasa cataliza la reconversión de malato en oxalacetato (figura 4.9).
- Conversión de fructosa-1,6-bisfosfato en fructosa-6-fosfato. Esta reacción es catalizada por la fructosa-1,6-bisfosfatasa y constituye un desvío a la reacción catalizada por la fosfofructoquinasa (figura 4.10).

- Formación de glucosa a partir de glucosa-6-fosfato. La glucosa-6-fosfatasa, que sólo se encuentra en hígado y riñón cataliza la hidrólisis irreversible de la glucosa-6-fosfato para formar glucosa y fósforo inorgánico (Pi) (figura 4.14).

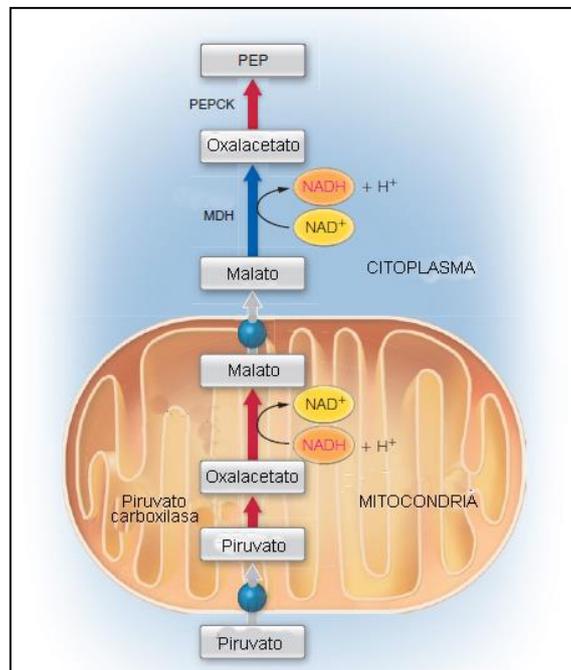
**Figura 4.8.**

*Síntesis de fosfoenolpiruvato (PEP) a partir de piruvato.*



**Figura 4.9.**

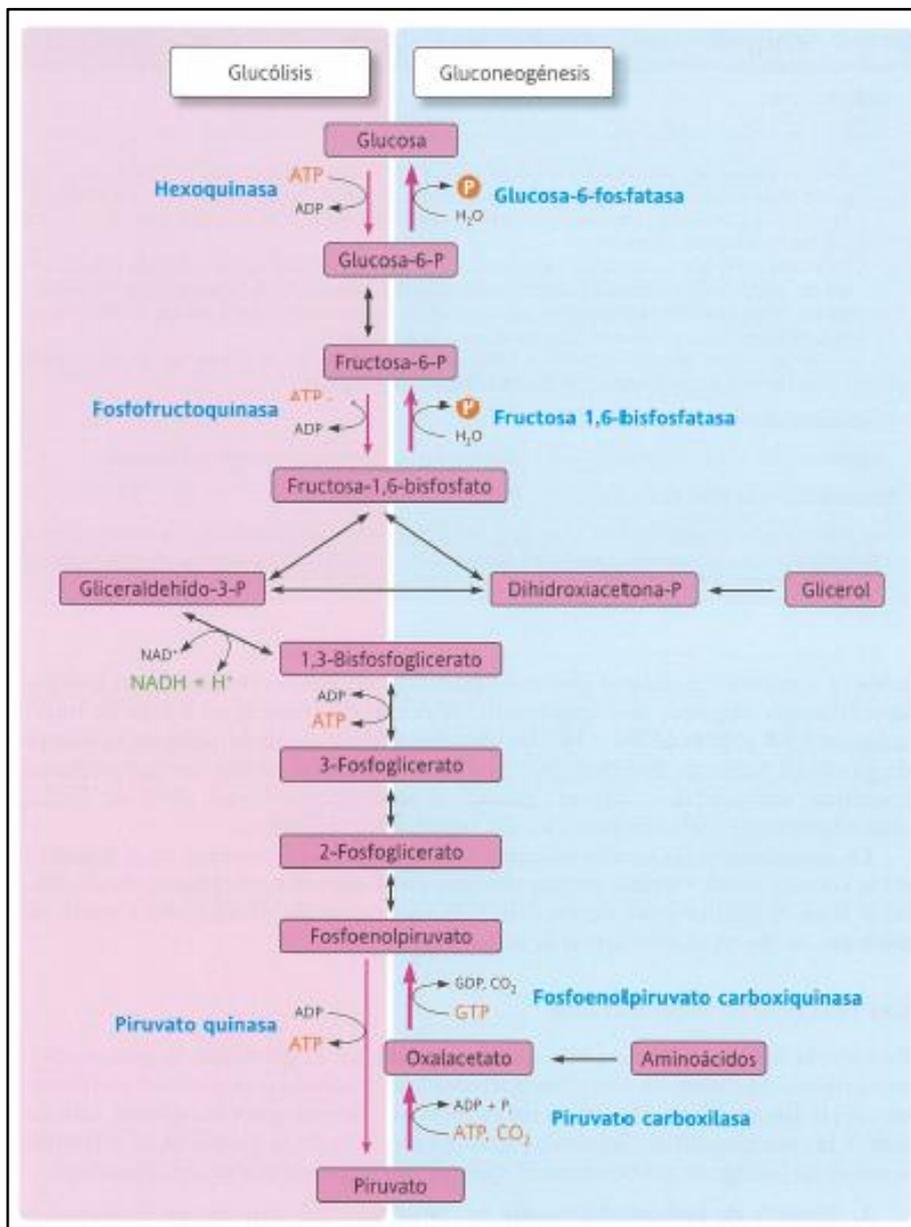
*Síntesis de fosfoenolpiruvato (PEP) a partir de oxalacetato mitocondrial.*



*Nota.* Los óvalos azules indican transportadores de la membrana mitocondrial interna. MDH: malato deshidrogenasa. PEPCK: PEP carboxiquinasa. Modificado de Biochemistry: Concepts and Connections, por Appling y cols. (p. 418), 2016, Global edition Pearson.

**Figura 4.10.**

Comparación de las reacciones enzimáticas implicadas en la vía glicolítica (rosado) y en la gluconeogénesis (azul).



Nota. Tomado de Bioquímica. Conceptos esenciales (p. 224), por Feduchi y cols., 2020, Panamericana.

La gluconeogénesis es una vía anabólica que requiere de energía. Dependiendo del sustrato glucogénico, la hidrólisis de enlaces fosfato de alta energía será:

A partir de piruvato o lactato: 2 piruvato o lactato (3C)	→	Glucosa (6C)
En la reacción catalizada por la Piruvato carboxilasa	→	1 ATP (x 2) = 2 ATP
En la reacción catalizada por la PEP carboxiquinasa	→	1 GTP (x 2) = 2 GTP

---

En la reacción catalizada por la Fosfoglicerato quinasa  $\longrightarrow$  1 ATP (x 2) = 2 ATP

---

Total de enlaces de alta energía hidrolizados= 6

---

A partir de glicerol: 2 Glicerol (3C)  $\longrightarrow$  Glucosa (6C)

En la reacción catalizada por la Glicerol quinasa  $\longrightarrow$  1 ATP (x 2) = 2 ATP

---

**PROBLEMAS DE APLICACIÓN**

1) El valor de  $V_{m\acute{a}x}$  para la enzima glucógeno fosforilasa del músculo esquelético es mucho mayor que el valor de  $V_{m\acute{a}x}$ . de la misma enzima del tejido hepático.

a) ¿Cuál es la función fisiológica de la glucógeno fosforilasa del músculo esquelético y del tejido hepático?

b) Teniendo en cuenta la función de la glucógeno fosforilasa muscular y la hepática ¿Cómo explicaría el mayor valor de la  $V_{m\acute{a}x}$ . de la enzima muscular respecto a la enzima hepática?

2) A continuación se da una lista de enzimas que están ausentes en el catabolismo de hidratos de carbono y una segunda lista de posibles consecuencias de tales efectos. Teniendo en cuenta lo anterior, unir con flechas el efecto que se da ante la ausencia de una determinada enzima.

Enzimas ausentes	Consecuencias
1- Fosfofructoquinasa	A- Incapacidad para utilizar galactosa como fuente de energía, sin ningún efecto sobre la capacidad para utilizar glucógeno.
2- Fosfoglucomutasa	B- Incapacidad para utilizar glucógeno o galactosa como fuente de energía.
3- Triosafosfato isomerasa	C- Capacidad disminuida para obtener energía de los carbohidratos.
4- UDP-Gal-4- epimerasa	D- Evita el uso de la mayor parte de los carbohidratos para la producción de ATP.
5- Glucógeno fosforilasa quinasa	E- Una disminución en el nivel normal del estado estacionario del glucógeno.
6- Glucógeno fosforilasa fosfatasa	F- Incapacidad para utilizar glucógeno como fuente de energía sin ningún efecto sobre la capacidad para utilizar galactosa.

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

a) Cuando las necesidades de  $NADPH + H^+$  son mayores que las de ribosa-5-fosfato.

b) Cuando las necesidades de ribosa-5-fosfato son mayores que las de  $NADPH + H^+$ .

4) 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.

5) 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  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -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

6) La gluconeogénesis es una vía anabólica que permite la síntesis de glucosa a partir de compuestos de naturaleza no glucídica. Considerando los siguientes precursores que pueden ingresar a esta vía, indique y explique cuántos enlaces de alta energía son hidrolizados cuando son transformados en glucosa:

a) Lactato.

b) Glicerol.

7) Se burbujeó  $^{14}\text{CO}_2$  a través de una suspensión de células hepáticas que estaban experimentando gluconeogénesis de lactato a glucosa. ¿Qué carbonos de la molécula de glucosa se volverían radiactivos?

## 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?
- ¿Qué enzima es activada en presencia de adrenalina y qué efecto tiene el producto de la reacción que cataliza?
- ¿Qué acción tiene sobre la glucogenólisis a nivel del hepatocito un aumento de la concentración de glucagón en sangre?
- ¿Qué reacción cataliza y en qué órgano se encuentra la glucosa 6-fosfato fosfatasa?

### Glucogenogénesis

- Reacciones que participan en la síntesis de glucógeno. Regulación hormonal

### 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+H<sup>+</sup>? ¿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?

### Gluconeogénesis

- Reacciones que participan en el proceso de gluconeogénesis. Alternativas de sustratos que son transformados en glucosa a través de esta vía metabólica.
- Relación con otras vías metabólicas.

- Gasto energético diferencial de acuerdo a los precursores que ingresan a la misma.

### Integración de las vías metabólicas de carbohidratos 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	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.				

### BIBLIOGRAFÍA

- Appling, D. R.; Anthony-Cahill, S. J. & Mathews, C. K. (2016). Biochemistry: Concepts and Connections, Global edition, 2<sup>nd</sup> edition. Ed. Pearson.
- Blanco, A. & Blanco, G. (2011). Química Biológica. Ed. El Ateneo.
- Feduchi, E., Romero Magdalena, C., Yáñez, E. & García Hoz Jiménez, C. (2020). Bioquímica. Conceptos esenciales. Ed. Panamericana.
- Nelson, D. & Cox, M. (2018). Lehninger. Principios de Bioquímica. 7ma. Edición. Ed. Omega.

- Lim, M.Y. & Roach, J. (2010). Lo esencial en el metabolismo y nutrición. Ed. Mosby.

## TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 5: METABOLISMO DE LÍPIDOS: BIOSÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

### Objetivos de aprendizaje

- Describir las reacciones enzimáticas que permiten a los organismos utilizar los ácidos grasos como fuente de energía y poder reductor.
- Interrelacionar las vías del metabolismo de lípidos con otras rutas metabólicas.
- Conocer y comparar los mecanismos de regulación del metabolismo de ácidos grasos.

### 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.

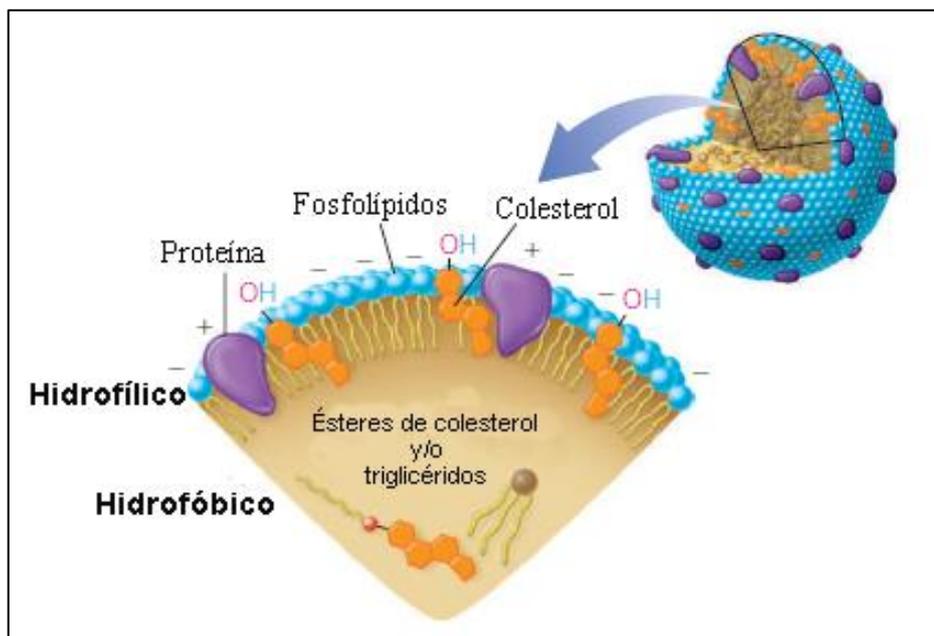
Las grasas producen por oxidación el doble de energía (9 Kcal/g) que los hidratos de carbono o las proteínas (4 Kcal/g), por lo que representan una importante fuente de energía para los individuos.

Los lípidos de la dieta, además de ser una fuente importante de energía, 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).

Debido a la naturaleza hidrofóbica de los lípidos, la mayor parte de los mismos son transportados en la sangre en las lipoproteínas plasmáticas. Las lipoproteínas son grandes complejos formados por lípidos y proteínas. Poseen una estructura con lípidos no polares (colesterol esterificado y triglicéridos) en un centro hidrofóbico rodeado por lípidos anfipáticos (fosfolípidos, colesterol libre) y proteínas (apoproteínas) (figura 5.1).

**Figura 5.1.**

*Estructura general de una lipoproteína plasmática.*



*Nota.* La partícula esférica de lipoproteína tiene un núcleo interno hidrofóbico (amarillo), compuesto por ésteres de colesterol y triglicéridos rodeado por una superficie hidrofílica formada por los grupos de cabeza polar de fosfolípidos y colesterol libre. Las apoproteínas se orientan con sus regiones hidrófobas en el núcleo interno y sus regiones hidrófilas en la superficie. Modificado de Biochemistry: Concepts and Connections (p. 543), por Appling y cols., 2016, Global Edition, Pearson.

Existen diferentes tipos de lipoproteínas, caracterizados por su densidad y por la relación de lípidos y proteínas que las constituyen (tabla 5.1). Las diferencias de densidad permiten su aislamiento fácilmente a través de técnicas de ultracentrifugación o de electroforesis. Los quilomicrones se sintetizan en el intestino y transportan principalmente triglicéridos de la dieta. Los triglicéridos unidos a los quilomicrones 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. Las VLDL se forman en el hígado y transportan triglicéridos sintetizados en este órgano hacia otros tejidos. Las IDL se forman a

partir del catabolismo de las VLDL. Las LDL constituyen el producto final del catabolismo de las VLDL y son ricas en colesterol esterificado. Las HDL son sintetizadas en hígado e intestino, y son responsables de la eliminación del exceso de colesterol de los tejidos periféricos.

**Tabla 5.1.**

*Tipos y composición de las principales lipoproteínas plasmáticas.*

Lipoproteína	Densidad (g/ml)	Lípidos principales	Movilidad electroforética	Apoproteína.
QM	< 0,94	TG exógenos	0	B-48, A-1, IV
VLDL	0,94 -1,006	TG endógenos	Pre- $\beta$	B-100, E, C-I, II, III
IDL	1,006- 1,019	TG y CE	$\beta$	B-100, E
LDL	1,019- 1,063	CE	$\beta$	B-100
HDL	1,063-1,21	FC, C, CE	$\alpha$	A-I, II; CII, D y E

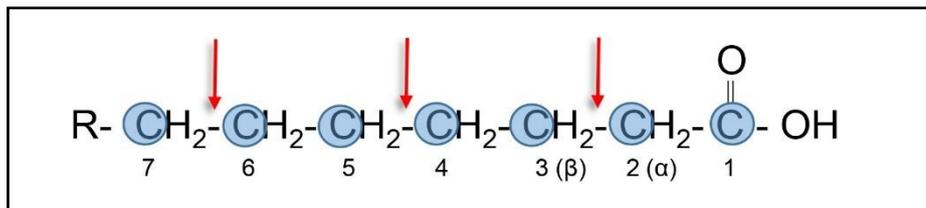
*Nota.* QM: quilomicrón; VLDL: lipoproteína de muy baja densidad; IDL: lipoproteína de densidad intermedia; LDL: lipoproteína de baja densidad; HDL: lipoproteína de alta densidad. TG: triglicéridos; CE: colesterol esterificado; C: colesterol; FC: fosfatidilcolina.

## 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 son 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 CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>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 (figura 5.2) en un proceso denominado  $\beta$ -oxidación.

**Figura 5.2.**

Esquema de un ácido graso.



*Nota.* Se indican los carbonos alfa y beta, respectivamente y los enlaces químicos que sufren ruptura (flechas de color rojo) durante el 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  $CO_2$  y  $H_2O$ . A continuación, se detallan los procesos que conducen a la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos.

### Activación y transporte

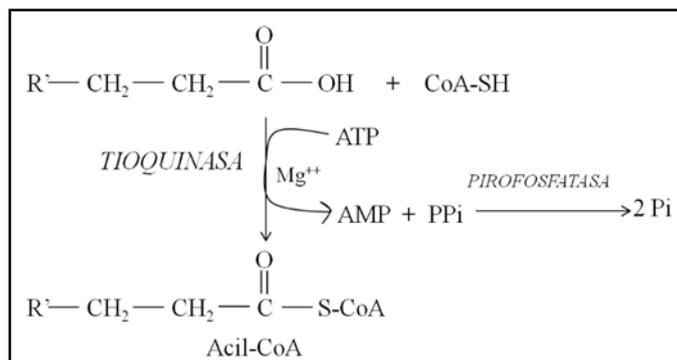
Las moléculas de ácidos grasos, obtenidas por degradación de triglicéridos, son activadas en el citosol por la acción de tioquinasas o acil-CoA sintetasas (fig. 5.3), que catalizan la síntesis de acil-CoA. Existen tres enzimas diferentes siendo cada una de ellas específica para un intervalo de longitud 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 5.3.**

Reacciones involucradas en la activación de ácidos grasos, previo al proceso de  $\beta$ -oxidación.

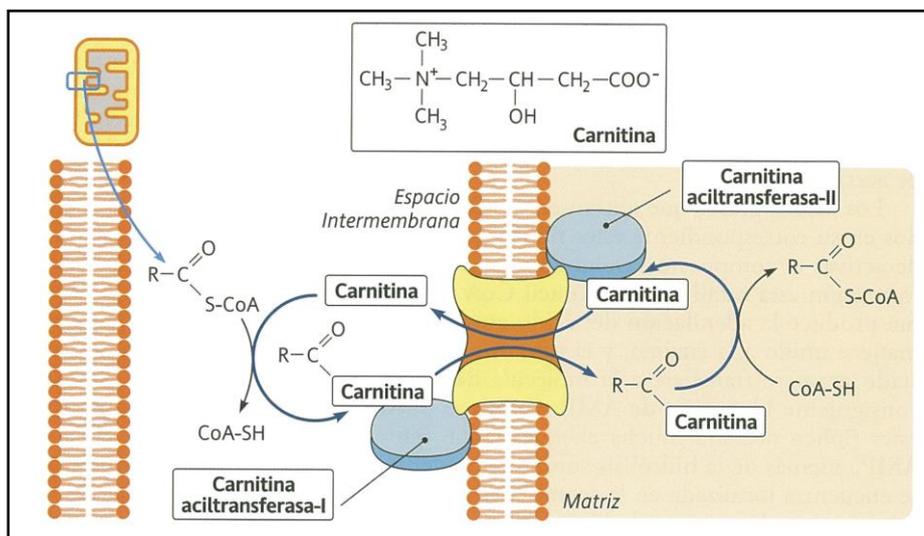


La reacción de activación de ácidos grasos es irreversible, debido a que la hidrólisis del pirofosfato (PPi) asegura que el equilibrio se desplace hacia la formación de acil-CoA. En esta reacción está implicado un intermediario unido a la enzima, que es un anhídrido mixto: acil-AMP o acil adenilato que 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. 5.4) 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 5.4.**

*Sistema de transporte de ácidos grasos "lanzadera de carnitina".*



*Nota.* La lanzadera de carnitina permite el transporte de ácidos grasos desde el citosol hacia la matriz mitocondrial. Tomado de Bioquímica. Conceptos esenciales (p. 264), por Feduchi y cols., 2020. Ed. Panamericana.

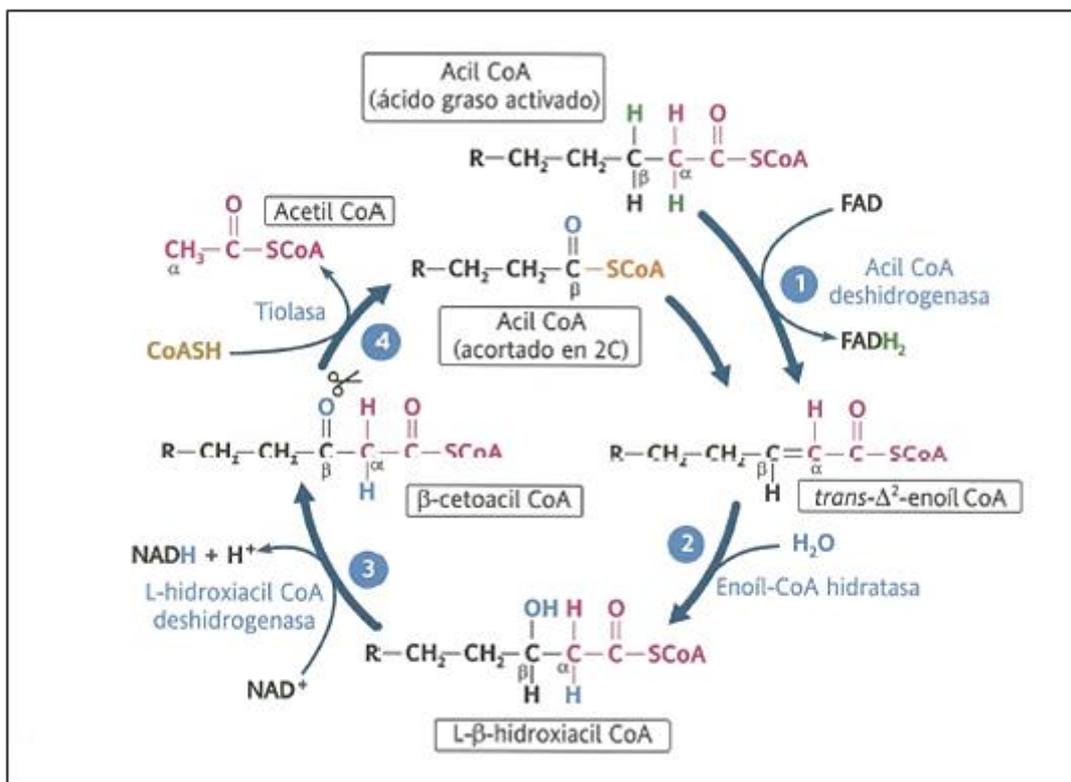
## Oxidación de ácidos grasos saturados

Dentro de la matriz mitocondrial las moléculas de acil-CoA siguen el proceso de  $\beta$ -oxidación (figura 5.5), 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 5.5.**

*Representación esquemática de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos.*



Nota. Tomado de Bioquímica. Conceptos esenciales (p. 264), por Feduchi y cols., 2020, 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 generan equivalentes de reducción, que luego son 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.

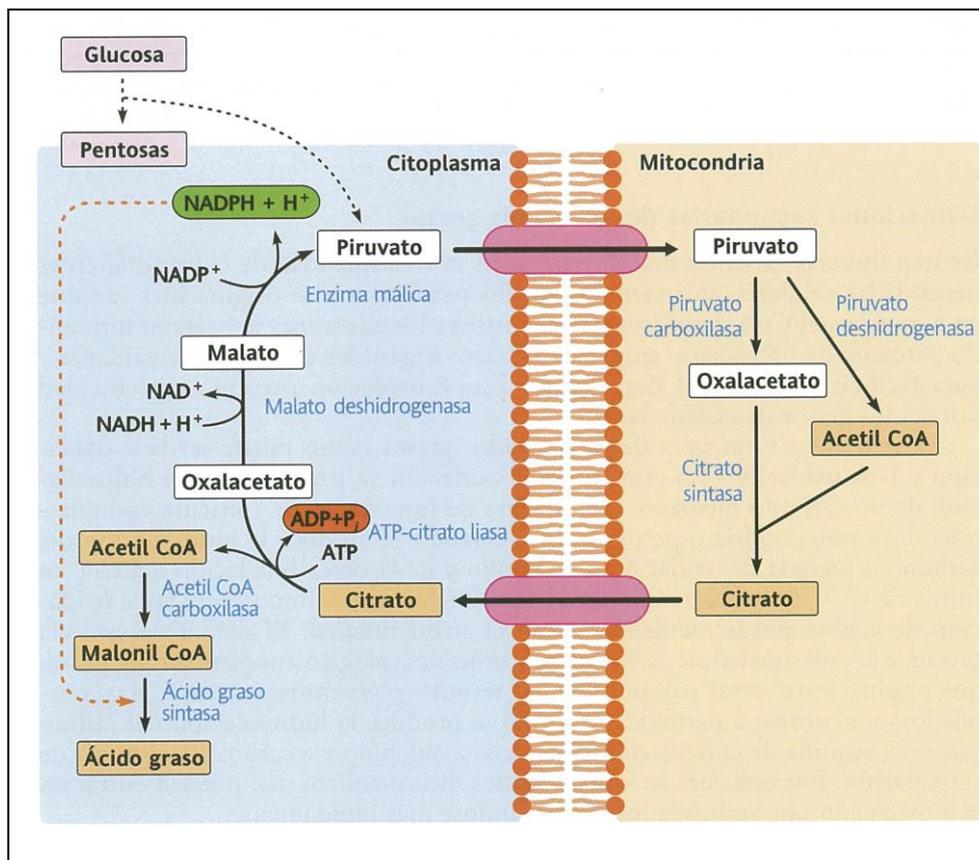
En bacterias como la *E. coli*, las enzimas del complejo se encuentran asociadas alrededor de una molécula central de ACP y se pueden separar conservando su actividad.

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 mismos

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 acilos hacia el citosol ocurre gracias al denominado “ciclo del citrato” (figura 5.6). 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 5.6.**

*Ciclo del citrato. Origen del citrato para la biosíntesis de ácidos grasos.*



*Nota.* Tomado de Bioquímica. Conceptos esenciales (p. 266), por Feduchi y cols., 2020, Panamericana.

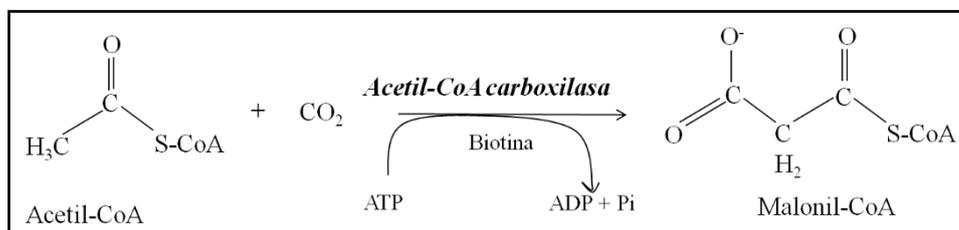
## Formación de malonil-CoA

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  $\text{CO}_2$  (figura 5.7).

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 es también regulada por hormonas y por la dieta.

### Figura 5.7.

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



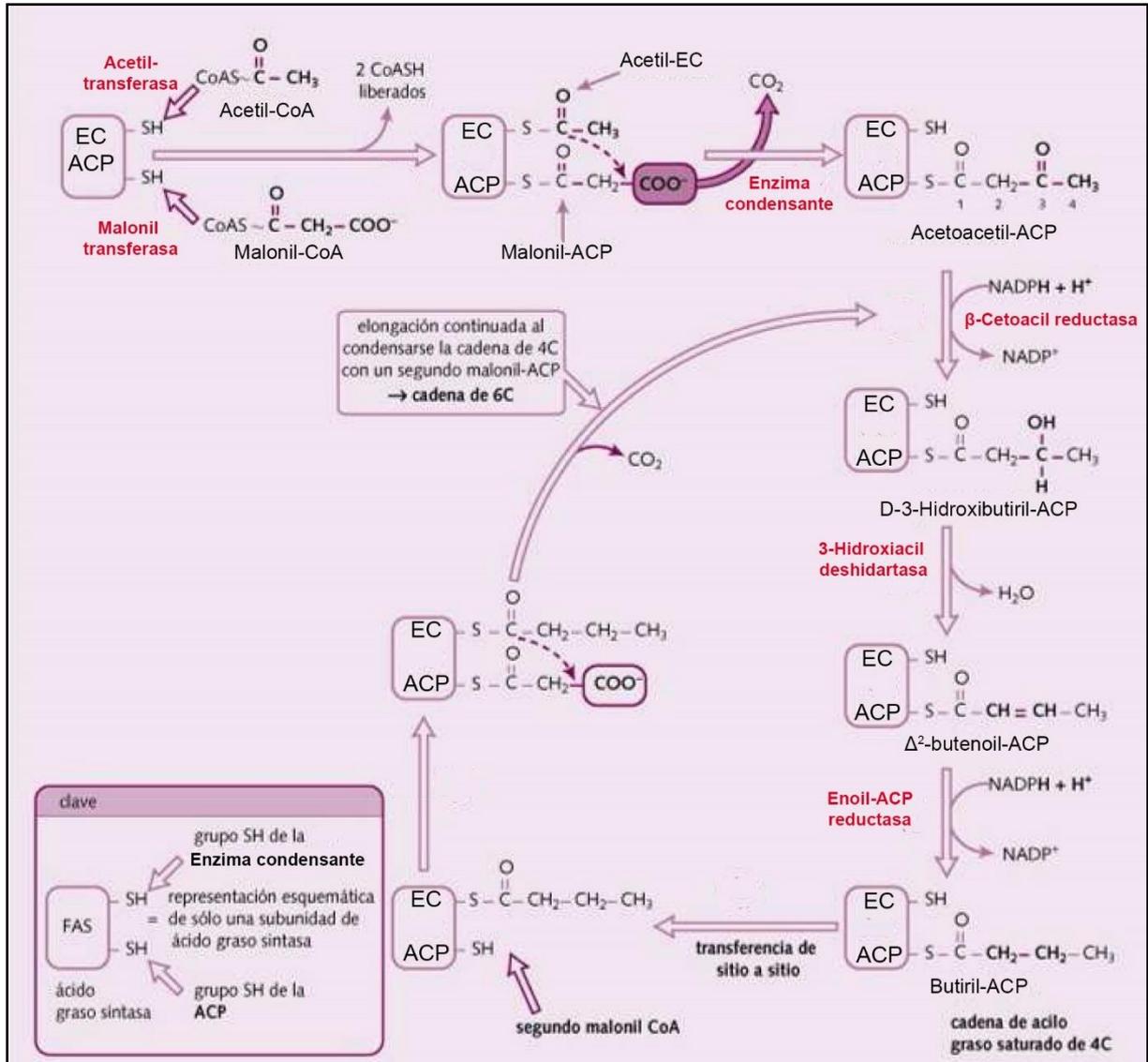
## Reacciones de síntesis de ácidos grasos saturados (palmitato)

La biosíntesis de ácidos grasos es catalizada en el complejo multienzimático denominado ácido graso sintasa. Para el inicio de la síntesis, acetil-CoA se une a la enzima condensante (EC) de la ácido graso sintasa, gracias a la actividad de la acetil-CoA transferasa, mientras que el malonil-CoA se une a la proteína transportadora de acilos (ACP) por la acción de la malonil transferasa (figura 5.8). De esta manera, la ácido graso sintasa se encuentra activada para el primer ciclo de elongación del palmitato. En cada ciclo, los grupos acilos unidos a la EC se condensan con un malonilo cargado en la ACP. El ciclo prosigue a través de cuatro reacciones enzimáticas secuenciales, que consisten en una condensación, una reducción, una deshidratación y una última reducción. El producto del primer ciclo es el butiril-ACP.

En el segundo ciclo, el butiril es transferido desde la ACP a la 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 llevan a cabo una serie de siete ciclos, consumiéndose siete moléculas de ATP (energía metabólica) y catorce de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  (poder reductor).

**Figura 5.8.**

Reacciones implicadas en un ciclo de biosíntesis de ácidos palmítico en organismos superiores y bacterias.



Nota. Modificado desde Benyon, S. "Metabolismo y Nutrición", 2010. Ed. Harcourt Brace.

### Comparación entre la síntesis y la degradación de ácidos grasos

La química de la biosíntesis y la degradación de ácidos grasos es similar. Sin embargo, como se ha descrito en este apartado, las reacciones implicadas en estos procesos difieren en las enzimas involucradas, los compuestos a los cuales se unen los ácidos grasos para su activación, el compartimento celular en el que se llevan adelante, los agentes reductores u oxidantes y la regulación. En la tabla 5.2 se resumen estas diferencias, y se incluyen otros aspectos de importancia.

**Tabla 5.2.**

*Comparación entre la biosíntesis y degradación de ácidos grasos saturados*

	<b>SÍNTESIS</b>	<b>DEGRADACIÓN</b>
<b>Situaciones fisiológicas en las cuales se activa</b>	Tras comidas (Postprandio)	Ayuno y ejercicio prolongado
<b>Principales tejidos implicados</b>	Hígado y tejido adiposo	Músculo e hígado
<b>Compartimento celular</b>	Citosol	Mitocondria
<b>Donante/ productor de 2C</b>	Acetil-CoA/ Malonil-CoA	Acetil-CoA
<b>Compuesto al que se une el ácido graso para su activación</b>	Unido a ACP	Unido a CoA
<b>Enzimas</b>	Complejo multienzimático: ácido graso sintasa	Probablemente no asociadas.
<b>Oxidante / reductor</b>	NADPH + H <sup>+</sup>	NAD <sup>+</sup> y FAD
<b>Control alostérico</b>	Acetil-CoA carboxilasa: (+) citrato; (-) palmitil-CoA	Carnitina-acil-transferasa I: (-) malonil-CoA
<b>Control hormonal</b>	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
<b>Producto final de la vía</b>	Palmitato.	Acetil-CoA

*Nota.* Los signos (+) y (-) indican modulador alostérico positivo y negativo, respectivamente.

## 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 C-15 y C-16 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 oxidar este ácido graso y cuántas moléculas de acetil-CoA se producen?
- ¿Cuántos ATP se generan durante los ciclos de  $\beta$ -oxidación de este ácido graso? 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.

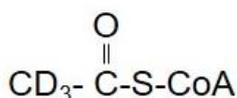
- ¿Cuál sería el efecto de la privación de glúcidos sobre la utilización de grasas para la obtención de energía?
- Si la dieta no contiene glúcidos en absoluto, ¿sería mejor consumir ácidos grasos de cadena par o impar?

### Biosíntesis de ácidos grasos

4) Suponiendo que se incubara 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) ¿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.

6) 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.

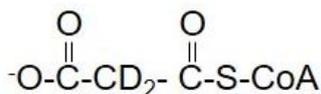


a) Si la molécula de acetil CoA marcada con deuterio (isótopo pesado del hidrógeno) y un exceso de malonil-CoA se añaden como sustrato:

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.

### Metabolismo de lípidos y carbohidratos

7)- Ingerir grandes cantidades de glucosa antes de un maratón podría parecer una buena forma de incrementar las reservas energéticas. Sin embargo, los corredores experimentados no ingieren glucosa antes de correr.

¿Cuál es la razón bioquímica para evitar esta fuente potencial de energía?

(Sugerencia: considere el efecto de la ingesta de glucosa en su nivel de insulina).

## 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?

### **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., Romero Magdalena, C., Yáñez, E. & García Hoz Jiménez, C. (2020). Bioquímica. Conceptos esenciales. Ed. Panamericana.
- Nelson, D. & Cox, M. (2018). Lehninger. Principios de Bioquímica. 7ma. Ed. Ed. Omega.
- Lim, M.Y. & Roach, J. (2010). Lo esencial en el metabolismo y nutrición. Editorial Mosby.

**TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº 4: METABOLISMO DE LÍPIDOS.**  
**Determinación de Triglicéridos – Separación de Macromoléculas por**  
**Electroforesis en Gel de Agarosa: Lipidograma**

**Objetivos de aprendizaje**

- Conocer la composición de las lipoproteínas y analizar el metabolismo de los lípidos que transportan.
- Adquirir destreza en las técnicas para la determinación de triglicéridos por métodos colorimétricos y en la separación de macromoléculas por electroforesis en gel de agarosa o lipidograma.

**Introducción teórica**

Los triglicéridos (TG) son comúnmente llamados grasas neutras, son los lípidos más abundantes en la naturaleza. En los animales representan el material de reserva energética. En los adipocitos, células constituyentes del tejido adiposo, los TG forman gotas citoplasmáticas que pueden llegar a ocupar toda la célula. Como integrantes del panículo adiposo, las grasas cumplen también una función de protección mecánica y de aislamiento térmico.

El movimiento de los ácidos grasos entre los distintos compartimentos del organismo, se produce con gran rapidez en respuesta a diversos estímulos (dieta, actividad física, estrés, edad, etc.). Debido a lo anterior, es de esperar que los TG, uno de los más importantes vehículos para el transporte de los ácidos grasos, varíen también su concentración en respuesta a estos factores fisiológicos. Sin embargo, el equilibrio de estos mecanismos puede verse alterado, conduciendo a niveles anormales de TG circulantes. La persistencia de esta condición, se asocia con numerosas patologías, tales como: enfermedad hepática, renal, hiperlipidemias esenciales, etc.

Un caso que resulta de particular interés es el aumento de TG en individuos obesos, en los cuales tiene importancia pronóstica, respecto a la probabilidad de desarrollar enfermedad cardíaca coronaria. Alrededor del 50 % de los lípidos de las lesiones ateromatosas que ocurren en las arterias coronarias son TG, por lo que es posible relacionar a los TG con la patogénesis de la arteriosclerosis coronaria.

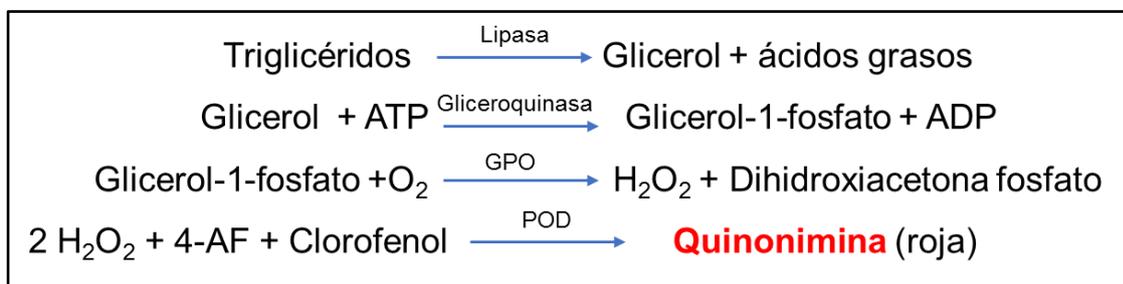
En este TPL se realizará la determinación de la concentración de TG a partir de una muestra humana de plasma o suero, mediante la utilización de un equipo comercial. También, se analizará la distribución de las diferentes lipoproteínas.

## A) Determinación de triglicéridos

Con el objeto de conocer la concentración de TG en una muestra de suero o plasma humano, utilizaremos un equipo comercial, basado en un método enzimático: “TG colorimétrico GPO/ PAP AA” de Wiener lab.

El equipo comercial está constituido por las enzimas lipasa, gliceroquinasa, glicerol fosfato oxidasa (GPO) y peroxidasa (POD), y las soluciones de ATP y 4-aminofenazona (4-AF). El funcionamiento de este equipo comercial se basa en una serie de reacciones acopladas en las que participan los reactivos antes mencionados. Brevemente, los TG de la muestra, por acción de la lipasa son hidrolizados a ácidos grasos libres y glicerol. El glicerol es fosforilado por la actividad de la gliceroquinasa, que utiliza al ATP como dador de grupos fosfato. El glicerol-1-fosfato formado, es oxidado por acción de la GPO. El peróxido de hidrógeno es uno de los productos formados en esta última reacción, en cuya presencia y gracias a la POD, ocurre la unión oxidativa del clorofenol con 4-aminofenazona, dando lugar a la formación de un cromógeno rojo (“quinonimina”). La cantidad de quinonimina formada (con un máximo de absorbancia a 505 nm.) es directamente proporcional a la cantidad de TG presentes en la muestra.

El mencionado fundamento de este equipo comercial, puede resumirse mediante el esquema de las siguientes reacciones enzimáticas acopladas:



## Materiales y métodos

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

- Muestra: Suero o plasma recolectado con 12 a 14 h de ayuno. En el caso del plasma, se utiliza como anticoagulante heparina. Los TG en suero son estables 3 días en la heladera (2-10 °C). No congelar.
- Estándar: solución de glicerol 2,26 mmol/l (equivale a 2 g/l de trioleína).
- Reactivo de trabajo: viales conteniendo las enzimas lipasa, gliceroquinasa, GPO y POD, ATP, resuspendidos en buffer pH 7,5, conteniendo clorofenol y 4-AF.

**Concentraciones finales:**

Buffer Good .....	50 mmol/l; pH 7,5
Clorofenol .....	2 mmol/l
Lipasa.....	≥ 800 U/l
Gliceroquinasa.....	≥ 500 U/l
GPO.....	≥ 1500 U/l
POD .....	≥ 900 U/l
ATP .....	2 mmol/l
4-AF .....	0,4 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	Desconocido
Muestra (μl)	----	-----	10 (*)
Testigo (μl)	----	10	-----
Rvo. de trabajo (ml)	1	1	1
Mezclar e incubar 5 min a 37 °C. Enfriar la solución y leer a 505 nm *.			

\* El color es estable durante 60 minutos.

**Cálculo de resultados**

Para determinar la concentración de TG del tubo “desconocido”, utilice como referencia la absorbancia corregida del estándar:

$$\text{Triglicéridos (g/L)} = \text{Absorbancia corregida de la muestra} \times f$$

$$f = \frac{2,00 \text{ (g/L)}}{\text{Absorbancia corregida estándar}}$$

Valores de referencia de TG plasmáticos

Deseable.....	< 1,50 g/l
Moderadamente elevado a elevado.....	1,50 – 1,99 g/l
Elevado.....	2,00 – 4,99 g/l
Muy elevado.....	> 5,00 g/l

## B) Lipidograma electroforético

Las lipoproteínas plasmáticas son macromoléculas encargadas del transporte de los lípidos en el plasma sanguíneo. Es posible la separación de estas lipoproteínas en función de su movilidad diferencial en un campo eléctrico. Mediante la utilización de gel de agarosa, sometido a un campo eléctrico se obtienen fracciones (coincidentes con la ultracentrifugación, método patrón para la separación de lipoproteínas) que migran en distintas bandas:  $\alpha$  (HDL), pre- $\beta$  (VLDL) o  $\beta$  (LDL). Las partículas con mayor carga negativa ( $\alpha$ ) son las que se mueven más rápidamente hacia el ánodo. Los quilomicrones (QM), secretados en el estado postprandial, carecen de carga y no migran, quedando atrapados en el origen del gel. En el caso de una muestra tomada con 12-14 h de ayuno, estas lipoproteínas no deberían estar presentes.

El lipidograma es un ensayo necesario para el diagnóstico de las denominadas a dislipoproteinemias o dislipemias (situaciones en las que se determinan alteraciones en los niveles plasmáticos de colesterol y/o TG). Se realiza en caso de: 1) Existir hipertrigliceridemia; 2) Para investigar la fracción pre- $\beta$ /VLDL, una banda ancha que aparece en ciertas patologías como la diabetes y otras alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono; 3) En las hiperlipemias Tipo I y Tipo IV donde están aumentados los TG de QM y VLDL, respectivamente.

### Materiales y métodos

Para la realización del lipidograma electroforético utilizaremos los siguientes reactivos:

- Buffer veronal-veronal sódico 0,05 M; pH = 8,6 (disolver 10,3 g de veronal sódico; 1,34 g de veronal en 700 ml de agua destilada, calentando si es necesario, completar a 1000 ml con agua destilada. Ajustar pH con HCl si fuera necesario. Conservar a 4°C).

- Solución solidificada de agarosa en buffer veronal-veronal sódico (0,6 % p/v), conservada a 4°C (conservación óptima durante no más de 20 días).
- Solución fijadora: Etanol/Metanol/Isopropanol/Agua (45:1:1:20).
- Solución colorante (disolver 0,4 g del colorante Sudán Black, 4 g de acetato de cinc y 120 ml de etanol absoluto en 80 ml de agua destilada. Primero se disuelve en agua el acetato y por separado el colorante en etanol. Dejar reposar y filtrar antes de usar). Permite la tinción de los lípidos reaccionando en primer lugar con las uniones ésteres de triglicéridos y colesterol. Como las fracciones de las lipoproteínas toman el colorante con diferente intensidad, las bandas no son cuantificables.
- Soporte: portaobjetos de 7 x 2,6 cm, perfectamente limpios y desengrasados con alcohol 70%.
- Trozos de agujas de aproximadamente 0,9 mm de diámetro cortadas en los extremos y 18 cm de longitud.
- Puentes de papel de filtro embebidos en buffer veronal-veronal sódico. Conservar a 4°C.
- Muestra: la determinación se efectúa utilizando el plasma, recogiendo la sangre con solución de EDTA al 5% en proporción de 0,1 ml para 1 ml de sangre (el EDTA es el anticoagulante de preferencia ya que retarda la auto-oxidación de los lípidos y la degradación oxidativa de las apoproteínas, particularmente la de la ApoB). También puede usarse suero. La muestra debe conservarse a 4°C. No deben ser congeladas porque se alteran las estructuras de los QM y VLDL.
- Solución de Azul de bromofenol (una punta de espátula cada 10 ml de metanol). El azul de bromofenol ha sido empleado para la tinción de las bandas proteicas en agarosa, da un color más intenso con la albúmina (proteína plasmática de mayor peso molecular) que con las globulinas, por tal razón, se mezcla con el suero para sembrar como testigo de corrida. Esta proteína plasmática migra más rápido que la fracción de las HDL y permite observar el frente de corrida, permitiendo controlar la corrida electroforética.

Durante este TPL, se llevará a delante las actividades de cada uno de los pasos para la electroforesis de macromoléculas lipídicas. Brevemente, las mismas consisten en la elaboración de los soportes con el gel de agarosa, luego se colocará la muestra en el pocillo del soporte y se someterá al campo eléctrico, utilizando como buffer de corrida al buffer veronal-veronal sódico. Finalmente, se procederá a la fijación y tinción de las macromoléculas resueltas. A continuación, se detallan los procedimientos a realizar:

**a)** Elaboración de los soportes sólidos. Sobre un portaobjetos limpio y desengrasado con alcohol, distribuir con una pipeta 1,8 ml de la solución de agarosa, calentada a baño María.

Inmediatamente, colocar a 2 cm del borde un trozo de aguja, cuidando de hacerlo antes que solidifique el gel. Esperar 10 min. y retirar la aguja con un imán.

**b)** Siembra de la muestra. En la canaleta o pocillo formado luego de retirar el trozo de aguja, agregar 10 µl de suero con una micropipeta. Una de las muestras agregada a los pocillos, será mezclada con la solución de azul de bromofenol.

**c)** Corrida electroforética. Colocar los portaobjetos con las muestras en la cuba de electroforesis y hacer conexiones con el buffer veronal-veronal sódico por medio de los puentes de papel de filtro. Aplicar el amperaje adecuado (3 o 5 mA/portaobjeto).

La electroforesis se detiene cuando la banda de azul de bromofenol se ha desplazado 4 cm (3 h aproximadamente).

**d)** Fijación de las bandas de lipoproteínas. Sumergir los portaobjetos en la solución fijadora durante por lo menos 2 h. Retirarlos, cubrirlos con papel de filtro mojado con agua destilada y colocarlos en estufa entre 55°C – 60°C hasta lograr el secado correcto y la deshidratación de la agarosa.

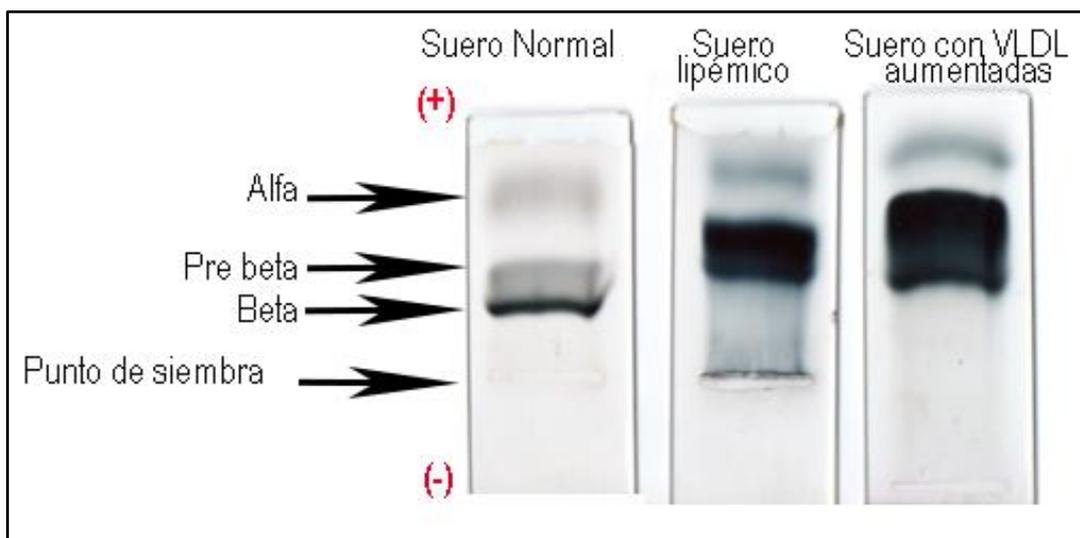
**e)** Coloración de las bandas lipoproteínas. Luego del proceso de fijación, colocar a los portaobjetos en la solución colorante durante 2 h. Lavarlos con agua destilada y dejarlos secar a temperatura ambiente.

### Análisis de los resultados

A partir de la observación de las bandas obtenidas, realizar la evaluación semicuantitativa de las lipoproteínas separadas en la muestra ensayada. En la figura 1 se muestran algunos ejemplos de lipidogramas electroforéticos para utilizar como referencia.

#### Figura 1.

*Fotografías de lipidogramas electroforéticos*



*Nota.* De izquierda a derecha, se observa un lipidograma correspondiente a un suero normal, distinguiéndose las tres bandas esperadas de LDL, VLDL y HDL (banda beta, pre-beta y HDL). Al centro, se observa una separación electroforética de un suero lipémico, con los QM coloreados en el punto de siembra. En el último caso, se aprecia un aumento de la banda pre-beta. Los signos (+) y (-) indican el ánodo y el cátodo, respectivamente.

## TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 6. METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS. DEGRADACION DE AMINOÁCIDOS

### Objetivos de aprendizaje

- Describir las reacciones enzimáticas implicadas en la eliminación de amoníaco en organismos ureotélicos y las que permiten el aprovechamiento del esqueleto carbonado de los aminoácidos.
- Interrelacionar el metabolismo de los aminoácidos con otras vías metabólicas.

### 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).

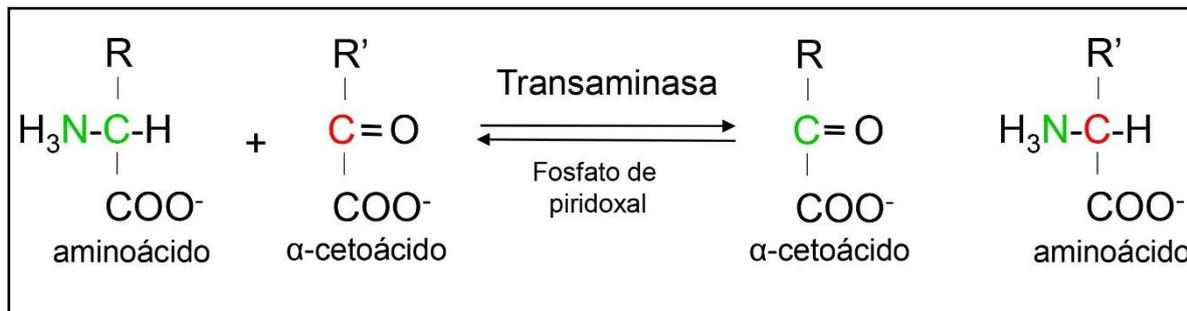
Los aminoácidos libres y los péptidos pequeños se absorben a través de las células de la mucosa intestinal. Existen mecanismos específicos de absorción, que incluyen transportadores de membrana para aminoácidos ácidos, básicos y neutros. Los péptidos absorbidos son hidrolizados a aminoácidos en el interior 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 reacción general de transaminación (figura 6.1), implica la acción reversible de una enzima, denominada transaminasa, que cataliza la transferencia del grupo alfa-amino de un aminoácido, hacia el carbono alfa de un alfa-cetoácido.

**Figura 6.1.**

Ecuación de una reacción de transaminación general.

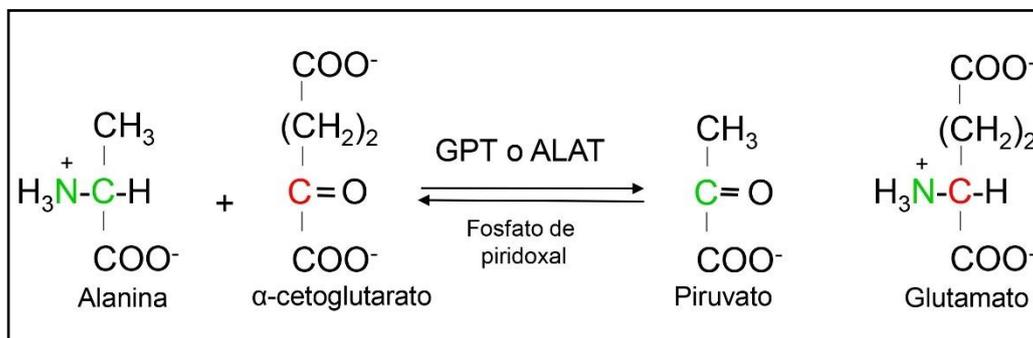


*Nota.* R: grupo radical.

Uno de los  $\alpha$ -cetoácidos implicados con mayor frecuencia en las reacciones de transaminación es el  $\alpha$ -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) (figura 6.2).

**Figura 6.2.**

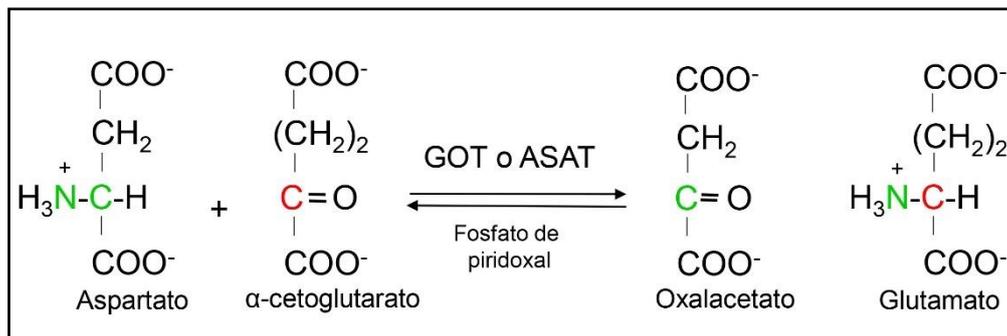
Reacción de transaminación catalizada por la enzima alanina-aminotransferasa (ALAT)



Cuando el proceso de transaminación ocurre entre  $\alpha$ -cetoglutarato y aspartato, la enzima que cataliza esta reacción es la aspartato-amino transferasa (ASAT), también conocida como glutámico-oxalacético transaminasa (GOT) (figura 6.3).

Figura 6.3.

Reacción de transaminación catalizada por la enzima aspartato-aminotransferasa (ASAT)



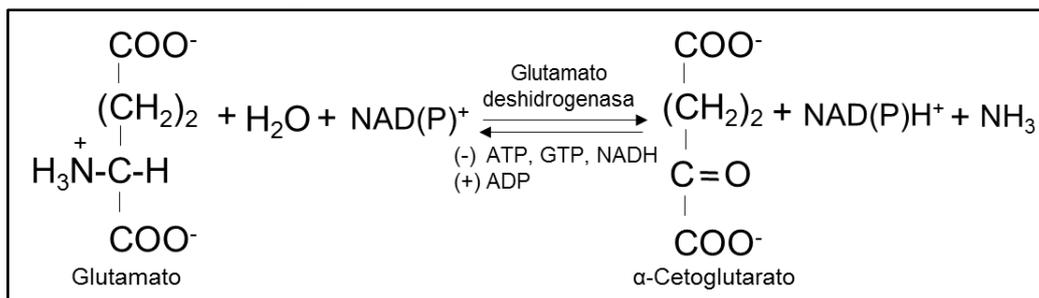
A diferencia de las reacciones de transaminación, en las cuales sólo hay una transferencia del grupo amino de los aminoácidos hacia un alfa-cetoácido, uno de los procesos de pérdida del grupo amino ocurre a través de la reacción de desaminación oxidativa (figura 6.4). Los grupos aminos de la mayoría de los aminoácidos son transferidos, en último término, al  $\alpha$ -cetoglutarato para generar L-glutamato. La liberación del nitrógeno como amoníaco es catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa, que en los tejidos de los mamíferos utiliza  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  como coenzimas. En la reacción directa generalmente participa el  $\text{NAD}^+$  y se forma  $\alpha$ -cetoglutarato y amoníaco. Sin embargo, el amoníaco liberado puede unirse al  $\alpha$ -cetoglutarato para generar L-glutamato, por lo tanto, sirve también como una vía de síntesis

La glutamato deshidrogenasa es una enzima alostérica siendo su modulador positivo el ADP, mientras que ATP, NADH 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 6.4.**

*Desaminación oxidativa del glutamato*

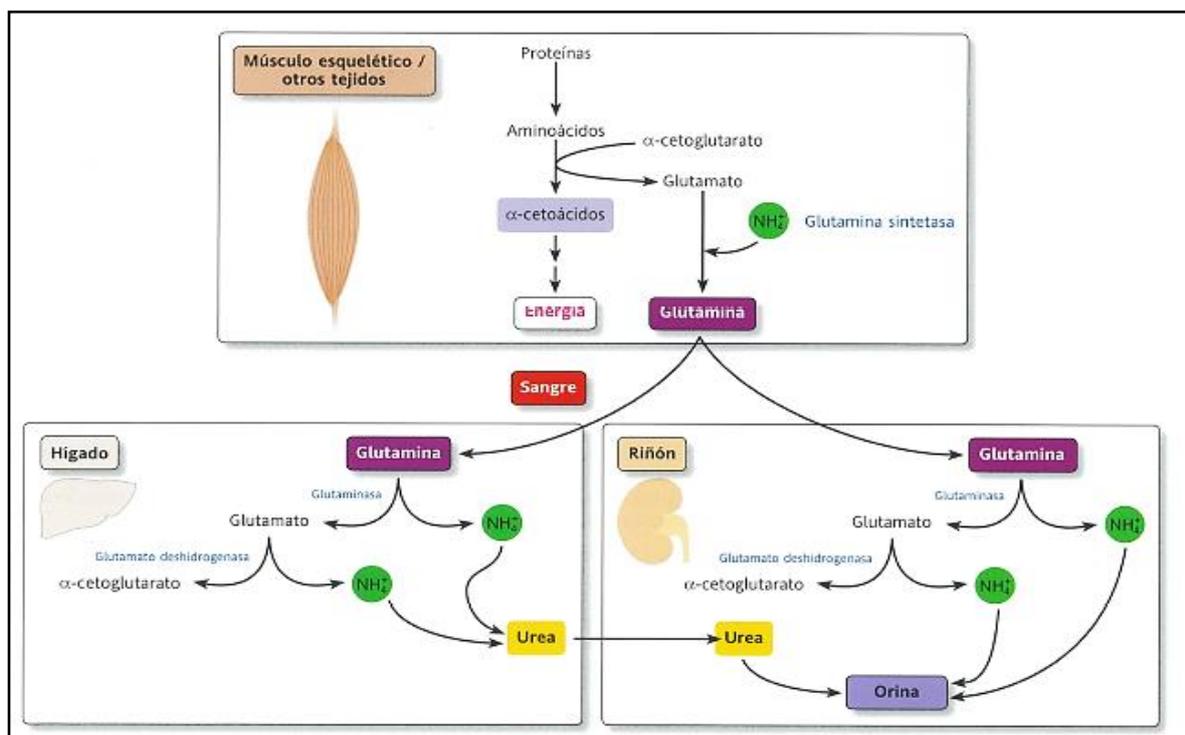


*Nota.* La enzima glutamato deshidrogenasa cataliza la eliminación del grupo amino del esqueleto carbonado del correspondiente aminoácido. La actividad de esta enzima es regulada por moduladores alostéricos positivos (+) o negativos (-).

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 periféricos es 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 (figura 6.5).

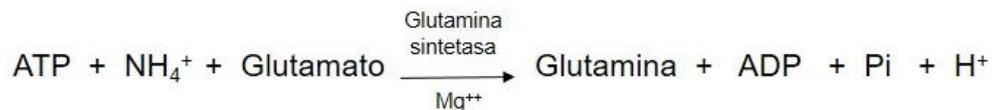
**Figura 6.5.**

*Transporte de nitrógeno desde músculo esquelético y otros tejidos hacia el hígado y el riñón.*

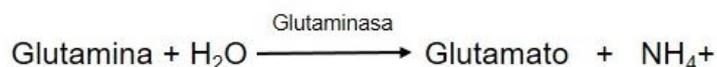


*Nota.* Tomado de Bioquímica. Conceptos esenciales (p. 285), por Feduchi y cols., 2020, Panamericana.

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 por la orina.

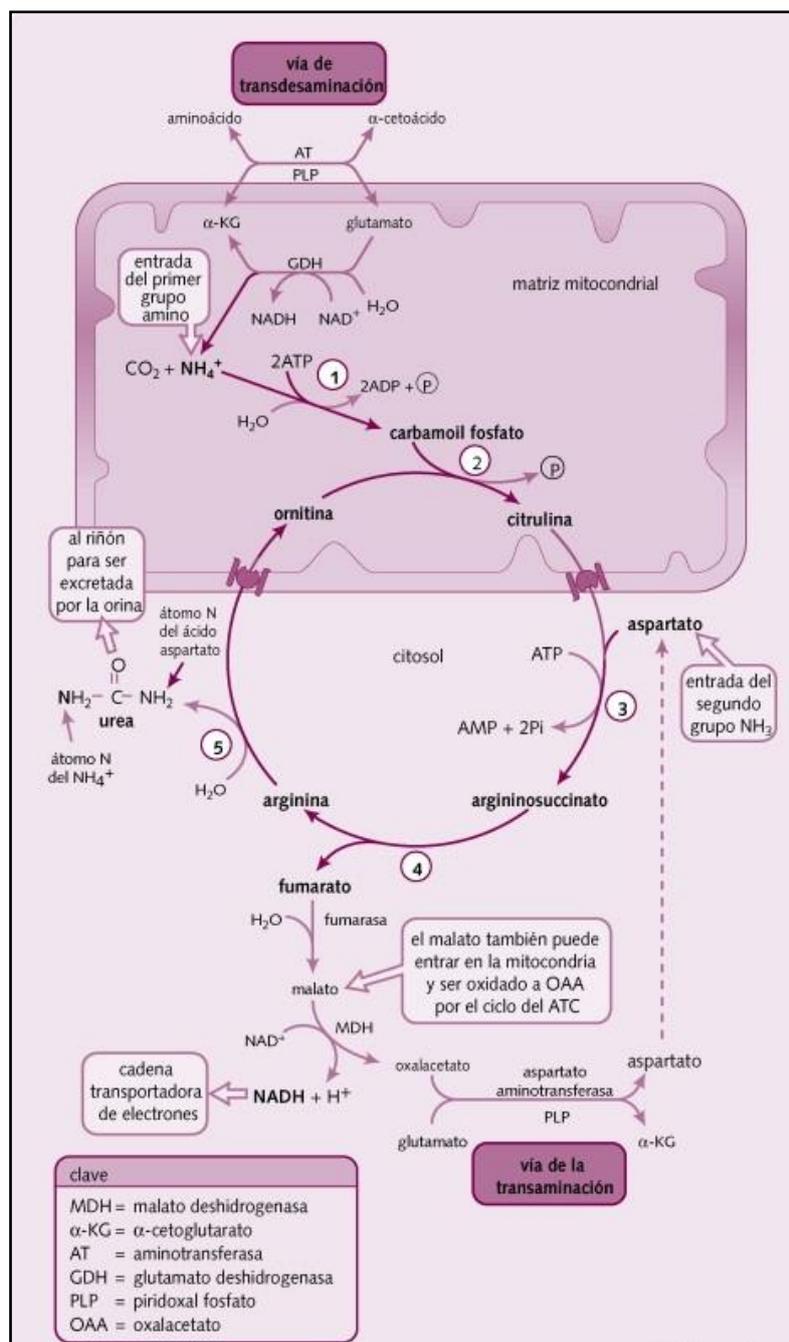
### Ciclo de la urea

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 (figura 6.6). En este ciclo se utiliza el amoníaco que proviene de las reacciones catalizadas por 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.

Figura 6.6.

Representación esquemática de las reacciones químicas implicadas en el ciclo de la urea.



Nota. Las reacciones del ciclo de la urea ocurren en el citosol y en la mitocondria de la célula hepática. Los números refieren a las enzimas que participan en este ciclo metabólico. 1: carbamil fosfato sintetasa. 2: ornitina transcarbamilasa. 3: argininosuccinato sintetasa. 4: argininosuccinasa. 5: arginasa. Modificado de Metabolismo y Nutrición, por Benyon, S. (p. 87), 2010, Harcourt Brace.

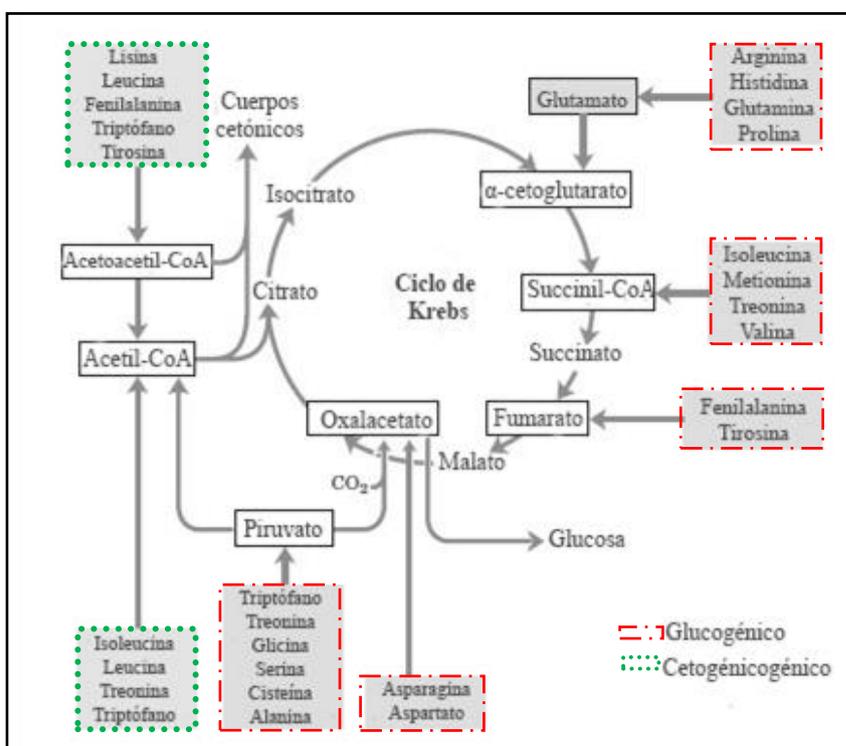
## Destino del esqueleto carbonado de los aminoácidos

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 6.7. Considerando el mencionado esquema, los aminoácidos son clasificados como:

- 1- Aminoácidos que se transforman en piruvato: alanina, cisteína, glicina, serina y treonina.
- 2- Aminoácidos que se catabolizan a acetoacetil-CoA: fenilalanina, tirosina, lisina, leucina y triptófano.
- 3- Aminoácidos que se catabolizan a oxalacetato: asparagina y ácido aspártico.
- 4- Aminoácidos que se catabolizan a 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 6.7.**

*Destino del esqueleto carbonado de los diferentes aminoácidos.*



*Nota.* Modificado de Bioquímica. Conceptos esenciales, por Feduchi y cols. (p. 287), 2020, Panamericana.

## Degradación de aminoácidos a piruvato

El esqueleto carbonado de seis aminoácidos es convertido en parte, o totalmente en piruvato (figura 6.8). 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.

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.

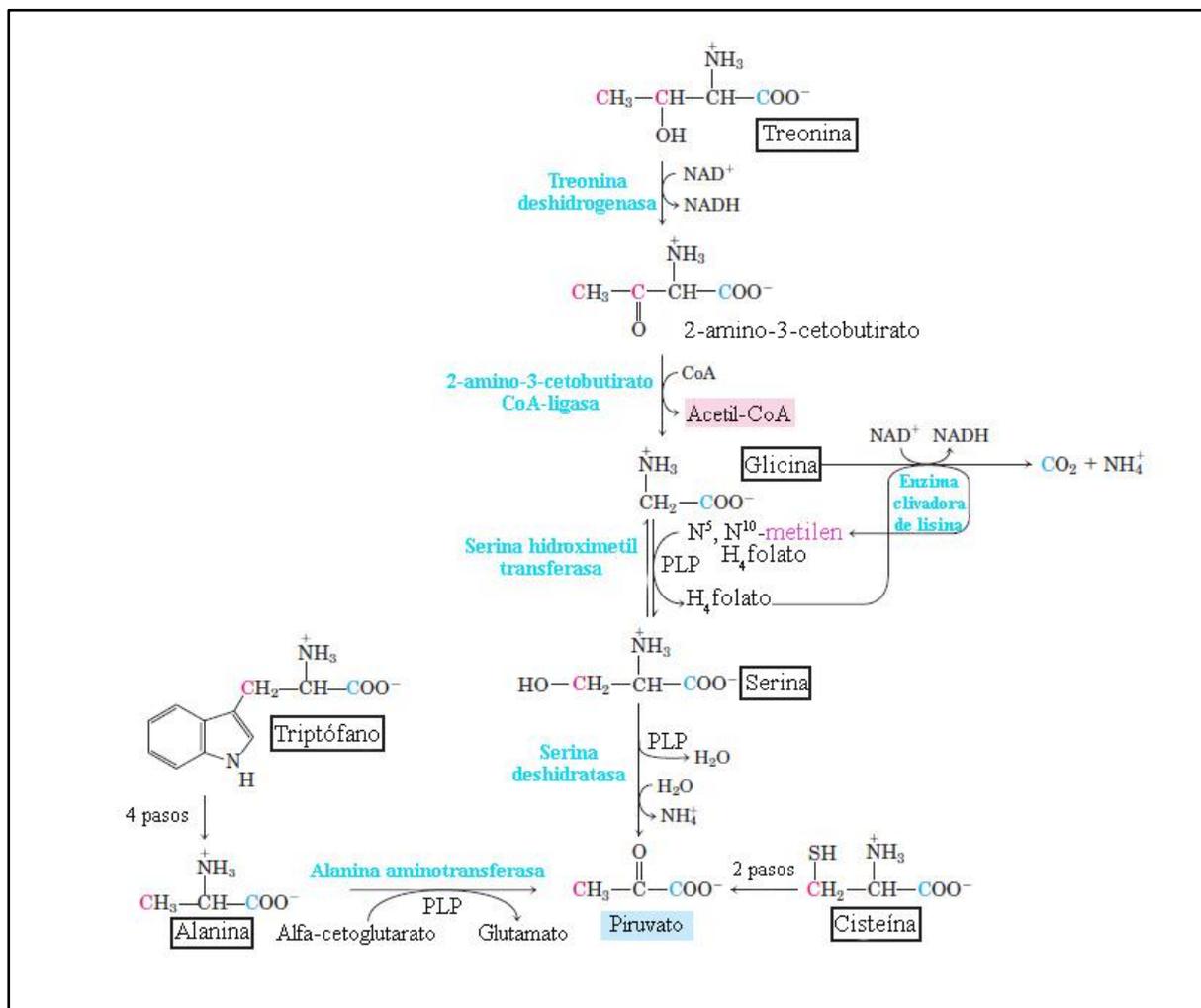
Cisteína es convertida en piruvato luego de dos pasos; en el primero se remueve el átomo de azufre, y en el otro ocurre una reacción de transaminación.

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 6.8.**

Reacciones catabólicas de triptófano, alanina, cisteína, glicina, serina y treonina para generar piruvato



*Nota.* PLP: fosfato de piridoxal. Tomado de Lehninger. Principios de Bioquímica, por Nelson & Cox (p. 297), 2018, W. H. Freeman.

### Catabolismo de aminoácidos aromáticos: fenilalanina y tirosina

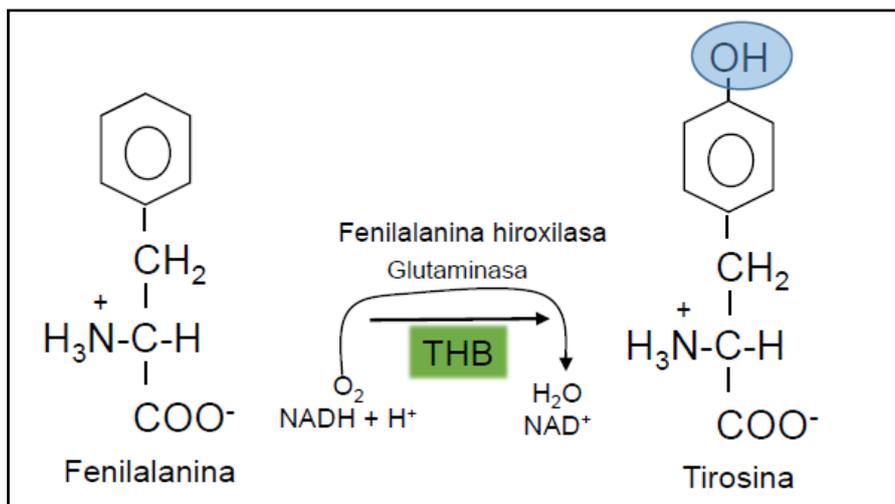
El aminoácido fenilalanina es un aminoácido esencial para los humanos y se convierte en tirosina mediante una reacción irreversible catalizada por la enzima fenilalanina hidroxilasa, que utiliza tetrahidrobiopterina como cofactor (figura 6.9).

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.

**Figura 6.9.**

*Síntesis del aminoácido tirosina a partir de fenilalanina.*



Nota. THB: tetrahidrobiopterina.

### **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.

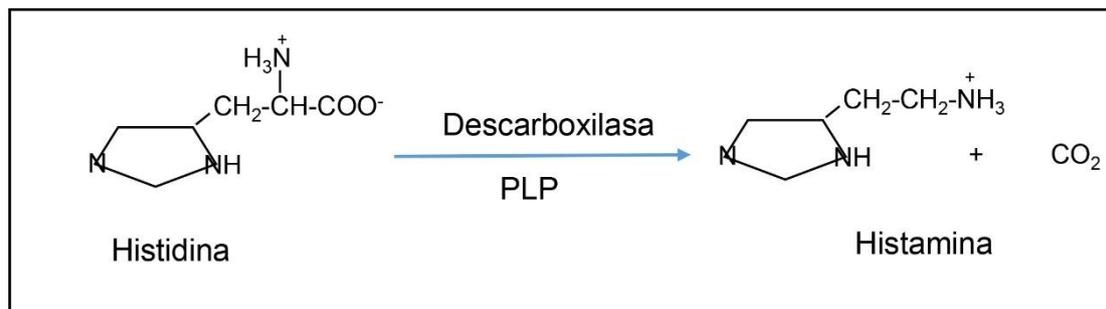
**Glicina:** la molécula entera de glicina es utilizada para la síntesis de purinas. El carbono alfa y el nitrógeno se emplean en la síntesis del hemo. Este aminoácido también es precursor de la síntesis de glutatión, un tripéptido con funciones antioxidantes.

**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 (figura 6.10). 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 6.10.**

*Síntesis de histamina por descarboxilación del aminoácido histidina*



*Nota.* 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.

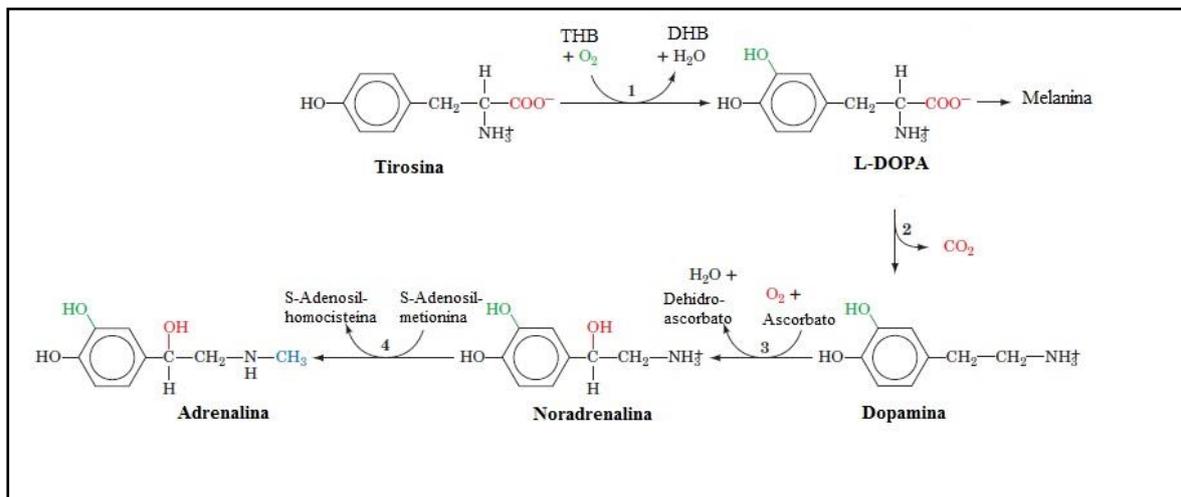
**Ácido glutámico:** por descarboxilación de este aminoácido, se forma el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). La enzima que cataliza esta reacción se encuentra preferentemente en la sustancia gris del sistema nervioso central. El GABA es un intermediario químico regulador de la actividad neuronal. 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 (figura 6.11), 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<sub>3</sub>) y tiroxina (T<sub>4</sub>).

**Figura 6.11.**

*Síntesis de catecolaminas a partir del aminoácido tirosina.*



*Nota.* 1: Tirosina hidroxilasa. 2: Aminoácido aromático descarboxilasa. 3: Dopamina β-hidroxilasa. 4: Feniletanolamina N-metiltransferasa. THB: tetrahidrobiopterina. DHB: dihidrobiopterina. Modificado de Fundamentos de bioquímica. La vida a nivel molecular, por Voet y cols. (p. 398), 2016. Ed. John Wiley & Sons.

**PROBLEMAS DE APLICACIÓN**

1) Formular las reacciones de transaminación en las que participe un alfa-cetoácido general y cada uno de los siguientes aminoácidos:

- a) Alanina
- b) Aspartato
- c) Glutamato
- d) Fenilalanina
- e) Tirosina

2) Algunas personas sufren hipoglucemias benignas con vértigos y apatía varias horas después de la última comida. Se ha comprobado que esto se puede evitar comiendo pequeñas cantidades de alimentos ricos en proteínas, a intervalos regulares entre comidas. Considerando lo anterior:

- a) ¿Sería conveniente consumir proteínas ricas en lisina, alanina o fenilalanina?
- b) En base a su respuesta anterior, en qué metabolismos están implicados cada uno de ellos.

3) Dos grupos de ratas fueron alimentadas con <sup>15</sup>N-aspartato. Un grupo fue también alimentado con fluoracetato (el cual es convertido en fluorocitrato, 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 <sup>15</sup>N. Se obtuvieron los siguientes resultados:

	Grupo con <sup>15</sup> N-aspartato	Grupo con <sup>15</sup> N-aspartato y fluoracetato
<b>Glutamato aislado</b> % de <sup>15</sup> N	0,65	0,12

Explicar la disminución de la incorporación de <sup>15</sup>N en el glutamato del segundo grupo.

4) 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 CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O) del lactato frente a la alanina cuando se incluye la excreción de nitrógeno en forma de urea.

**5)** El glutamato es un neurotransmisor importante cuyos niveles deben ser cuidadosamente regulados en el cerebro. Explique cómo la presencia de amoníaco en alta concentración podría alterar esa regulación. ¿Cómo podría una alta concentración de amoníaco alterar el ciclo del ácido cítrico?

**6)** A los pocos días de haber comenzado un ayuno, la excreción de nitrógeno se acelera, alcanzando niveles más altos de lo normal. A las pocas semanas, la velocidad de eliminación de nitrógeno disminuye hasta niveles más bajos y continúa con esta velocidad reducida. Sin embargo, una vez agotadas las reservas de grasa, la excreción de nitrógeno alcanza valores elevados.

a) ¿Qué sucesos metabólicos desencadenan la intensa excreción de nitrógeno inicial?

b) Explique el incremento de la excreción de nitrógeno una vez agotadas las reservas de lípidos.

## **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. (2011). Química Biológica. 9<sup>o</sup> Edición. Ed. El Ateneo.
- Feduchi, E., Romero Magdalena, C., Yáñez, E. & García Hoz Jiménez, C. (2020). Bioquímica. Conceptos esenciales. Ed. Panamericana.
- Nelson, D. & Cox, M. (2018). 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. (2016). Fundamentos de Bioquímica -4<sup>o</sup> Edición: La Vida a Nivel Molecular. Ed. Artmed.

## METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS

### Objetivos de aprendizaje

- 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

#### Biosíntesis de nucleótidos

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.

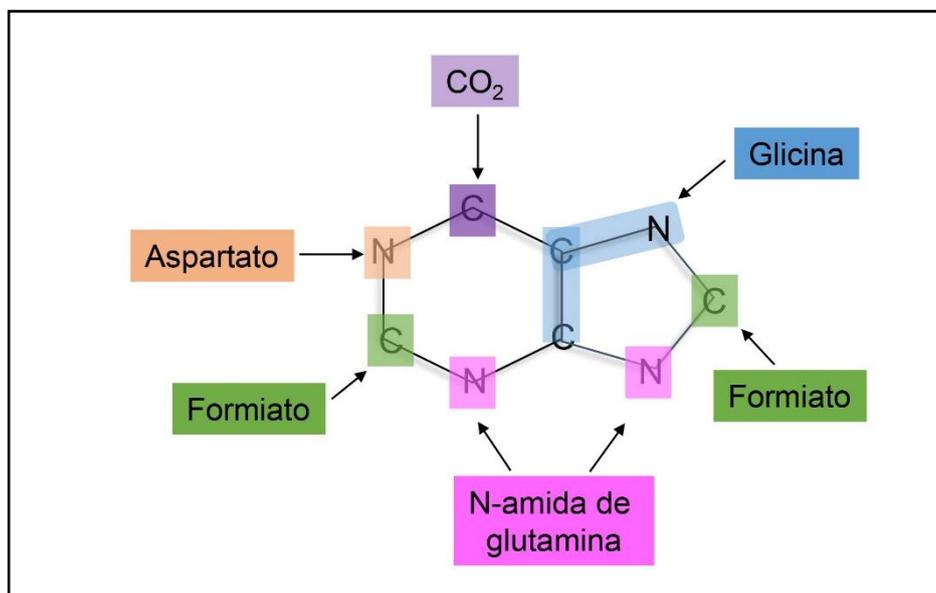
En el RNA la pentosa es la D-ribosa, las bases nitrogenadas derivadas de la purina son adenina y guanina y las derivadas de la pirimidina son uracilo y citosina.

### 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 (figura 6.12). Así, los compuestos precursores son los aminoácidos aspartato, glicina y glutamina, como también el CO<sub>2</sub> y el formiato.

**Figura 6.12.**

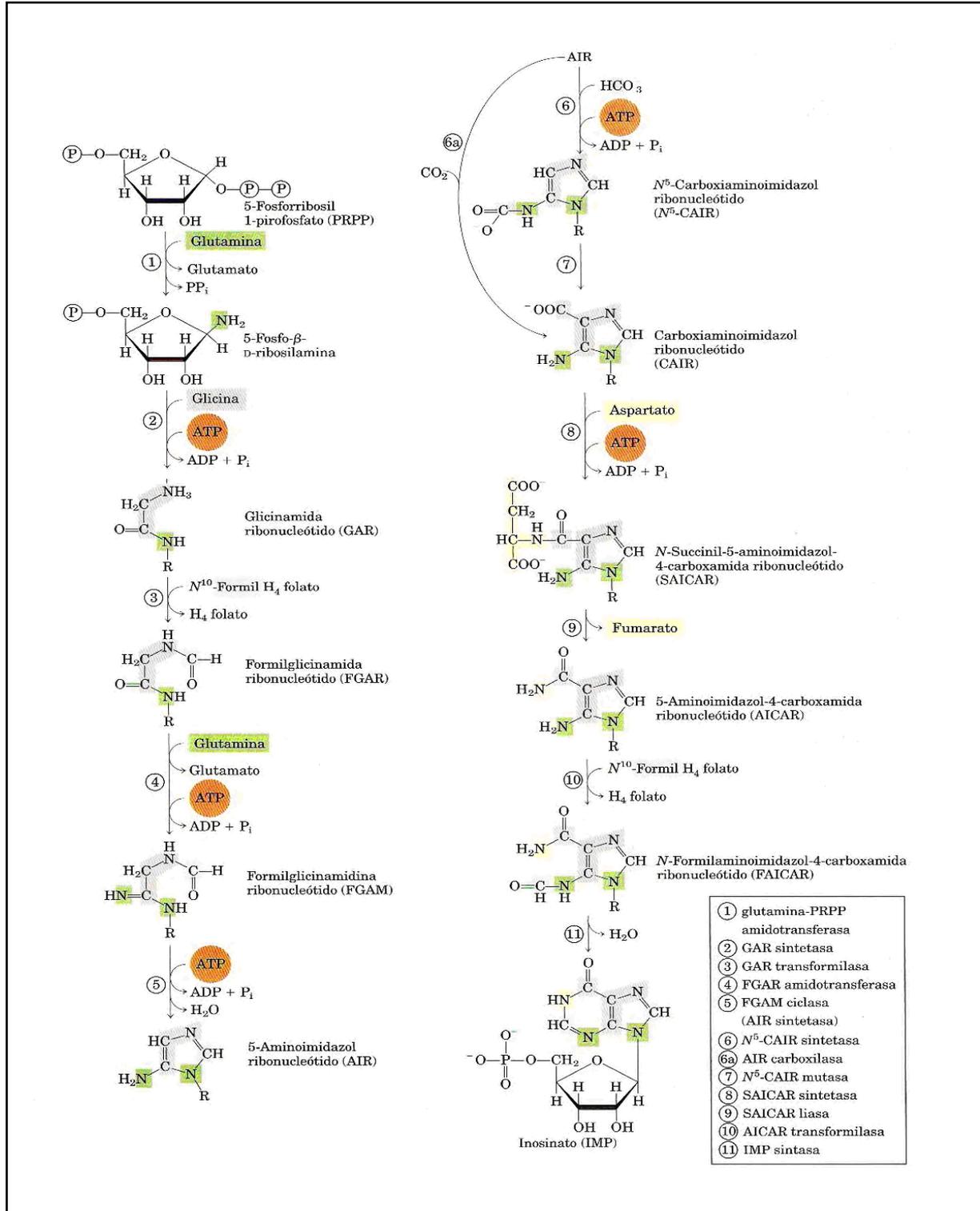
*Origen de los átomos de carbono y nitrógeno que constituyen el anillo de purina.*



Aunque podría esperarse que el anillo de purina se sintetice en primer lugar y después se una 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 (figura 6.13).

Figura 6.13.

Nucleótidos púricos: Síntesis de ácido inosínico (IMP).

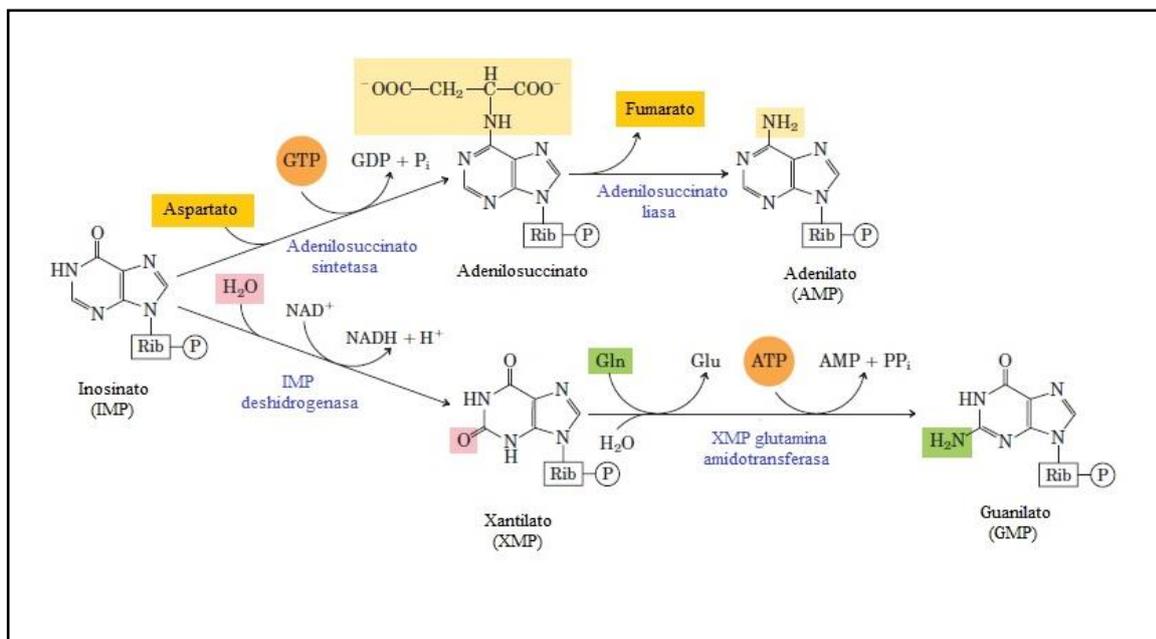


Nota. Tomado de Lehninger. Principios de Bioquímica, por Nelson & Cox (p. 504), 2018, W. H. Freeman.

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) (figura 6.14).

**Figura 6.14.**

**Conversión de ácido inosínico en AMP y GMP.**



*Nota.* Tomado de Lehninger. Principios de Bioquímica, por Nelson & Cox (p. 504), 2018, W. H. Freeman.

**Regulación de la síntesis de purinas**

La síntesis de nucleótidos púricos es regulada por retroalimentación en varios niveles (figura 6.15):

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



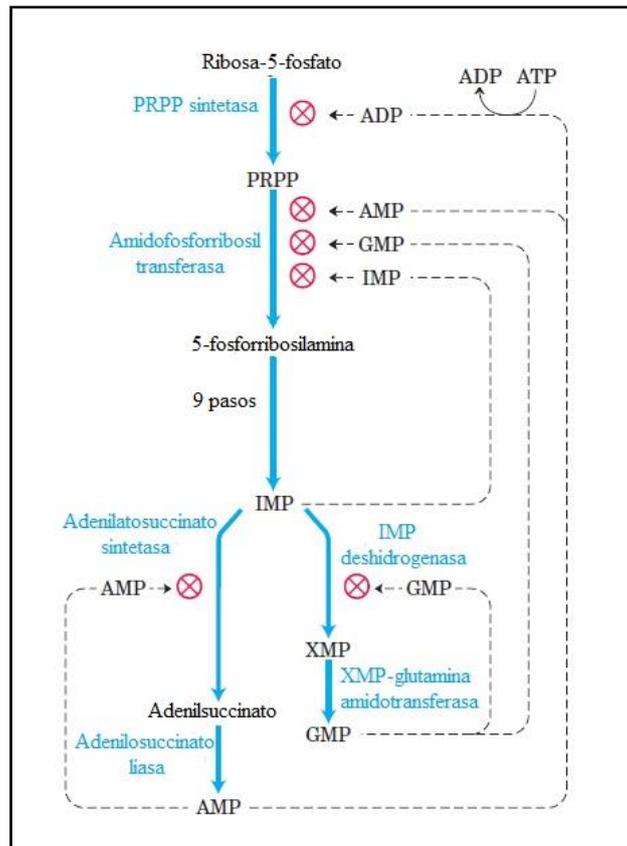
b) Etapa desde PRPP a fosforribosilamina catalizado por la enzima amidofosforribosiltransferasa, que es el principal sitio de control. Los nucleótidos AMP, ADP, ATP, GMP, GDP y GTP actúan como inhibidores. Esta enzima también es inhibida por IDP e ITP.



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 adenilatosuccinato sintetasa produciéndose más ATP. Cuando se acumula ATP se activa la enzima GMP-sintetasa aumentando los niveles de GTP.

**Figura 6.15.**

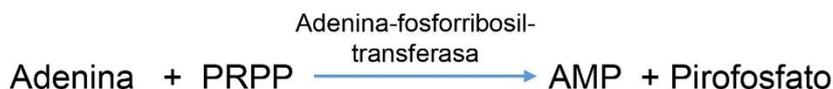
*Regulación de la síntesis de nucleótidos de purina.*



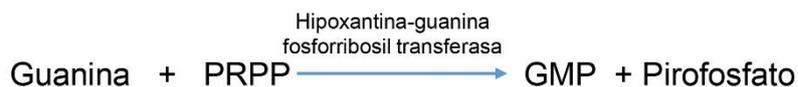
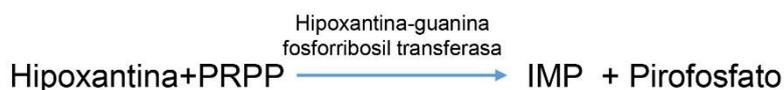
*Nota.* Tomado desde Lehninger. Principios de bioquímica, por Nelson & Cox (p. 511), 2018. Ed. W. H. Freeman.

### 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-transferasa.

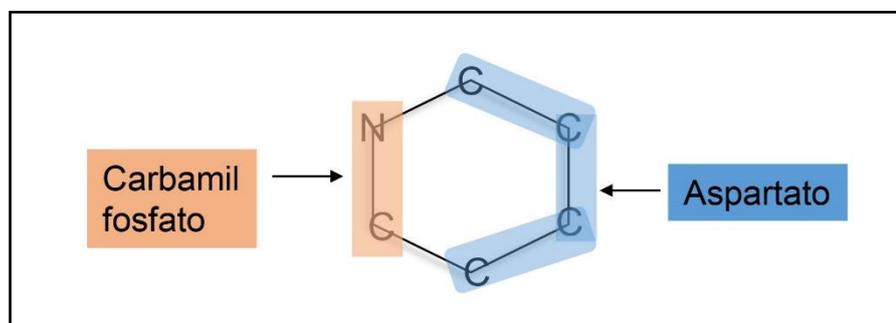


### Biosíntesis de nucleótidos pirimídicos

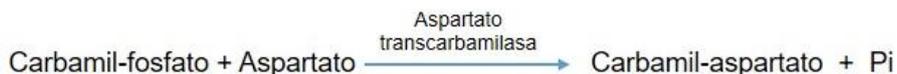
La biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina transcurre de una manera algo diferente que la de los nucleótidos de purina. En este caso el anillo de pirimidina se sintetiza primero y luego se une al fosfato de ribosa (figura 6.16). Los precursores para la síntesis de este anillo son el carbamil fosfato y aspartato.

**Figura 6.16.**

*Origen de los átomos de carbono y nitrógeno que constituyen el anillo de pirimidina.*



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:



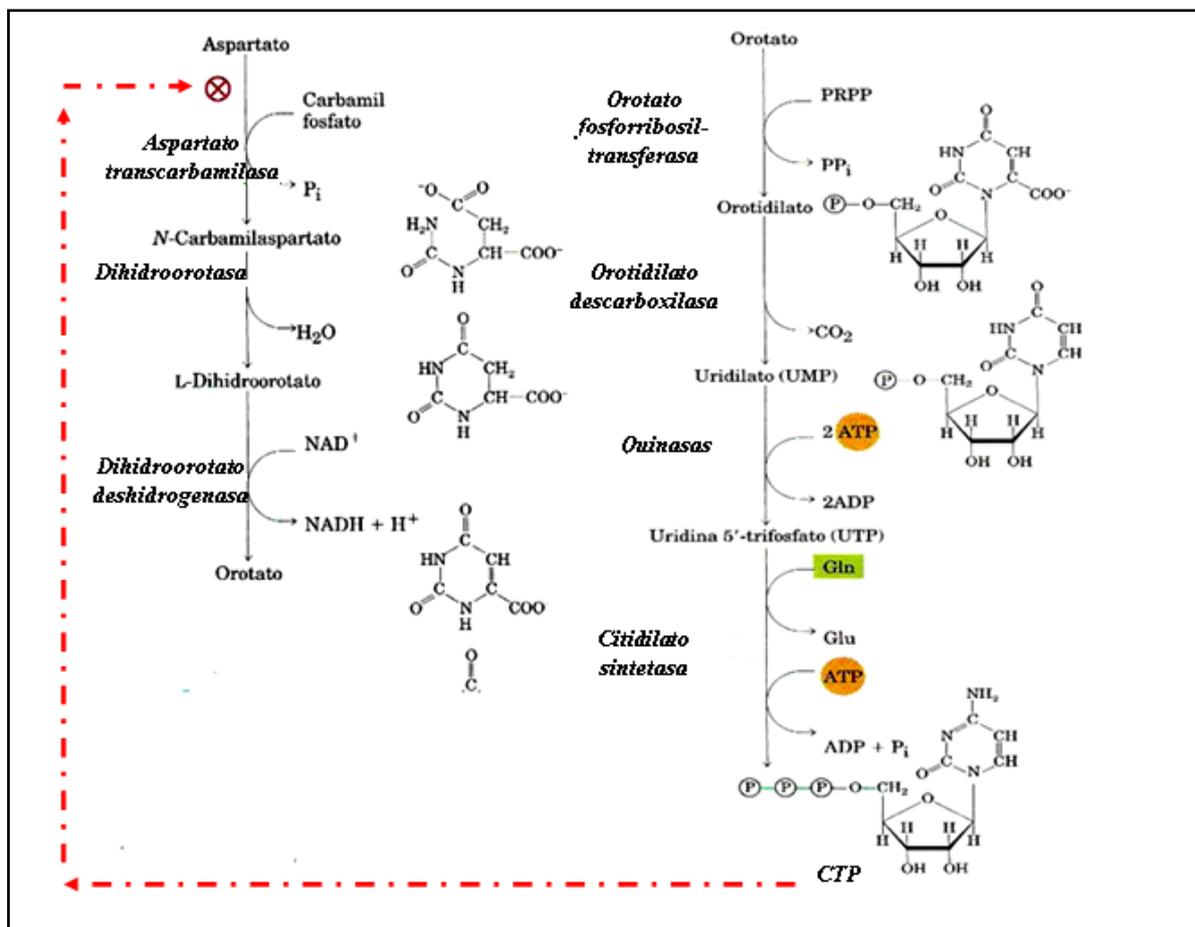
Una vez formado el carbamil-fosfato, éste se combina con aspartato para formar carbamil-aspartato. La reacción es catalizada por la aspartato transcarbamilasa (ATC).

Después de tres pasos se obtiene el primer nucleótido de pirimidina (UMP) el cual se convierte posteriormente en UTP y CTP (figura 6.17).

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.

**Figura 6.17.**

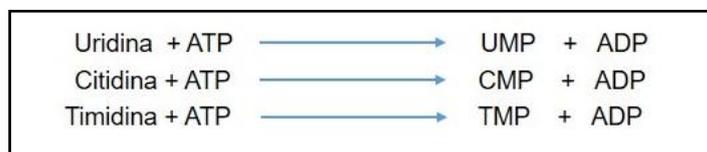
Reacciones involucradas en la biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos.



Nota. Tomado de Lehninger. Principios de Bioquímica, por Nelson & Cox (p. 515), 2018. 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.



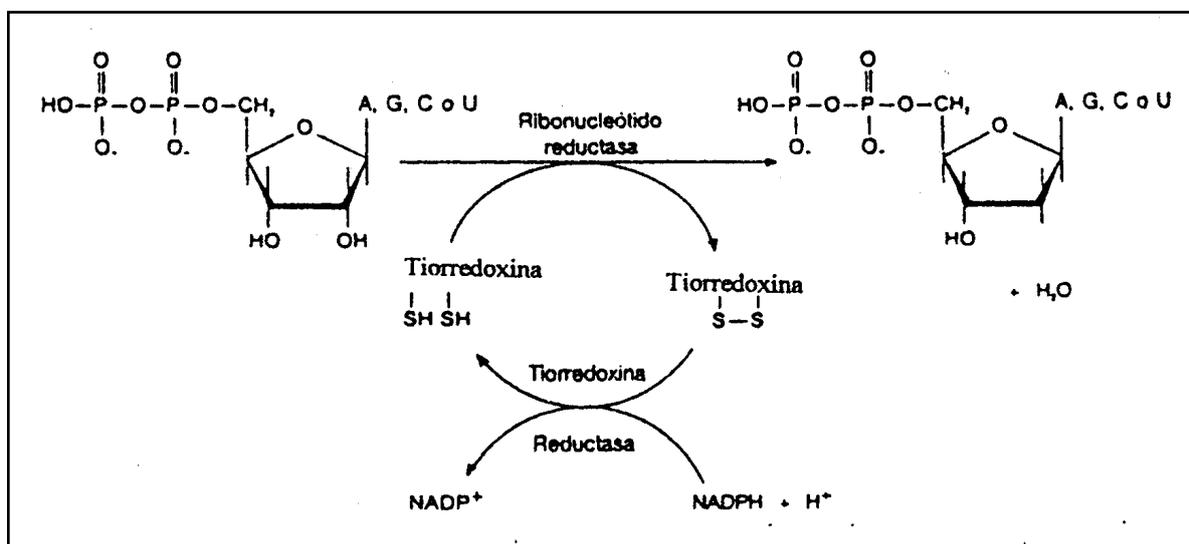
### Biosíntesis de desoxirribonucleótidos

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 (figura 6.18).

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.

**Figura 6.18.**

*Reacciones involucradas en la biosíntesis de desoxirribonucleótidos.*



*Nota.* A: adenina; G: guanina; C: citosina; U: uracilo.

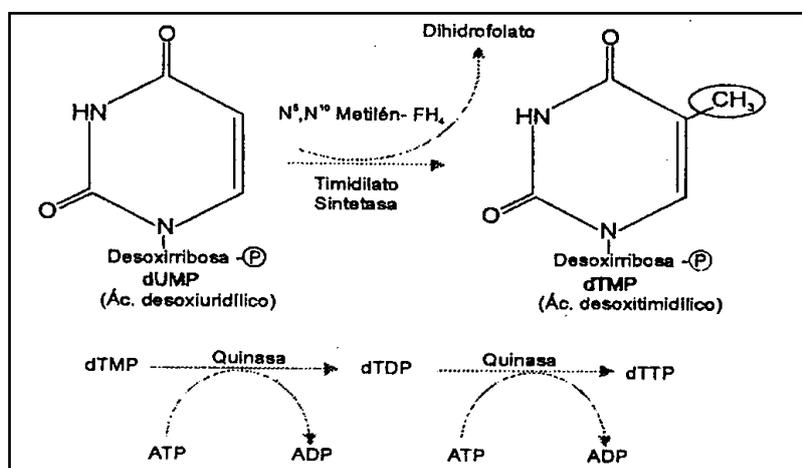
El control alostérico de la síntesis de desoxirribonucleótidos se realiza a nivel de la enzima ribonucleótido reductasa o ribonucleósido difosfato reductasa. El dATP actúa como inhibidor general de la síntesis de todos los ribonucleósidos-5'-difosfatos.

### 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 (figura 6.19). 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 6.19.**

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

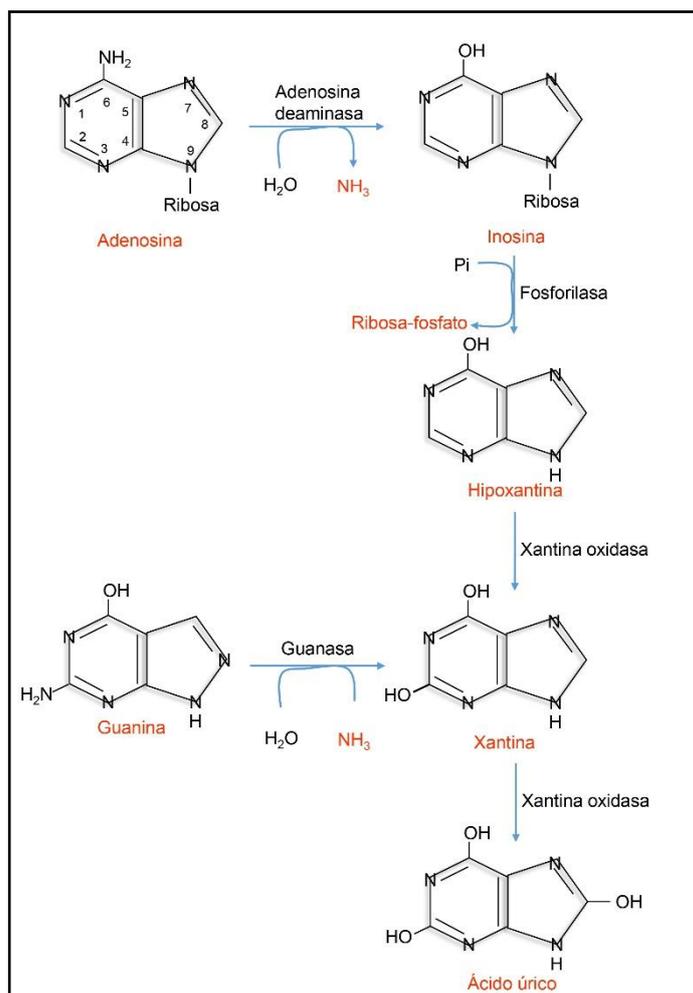


### Catabolismo de purinas

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 (figura 6.20).

**Figura 6.20.**

*Catabolismo de purinas: formación de ácido úrico.*



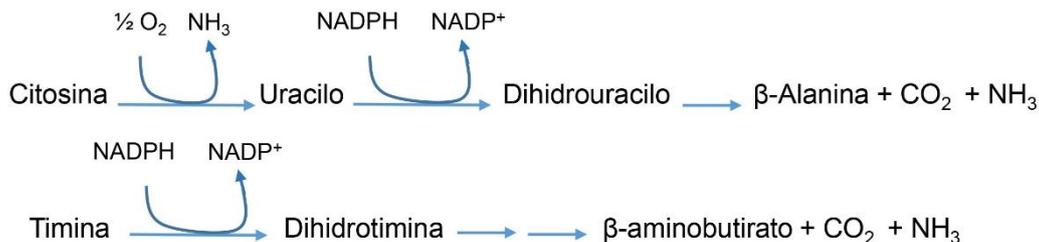
*Nota.* Modificado de Química Biológica, por Blanco, A. (p.147), 2006. Ed. El Ateneo.

### 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  $\text{CO}_2$  respiratorio a partir del C2 del núcleo pirimidínico, representa una vía importante para el catabolismo de uracilo, citosina y timina. La  $\beta$ -alanina (aminoácido cuyo grupo amino se encuentra unido a su carbono beta) y el ácido  $\beta$ -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  $\beta$ -aminoisobutírico, como índice de la degradación exagerada del ADN.



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

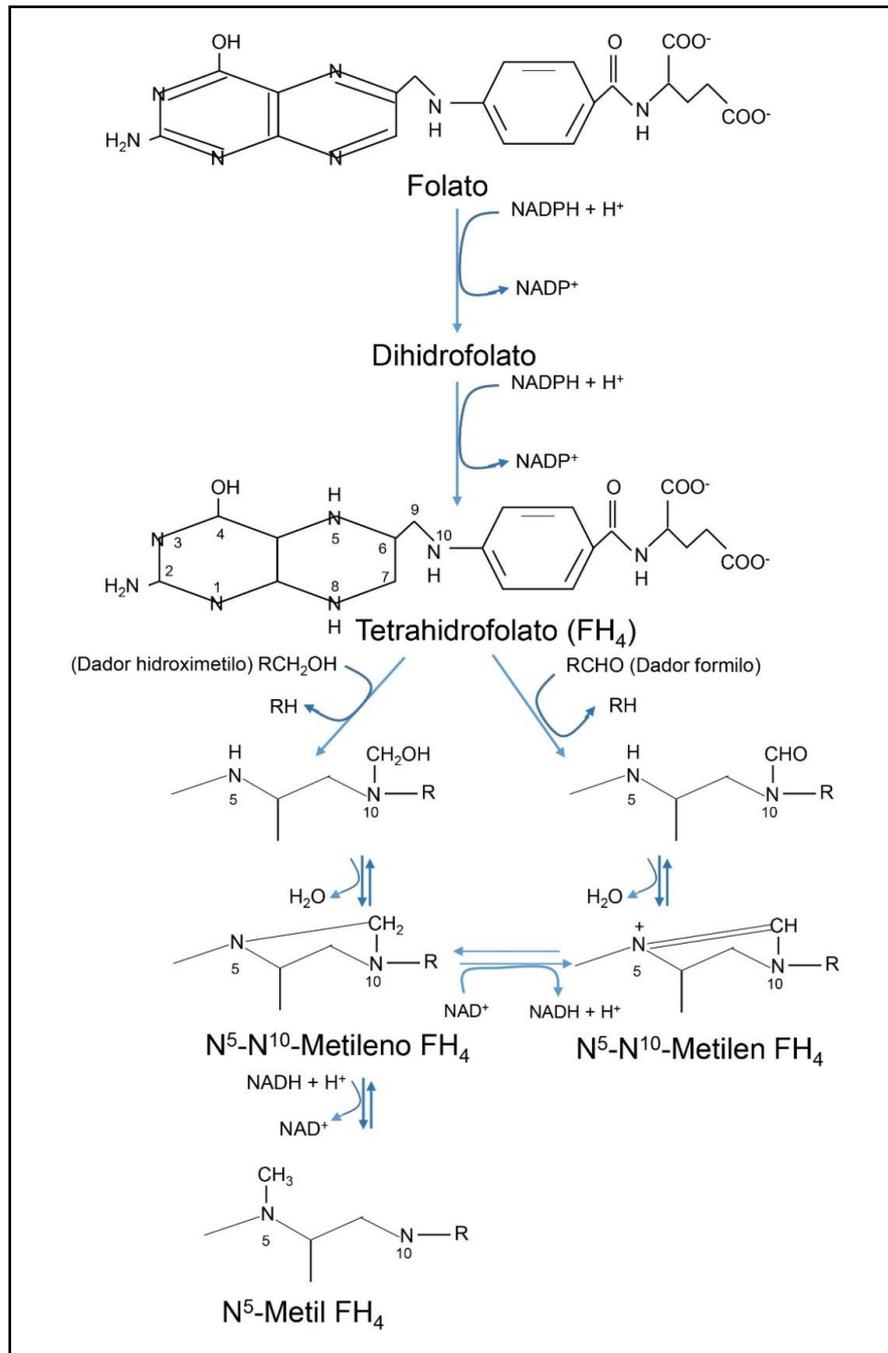
El ácido fólico es un compuesto ampliamente distribuido en las plantas. Su deficiencia en mamíferos provoca una disminución del crecimiento y aparición de diversas formas de anemias. La molécula de ácido fólico está constituida por tres sillares característicos: una pteridina, sustituida, ácido p-aminobenzoico, 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 tetrahidrofólico ( $\text{FH}_4$ ) actúa como transportador intermediario de grupos hidroximetilo, formilo y metilo, en numerosas reacciones enzimáticas. En la siguiente figura (figura 6.21) se puede observar las reacciones de reducción y transformación del ácido fólico.

**Figura 6.21.**

*Transformación del ácido fólico para generar las formas metabólicamente activas.*



*Nota.* Modificado de Lehninger. Principios de Bioquímica, por Nelson & Cox, 2018. 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:

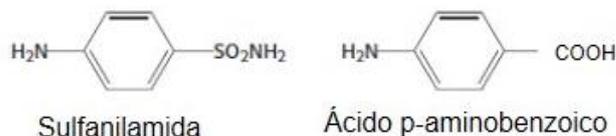
a)  $^{15}\text{N}$ -aspartato    b)  $^{14}\text{C}$ -serina (grupo  $\text{OH-CH}_3$  marcado)    c)  $^3\text{H}$ -Oxalacetato (marcado uniformemente)

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  $\text{NH}_2$ .

b) adenosina en el átomo de C 5.

c) guanina en el átomo de N del grupo  $\text{NH}_2$ .

Mencione donde quedaría la marca en los productos de degradación de purinas en el hombre: ácido úrico y  $\text{NH}_3$ .

## 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. (2018). 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.

## TRABAJO PRÁCTICO DE AULA N° 7. INTERRELACIONES METABÓLICAS

### Objetivos de aprendizaje

- Analizar, interpretar y presentar un trabajo científico de investigación que aborde interrelación de diversas vías metabólicas y de mecanismos moleculares implicados en la regulación del metabolismo.
- Familiarizar a los y las estudiantes con distintos trabajos científicos mediante la identificación de las distintas secciones que los constituyen y el análisis crítico del artículo.

### ACTIVIDADES

En este trabajo práctico se realizará la exposición de artículos científicos en los cuales es necesario establecer interrelaciones metabólicas. Además, se propone indagar en los mecanismos moleculares implicados en la regulación del metabolismo de los macronutrientes estudiados en la asignatura.

Los y las estudiantes tendrán la oportunidad de seleccionar un artículo científico entre varios propuestos por las docentes, o proponer una selección propia.

Los trabajos seleccionados se expondrán en grupos de dos estudiantes, mediante la utilización de equipo multimedia o de las herramientas que consideren adecuadas para la presentación.

A continuación, se encuentra una serie de aspectos que serán considerados en la presentación oral.

- 1)- Tipo de artículo: diferenciar entre trabajo de investigación y revisión.
- 2) Título. ¿De qué se trata el trabajo? Identificar las palabras claves del artículo.
- 3) Autores. ¿Quiénes son los y las autores? ¿Cuál es su lugar de trabajo?
- 4) En el caso de tratarse de un trabajo de investigación:
  - A partir de la introducción, esquematizar y explicar los conocimientos previos y los conceptos claves (antecedentes) en los que se basó la investigación.
  - Identificar y exponer los objetivos del trabajo de investigación., así como también la hipótesis y la forma de abordar su estudio.
  - A partir de los materiales y métodos, mencionar las técnicas utilizadas, los análisis realizados y su aplicación.

- En la sección de resultados, seleccionar los resultados más significativos en relación al metabolismo y sus interrelaciones. Interpretar y explicar las gráficas o figuras que representan esos resultados.

- En la discusión del artículo, referirse a si los o las autores logran cumplir los objetivos y/o comprobar la hipótesis. En ese caso, ¿cómo lo realizan?, ¿comparan/contrastan sus resultados con los de otras investigaciones? ¿cuáles son las conclusiones a las que llegan?

- ¿Qué interrelaciones metabólicas se plantean a partir del trabajo?

- ¿Qué más podría estudiarse a partir de los resultados?

5) En el caso de tratarse de un trabajo de revisión:

- Interpretar y explicar cada una de las gráficas, figuras o tablas que se presentan.

- ¿Qué interrelaciones metabólicas se plantean, o surgen, a partir de la revisión?

Esquematizar.

- ¿Cuál es el conocimiento más relevante y/o novedoso que se plantea? Revisar la bibliografía.