BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CÉLULA

TERCERA EDICIÓN

Bruce Alberts • Dennis Bray
Julian Lewis • Martin Raff
Keith Roberts • James D. Watson

Traducido por

Mercè Durfort i Coll
Catedrática de Biología Celular Animal y Vegetal
de la Facultad de Biología
de la Universidad de Barcelona

Miquel Llobera i Sande
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular
de la Facultad de Biología
de la Universidad de Barcelona

UNIVERSIDAD METROPOLITANA DE CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN
57605
BIBLIOTECA
CENTRAL

EDICIONES OMEGA, S.A.
Plató, 26 - 08006 Barcelona

Bruce Alberts es Doctor (Ph.D.) por la Universidad de Harvard y actualmente es Presidente de la National Academy of Sciences y Profesor de Bioquímica y Biofísica en la Universidad de California, San Francisco. *Dennis Bray* es Doctor (Ph.D.) por el Massachusetts Institute of Technology y actualmente está becado por el Medical Research Council en el Departamento de Zoología de la Universidad de Cambridge. *Julian Lewis* es Doctor (D.Phil.) por la Universidad de Oxford y actualmente es Senior Scientist en la Imperial Cancer Research Fund Developmental Biology Unit, de la Universidad de Oxford. *Martin Raff* es Doctor (M.D.) por la Universidad de McGill y actualmente es Profesor del MRC Laboratory for Molecular Cell Biology y del Biology Department University College de Londres. *Keith Roberts* es Doctor (Ph.D.) por la Universidad de Cambridge y actualmente es Director del Department of Cell Biology del John Innes Institute de Norwich. *James D.Watson* es Doctor (Ph.D.) por la Universidad de Indiana y actualmente es Director del Cold Spring Harbor Laboratory. Es autor de *Molecular Biology of the Gene* y, con Francis Crick y Maurice Wilkins, recibió el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1962.

En la traducción han colaborado: Dra. M. Gràcia Bozzo, Dra. Roser Pagan, Dra. Montserrat Poquet, Dr. Manuel Reina, Dr. Josep Valero y Dr. Senén Vilaró.

Quedan rigurosamente prohibidas, sin la autorización escrita de los titulares del "Copyright", bajo las sanciones establecidas en las leyes, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, y la distribución de ejemplares de ella mediante alquiler o préstamo públicos, así como la exportación e importación de esos ejemplares para su distribución en venta, fuera del ámbito de la Comunidad Económica Europea.

Authorized translation from English language edition published by Garland Publishing, Inc.

MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL

©1993, 1989, 1994 by Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts and James D. Watson

y para la edición española

©1996 Ediciones Omega, S.A., Barcelona

ISBN 84-282-1011-X
Depósito legal B. 23.553-96
Printed in Spain
Ind. Gráf. Ferré Olsina, S.A. – Viladomat, 158-160 int. – 08015 Barcelona

Cubierta anterior: la fotografía muestra una fibra nerviosa de rata en cultivo. Está marcada con un fluorocromo asociado a un anticuerpo que reconoce el soma celular y las prolongaciones dendríticas de la célula (*amarillo*). Los terminales nerviosos (*verde*) de otras neuronas (no visibles) que han establecido sinapsis con la célula están marcados con un anticuerpo diferente. (Por cortesía de Olaf Mundigl y Pietro de Camilli.)

Cubierta posterior: los autores, en orden alfabético, atravesando Abbey Road en Londres, yendo a comer. La mayor parte de esta tercera edición se ha escrito en una casa situada en el ángulo de la imagen. (Fotografía de Richard Olivier.)

Dedicatoria: Gavin Borden, último presidente de Garland Publishing, curtido durante la ascensión cerca del Mount McKinley, a mediados de 1980, con Bruce Alberts, autor de "Biología Molecular de la Célula" y el famoso guía de montaña Mugs Stump (1940-1992).

Índice general

Características especiales *xv*
Índice de materias *xvii*
Agradecimientos *xxxix*
Nota al lector *xliii*
Nota de los traductores *xlv*

Introducción a la célula — PARTE I

1. La evolución de la célula 3
2. Pequeñas moléculas, energía y biosíntesis 43
3. Macromoléculas: estructura, forma e información 93
4. Cómo se estudian las células 147

Genética molecular — PARTE II

5. Función de las proteínas 207
6. Mecanismos genéticos básicos 237
7. Tecnología del DNA recombinante 313
8. El núcleo celular 359
9. El control de la expresión génica 429

Organización interna de la célula — PARTE III

10. Estructura de la membrana 509
11. Transporte de moléculas pequeñas a través de la membrana y base iónica de la excitabilidad de la membrana 541
12. Compartimientos intracelulares y clasificación de proteínas 589
13. Tráfico vesicular mediante las rutas secretora y endocítica 641
14. Conversión energética: mitocondrias y cloroplastos 697
15. Transmisión de señales entre células 771
16. El citoesqueleto 843
17. El ciclo de división celular 925
18. Los mecanismos de la división celular 977

Las células en su contexto social — PARTE IV

19. Adhesión celular, uniones celulares y matriz extracelular 1017
20. Células germinales y fecundación 1083
21. Mecanismos celulares del desarrollo 1111
22. Células diferenciadas y conservación de los tejidos 1219
23. El sistema inmunitario 1279
24. Cáncer 1345

Glosario *G-1*
Índice alfabético *I-1*

Características especiales

Panel 1-1	Células eucariotas: esquema de sus principales orgánulos	18–19
Panel 1-2	Modelos celulares y tejidos con los que están construidas las plantas superiores	30–31
Panel 1-3	Algunos de los diferentes tipos de células existentes en el cuerpo de un vertebrado	38–39
Tabla 2-1	Composición química aproximada de una célula bacteriana	45
Panel 2-1	Propiedades químicas del agua y su influencia sobre el comportamiento de las moléculas biológicas	50–51
Panel 2-2	Enlaces y grupos químicos frecuentes en las moléculas biológicas	52–53
Panel 2-3	Algunos de los tipos de azúcares encontrados habitualmente en las células	54–55
Panel 2-4	Algunos de los tipos de ácidos grasos encontrados habitualmente en las células y las estructuras que forman	56–57
Panel 2-5	Los 20 aminoácidos que intervienen en la síntesis de las proteínas	58-59
Panel 2-6	Resumen de los principales tipos de nucleótidos y sus derivados existentes en las células	60–61
Tabla 3-1	Composición química aproximada de una bacteria típica y de una célula de mamífero típica	94
Tabla 3-2	Enlaces químicos covalentes y no covalentes	95
Panel 3-1	Principales tipos de fuerzas no covalentes débiles que unen las moléculas entre sí	96–97
Tabla 3-3	La relación entre las diferencias de energía libre y las constantes de equilibrio	101
Panel 3-2	Estructuras del DNA y del RNA	104–105
Tabla 11-1	Comparación de las concentraciones iónicas en el interior y el exterior de una célula de mamífero	542
Panel 11-1	Equilibrio del agua intracelular: el problema y su solución	552
Panel 11-2	Deducción de la ecuación de Nernst	562
Panel 11-3	Algunos experimentos clásicos realizados en el axón gigante del calamar	568
Tabla 12-1	Volúmenes relativos ocupados por los principales compartimientos intracelulares en una célula hepática típica (hepatocito)	591
Tabla 12-2	Cantidades relativas de tipos de membrana en dos células eucariotas	591
Panel 12-1	Estudio de las secuencias señal y de la translocación de proteínas a través de membranas	598
Panel 13-1	Estrategias utilizadas para estudiar los mecanismos moleculares implicados en el transporte vesicular	682–683
Panel 14-1	Energía libre y reacciones biológicas	714–715
Panel 16-1	Polimerización de la actina y la tubulina	882–883
Panel 18-1	Los seis estadios de la división celular	982–983
Panel 21-1	Revisión de genética clásica	1148–1149
Panel 21-2	Características generales del desarrollo temprano de las plantas con flores	1189
Capítulo 22 Apéndice	Catálogo de las células del cuerpo humano adulto	1271–1274

Índice de materias

Introducción a la célula

Parte I

La evolución de la célula

Capítulo 1

Desde las moléculas hasta la primera célula 4
En condiciones prebióticas se pueden formar moléculas biológicas 4
Pueden desarrollarse sistemas químicos complejos en un entorno alejado de su equilibrio químico 4
Los polinucleótidos son capaces de dirigir su propia síntesis 6
Las moléculas autorreplicantes están sometidas a la selección natural 7
Algunas moléculas especializadas de RNA pueden catalizar reacciones bioquímicas 8
La información fluye desde los polinucleótidos a los polipéptidos 8
Las membranas definieron la primera célula 10
Todas las células actuales utilizan el DNA como material hereditario 11
Resumen 12

De los procariotas a los eucariotas 12
Las células procariotas son estructuralmente simples pero bioquímicamente diversas 12
Las reacciones metabólicas evolucionan 14
Comparando secuencias de DNA se pueden deducir relaciones evolutivas 15
Las cianobacterias pueden fijar CO_2 y N_2 16
Las bacterias pueden realizar la oxidación aeróbica de las moléculas nutritivas 17
Las células eucariotas poseen varios orgánulos característicos 20
Las células eucariotas dependen de las mitocondrias para su metabolismo oxidativo 21
Los cloroplastos son descendientes de una célula procariota incorporada 22
Las células eucariotas contienen una rica dotación de membranas internas 23
Las células eucariotas tienen un citoesqueleto 25
Entre los protozoos se encuentran las células más complejas conocidas 25
En las células eucariotas el material genético está empaquetado de forma compleja 26
Resumen 27

De las células simples a los organismos pluricelulares 27
Las células se pueden asociar formando colonias 28
Las células de un organismo superior se especializan y cooperan 29
La organización pluricelular depende de la cohesión entre las células 32
Las capas de células epiteliales envuelven un medio interno protegido 32
La comunicación célula-célula controla es esquema espacial de los organismos pluricelulares 33
La memoria celular permite el desarrollo de patrones complejos 34
Los programas básicos de desarrollo tienden a ser conservados en la evolución 34
Las células somáticas del cuerpo de los vertebrados muestran más de 200 tipos diferentes de especialización 36
Los genes pueden ser activados y desactivados 37
Comparaciones entre secuencias revelan centenares de familias de genes homólogos 37
Resumen 41

Bibliografía 41

Pequeñas moléculas, energía y síntesis

Capítulo 2

Los componentes químicos de una célula 43
La química celular se basa en los compuestos de carbono 43
Las células utilizan cuatro tipos básicos de moléculas pequeñas 45
Los azúcares son las moléculas alimenticias de la célula 46
Los ácidos grasos son componentes de las membranas celulares 47
Los aminoácidos son las subunidades de las proteínas 48
Los nucleótidos son las subunidades del DNA y del RNA 49
Resumen 62

Orden biológico y energía 62
El orden biológico resulta posible gracias a la liberación de energía calorífica por parte de las células 63
Los organismos fotosintetizadores utilizan la luz solar para sintetizar compuestos orgánicos 63
La energía química pasa de las plantas a los animales 64
Las células obtienen energía mediante la oxidación de moléculas biológicas 65
La degradación de una molécula orgánica se realiza a través de una secuencia de reacciones catalizadas enzimáticamente 66
Parte de la energía liberada en las reacciones de oxidación se acopla a la reacción de formación de ATP 66
La hidrólisis del ATP genera orden en las células 67
Resumen 69

El alimento y la obtención de la energía celular 69
Las moléculas alimenticias son degradadas en tres etapas para producir ATP 69
La glucolisis puede producir ATP incluso en ausencia de oxígeno 70
El NADH es el intermediario central en el catabolismo oxidativo 73

El metabolismo está dominado por el ciclo del ácido cítrico 74
En la fosforilación oxidativa, la transferencia de electrones al oxígeno impulsa la formación de ATP 75
Los aminoácidos y los nucleótidos forman parte del ciclo del N 76
Resumen 77

La biosíntesis y la creación de orden **77**
El cambio de energía libre de una reacción determina si ésta puede producirse o no 77
A menudo las reacciones de biosíntesis están acopladas directamente a la hidrólisis del ATP 78
Las coenzimas intervienen en la transferencia de determinados grupos químicos 80
La estructura de las coenzimas sugiere que se formaron en un mundo de RNA 81
La biosíntesis necesita poder reductor 82
Los polímeros biológicos se sintetizan mediante la repetición de reacciones elementales de deshidratación 84
Resumen 84

Coordinación entre catabolismo y biosíntesis **86**
El metabolismo está organizado y regulado 86
Las vías metabólicas están reguladas a través de cambios de la actividad enzimática 86
Las reacciones catabólicas pueden revertirse mediante un aporte de energía 87
Las enzimas pueden activarse e inhibirse mediante modificaciones covalentes 89
Las reacciones están compartimentadas, tanto dentro de las células como dentro de los organismos 89
Resumen 91

Bibliografía **91**

Macromoléculas: estructura, forma e información

Capítulo **3**

Procesos de reconocimiento molecular **93**
Las interacciones específicas de una macromolécula dependen de enlaces débiles no covalentes 94
Una hélice es un motivo estructural común en las estructuras biológicas generadas a partir de subunidades repetidas 99
La difusión es el primer paso hacia el reconocimiento molecular 99
Los movimientos térmicos unen a las moléculas y luego las separan 99
La constante de equilibrio constituye una medida de la fuerza de interacción entre dos moléculas 100
Los átomos y las moléculas se mueven rápidamente 101
Los procesos de reconocimiento molecular nunca pueden ser perfectos 101
Resumen 102

Ácidos nucleicos **102**
Los genes están formados por DNA 102
Las moléculas de DNA consisten en dos largas cadenas unidas por pares de bases complementarias 103
La estructura del DNA proporciona una explicación del proceso de la herencia 106
Los errores en el proceso de replicación del DNA generan mutaciones 108
La secuencia de nucleótidos de un gen determina la secuencia de aminoácidos de una proteína 108
Porciones de la secuencia de DNA se copian en moléculas de RNA para guiar la síntesis de proteínas 109
Las moléculas de RNA de eucariotas son cortadas y recombinadas, eliminándose secuencias intrón 110
Las secuencias de nucleótidos del mRNA son "leídas" en grupos de tres y traducidas a aminoácidos 111
Las moléculas de tRNA emparejan los aminoácidos con los grupos de nucleótidos 111
El mensaje de RNA se lee de un extremo al otro por un ribosoma 112
Algunas moléculas de RNA actúan como catalizadores 113
Resumen 116

Estructura de las proteínas **116**
La forma de una molécula proteica está determinada por la secuencia de sus aminoácidos 116
Diferentes cadenas proteicas presentan esquemas de plegamiento iguales 119
Las proteínas son moléculas asombrosamente versátiles 120
Las proteínas presentan diferentes niveles de organización estructural 122
Los dominios están formados por cadenas polipeptídicas que se pliegan adelante y atrás, generando delgadas circunvoluciones en la superficie de la proteína 124
De entre la gran cantidad de cadenas polipeptídicas posibles, únicamente un número relativamente pequeño de ellas llegaría a ser útil 125
Normalmente las nuevas proteínas se desarrollan por alteraciones menores de proteínas antiguas 125
Las nuevas proteínas pueden desarrollarse por recombinación de dominios polipeptídicos preexistentes 127
Las homologías estructurales pueden contribuir en la asignación de funciones a las proteínas descubiertas recientemente 129
Las subunidades proteicas pueden ensamblarse formando grandes estructuras 130
Un solo tipo de subunidad proteica puede interaccionar consigo misma formando agregados geométricos regulares 130
A menudo las proteínas superenrolladas colaboran en la construcción de grandes estructuras en las células 131
Las proteínas pueden ensamblarse formando láminas, tubos o esferas 132
Muchas estructuras celulares son capaces de autoensamblarse 132
No todas las estructuras biológicas se forman por autoensamblaje 134
Resumen 135

Las proteínas como catalizadores **135**
La conformación de una proteína determina sus propiedades químicas 135
El primer paso de la catálisis enzimática es la unión del substrato 137
Las enzimas aceleran las reacciones estabilizando determinados estados de transición 138
Las enzimas pueden facilitar la formación y la rotura de enlaces covalentes a través de una catálisis ácida y básica simultánea 139
Además, las enzimas pueden incrementar las velocidades de reacción formando enlaces covalentes intermedios con sus substratos 140
Las enzimas aceleran las reacciones químicas pero no pueden hacerlas energéticamente más favorables 140
Las enzimas pueden determinar el sentido de una vía acoplando determinadas reacciones a la hidrólisis del ATP 141
Los complejos multienzimáticos ayudan a incrementar la velocidad del metabolismo celular 141
Resumen 142

Bibliografía **143**

Cómo se estudian las células

Capítulo 4

Observación de la estructura de las células con el microscopio 147
El microscopio óptico puede resolver detalles situados a 0,2 µm de distancia 149
Para la observación microscópica, normalmente los tejidos son fijados y seccionados 150
Los diferentes componentes de la célula pueden ser teñidos selectivamente 151
Mediante la microscopia de fluorescencia se pueden localizar moléculas en las células de forma específica 152
Las células vivas se pueden observar con nitidez en un microscopio de contraste de fases o de contraste de fases interferencial 153
Mediante técnicas electrónicas las imágenes pueden ser amplificadas y analizadas 154
Gracias al microscopio de barrido confocal es posible obtener imágenes de complejos objetos tridimensionales 155
El microscopio electrónico resuelve la estructura fina de la célula 157
Para poder ser estudiadas al microscopio electrónico, las muestras biológicas requieren una preparación especial 159
Mediante la microscopia electrónica de barrido se pueden obtener imágenes tridimensionales 161
El sombreado metálico permite el examen a alta resolución de detalles superficiales, mediante el microscopio electrónico de transmisión 162
La microscopia electrónica de criofractura y la de grabado por congelación proporcionan una nueva visión del interior celular 162
La tinción negativa y la microscopia crioelectrónica permiten observar macromoléculas a alta resolución 163
Resumen 165

Aislamiento y crecimiento de células en cultivo 166
Las células de un tejido pueden ser aisladas y separadas en diversos tipos celulares 166
Las células pueden cultivarse en una placa de cultivo 167
Los medios definidos químicamente, libres de suero, permiten la identificación de factores de crecimiento específicos 168
Las líneas celulares eucariotas constituyen una fuente ampliamente utilizada para la obtención de células homogéneas 169
Las células pueden fusionarse formando células híbridas 170
Resumen 172

Fraccionamiento de las células y análisis de sus moléculas 172
Los orgánulos y las macromoléculas pueden separarse por ultracentrifugación 172
Los detalles moleculares de los procesos celulares complejos únicamente se pueden descifrar en sistemas libres de células 174
Las proteínas pueden separase mediante cromatografía 176
Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS pueden determinarse el tamaño y la composición de subunidades de una proteína 179
Mediante electroforesis bidimensional sobre gel de poliacrilamida, se pueden resolver más de 1000 proteínas sobre un mismo gel 181
La hidrólisis selectiva de una proteína genera un conjunto característico de fragmentos peptídicos 183
Mediante máquinas automatizadas pueden analizarse secuencias cortas de aminoácidos 184
La difracción de rayos X por cristales de proteína puede revelar la estructura exacta de una proteína 185
También se puede determinar la estructura molecular utilizando espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) 186
Resumen 187

Siguiendo el rastro y cuantificando las moléculas del interior de las células 189
Los átomos radiactivos pueden ser detectados con una gran sensibilidad 189
Los radioisótopos se utilizan para marcar las moléculas en las células y en los organismos y seguirles la pista 190
Las concentraciones de los iones se pueden medir mediante electrodos intracelulares 191
Los cambios rápidos en las concentraciones iónicas intracelulares se pueden medir mediante indicadores emisores de luz 193
Existen diferentes sistemas que permiten introducir moléculas en una célula para las que la membrana celular sea impermeable 194
La activación inducida por la luz de moléculas precursoras "empaquetadas" facilita el estudio de la dinámica intracelular 197
Se pueden utilizar anticuerpos para detectar y aislar moléculas determinadas 197
Las líneas celulares de hibridomas constituyen una fuente permanente de anticuerpos monoclonales 199
Resumen 201

Bibliografía 201

Genética molecular

Parte II

Función de las proteínas

Capítulo 5

Las proteínas como máquinas 207
La unión de un ligando puede cambiar la conformación de una proteína 208
A menudo cuando dos ligandos se unen a la misma proteína, cada uno de ellos afecta la unión del otro 209
Dos ligandos cuyos lugares de unión están acoplados pueden afectar recíprocamente uno la unión del otro 210
Las transiciones alostéricas colaboran en la regulación del metabolismo 210
A menudo las proteínas forman agregados simétricos que sufren transiciones alostéricas cooperativas 212
La transición alostérica de la aspartato transcarbamilasa se conoce a nivel atómico 212

La fosforilación de proteínas es un mecanismo para dirigir transiciones alostéricas en las células eucariotas 214
Una célula eucariota contiene muchas proteína quinasas y fosfatasas 215
La estructura de la proteína quinasa Cdk muestra de qué forma una proteína puede actuar como un microchip 216
Las proteínas que unen e hidrolizan GTP son reguladores celulares ubicuos 218
Otras proteínas controlan la actividad de las proteínas que unen GTP, determinando si se une GDP o GTP 219
La transición alostérica de la proteína EF-Tu muestra de qué manera pequeñas moléculas pueden generar grandes movimientos 219
Proteínas que hidrolizan ATP realizan trabajo mecánico en las células 221
La estructura de la miosina revela de qué forma los músculos generan fuerza 222
Proteínas alostéricas unidas a membrana y dirigidas por ATP pueden actuar como bombas iónicas o trabajar en sentido inverso, sintetizando ATP 223
Las transiciones alostéricas acopladas energéticamente permiten a las proteínas actuar como motores, como relojes, como factores de ensamblaje o como transductores de información 224
A menudo las proteínas forman grandes complejos que actúan como máquinas proteicas 225
Resumen 225

Nacimiento, ensamblaje y muerte de las proteínas 226
Se cree que las proteínas se pliegan a través de un intermediario globular fundido 226
Las chaperonas moleculares facilitan el plegamiento de las proteínas 227
Muchas proteínas contienen series de moléculas plegadas de forma independiente 229
Los módulos confieren versatilidad y a menudo median las interacciones proteína-proteína 230
Las proteínas pueden unirse unas a otras a través de diferentes tipos de interfases 231
La conexión y la proteolisis selectiva aseguran los ensamblajes del tipo todo o nada 231
La proteolisis dependiente de ubiquitina es la responsable principal del recambio proteico selectivo en los eucariotas 232
La vida media de una proteína puede ser determinada por enzimas que alteran su extremo N 234
Resumen 235

Bibliografía 235

Mecanismos genéticos básicos

Capítulo **6**

Síntesis de RNA y de proteínas 237
La RNA polimerasa copia el DNA a RNA: el proceso de la transcripción del DNA 238
Sólo se utilizan zonas seleccionadas de un cromosoma para producir moléculas de RNA 241
Las moléculas de RNA de transferencia actúan como adaptadores que traducen secuencias de nucleótidos a secuencias de proteína 242
Unas determinadas enzimas acoplan cada aminoácido con su molécula apropiada de tRNA 243
Los aminoácidos se van añadiendo al extremo carboxilo terminal de una cadena polipeptídica en crecimiento 244
El código genético es degenerado 245
Los acontecimientos de la síntesis proteica están catalizados sobre el ribosoma 246
El ribosoma se desplaza, paso a paso, a lo largo de la cadena de mRNA 247
Cuando se alcanza uno de los tres tipos de codón de terminación, la cadena proteica se libera del ribosoma 249
El proceso de iniciación establece la pauta de lectura para la síntesis proteica 249
En células eucariotas, normalmente sólo se sintetiza un tipo de cadena polipeptídica sobre cada molécula de mRNA 252
La unión de varios ribosomas a una misma molécula de mRNA genera polirribosomas 253
En los eucariotas, la velocidad general de síntesis de proteínas está controlada por factores de iniciación 254
La fidelidad de la síntesis de proteínas está incrementada gracias a dos procesos independientes de corrección de galeradas 254
Muchos inhibidores de la síntesis de proteínas en procariotas resultan útiles como antibióticos 255
¿Cómo evolucionó el proceso de la síntesis de proteínas? 257
Resumen 257

Mecanismos de reparación del DNA 258
Las secuencias de DNA se mantienen con un elevado grado de fidelidad 258
Las frecuencias de mutación observadas en células proliferativas son consistentes con los valores evolutivos estimados 259
La mayoría de mutaciones de las proteínas resultan perjudiciales y son eliminadas por selección natural 259
Para que exista la vida tal como la conocemos, es necesario que se den estas bajas frecuencias de mutación 260
El hecho de que las frecuencias de mutación sean bajas significa que los organismos relacionados han de estar formados esencialmente por las mismas proteínas 260
Si no fueran corregidas, las alteraciones espontáneas del DNA podrían cambiar rápidamente las secuencias del DNA 261
La estabilidad de los genes depende de la reparación del DNA 263
Las alteraciones del DNA pueden ser eliminadas por más de una vía 263
Las células pueden producir enzimas de reparación de DNA en respuesta a las alteraciones del DNA 266
La estructura y las propiedades químicas de la doble hélice del DNA hacen que sea fácil de reparar 266
Resumen 268

Mecanismos de replicación del DNA 268
Tal como ocurre para el proceso de reparación del DNA, el fundamento del proceso de replicación es el apareamiento de bases 268
La horquilla de replicación del DNA es asimétrica 269
El elevado grado de fidelidad del mecanismo de replicación del DNA requiere la existencia de una mecanismo de "corrección de galeradas" 270
Sólo la replicación del DNA en dirección 5' a 3' permite la existencia de un eficiente procesos de corrección de errores 271
Una enzima especial que polimeriza nucleótidos sintetiza cortas moléculas cebadoras de RNA sobre la cadena retrasada 272
Unas proteínas especiales ayudan a abrir la doble hélice del DNA por delante de la horquilla de replicación 273
Una molécula de DNA polimerasa móvil se mantiene unida al DNA mediante un anillo deslizante 273
En la horquilla de replicación, una serie de proteínas cooperan entre sí formando una "máquina de replicación" 275
Un sistema de corrección de galeradas que elimina los errores de replicación producidos por la máquina de replicación 276

Las horquillas de replicación se inician en el origen 277
Las DNA topoisomerasas evitan que el DNA se enrede durante la replicación 278
La replicación del DNA en los eucariotas es básicamente similar a la de los procariotas 280
Resumen 280

Recombinación genética **281**
La recombinación general está guiada por interacciones de apareamiento de bases entre cadenas complementarias de dos moléculas homólogas de DNA 282
La recombinación general puede iniciarse en una muesca de una cadena de la doble hélice de DNA 283
Las reacciones de hibridación del DNA proporcionan un modelo sencillo para la fase de apareamiento de bases en la recombinación general 284
La proteína RecA permite a una molécula de una sola cadena de DNA aparearse con una región homóloga de una doble hélice en *E. coli* 285
La recombinación genética general habitualmente supone un intercambio cruzado de cadenas o entrecruzamiento 287
La conversión génica se produce combinando procesos de recombinación general y de síntesis limitada de DNA 287
Los mecanismos de corrección de errores pueden evitar la recombinación genética promiscua entre dos secuencias de DNA mal apareadas 288
Enzimas de recombinación específica de lugar ponen y quitan del genoma secuencias especiales de DNA 289
La recombinación transposicional puede insertar un elemento genético móvil en cualquier secuencia de DNA 291
Resumen 292

Virus, plásmidos y elementos genéticos transponibles **293**
Los virus son elementos genéticos móviles 293
La cubierta exterior de un virus puede ser una cápside proteica o una envoltura membranosa 294
Los genomas víricos se presentan en una gran variedad de formas víricas y pueden ser tanto de DNA como de RNA 294
Los cromosomas víricos codifican enzimas implicadas en la replicación de su ácido nucleico 296
Tanto los virus RNA como los virus DNA se replican mediante la formación de cadenas complementarias 297
Los virus utilizan la maquinaria de tráfico intracelular de sus células huésped 298
Diferentes virus recubiertos geman a partir de diferentes membranas celulares 300
Los cromosomas víricos pueden integrarse en los cromosomas del huésped 301
La síntesis continuada de algunas proteínas víricas puede transformar a las células en cancerosas 301
Los virus tumorales RNA son retrovirus 302
El virus del SIDA es un retrovirus 304
Algunos elementos transponibles están estrechamente relacionados con los retrovirus 305
Otros elementos transponibles se transfieren directamente a sí mismos desde un lugar a otro del genoma 305
Probablemente la mayoría de los virus evolucionaron a partir de plásmidos 306
Resumen 307

Bibliografía **308**

Tecnología del DNA recombinante

Capítulo **7**

Fragmentación, separación y secuenciación de moléculas de DNA **314**
Las endonucleasas de restricción cortan las moléculas de DNA en secuencias nucleotídicas específicas 315
Los mapas de restricción muestran la distribución de pequeñas secuencias nucleotídicas a lo largo del cromosoma 315
Las moléculas de DNA de diferentes tamaños pueden separarse mediante la electroforesis en gel 317
Las moléculas purificadas de DNA pueden ser marcadas *in vitro* con radioisótopos o con marcadores químicos 318
Los fragmentos aislados de DNA pueden ser rápidamente secuenciados 319
Las huellas del DNA revelan los lugares donde las proteínas se unen a la molécula de DNA 320
Resumen 322

Hibridación de ácidos nucleicos **322**
La hibridación de ácidos nucleicos proporciona un método sensible para la detección de secuencias determinadas de nucleótidos 323
Las transferencias Northern y Southern facilitan la hibridación con moléculas de ácidos nucleicos separadas electroforéticamente 324
El análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) facilita el análisis genético de los grandes genomas 326
Las moléculas sintéticas de DNA facilitan el diagnóstico prenatal de enfermedades genéticas 327
La hibridación poco rigurosa permite identificar genes relacionados de forma indirecta 329
Las técnicas de hibridación *in situ* permiten localizar secuencias específicas de ácidos nucleicos en los cromosomas y en las células 330
Resumen 331

Clonaje de DNA **331**
Se puede construir una librería de DNA utilizando vectores víricos o vectores plasmídicos 332
Dos tipos de librerías de DNA cubren diferentes propósitos 333
Los clones cDNA contienen secuencias codificantes continuas 334
Pueden preparse librerías cDNA a partir de poblaciones seleccionadas de moléculas de mRNA 335
Para identificar los clones de interés en una librería de DNA puede utilizarse tanto una sonda DNA como un ensayo para la proteína expresada 335
La traducción *in vitro* facilita la identificación del clon de DNA correcto 337
La selección de clones DNA solapados permite "caminar" sobre el cromosoma hasta un gen vecino de interés 337
Se están construyendo librerías genómicas de clones ordenados para organismos seleccionados 339
El clonaje posicional de DNA revela la presencia de genes de funciones imprevistas 340
Mediante una reacción de polimerización en cadena se pueden clonar segmentos de DNA en un tubo de ensayo 340
Resumen 341

Ingeniería de DNA **342**
Se pueden construir moléculas de DNA de cualquier secuencia uniendo fragmentos de DNA 343
Es posible producir grandes cantidades de moléculas de RNA homogéneas mediante transcripción de DNA *in vitro* 343
Utilizando vectores de expresión es posible producir grandes cantidades de proteínas celulares minoritarias 344
Los genes marcadores permiten analizar la función de las secuencias de DNA reguladoras 345
Los organismos mutantes revelan mejor la función de un gen 345

Pueden fabricarse "a medida" células y organismos que contengan genes alterados 347
Los genes se pueden rediseñar para que produzcan proteínas de cualquier secuencia que se desee 347
Habitualmente las proteínas de fusión son de gran utilidad para analizar la función proteica 348
Los genes normales son fácilmente reemplazables por mutantes, tanto en bacterias como en algunos eucariotas inferiores 349
Genes desarrollados por ingeniería genética pueden crear mutaciones dominantes específicas en los organismos diploides 350
Genes sometidos a ingeniería genética se pueden insertar de forma permanente en la línea germinal de un ratón o de la mosca del vinagre, produciendo animales trangénicos 351
El direccionamiento génico hace posible obtener ratones transgénicos que carecen de determinados genes 353
Las plantas transgénicas son importantes tanto para la biología celular como para la agricultura 355
Resumen 356

Bibliografía **356**

El núcleo célular

Capítulo **8**

El DNA cromosómico y su empaquetamiento **361**
Cada molécula de DNA que forma un cromosoma ha de contener un centrómero, dos telómeros y varios orígenes de replicación 361
La mayor parte del DNA cromosómico no codifica proteínas esenciales ni RNA 363
Cada gen produce una molécula de RNA 364
La comparación entre secuencias de DNA de organismos relacionados permite diferenciar entre regiones de DNA de secuencia conservada y no conservada 366
Las histonas son las principales proteínas estructurales en los cromosomas eucariotas 366
La asociación de las histonas con el DNA conduce a la formación de los nucleosomas, las partículas unitarias de la cromatina 367
La posición de los nucleosomas en el DNA viene determinada por la tendencia del DNA a formar bucles estrechos y por la presencia de otras proteínas de unión al DNA 368
Habitualmente los nucleosomas se empaquetan con la histona H1 formando estructuras regulares de orden superior 369
Resumen 370

La estructura global de los cromosomas **371**
Los cromosomas plumulados contienen bucles de cromatina descondensada 371
También se pueden apreciar dominios estructurales organizados en la cromatina interfásica en los cromosomas politénicos 373
Los diferentes dominios de la cromatina de los cromosomas politénicos pueden empaquetarse y desempaquetarse como una unidad 374
Es probable que tanto las bandas como las interbandas de los cromosomas politénicos contengan genes 375
La cromatina está menos condensada en las regiones que son transcripcionalmente activas 376
La cromatina activa es bioquímicamente diferente 377
La heterocromatina está muy condensada y es transcripcionalmente inactiva 378
Los cromosomas mitóticos están formados por cromatina en su forma más condensada 378
Cada uno de los cromosomas mitóticos presenta un patrón característico de grandes dominios estructurales 380
Resumen 381

Replicación del cromosoma **382**
Secuencias específicas de DNA actúan como orígenes de replicación 382
Un sistema eucariota libre de células replica el cromosoma de un virus de simio 383
Los orígenes de replicación de los cromosomas eucariotas se activan en grupos 384
Regiones distintas del mismo cromosoma se replican en diferente momento 385
La cromatina muy condensada se replica tardíamente en la fase S, mientras que la cromatina activa se replica temprano 386
Las unidades de replicación tardías coinciden con las bandas ricas en A-T en los cromosomas metafásicos 386
El patrón ordenado de activación de los orígenes de replicación puede contribuir a la memoria de la célula 387
Factores unidos a la cromatina aseguran que cada región del DNA sólo se replique una vez 388
A medida que el DNA se replica, se van ensamblando nuevas histonas en la cromatina 389
Los telómeros son secuencias cortas, repetidas, ricas en G, que se añaden al extremo de los cromosomas por acción de la telomerasa 389
Resumen 390

Síntesis y procesamiento del RNA **391**
Las RNA polimerasas intercambian subunidades cuando inician cada cadena de RNA 392
En las células eucariotas, el RNA sintetiza por tres RNA polimerasas diferentes 393
La RNA polimerasa II transcribe algunas secuencias de DNA mucho más frecuentemente que otras 393
Los precursores de los RNA mensajeros son modificados covalentemente en sus dos extremos 395
El procesamiento del RNA elimina largas secuencias nucleotídicas del interior de las moléculas de RNA 397
Los transcritos hnRNA son inmediatamente recubiertos por proteína y snRNP 398
Las secuencias intrónicas se eliminan de las moléculas de RNA en forma de lazo 400
Habitualmente de cada transcrito de RNA se eliminan muchas secuencias intrónicas 401
El estudio de la talasemia revela de qué forma la maduración del RNA puede permitir que las proteínas evolucionen 402
Probablemente la maduración del RNA catalizada por el espliceosoma evolucionó a partir de mecanismos de automaduración 403
El transporte de los mRNA al citoplasma se retrasa hasta que la maduración se ha completado 404
Los RNA ribosómicos y los RNA de transferencia se sintetizan sobre conjuntos de genes idénticos dispuestos en tándem 405
El nucléolo es una máquina productora de ribosomas 407
El nucléolo es un subcompartimiento nuclear muy organizado 408
Después de cada mitosis, el nucléolo se ensambla de nuevo en determinados cromosomas 409
Los cromosomas ocupan territorios discretos en el núcleo interfásico 410
¿Está muy ordenado el núcleo? 411
Resumen 412

Organización y evolución del genoma nuclear **413**
Los genomas se van ajustando de forma precisa por mutaciones puntuales y se remodelan radicalmente o aumentan de tamaño por recombinación genética 413
Las secuencias repetidas en tándem de DNA tienden a permanecer inalteradas 414
La evolución de la familia de los genes de la globina muestra que las duplicaciones al azar contribuyen a la evolución de los organismos 415
Los genes que codifican nuevas proteínas se pueden crear mediante la recombinación de exones 417
La mayoría de las proteínas se han originado probablemente a partir de genes altamente fragmentados 417
Una fracción mayoritaria del DNA de los eucariotas superiores está formada por secuencias de nucleótidos repetidas y no codificantes 419
Las secuencias de DNA satélite no tienen ninguna función conocida 420
La evolución de los genomas se ha acelerado mediante al menos tres tipos de elementos transponibles 421
Los elementos transponibles afectan frecuentemente a la regulación génica 422
Las "explosiones de transposición" provocan cambios catastróficos en los genomas e incrementan la diversidad biológica 423
Aproximadamente un diez por ciento del genoma humano consiste en dos familias de elementos transponibles 423
Resumen 424

Bibliografía **424**

El control de la expresión génica

Capítulo **9**

Introducción al control génico **429**
Los distintos tipos celulares de un organismo pluricelular contienen el mismo DNA 429
Distintos tipos celulares sintetizan distintos conjuntos de proteínas 430
Un célula puede cambiar la expresión de sus genes como respuesta a señales externas 431
La expresión génica se puede regular en muchas de las etapas de la vía que conduce desde el DNA al RNA y a las proteínas 431
Resumen 432

Motivos estructurales de unión a DNA en las proteínas de regulación génica **432**
Las proteínas de regulación génica se descubrieron utilizando técnicas de genética bacteriana 432
El exterior de la hélice de DNA puede ser leído por proteínas 433
La geometría de la doble hélice de DNA depende de la secuencia de nucleótidos 433
Secuencias cortas de DNA son componentes fundamentales de los interruptores genéticos 435
Las proteínas de regulación génica contienen motivos estructurales que pueden leer secuencias de DNA 435
El motivo hélice-giro-hélice es uno de los motivos de unión a DNA más simples y comunes 437
Las proteínas de homeodominios son una clase especial de proteínas hélice-giro-hélice 438
Existen diferentes tipos de motivos de unión a DNA en forma de dedos de zinc 439
Las láminas β también pueden reconocer el DNA 440
El motivo cremallera de leucina está implicado tanto en el reconocimiento del DNA como en la dimerización 440
El motivo hélice-bucle-hélice también está implicado en la dimerización y la unión al DNA 442
Aún no es posible predecir la secuencia de DNA que es reconocida por una proteína reguladora 442
Un ensayo de movilidad en gel permite detectar con gran facilidad proteínas que se unen a una secuencia específica de DNA 443
La cromatografía de afinidad de DNA facilita la purificación de proteínas de unión a secuencias específicas de DNA 444
Resumen 445

Cómo funcionan los interruptores genéticos **445**
El represor de triptófano es un interruptor simple que activa y desactiva genes en bacterias 446
Los activadores transcripcionales activan los genes 447
Un activador transcripcional y un represor transcripcional controlan el operón *lac* 448
La regulación de la transcripción en las células eucariotas es compleja 449
Las RNA polimerasas eucariotas requieren factores de transcripción generales 450
Los incrementadores o activadores controlan los genes a distancia 451
Una región de control eucariota está formada por un promotor y por las secuencias de DNA reguladoras 452
Muchas proteínas activadoras aceleran el ensamblaje de los factores generales de transcripción 453
Las proteínas represoras pueden inhibir la transcripción de diferentes formas 454
Las proteínas reguladoras de genes de células eucariotas frecuentemente se ensamblan formando pequeños complejos sobre el DNA 454
Los complejos interruptores genéticos que regulan el desarrollo de *Drosophila* están formados por módulos menores 456
El gen *eve* de *Drosophila* está regulado por controles combinatorios 457
En mamíferos las regiones de control también están formadas a partir de módulos reguladores sencillos 458
A su vez, la actividad de una proteína de regulación génica puede estar regulada 459
Las bacterias utilizan subunidades intercambiables de la RNA polimerasa para colaborar en el control de la transcripción génica 460
Los interruptores genéticos han evolucionado gradualmente 461
Resumen 461

Estructura de la cromatina y el control de la expresión génica **462**
La transcripción del DNA que está empaquetado en nucleosomas se puede activar 463
Algunas formas de la cromatina impiden la transcripción 463
Antes de que los genes de globina de mamífero puedan transcribirse, puede ser necesaria una etapa de descondensación 465
No se conocen los mecanismos que forman la cromatina activa 466
La tensión superhelicoidal del DNA permite la acción a distancia 467
Resumen 469

Mecanismos genéticos que originan tipos celulares especializados **469**
Los cambios de fase de las bacterias son provocados por reorganizaciones del DNA 469

En levaduras, algunas proteínas reguladoras determinan la identidad del tipo celular 470
Dos proteínas fágicas que se reprimen mutuamente su síntesis determinan el estado del bacteriófago lambda 472
La expresión de una proteína reguladora crítica puede disparar la expresión de una batería de genes situados por debajo (en dirección 3') 474
El control génico combinatorio es la norma en los eucariotas 475
Se hereda un cromosoma X inactivo 476
Los genes de *Drosophila* y de levadura también pueden inactivarse por características hereditarias de su estructura cromatínica 478
Cuando las células de vertebrados se dividen, pueden heredar el patrón de metilación del DNA 479
En las células de los vertebrados la metilación del DNA refuerza las decisiones del desarrollo 480
La actividad genómica heredable requiere metilación del DNA 481
En los mamíferos, las islas ricas en CG están asociadas con alrededor de 40 000 genes 482
Resumen 483

Controles post-transcripcionales **484**
La atenuación de la transcripción causa una terminación temprana de algunas moléculas de RNA 484
La maduración alternativa del RNA puede producir diferentes formas de proteína a partir de un mismo gen 484
La determinación del sexo en *Drosophila* depende de una serie de procesos de maduración alternativa regulada del RNA 485
Un cambio en el punto de rotura del transcrito de RNA y la adición de poli-A puede cambiar el extremo carboxilo terminal de una proteína 486
La definición de gen se ha de modificar debido al descubrimiento de la maduración alternativa del RNA 487
El transporte de RNA desde el núcleo puede ser regulado 488
Algunos RNA están localizados en regiones específicas del citoplasma 489
La edición del RNA puede cambiar el sentido del mensaje del RNA 490
Las células eucariotas y procariotas utilizan estrategias diferentes para especificar el lugar de inicio de la traducción en una molécula de mRNA 492
La fosforilación de un factor de iniciación regula la síntesis de proteínas 493
Las proteínas que se unen a la región 5' líder de los mRNA intervienen en el control traduccional negativo 494
La expresión génica puede estar controlada por variaciones de la estabilidad del mRNA 495
La degradación selectiva del mRNA está acoplada a la traducción 496
El control citoplasmático de la longitud de las cadenas de poli-A pueden afectar tanto la traducción como la estabilidad del mRNA 497
Algunos mRNA contienen señales de reconocimiento que interrumpen el proceso normal de la traducción 498
Es muy probable que las reacciones catalizadas por RNA tengan un origen muy antiguo 499
Resumen 499

Bibliografía **500**

Organización interna de la célula

Parte **III**

Estructura de la membrana

Capítulo **10**

La bicapa lipídica **510**
Los lípidos de las membranas son moléculas anfipáticas que espontáneamente forman bicapas 510
La bicapa lipídica es un fluido bidimensional 511
La fluidez de una bicapa lipídica depende de su composición 513
La bicapa lipídica es asimétrica 514
En la superficie de todas las membranas plasmáticas hay glucolípidos 516
Resumen 517

Proteínas de membrana **517**
Las proteínas de membrana pueden estar asociadas a la bicapa lipídica de varias maneras 518
Se considera que, en la mayoría de proteínas transmembrana, las regiones de la cadena polipeptídica que cruzan la bicapa lipídica presentan una conformación en hélice α 519
Las proteínas de membrana pueden solubilizarse y purificarse mediante detergentes 521
El lado citoplasmático de las proteínas de membrana se puede estudiar en "fantasmas" de eritrocito 522
La espectrina es una proteína del citoesqueleto asociada no covalentemente a la cara citoplasmática de la membrana del eritrocito 524
La glucoforina atraviesa la bicapa lipídica del glóbulo rojo, formando una hélice α sencilla 526
La banda 3 de la membrana celular del eritrocito es una proteína de membrana multipaso que cataliza el cotransporte aniónico 527
La bacteriorrodopsina es una bomba de protones que atraviesa la bicapa en forma de siete hélices α 528
Las porinas son proteínas transmembrana formadoras de canales que cruzan la membrana en forma de un barril β 530
Las proteínas de membrana actúan a menudo como grandes complejos 531
Muchas proteínas de membrana difunden en el plano de la membrana 531
Las células pueden confinar a lípidos y a proteínas en dominios específicos de la membrana 534
La superficie celular está recubierta con residuos de azúcar 535
Las selectinas son proteínas de membrana que se unen a carbohidratos de la superficie celular y que median adhesiones celulares transitorias en el torrente sanguíneo 536
Resumen 538

Bibliografía **538**

Transporte de moléculas pequeñas a través de la membrana y base iónica de la excitabilidad de la membrana

Capítulo **11**

Principios de transporte a través de membrana **542**

Las bicapas lipídicas libres de proteína son altamente impermeables a los iones 542

Existen dos clases principales de proteínas de transporte a través de membrana: proteínas transportadoras y proteínas de canal 543

El transporte activo está mediado por proteínas transportadoras acopladas a una fuente energética 543

La tecnología del DNA recombinante ha revolucionado el estudio de las proteínas de transporte a través de membrana 544

Se pueden utilizar ionóforos como herramientas para incrementar la permeabilidad de las membranas a determinados iones 545

Resumen 546

Proteínas transportadoras y transporte activo a través de membrana **547**

La bombas Na^+-K^+ de la membrana plasmática es una ATPasa 548

La ATPasa de Na^+-K^+ es necesaria para mantener el equilibrio osmótico y estabilizar el volumen celular 550

Algunas bombas de Ca^{2+} también son ATPasas unidas a membrana 551

Algunas enzimas ligadas a membrana que sintetizan ATP son ATPasas de transporte que actúan en sentido opuesto 553

El transporte activo puede ser impulsado por gradientes iónicos 553

Las proteínas de transporte impulsado por Na^+ de la membrana plasmática regulan el pH citosólico 554

En las células epiteliales, la distribución asimétrica de proteínas transportadoras permite el transporte transcelular de solutos 555

Algunas ATPasas transportadoras de membrana son homólogas a las ATPasas transportadoras de eucariotas, que participan en la resistencia a drogas y en la fibrosis quística: la superfamilia de transportadores ABC 555

Resumen 558

Canales iónicos y propiedades eléctricas de las membranas **558**

Los canales iónicos son selectivos para el ion y fluctúan entre estados abiertos y cerrados 559

El potencial de membrana de las células animales depende principalmente de los canales de fuga de K^+ y del gradiente de K^+ a través de la membrana plasmática 560

Cuando se para la bomba de Na^+-K^+, el potencial de reposos sólo decae lentamente 561

La función de una célula nerviosa depende de su estructura alargada 563

Los canales iónicos regulados por voltaje son los responsables de la generación de potenciales de acción en células excitables eléctricamente 565

La mielinización incrementa la velocidad y la eficiencia de la propagación de los potenciales de acción en las células nerviosas 567

El registro de zona indica que cada uno de los canales de Na^+ se abre siguiendo la ley del todo o nada 567

Los canales catiónicos regulados por voltaje están relacionados evolutiva y estructuralmente 570

En las sinapsis químicas los canales iónicos regulados por transmisor transforman señales químicas en señales eléctricas 572

Las sinapsis químicas pueden ser excitadoras o inhibidoras 573

Los receptores de acetilcolina de las uniones neuromusculares son canales catiónicos regulados por transmisor 574

Los canales iónicos regulados por transmisor son las dianas principales de la acción de drogas psicoactivas 575

La transmisión neuromuscular implica la activación secuencial de al menos cuatro grupos de canales iónicos regulados 577

El potencial postináptico principal de una neurona representa la suma espacial y temporal de muchos pequeños potenciales postsinápticos 578

La integración neuronal requiere la combinación de al menos tres tipos de canales de K^+ diferentes 580

La potenciación a largo plazo en el hipocampo de los mamíferos depende de la entrada de Ca^{2+} a través de canales receptores NMDA 582

Resumen 584

Bibliografía **585**

Compartimientos intracelulares y clasificación de proteínas

Capítulo **12**

La compartimentación de las células superiores **589**

Todas las células eucariotas tienen la misma colección básica de orgánulos rodeados de membrana 589

La relación topológica de los orgánulos rodeados de membrana puede ser interpretada en términos de sus orígenes evolutivos 592

Las proteínas pueden desplazarse entre compartimientos de diferentes maneras 594

Los péptidos señal y la región señal determinan el destino celular correcto de las proteínas 596

Las células no pueden construir *de novo* sus orgánulos rodeados de membrana: necesitan información del propio orgánulo 597

Resumen 599

El transporte de moléculas hacia dentro y hacia fuera del núcleo **599**

Los poros nucleares atraviesan la envoltura nuclear 600

Unas señales de localización nuclear dirigen las proteínas nucleares hacia el núcleo 601

Las macromoléculas son transportadas activamente hacia dentro y hacia fuera del núcleo a través de los poros nucleares 603

La envoltura nuclear se desorganiza durante la mitosis 604

El transporte entre el núcleo y el citosol puede ser regulado evitando el acceso a la maquinaria transportadora 605

Resumen 606

El transporte de proteínas al interior de mitocondrias y de cloroplastos **607**

La translocación hacia la matriz mitocondrial depende de una señal típica de la matriz 607

La translocación hacia la matriz mitocondrial depende del gradiente electroquímico a través de la membrana interna y de la hidrólisis de ATP 608

Las proteínas mitocondriales son importadas hacia la matriz mediante un proceso de dos etapas, a través de lugares de contacto que unen las membranas externa e interna 609
Las proteínas son importadas hacia el interior de la matriz mitocondrial, en un estado desplegado 610
La unión secuencial de las proteínas importadas a las proteínas mitondriales hsp70 y hsp60 impulsa su translocación y ayuda al plegamiento proteico 611
El transporte de proteínas al espacio intermembrana mitocondrial requiere dos señales 611
Para dirigir el transporte de proteínas a la membrana tilacoidal de los cloroplastos se necesita la participación de dos péptidos señal 612
Resumen 613

Peroxisomas **614**
Los peroxisomas utilizan el oxígeno molecular y el peróxido de hidrógeno para realizar reacciones oxidativas 614
Una corta secuencia señal dirige la importación de proteínas hacia los peroxisomas 616
Resumen 616

El retículo endoplasmático **617**
Los ribosomas adheridos a las membranas definen el ER rugoso 617
El ER liso es abundante en algunas células especializadas 618
Las regiones lisas del ER pueden separarse de las rugosas mediante centrifugación 620
Los péptidos señal fueron descubiertos por primera vez en proteínas importadas al ER 622
Una partícula de reconocimiento de señal (SRP) dirige los péptidos señal para el ER a un receptor específico de la membrana del ER 623
La translocación a través de la membrana del ER no siempre requiere que se esté produciendo el crecimiento de la cadena polipeptídica 623
La cadena polipeptídica pasa a través de un poro acuoso en el aparato de translocación 624
El péptido señal del ER es eliminado de la mayoría de proteínas solubles después de la translocación 625
En las proteínas transmembrana de un solo paso, un péptido señal interno permanece en la bicapa lipídica como una hélice α que atraviesa la membrana 626
Combinaciones de señales de inicio y de paro de transferencia determinan la topología de las proteínas transmembrana de multipaso 627
Las cadenas polipeptídicas translocadas se pliegan y se ensamblan en el lumen del ER rugoso 629
La mayoría de proteínas sintetizadas en el ER rugoso son glucosiladas por la adición de un *N*-oligosacárido común 630
Algunas proteínas de membrana, poco después de entrar en el ER, intercambian un cola transmembrana carboxilo terminal por un glucosilfosfatidilinositol (GPI) unido de forma covalente 632
La mayoría de las bicapas lipídicas de membrana son ensambladas en el ER 633
Las proteínas de intercambio de fosfolípidos pueden transportar fosfolípidos desde el ER a las mitocondrias y a los peroxisomas 634
Resumen 635

Bibliografía **636**

Tráfico vesicular mediante las rutas secretora y endocítica

Capítulo **13**

Transporte desde el ER al complejo de Golgi **642**
El complejo de Golgi está formado por una serie de compartimientos ordenados 643
Las proteínas residentes en el ER son selectivamente recuperadas de la red del *cis* Golgi 644
Las proteínas del Golgi vuelven al ER cuando las células se tratan con la droga brefeldina A 645
En el complejo de Golgi se procesan las cadenas de oligosacárido 646
Las cisternas del Golgi están organizadas en forma de series secuenciales de compartimientos de procesamiento 647
Los proteoglucanos son ensamblados en el complejo de Golgi 649
Los carbohidratos de las membranas celulares se encuentran en la cara de la membrana que es topológicamente equivalente al exterior de la células 650
¿Cuál es el propósito de la glucosilación? 650
Resumen 652

Transporte desde la red del *trans* Golgi a los lisosomas **652**
Los lisosomas son el lugar principal de digestión intracelular 652
Los lisosomas son heterogéneos 654
Las vacuolas de las plantas y de los hongos son lisosomas muy versátiles 654
Los materiales son transportados hasta los lisosomas a través de varias rutas 656
Algunas proteínas citosólicas son transportadas directamente a los lisosomas para ser degradadas 656
Las enzimas lisosomales son clasificadas en la red del *trans* Golgi por un receptor proteico unido a membrana que reconoce la manosa 6-fosfato 657
El receptor de manosa 6-fosfato viaja como una lanzadera, adelante y atrás, entre determinadas membranas 658
Una región señal en la cadena polipeptídica proporciona la clave para marcar una enzima lisosomal con la manosa 6-fosfato 659
Los defectos en la GlcNAc-fosfotransferasa causan una enfermedad de acúmulo lisosomal en humanos 659
Resumen 660

Transporte desde la membrana plasmática vía endosomas: endocitosis **661**
Células fagocíticas especializadas pueden ingerir grandes partículas 661
Las vesículas de pinocitosis se forman en la membrana plasmática a partir de depresiones revestidas 662
Las depresiones revestidas de clatrina pueden actuar como un mecanismo concentrador internalizando macromoléculas extracelulares específicas 663
Las células importan colesterol por endocitosis mediada por receptor 664
El material endocitado termina frecuentemente en los lisosomas 665
Determinadas proteínas son recuperadas de los endosomas tempranos y devueltas a la membrana plasmática 666
La relación entre endosomas tempranos y tardíos es incierta 668
Las macromoléculas pueden ser transferidas a través de las láminas de células epiteliales mediante transcitosis 668
Las células epiteliales tienen dos compartimientos endosomales tempranos distintos pero un solo compartimiento endosomal tardío común 669
Resumen 669

Transporte desde la red del *trans* Golgi hasta la superficie celular: exocitosis **670**
Parece que muchas proteínas y lípidos son transportados automáticamente desde el ER y el complejo de Golgi a la superficie celular 670

Las vesículas de secreción emergen por gemación desde la red del *trans* Golgi 671
A menudo las proteínas son procesadas proteolíticamente durante la formación de las vesículas de secreción 672
Las vesículas de secreción permanecen cerca de la membrana plasmática hasta que una señal les hace liberar su contenido 673
La exocitosis regulada es una respuesta localizada de la membrana plasmática y del citoplasma subyacente 674
Los componentes de la membrana de las vesículas de secreción se reciclan 674
Las vesículas sinápticas se forman a partir de los endosomas 675
Las células polarizadas dirigen las proteínas desde la red del *trans* Golgi hasta el dominio apropiado de la membrana plasmática 675
Resumen 677

Mecanismos moleculares del transporte vesicular y mantenimiento de la diversidad de compartimientos 678
El mantenimiento de las diferencias entre compartimientos requiere un aporte de energía libre 678
Existe más de un tipo de vesículas revestidas 679
El ensamblaje del revestimiento de clatrina conduce a la formación de la vesícula 680
Las adaptinas reconocen proteínas transmembrana específicas y las unen al revestimiento de clatrina 684
Las vesículas revestidas de coatómero median el transporte vesicular no selectivo 685
El transporte vesicular depende de proteínas reguladoras que unen GTP 686
Parece que ARF señaliza el ensamblaje y el desensamblaje del revestimiento de coatómero 686
Marcadores proteicos de orgánulo, llamados SNARE, colaboran en la dirección del transporte de vesículas 687
Se cree que las proteínas Rab aseguran la especificidad de la unión de las vesículas 688
La fusión de vesículas está catalizada por una "maquinaria de fusión de membrana" 689
La proteína de fusión de membrana mejor caracterizada está sintetizada por un virus 690
Resumen 691

Bibliografía 692

Conversión energética: mitocondrias y cloroplastos

Capítulo **14**

La mitocondria 699
La mitocondria presenta una membrana externa y una membrana interna que define dos compartimientos internos 700
La oxidación mitocondrial empieza cuando se generan grandes cantidades de acetil CoA a partir de piruvato y de ácidos grasos en el espacio de la matriz 702
El ciclo del ácido cítrico oxida el grupo acetilo del acetil CoA, generando NADH y $FADH_2$ para la cadena respiratoria 705
En la membrana mitocondrial interna, un proceso quimiosmótico convierte la energía de oxidación en ATP 706
Los electrones son transferidos desde el NADH hasta el oxígeno, a través de tres grandes complejos enzimáticos respiratorios 708
La energía liberada por el paso de los electrones a lo largo de la cadena respiratoria se almacena en forma de gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna 710
La energía almacenada en el gradiente electroquímico de protones se utiliza para producir ATP y para transportar metabolitos e iones inorgánicos hacia el espacio de la matriz 710
La rápida conversión de ADP en ATP en las mitocondrias mantiene una elevada relación ATP-ADP en las células 711
La diferencia entre ΔG° y ΔG: para que la hidrólisis de ATP sea útil para la célula es necesario que tenga un valor muy negativo de ΔG 712
La respiración celular es notablemente eficiente 716
Resumen 716

La cadena respiratoria y la ATP sintasa 717
A partir de las mitocondrias se pueden aislar partículas invertidas funcionales 717
La ATP sintasa puede ser purificada y de nuevo incorporada a las membranas 717
La ATP sintasa puede funcionar de manera reversible, hidrolizando ATP y bombeando H^+ 719
La cadena respiratoria bombea H^+ a través de la membrana mitocondrial interna 720
Se han utilizado métodos espectroscópicos para identificar muchos transportadores de electrones de la cadena respiratoria 720
La cadena respiratoria contiene tres grandes complejos enzimáticos incluidos en la membrana 721
En la citocromo oxidasa, un centro de hierro-cobre cataliza de forma eficiente la reducción del O_2 723
Las transferencias de electrones están mediadas por colisiones aleatorias que se producen entre los dadores y los aceptores que difunden en la membrana mitocondrial interna 725
Una gran caída de potencial redox a través de cada uno de los tres complejos enzimáticos respiratorios aporta energía para el bombeo de H^+ 725
El mecanismo del bombeo de H^+ se conoce mejor en bacteriorrodopsina 726
Los ionóforos de H^+ disipan el gradiente de H^+, desacoplando así el transporte de electrones de la síntesis de ATP 727
Normalmente el control respiratorio restringe el flujo de electrones a través de la cadena 728
Existen desacoplantes naturales que transforman las mitocondrias del tejido adiposo marrón en máquinas generadoras de calor 728
Todas las bacterias utilizan mecanismos quimiosmóticos para ahorrar energía 729
Resumen 730

Cloroplastos y fotosíntesis 730
El cloroplasto es un miembro de una familia de orgánulos exclusivos de las plantas –los plastidios 731
Los cloroplastos se parecen a las mitocondrias, pero tienen un compartimiento adicional 733
Dos reacciones características de los cloroplastos: la producción de ATP y de NADPH, impulsada por la luz, y la conversión de CO_2 en carbohidratos 733
La fijación del carbono está catalizada por la ribulosa bisfosfato carboxilasa 734
En el ciclo de fijación del carbono se consumen tres moléculas de ATP y dos moléculas de NADPH por cada molécula de CO_2 fijada 735
En algunas plantas, la fijación del carbono está compartimentada para facilitar el crecimiento a concentraciones bajas de CO_2 736
La fotosíntesis depende de la fotoquímica de las moléculas de clorofila 737
Un fotosistema contiene un centro de reacción y un complejo antena 738

En un centro de reacción, la energía capturada por la clorofila genera un dador fuerte de electrones a partir de uno débil 739
En plantas y en cianobacterias, la fotofosforilación no cíclica produce NADPH y ATP 740
Los cloroplastos pueden producir ATP por fotofosforilación cíclica sin generar NADPH 742
El gradiente electroquímico de protones es similar en las mitocondrias y los cloroplastos 742
Como la membrana mitocondrial interna, la membrana interna del cloroplasto contiene proteínas transportadoras que facilitan el intercambio de metabolitos con el citosol 743
Los cloroplastos llevan a cabo otros procesos biosintéticos 743
Resumen 743

Evolución de las cadenas de transporte de electrones 744
Probablemente las células más primitivas producían ATP mediante fermentación 744
La evolución de la cadena de transporte electrónico conservadora de energía capacitó a las bacterias anaeróbicas para utilizar compuestos orgánicos no fermentables como fuente de energía 744
Las bacterias fotosintéticas, suministrando una fuente inagotable de poder reductor, superaron el mayor obstáculo de la evolución de las células 746
Las cadenas de transporte electrónico de los complejos fotosintéticos de las cianobacterias produjeron oxígeno atmosférico y permitieron nuevas formas de vida 748
Resumen 750

Los genomas de las mitocondrias y de los cloroplastos 751
La biosíntesis de las mitocondrias y de los cloroplastos supone la contribución de dos sistemas genéticos diferentes 751
El crecimiento y la división de los orgánulos mantiene el número de mitocondrias y de cloroplastos en la célula 752
Generalmente los genomas de los cloroplastos y de las mitocondrias son moléculas de DNA circulares 753
Las mitocondrias y los cloroplastos contienen sistemas genéticos completos 754
El genoma del cloroplasto de las plantas superiores contiene aproximadamente 120 genes 755
Los genomas mitocondriales presentan varias características sorprendentes 756
Las mitocondrias de animales contienen el sistema genético más simple de los conocidos 757
¿Por qué los genomas mitocondriales en las plantas son tan grandes? 758
Algunos genes de orgánulos contienen intrones 758
Los genes mitocondriales se pueden distinguir de los genes nucleares gracias a su herencia no mendeliana (citoplasmática) 759
En muchos organismos, los genes de los orgánulos se heredan de la madre 760
Los mutantes diminutos en levadura demuestran la extraordinaria importancia del núcleo celular en la biogénesis mitocondrial 761
Las mitocondrias y los cloroplastos contienen proteínas específicas de tejido 762
Las mitocondrias importan la mayor parte de sus lípidos mientras que los cloroplastos producen la mayor parte de ellos 762
Probablemente, tanto las mitocondrias como los cloroplastos han evolucionado a partir de bacterias endosimbióticas 762
¿Por qué los cloroplastos y las mitocondrias tienen sus propios sistemas genéticos? 764
Resumen 765

Bibliografía 766

Transmisión de señales entre células

Capítulo **15**

Principios generales de la señalización celular 771
Las moléculas señal extracelulares son reconocidas por receptores específicos de la superficie o del interior de las células diana 772
Las moléculas secretadas median tres formas de señalización: la paracrina, la sináptica y la endocrina 773
La señalización autocrina puede coordinar decisiones de grupos de células idénticas 774
Las uniones comunicantes permiten que la información de señalización sea compartida por las células vecinas 776
Cada célula está programada para responder a combinaciones específicas de moléculas señal 776
Diferentes células pueden responder de forma diferente a la misma señal química 777
La concentración de una molécula puede ajustarse rápidamente sólo si la vida media de la molécula es corta 777
El gas óxido nítrico actúa como una señal, uniéndose directamente a una enzima en el interior de la célula diana 779
Las hormonas esteroideas, las hormonas tiroideas, los retinoides y la vitamina D se unen a receptores intracelulares que son proteínas reguladoras de genes activadas por ligando 779
Se conocen tres clases de proteínas receptoras de superficie celular: las asociadas a canales iónicos, las asociadas a proteínas G y las asociadas a enzimas 782
Los receptores de superficie celular, una vez activados, desencadenan la adición de grupos fosfato a una red de proteínas intracelulares 783
Resumen 784

Señalización vía receptores de superficie celular asociados a proteínas G 786
Las proteínas G triméricas transmiten la señal intracelular desde los receptores asociados a proteínas G 786
Algunos receptores incrementan los niveles intracelulares de AMP cíclico activando la adenil ciclasa a través de una proteína G estimuladora (G_s) 787
Se cree que las proteínas G triméricas se desensamblan cuando son activadas 788
Algunos receptores disminuyen los niveles de AMP cíclico inhibiendo la adenil ciclasa vía una proteína G trimérica inhibidora (G_i) 791
La proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (quinasa A) media los efectos del AMP cíclico 791
Diversas proteína serina/treonina fosfatasas revierten rápidamente los efectos de la quinasa A 793
Para utilizar el Ca^{2+} como señal intracelular, las células han de mantener los niveles basales de Ca^{2+} muy bajos 794
El Ca^{2+} actúa como un mensajero intracelular ubicuo 795
Algunos receptores relacionados con proteínas G activan el proceso de señalización de fosfolípidos de inositol activando la fosfolipasa C-β 796
El inositol trisfosfato (IP_3) acopla la activación del receptor con la liberación de Ca^{2+} del ER 797
A menudo las oscilaciones de Ca^{2+} prolongan la respuesta inicial de Ca^{2+} inducida por IP_3 798
El diacilglicerol activa la proteína quinasa C (quinasa C) 799
La calmodulina es un receptor intracelular de Ca^{2+} ubicuo 801

En las células animales la mayoría de acciones del Ca^{2+} se producen a través de proteína quinasas dependientes de Ca^{2+}-calmodulina (quinasas CaM) 802
Los procesos de Ca^{2+} y de AMP cíclico interaccionan entre sí 803
Algunas proteínas G triméricas regulan directamente canales iónicos 804
La olfacción y la visión dependen de receptores asociados a proteínas G y de canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos 805
Las señales extracelulares son notablemente amplificadas mediante la utilización de mensajeros intracelulares y de cascadas enzimáticas 807
Las células pueden responder de forma súbita a incrementos graduales de la concentración de una señal extracelular 808
El efecto de algunas señales puede ser recordado por la célula 811
Resumen 811

Señalización vía receptores de superficie celular asociados a enzimas 812
Los receptores guanilato ciclasa generan GMP cíclico directamente 812
Los receptores para la mayoría de los factores de crecimiento son proteínas transmembrana que presentan actividad proteína tirosina quinasa específica 813
Los residuos tirosina fosforilados son reconocidos por proteínas con dominios SH2 815
Las proteínas Ras constituyen un eslabón crucial en la cascada intracelular de señalización activada por receptores proteína quinasa 816
Una proteína SH adapatadora acopla los receptores tirosina quinasa con Ras: evidencias que provienen del desarrollo del ojo de *Drosophila* 817
Ras activa una cascada de fosforilaciones serina/treonina que activa la MAP-quinasa 818
La actividad de los receptores asociados a tirosina quinasa depende de tirosina quinasas que no son receptores 820
Algunos receptores son proteína tirosina fosfatasas 821
La utilización de oncogenes que provocan cáncer ha permitido identificar muchos componentes del proceso de señalización de los receptores tirosina quinasa 822
Las proteínas de la superfamilia TGF-β activan receptores que son proteína serina/treonina quinasas 823
El receptor transmembrana Notch media la inhibición lateral mediante un mecanismo desconocido 823
Resumen 824

Adaptación de las células diana 825
La adaptación lenta depende de la regulación por disminución del número de receptores 825
A menudo la adaptación rápida se produce por fosforilación de los receptores 826
Algunas formas de adaptación son debidas a cambios en el proceso de señalización 827
La adaptación desempeña un papel crucial en la quimiotaxis bacteriana 827
La quimiotaxis bacteriana está mediada por una familia de cuatro receptores transmembrana homólogos y por un sistema de fosforilación que transmite la señal 830
En la quimiotaxis bacteriana, la metilación del receptor es responsable de la adaptación 831
Resumen 833

La lógica de la señalización intracelular: lecciones de "redes neuronales" basadas en los ordenadores 833
Las redes neuronales basadas en el ordenador pueden ser entrenadas 834
Las redes de señalización celular pueden observarse como redes neuronales entrenadas por la evolución 835
Las redes de señalización capacitan a las células para responder a complejos patrones de señales extracelulares 836
Las redes señal son robustas 837
Resumen 837

Bibliografía 838

El citoesqueleto

Capítulo **16**

La naturaleza del citoesqueleto 844
El citoplasma de una célula eucariota está organizado espacialmente por los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios 844
La dinámica de los microtúbulos emana del centrosoma 844
La red microtubular puede encontrar el centro de la célula 846
Determinadas proteínas motoras utilizan la red microtubular como guía para posicionar los orgánulos rodeados de membrana 848
El córtex de actina puede generar y mantener la polaridad celular 849
Normalmente los filamentos de actina y los microtúbulos actúan juntos polarizando la célula 850
Las funciones del citoesqueleto son difíciles de estudiar 851
Resumen 852

Filamentos intermedios 852
Los filamentos intermedios son polímeros de proteínas fibrosas 853
Las células epiteliales presentan una familia muy diversa de filamentos de queratina 854
Muchas células no epiteliales presentan sus propios filamentos intermedios citoplasmáticos diferenciales 856
La lámina nuclear está constituida por un tipo especial de proteínas de filamentos intermedios: las lamininas 857
Los filamentos intermedios proporcionan estabilidad mecánica a las células animales 858
Resumen 860

Microtúbulos 860
Los microtúbulos son cilindros huecos formados por tubulina 860
Los microtúbulos son estructuras muy lábiles, sensibles a drogas antimitóticas específicas 861
El alargamiento de un microtúbulo es un proceso rápido, mientras que la nucleación de un nuevo microtúbulo es un proceso lento 862
Los dos extremos de un microtúbulo son diferentes y crecen a velocidades diferentes 863
Los centrosomas son el lugar primario de nucleación de los microtúbulos en las células animales 864
En las células animales los microtúbulos se despolimerizan y repolimerizan continuamente 866
La hidrólisis de GTP puede explicar la inestabilidad dinámica de los microtúbulos individuales 867
La inestabilidad dinámica de los microtúbulos proporciona un principio organizador para la morfogénesis celular 868
Los microtúbulos sufren una lenta "maduración" como resultado de modificaciones post-traduccionales de sus subunidades de tubulina 869
Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) se unen a los microtúbulos y modifican sus propiedades 870
Las MAP colaboran en la generación de regiones citoplasmáticas funcionalmente distintas 870
La quinesina y la dineína dirigen el movimiento de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos 871

La velocidad y la dirección de desplazamiento a lo largo de los microtúbulos son específicas del dominio globular de las proteínas motoras 872
Resumen 873

Cilios y centríolos **874**
Los cilios se mueven por el batido de un axonema –un complejo haz de microtúbulos 874
La dineína dirige el movimiento de los cilios y de los flagelos 876
Cilios y flagelos crecen a partir de corpúsculos basales que están muy íntimamente relacionados con los centríolos 877
Los centríolos suelen aparecer por duplicación de los centríolos preexistentes 878
Resumen 879

Filamentos de actina **880**
Los filamentos de actina son delgados y flexibles 880
La actina y la tubulina polimerizan por mecanismos parecidos 880
El comportamiento dinámico de los filamentos de actina requiere la hidrólisis del ATP 884
Las funciones de los filamentos de actina son inhibidas por drogas estabilizadoras y desestabilizadoras del polímero 885
La molécula de actina se une a pequeñas proteínas que ayudan a controlar su polimerización 885
Muchas células emiten, desde su borde frontal de avance, microespinas y lamelipodios dinámicos que contienen actina 887
El borde frontal de avance de las células móviles nuclea la polimerización de la actina 888
Algunas bacterias patógenas utilizan la actina para moverse dentro y entre las células 889
La polimerización de la actina en el córtex celular está controlada por receptores de la superficie celular 890
Proteínas G heterotriméricas y pequeñas GTPasas transmiten señales desde la superficie celular al córtex de actina 892
Los mecanismos de polarización celular pueden ser analizados en las células de levadura 893
Resumen 894

Proteínas de unión a la actina **894**
Un citoesqueleto unido de manera sencilla a la membrana proporciona soporte mecánico a la membrana plasmática de los eritrocitos 894
Proteínas de entrecruzamiento con diferentes propiedades organizan ensamblajes particulares de actina 895
Las proteínas de unión a la actina con propiedades diferentes están construidas a partir de módulos semejantes 897
La gelsolina, cuando se activa por Ca^{2+}, fragmenta los filamentos de actina 897
En las células eucariotas se han encontrado múltiples tipos de miosina 898
En células no musculares pueden formarse transitoriamente ensamblajes semejantes a los musculares 900
Los contactos focales permiten que los filamentos de actina se extiendan hacia el substrato 902
Los microvilli ilustran de qué forma los haces de filamentos entrecruzados de actina pueden estabilizar zonas locales de la membrana plasmática 902
El comportamiento de la corteza celular depende de un equilibrio de interacciones cooperativas y competitivas entre una gran colección de proteínas de unión a la actina 904
La migración de las células animales comporta tres subprocesos distintos dependientes de actina 906
El mecanismo de la locomoción celular puede ser diseccionado genéticamente 907
Resumen 908

El músculo **908**
Las miofibirillas están formadas por ensamblajes repetitivos de filamentos gruesos y delgados 910
La contracción se produce por el deslizamiento de los filamentos de miosina y de actina entre sí 910
Las cabezas de miosina "caminan" hacia el extremo menos de los filamentos de actina 913
La contracción muscular se inicia por un aumento repentino de la concentración de Ca^{2+} citosólico 915
La troponina y la tropomiosina median la regulación de la contracción del músculo esquelético por el Ca^{2+} 916
Otras proteínas accesorias mantienen la arquitectura de la miofibrilla y le proporcionan su elasticidad 916
La misma maquinaria contráctil, en una forma modificada, se encuentra en el músculo cardíaco y en el músculo liso 917
En muchas células, la activación de la miosina depende de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina 918
Resumen 920

Bibliografía **920**

El ciclo de la división celular

Capítulo **17**

La estrategia general del ciclo celular **926**
La replicación del DNA nuclear ocurre durante una fase específica de la interfase: la fase S 927
Paralelamente al crecimiento continuo de la célula, durante el ciclo celular se producen una serie de procesos discretos 929
Un sistema de control central desencadena los procesos esenciales del ciclo celular 929
El control del ciclo celular es un mecanismo basado en una proteína quinasa 931
Resumen 933

El ciclo celular de los embriones tempranos y la función del MPF **933**
El crecimiento del oocito de *Xenopus* está equilibrado por la división del huevo 934
Un regulador citoplasmático, el MPF, controla la entrada en la mitosis 935
Las oscilaciones de la actividad MPF controlan el ciclo de división celular 936
La acumulación y la destrucción de ciclina controla la activación y la inactivación de MPF 937
La degradación de la ciclina desencadena la salida de la mitosis 939
El MPF puede actuar como autocatalítico, estimulando su propia activación 939
El MPF activo induce los procesos subordinados de la mitosis 939
El sistema de control del ciclo celular permite tiempo suficiente para que se produzca una ronda de replicación del DNA en cada interfase 940
Un bloqueo de la re-replicación asegura que ningún segmento de DNA se replique más de una vez en cada ciclo celular 941
El paso por la mitosis hace desaparecer el bloqueo a las re-replicaciones 941
Resumen 943

Las levaduras y la genética molecular del sistema de control del ciclo celular **943**
El crecimiento celular requiere una interfase prolongada con puntos de control del ciclo celular 944

Las levaduras de fisión y de gemación cambian de forma a medida que van progresando a lo largo del ciclo celular 945
Las mutaciones del ciclo de división celular detienen el ciclo en puntos específicos; las mutaciones *wee* permiten al ciclo saltarse un punto de control de tamaño 945
Las subunidades del MPF en las levaduras son homólogas a las del MPF en animales 947
La actividad del MPF está regulada por fosforilación y desfosforilación 948
El mecanismo de activación del MPF controla el tamaño de las levaduras de fisión 948
Para la mayoría de las células el punto de control principal del ciclo celular se encuentra en el Inicio de G_1 949
La proteína Cdc2 se asocia con la ciclina G_1 para conducir a la célula más allá del Inicio 949
Las ciclinas G_1 median muchos de los controles que actúan en el Inicio 951
La quinasa de Inicio pone en marcha la fabricación de los componentes necesarios para la replicación del DNA 952
Los controles por retroalimentación aseguran que las células completen un proceso de ciclo celular antes de comenzar el siguiente 952
El DNA dañado genera una señal que retrasa la mitosis 953
Generalmente los controles por retroalimentación en el ciclo celular dependen de señales inhibidoras 954
Resumen 955

Controles de la división celular en los animales pluricelulares **955**
El sistema de control del ciclo celular es más elaborado que el de las levaduras 956
La regulación del crecimiento y de la proliferación de las células de mamífero se estudia normalmente en líneas celulares cultivadas 957
Los factores de crecimiento estimulan la proliferación de células de mamífero 957
El crecimiento celular y la división celular pueden ser regulados independientemente 959
Las células pueden retrasar su división entrando en un estado especializado de no-crecimiento 960
La ausencia de suero evita el paso por el punto de control G_1 961
El sistema de control del ciclo celular puede desensamblarse rápidamente pero sólo puede ensamblarse de nuevo, lentamente 962
Las células vecinas compiten por los factores de crecimiento 963
Las células animales normales en cultivo necesitan anclarse para superar el Inicio 964
Estudios en células cancerosas revelan la existencia de genes implicados en el control de la proliferación celular 966
Los factores de crecimiento desencadenan cascadas de señales intracelulares 967
Las ciclinas y la Cdk son inducidas por factores de crecimiento tras un largo retraso 968
La proteína retinoblastoma actúa manteniendo la proliferación bajo control 968
La probabilidad de entrar en G_0 aumenta con el número de divisiones celulares: la senescencia celular 969
El cuerpo se genera y se mantiene mediante complicados patrones reguladores de la división celular 971
Resumen 972

Bibliografía **973**

Los mecanismos de la división celular

Capítulo **18**

Visión de conjunto de la fase M **977**
Tres características son exclusivas de la fase M: la condensación cromosómica, el huso mitótico y el anillo contráctil 977
La división celular depende de la duplicación del centrosoma 978
Tradicionalmente la fase M se divide en seis estadios 980
Los orgánulos citoplasmáticos grandes se fragmentan durante la fase M asegurando que se heredan correctamente 984
Resumen 985

Mitosis **985**
La formación del huso mitótico en una célula en fase M se acompaña de cambios sorprendentes en las propiedades dinámicas de los microtúbulos 986
Las interacciones entre microtúbulos orientados en direcciones opuestas conducen el ensamblaje del huso 986
Los cromosomas replicados se unen a los microtúbulos por sus cinetocoros 988
En los cromosomas de la levadura los complejos proteicos cinetocóricos se ensamblan siguiendo secuencias específicas de DNA centromérico 989
Los cinetocoros capturan los microtúbulos nucleados en los polos del huso 990
Los extremos "más" de los microtúbulos cinetocóricos pueden añadir y perder subunidades de tubulina mientras están adheridos al cinetocoro 991
Los polos del huso repelen los cromosomas 991
Las cromátidas hijas se unen a polos opuestos del huso mediante sus cinetocoros 992
Fuerzas bipolares equilibradas mantienen a los cromosomas en la placa metafásica 992
Los microtúbulos son dinámicos en el huso metafásico 993
Las cromátidas hermanas se separan repentinamente en la anafase 995
La anafase se retrasa hasta que todos los cromosomas se posicionan en la placa metafásica 996
Dos procesos diferentes separan las cromátidas en la anafase 996
El desensamblaje de los microtúbulos cinetocóricos se produce durante la anafase A 996
Dos fuerzas distintas podrían contribuir a la anafase B 998
En la telofase se recompone la envoltura nuclear alrededor de los grupos de cromosomas 999
Resumen 1000

Citocinesis **1001**
El huso mitótico determina el lugar de la segmentación del citoplasma durante la citocinesis 1001
El huso se reposiciona específicamente creando divisiones celulares asimétricas 1002
La actina y la miosina generan las fuerzas necesarias para la segmentación 1003
En casos especiales, determinados componentes celulares se pueden segregar a una sola célula hija 1005
En las células de las plantas superiores, la citocinesis ocurre mediante un mecanismo especial 1006
Una red de citoesqueleto determina el plano de división de las células vegetales 1007
La elaborada fase M de los organismos superiores evolucionó gradualmente a partir de organismos procariotas de fisión 1009
Resumen 1011

Bibliografía **1011**

Las células en su contexto social

Parte **IV**

Adhesión celular, uniones celulares y matriz extracelular

Capítulo **19**

Uniones celulares **1018**

Las uniones estancas forman una barrera de permeabilidad selectiva a través de los epitelios 1019

Las uniones de anclaje conectan el citoesqueleto entre células o entre la célula y la matriz extracelular 1021

Las uniones adherentes conectan haces de fibras de actina entre células o entre la célula y la matriz extracelular 1022

Los desmosomas conectan filamentos intermedios entre células; los hemidesmosomas los unen a la lámina basal 1024

Las uniones de tipo gap permiten el paso directo de pequeñas moléculas entre células 1026

Los conexones de las uniones de tipo gap están compuestos por seis subunidades 1027

La mayor parte de las células embrionarias están acopladas entre sí durante las primeras etapas del desarrollo mediante uniones de tipo gap 1028

La permeabilidad de las uniones de tipo gap está regulada 1029

En los vegetales, los plasmodesmos realizan muchas de las funciones de las uniones de tipo gap 1030

Resumen 1031

Adhesión intercelular **1032**

Existen dos vías fundamentales mediante las cuales las células animales se unen para formar tejidos 1032

Las células de vertebrados disociadas pueden reagregarse en tejidos organizados mediante mecanismos de adhesión selectiva célula-célula 1033

Las cadherinas median la unión célula-célula dependiente de Ca^{2+} en los vertebrados 1035

Las cadherinas median la adhesión célula-célula a través de un mecanismo homofílico 1036

La adhesión intercelular independiente de Ca^{2+} está mediada principalmente por unas proteínas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas 1037

Muchos tipos de moléculas de superficie celular actúan paralelamente mediando la adhesión selectiva célula-célula y célula-matriz 1038

Los contactos no adhesivos pueden ser los iniciadores de fenómenos de adhesión intercelular específicos de tejido que posteriormente son orientados y estabilizados por contactos de unión 1040

Resumen 1041

La matriz extracelular de los animales **1041**

La matriz extracelular está producida y orientada por las células que engloba 1042

Las cadenas de glucosaminoglucano (GAG) ocupan grandes volúmenes, formando geles hidratados 1043

Parece que el ácido hialurónico facilita la migración celular durante la morfogénesis y la reparación de los tejidos 1044

Los proteoglucanos están compuestos por cadenas de GAG unidas covalentemente a una proteína central 1045

Las cadenas de proteoglucanos pueden regular las actividades de moléculas secretadas de señalización 1046

Las cadenas de GAG pueden estar altamente organizadas en la matriz extracelular 1047

Los proteoglucanos de superficie celular actúan como correceptores 1048

Las colágenas son las proteínas más abundantes de la matriz extracelular 1048

Las moléculas de colágena son secretadas con unas extensiones no helicoidales en cada una de las regiones terminales 1051

Después de su secreción, las moléculas fibrilares de procolágena son degradadas hasta moléculas de colágena, las cuales se organizan en fibrillas 1052

Las colágenas asociadas a fibrillas organizan estas fibrillas 1053

Las células participan de la organización de las fibras de colágena que secretan ejerciendo tensiones mecánicas sobre la matriz 1054

La elastina confiere a los tejidos su elasticidad 1055

La fibronectina es un proteína extracelular adhesiva que contribuye a la adhesión de la célula a la matriz 1057

Las diversas formas de fibronectina son producto de una maduración alternativa del RNA 1058

Las glucoproteínas de la matriz ayudan a determinar las vías de migración celular 1059

Las moléculas de colágena de tipo IV se ensamblan formando una red laminar que facilita la formación de la lámina basal 1059

La lámina basal está compuesta fundamentalmente por colágena de tipo IV, proteoglucanos del tipo heparán sulfato, laminina y entactina 1060

Las láminas basales realizan diversas y complejas funciones 1062

La degradación de los componentes de la matriz extracelular está estrechamente controlada 1065

Resumen 1066

Receptores de la matriz extracelular en células animales: las integrinas **1067**

Las integrinas son heterodímeros transmembrana 1068

Las integrinas pueden interaccionar con el citoesqueleto para unir las células a la matriz extracelular 1069

Las integrinas permiten al citoesqueleto y a la matriz extracelular comunicarse a través de la membrana plasmática 1069

Las células pueden regular la actividad de sus integrinas 1070

Las integrinas pueden activar cascadas de señalización intracelular 1071

Resumen 1072

La pared celular de los vegetales **1073**

La composición de la pared celular depende del tipo celular 1073

Las fuerzas de tensión de las paredes celulares permiten a las células vegetales desarrollar una presión de turgencia 1074

La pared celular está constituida por microfibrillas de celulosa entretejidas con una red de polisacáridos y proteínas 1074

Los microtúbulos orientan la deposición de la pared celular 1076

Resumen 1078

Bibliografía **1079**

Células germinales y fecundación

Capítulo **20**

Las ventajas del sexo **1083**

En los animales pluricelulares, la fase diploide es compleja y larga mientras que la haploide es sencilla y corta 1084

La reproducción sexual confiere una ventaja competitiva a los organismos que se encuentran en un ambiente que cambia de forma imprevisible 1085

Resumen 1086

Meiosis **1086**

La meiosis implica dos divisiones nucleares en lugar de una sola 1086

La redistribución génica aumenta debido al entrecruzamiento entre las cromátidas homólogas no hermanas 1088

El apareamiento meiótico cromosómico culmina con la formación del complejo sinaptonémico 1089

Se cree que los nódulos de recombinación median los intercambios de cromátidas 1090

Los quiasmas desempeñan un importante papel en la segregación cromosómica durante la meiosis 1091

El apareamiento de los cromosomas sexuales asegura que también ellos se segreguen 1093

La división meiótica II es semejante a la mitosis 1093

Resumen 1094

Oocitos **1094**

El oocito es la única célula de un animal superior que es capaz de desarrollarse produciendo un nuevo individuo 1094

Un oocito está altamente especializado para su desarrollo independiente, presentando grandes reservas nutritivas y una compleja cubierta protectora 1094

Los oocitos se desarrollan por etapas 1095

Los oocitos crecen hasta alcanzar su gran tamaño por medio de mecanismos especiales 1097

Resumen 1099

Espermatozoides **1099**

Los espermatozoides están altamente adaptados para depositar su DNA en un oocito 1099

En muchas especies de mamíferos los espermatozoides se producen de manera continua 1100

Resumen 1103

Fecundación **1103**

El contacto con la cubierta pelúcida estimula al espermatozoide a sufrir la reacción acrosómica 1104

La reacción cortical del oocito contribuye a asegurar que sea fecundado por un solo espermatozoide 1105

Una proteína de fusión transmembrana de la membrana plasmática del espermatozoide cataliza la fusión espermatozoide-oocito 1106

El espermatoide proporciona un centríolo al zigoto 1107

Resumen 1108

Bibliografía **1108**

Mecanismos celulares del desarrollo

Capítulo **21**

Movimientos morfogénicos y la forma del mapa corporal **1111**

La polaridad del embrión de anfibio depende de la polaridad del huevo 1112

La segmentación produce muchas células a partir de una célula inicial 1113

La blástula es una cavidad rodeada por un epitelio 1114

La gastrulación transforma una esfera hueca de células en una estructura triestratificada con un intestino primitivo 1114

Los movimientos de gastrulación se organizan alrededor del labio dorsal del blastoporo 1116

Cambios activos del empaquetamiento celular suministran una fuerza conductora para la gastrulación 1117

Las tres capas germinales formadas por la gastrulación tienen destinos distintos 1118

El mesodermo situado a cada lado del eje del cuerpo se fragmenta en somitos, de los que derivan las células musculares 1120

Los patrones cambiantes de moléculas de adhesión celular regulan los movimientos morfogénicos 1121

Células migratorias invaden los tejidos del embrión de forma estrictamente controlada 1122

El plano estructural del cuerpo de los vertebrados se forma primero en miniatura y después se mantiene a medida que el embrión crece 1124

Resumen 1124

Diversificación celular en el embrión animal temprano **1125**

Las diferencias iniciales entre los blastómeros de *Xenopus* surgen a partir de la segregación espacial de determinantes en el huevo 1126

Interacciones inductivas generan nuevos tipos de células en un patrón cada vez más detallado 1127

Un sencillo gradiente de morfógeno puede organizar un complejo patrón de respuestas celulares 1129

Las células pueden reaccionar de forma distinta a una señal según el momento en que la reciban: función de un reloj intracelular 1131

En los mamíferos, el protegido entorno uterino permite un tipo extraordinario de desarrollo temprano 1131

Todas las células del embrión animal temprano tienen el mismo potencial de desarrollo 1133

Las células madre embrionarias de los mamíferos muestran cómo señales procedentes del entorno pueden controlar el ritmo y la vía de desarrollo 1133

Resumen 1135

Memoria celular, determinación celular y el concepto de valores posicionales **1135**

A menudo las células quedan determinadas para su futuro papel especializado mucho antes de que se diferencien manifiestamente 1135

El momento de la determinación celular puede ponerse de manifiesto por medio de experimentos de trasplante 1136

La determinación y la diferenciación celulares reflejan la expresión de genes reguladores 1137

El estado de determinación puede estar controlado por el citoplasma o puede ser intrínseco a los cromosomas 1138

Las células de los tejidos en desarrollo recuerdan sus valores posicionales 1139

El patrón de valores posicionales controla la proliferación celular y se regula a través de intercalación 1140

Resumen 1142

El gusano nemátodo: los genes controladores del desarrollo y las leyes del comportamiento celular **1143**
Caenorhabditis elegans es anatómica y genéticamente sencillo 1143
El desarrollo del nemátodo es prácticamnte invariable 1144
Los genes de control del desarrollo definen las leyes del comportamiento celular que generan el mapa corporal 1145
La inducción de la vulva depende de un amplio conjunto de genes controladores del desarrollo 1146
Pruebas genéticas microquirúrgicas revelan la lógica del control del desarrollo; el clonaje y la secuenciación de genes nos ayudan a descubrir su bioquímica 1147
Mutaciones heterocrónicas identifican los genes que especifican cambios en las leyes del comportamiento celular a medida que transcurre el tiempo 1151
El "tempo" del desarrollo no está controlado mediante el ciclo de división celular 1152
Las células mueren ordenadamente como parte del programa de desarrollo 1152
Resumen 1153

***Drosophila* y la genética molecular del patrón de formación. I. Génesis del mapa corporal** **1154**
El cuerpo del insecto se construye mediante la modulación de un patrón fundamental de unidades de repetición 1155
Drosophila inicia su desarrollo como un sincitio 1156
Dos sistemas ortogonales definen el mapa geométrico del embrión 1158
Influencias procedentes de las células que envuelven el huevo marcan el inicio del modelaje del embrión 1159
El eje dorsoventral se define en el interior del embrión mediante una proteína reguladora de genes con un gradiente de concentración intranuclear 1160
El sistema posterior define las células germinales y también los segmentos corporales posteriores 1162
El mRNA localizado en el polo anterior codifica una proteína reguladora de genes que constituye el gradiente morfogénico anterior 1163
Tres clases de genes de segmentación subdividen el embrión 1165
La expresión localizada de los genes de segmentación está regulada por una jerarquía de señales de posición 1166
El producto de un gen de segmentación controla la expresión de otro gen generando un patrón detallado 1168
Los genes de polaridad del huevo gap y de regla par generan un patrón transitorio que es recordado por otros genes 1169
Los genes de la polaridad de segmento marcan las subdivisiones básicas de cada parasegmento 1169
Resumen 1170

***Drosophila* y la genética molecular del patrón de formación. II. Genes selectores homeóticos y modelaje de las partes del cuerpo** **1171**
Los genes selectores homeóticos del complejo bithorax y del complejo Antennapedia definen las diferencias entre parasegmentos 1171
Los genes selectores homeóticos codifican un sistema de marcadores moleculares de dirección 1172
Las regiones de control de los genes selectores homeóticos actúan como chips de memoria de información posicional 1172
La mosca adulta se desarrolla a partir de un conjunto de discos imaginales que contienen información posicional 1174
Los genes selectores homeóticos son esenciales para la memoria de la información posicional de las células de los discos imaginales 1176
Los genes selectores homeóticos y los genes de polaridad del segmento definen los compartimientos del cuerpo 1178
La expresión localizada de proteínas específicas antecede la producción de quetas sensitivas 1179
La inhibición lateral regula el patrón detallado de tipos celulares diferenciados 1180
Los genes de control de desarrollo de *Drosophila* tienen homólogos en los vertebrados 1182
Los mamíferos tienen cuatro complejos HOM homólogos 1183
Los genes Hox definen los valores posicionales en los vertebrados tal como ocurre en los insectos 1184
Subconjuntos de los genes Hox se expresan distribuidos a lo largo de los dos ejes ortogonales de las yemas de las extremidades de los vertebrados 1185
Resumen 1186

El desarrollo vegetal **1187**
El desarrollo embrionario empieza con el establecimiento del eje raíz-brote y se detiene en el interior de la semilla 1188
Los módulos repetitivos de una planta son generados secuencialmente por los meristemos 1190
La forma de cada nueva estructura depende de la orientación de la división celular y de la expansión 1190
Cada módulo de la planta crece a partir de un conjunto microscópico de primordios de un meristemo 1192
Señales hormonales de largo alcance coordinan los procesos del desarrollo en partes distantes de la planta 1193
Arabidopsis se utiliza como organismo modelo para la genética molecular de las plantas 1194
Los genes selectores homeóticos definen las partes de una flor 1195
Resumen 1198

El desarrollo neural **1199**
Las reservas de neuronas generadas en el inicio del desarrollo neural no se reemplazarán posteriormente 1200
El momento y el lugar de nacimiento de una neurona determinarán sus conexiones 1201
Cada axón o dendrita se extiende gracias a un cono de crecimiento situado en su extremo 1203
El cono de crecimiento conduce *in vivo* a la neurita en desarrollo a través de una vía definida con precisión 1205
Los tejidos diana liberan factores neurotróficos que controlan el crecimiento y la supervivencia de las células nerviosas 1205
Los valores posicionales de las neuronas guían la formación de mapas neuronales ordenados: doctrina de la especificidad neuronal 1207
Los axones de lados opuestos de la retina responden de forma distinta al gradiente de las moléculas repelentes del tectum 1207
Los patrones difusos de las conexiones sinápticas se definen mediante la eliminación de la sinapsis dependiente de actividad 1209
La experiencia moldea el patrón de conexiones sinápticas del cerebro 1210
Resumen 1211

Bibliografía **1212**

Células diferenciadas y conservación de los tejidos

Capítulo 22

Mantenimiento del estado diferenciado **1219**

La mayoría de las células diferenciadas recuerdan su carácter esencial incluso en un nuevo entorno 1221

El estado diferenciado se puede modular por el entorno celular 1221

Resumen 1222

Tejidos con células permanentes **1222**

Las células del centro del cristalino del ojo de un adulto son residuos del embrión 1223

La mayoría de las células permanentes renuevan sus componentes: las células fotorreceptoras de la retina 1224

Resumen 1226

Renovación por bipartición simple **1227**

Las funciones del hígado como interfase entre el tracto digestivo y la sangre 1227

La pérdida de células hepáticas estimula la proliferación de células hepáticas 1230

La regeneración requiere el crecimiento coordinado de los constituyentes de los tejidos 1231

Las células endoteliales revisten todos los vasos sanguíneos 1231

Las nuevas células endoteliales se generan por bipartición simple de células endoteliales ya existentes 1232

Los capilares se forman mediante proliferación 1233

La angiogénesis está controlada por factores de crecimiento liberados por los tejidos próximos 1234

Resumen 1235

Renovación por medio de células madre: la epidermis **1236**

Las células madre pueden dividirse sin límite y dar lugar a una progenie diferenciada 1237

Las células madre epidérmicas se encuentran en la capa basal 1238

Las células epidérmicas en diferenciación sintetizan una secuencia de queratinas diferentes a medida que maduran 1239

Las células madre epidérmicas son un subconjunto de las células basales 1240

La proliferación de las células basales se regula en función del grosor de la epidermis 1241

Las células secretoras de la piel están agrupadas en glándulas que tienen su propia cinética de población 1242

Resumen 1243

Renovación por medio de células madre pluripotenciales: formación de las células sanguíneas **1243**

Existen tres tipos principales de glóbulos blancos: los granulocitos, los monocitos y los linfocitos 1244

La producción de los distintos tipos de células sanguíneas en la médula ósea se halla controlada individualmente 1246

La médula ósea contiene las células madre hematopoyéticas 1247

Las células madre pluripotenciales dan lugar a todos los tipos de células sanguíneas 1249

El número de células sanguíneas especializadas se amplifica por divisiones de células progenitoras determinadas 1250

Los factores que regulan la hematopoyesis pueden analizarse en cultivo 1251

La eritropoyesis depende de la hormona eritropoyetina 1252

En la producción de los neutrófilos y de los macrófagos influyen múltiples CSF 1253

Las células madre hematopoyéticas dependen del contacto con células que expresan el factor Steel 1255

El comportamiento de una célula hematopoyética depende parcialmente del azar 1255

La regulación de la supervivencia celular es tan importante como la regulación de la proliferación celular 1256

Resumen 1258

Génesis, modulación y regeneración del músculo esquelético **1258**

Las nuevas células del músculo esquelético se forman por fusión de los mioblastos 1260

Las fibras musculares pueden modular sus propiedades mediante cambios de las proteínas isoformas que poseen 1261

En el adulto persisten algunos mioblastos como células madre quiescentes 1261

Resumen 1262

Los fibroblastos y sus transformaciones: la familia de las células del tejido conjuntivo **1262**

Los fibroblastos cambian sus características en respuesta a señales de la matriz extracelular 1263

La matriz extracelular puede influir en la diferenciación de las células del tejido conjuntivo, afectando a su adhesión y a su forma 1264

Distintas moléculas señal actúan de forma secuencial regulando la producción de adipocitos 1265

El hueso se remodela continuamente por medio de las células que lo constituyen 1265

Los osteoblastos segregan matriz ósea, mientras que los osteoclastos la erosionan 1266

Durante el desarrollo, los osteoclastos erosionan el cartílago y se abren paso en el hueso 1269

La estructura del cuerpo está estabilizada mediante su armazón de tejido conjuntivo y mediante la cohesión selectiva de las células 1269

Resumen 1271

Apéndice Catálogo de las células del cuerpo humano adulto **1271**

Bibliografía **1274**

El sistema inmunitario

Capítulo 23

Base celular de la inmunidad **1280**

El sistema inmunitario humano está compuesto por billones de linfocitos 1280

Los linfocitos B producen las repuestas humorales con anticuerpos; los linfocitos T producen las respuesta mediadas por células 1281

Los linfocitos se desarrollan en los órganos linfoides primarios y reaccionan con los antígenos extraños en los órganos linfoides secundarios 1282

Los marcadores de superficie celular permiten distinguir y separar las células T de las células B 1283

El sistema inmunitario actúa mediante la selección clonal 1284

La mayoría de antígenos estimulan muchos clones diferentes de linfocitos 1286

La mayoría de los linfocitos recirculan continuamente 1286

La memoria inmunológica se debe a la expansión clonal y a la maduración de los linfocitos 1288

La falta de respuesta ante los antígenos propios es debida a una tolerancia inmunológica adquirida 1289
Resumen 1291

Propiedades funcionales de los anticuerpos 1291
Los receptores de las células B específicos para los antígenos son moléculas de anticuerpo 1291
Las células B pueden ser estimuladas a segregar anticuerpos en una placa de cultivo 1292
Los anticuerpos tienen dos lugares idénticos de unión al antígeno 1292
Una molécula de anticuerpo está compuesta por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas 1293
Existen cinco clases diferentes de cadenas pesadas, cada una de las cuales tiene propiedades biológicas distintas 1293
Los anticuerpos pueden tener cadenas ligeras κ o λ, pero no de ambos tipos 1296
La intensidad de una interacción antígeno-anticuerpo depende tanto del número de lugares de unión ocupados como de la afinidad de cada lugar de unión 1297
La utilización del complemento por los anticuerpos contribuye a la lucha contra las infecciones bacterianas 1298
Resumen 1301

La estructura fina de los anticuerpos 1302
Las cadenas ligeras y las cadenas pesadas presentan regiones constantes y regiones variables 1302
Las cadenas ligeras y las cadenas pesadas contienen tres regiones hipervariables cada una, que en conjunto forman el lugar de unión al antígeno 1303
Las cadenas ligeras y las cadenas pesadas están plegadas en dominios repetitivos similares 1303
Estudios por difracción de rayos X han revelado la estructura tridimensional de los dominios de las Ig y de sus lugares de unión al antígeno 1304
Resumen 1307

La generación de la diversidad de los anticuerpos 1307
Durante el desarrollo de las células B, los genes de los anticuerpos se ensamblan a partir de segmentos génicos aislados 1307
Cada región V está codificada por más de un segmento génico 1308
La unión imprecisa de los segmentos génicos aumenta la diversidad de las regiones V 1310
La hipermutación somática dirigida por el antígeno acaba de afinar las respuestas de anticuerpos 1310
La unión de los segmentos génicos de los anticuerpos está regulada asegurando que las células B sean monoespecíficas 1311
Cuando las células B son estimuladas por un antígeno, pasan de la producción de anticuerpo ligado a la membrana a la producción de la forma segregada del mismo anticuerpo 1312
Las células B pueden cambiar la clase de anticuerpo que producen 1313
Resumen 1314

Los receptores de las células T y sus subclases 1315
Los receptores de la célula T son heterodímeros similares a los anticuerpos 1315
Las diferentes respuestas de las células T están mediadas por distintas clases de células T 1316
Resumen 1316

Las moléculas MHC y la presentación del antígeno a las células T 1317
Existen dos clases principales de moléculas MHC 1317
Estudios por difracción de rayos X revelan el lugar de unión al antígeno de las proteínas MHC así como el péptido de unión 1319
Las moléculas MHC de clase I y de clase II tienen funciones distintas 1321
Las proteínas CD4 y CD8 actúan como correceptores de unión a MHC en las células T colaboradoras y citotóxicas, respectivamente 1322
Resumen 1322

Las células T citotóxicas 1323
Las células T citotóxicas reconocen fragmentos de proteínas víricas en la superficie de células infectadas por virus 1323
Los transportadores ABC codificados por MHC transfieren fragmentos peptídicos desde el citosol hasta la luz del ER 1324
Las células T citotóxicas inducen a las células diana infectadas a destruirse a sí mismas 1325
Resumen 1326

Células T colaboradoras y activación de las células T 1326
Las células T colaboradoras reconocen fragmentos de proteínas antigénicas endocitadas, asociadas con proteínas MHC de clase II 1327
Las células T colaboradoras se activan por las células presentadoras de antígeno 1328
El receptor de una célula T forma parte de un gran complejo de señalización en la membrana plasmática 1329
Para activar la célula T colaboradora se requieren dos señales simultáneas 1329
Las células T colaboradoras, una vez activadas, se estimulan a sí mismas y a otras células T para proliferar mediante la secreción de interleuquina-2 1331
Para responder ante un antígeno, la mayoría de las células B necesitan la participación de las células T colaboradoras 1331
La activación de las células B por células T colaboradoras se produce tanto por señales unidas a la membrana como por señales segregadas 1332
Algunas células T colaboradoras activan las células T citotóxicas y los macrófagos mediante la secreción de interleuquinas 1333
Resumen 1334

Selección del repertorio de células T 1335
Las células T que reconocen péptidos asociados a las moléculas MHC propias son seleccionadas positivamente durante su desarrollo en el timo 1335
Las células T en desarrollo que reaccionan fuertemente con los péptidos propios unidos a moléculas MHC propias son eliminadas en el timo 1336
Algunas formas alélicas de moléculas MHC no son efectivas en la presentación de antígenos específicos a las células T: genes de la respuesta inmunitaria (*Ir*) 1338
El papel de las proteínas MHC en la presentación del antígeno a las células T proporciona una explicación de las reacciones de trasplante y del polimorfismo MHC 1338
Las moléculas de reconocimiento inmunitario pertenecen a una antigua superfamilia 1339
Resumen 1340

Bibliografía 1341

Cáncer

Capítulo **24**

El cáncer como un proceso de microevolución **1345**

Los cánceres difieren en función del tipo celular del que derivan 1346

La mayoría de cánceres derivan de una sola célula anormal 1348

Probablemente la mayoría de cánceres se inician por un cambio en la secuencia de DNA de una célula 1349

Una sola mutación no es suficiente para causar cáncer 1350

Los cánceres evolucionan mediante etapas lentas a partir de células alteradas benignas 1352

La progresión de los tumores implica rondas sucesivas de mutación y selección natural 1354

El desarrollo de un cáncer puede estar estimulado por factores que no alteran la secuencia de DNA de las células 1355

La mayoría de cánceres se producen por combinaciones evitables de causas ambientales 1356

La búsqueda de curaciones para el cáncer es dura pero no imposible 1358

El crecimiento canceroso depende a menudo de desórdenes de la diferenciación celular 1359

Para formar metástasis, las células cancerosas han de ser capaces de cruzar la lámina basal 1360

Las mutaciones que aumentan la frecuencia de mutación aceleran el desarrollo del cáncer 1361

El incremento de la capacidad de mutar de las células cancerosas confiere a estas células una cierta capacidad de evadirse de la destrucción producida por drogas anticancerosas 1363

Resumen 1364

Genética molecular del cáncer **1365**

Los retrovirus pueden actuar como vectores para los oncogenes que modifican el comportamiento celular 1365

Los retrovirus recogen oncogenes por accidente 1367

Un retrovirus puede transformar una célula huésped insertando su DNA en un lugar próximo a un proto-oncogén del huésped 1369

Diferentes investigaciones sobre la base genética del cáncer convergen sobre disfunciones de un mismo pequeño grupo de proto-oncogenes 1369

Un proto-oncogén puede ser convertido en oncogénico de muchas maneras 1370

Las acciones de los oncogenes puede ensayarse individualmente o combinadas entre sí en ratones transgénicos 1372

La pérdida de una copia de un gen supresor de tumores puede generar predisposición hereditaria al cáncer 1373

La pérdida del gen supresor de tumores de retinoblastoma interviene en muchos cánceres distintos 1375

Los virus de DNA tumorales activan la maquinaria de replicación del DNA de la célula como parte de su estrategia para sobrevivir 1376

Los virus de DNA tumorales activan la maquinaria de replicación de la célula bloqueando la acción de los genes clave supresores de tumores 1377

Mutaciones en el gen *p53* inhabilitan el freno de emergencia de la proliferación celular y conducen a una inestabilidad genética 1378

Los cánceres colon-rectales se desarrollan lentamente, a través de una sucesión de cambios estructurales visibles 1379

Las mutaciones que conducen al cáncer colon-rectal pueden ser identificadas examinando las células cancerosas y estudiando las familias propensas a desarrollar cáncer 1381

Deleciones genéticas en las células cancerosas colon-rectales revelan lugares de pérdida de genes supresores de tumores 1382

Las etapas de la progresión tumoral puede correlacionarse con determinadas mutaciones 1382

Cada caso de cáncer se caracteriza por su propia sucesión de lesiones genéticas 1383

Resumen 1384

Bibliografía **1385**

Introducción a la célula

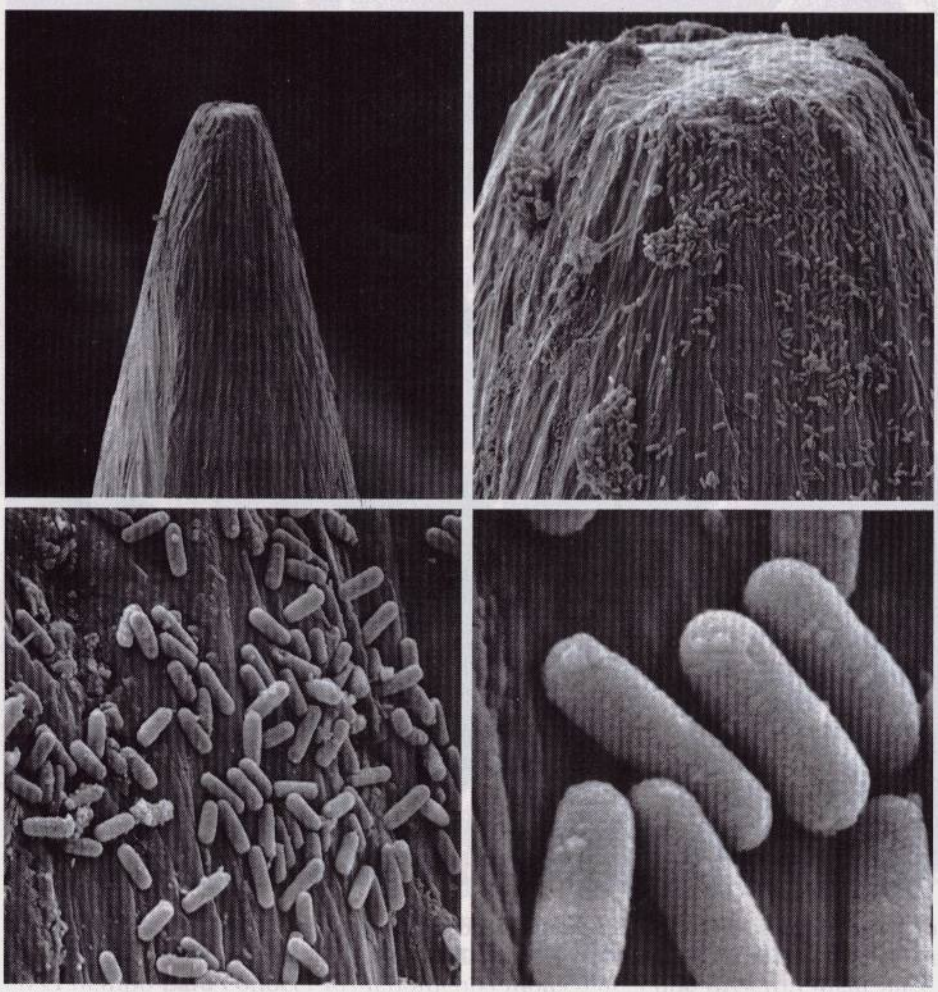
I

1 La evolución de la célula

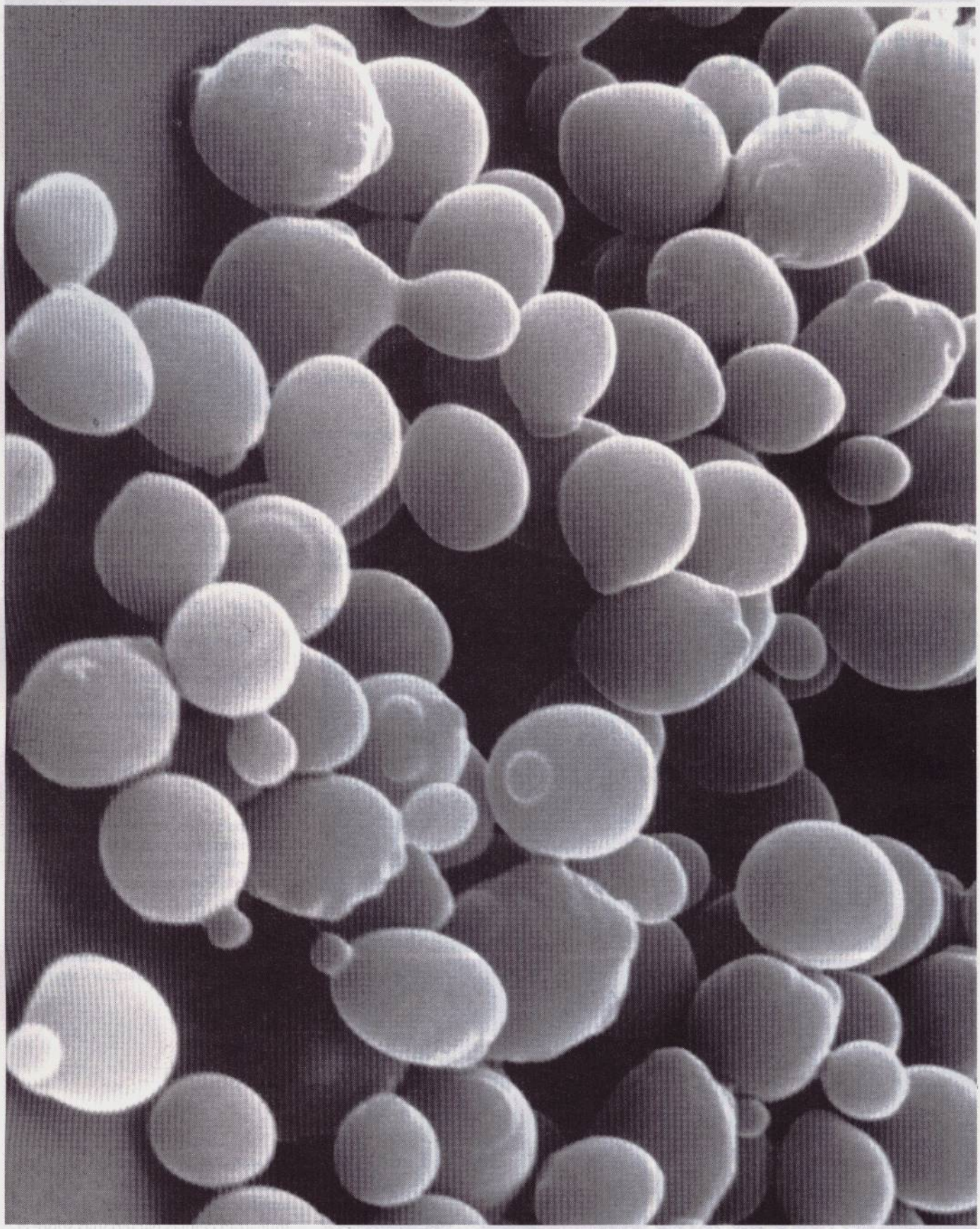
2 Pequeñas moléculas, energía y biosíntesis

3 Macromoléculas: estructura, forma e información

4 Cómo se estudian las células



El sentido de la escala: estas electronmicrografías tomadas a ampliaciones cada vez mayores muestran células bacterianas sobre la punta de un alfiler doméstico. (Por cortesía de Tony Brain y de Science Photo Library.)



Electronmicrografía de barrido de células de levadura en desarrollo. Estos eucariotas unicelulares generan por gemación pequeñas células hijas cuando se multiplican. (Por cortesía de Iva Herskowitz y Eric Schabatach.)

La evolución de la célula

1

- Desde las moléculas hasta la primera célula
- De los procariotas a los eucariotas
- De las células simples a los organismos pluricelulares

Todas las criaturas vivas están formadas por células –pequeños compartimientos rodeados de membrana y llenos de una solución acuosa concentrada de compuestos químicos. Las formas más simples de vida son células solitarias que se propagan dividiéndose en dos. Los organismos superiores, como nosotros mismos, son como ciudades celulares en las que grupos de células realizan funciones especializadas y están unidos por intrincados sistemas de comunicación. Las células ocupan un punto intermedio en la escala de la complejidad biológica. Las estudiamos para aprender, por un lado, cómo están formadas a partir de las moléculas y, por otro, cómo cooperan para constituir un organismo tan complejo como un ser humano.

Se cree que todos los organismos, y todas las células que los constituyen, descienden por *evolución mediante selección natural* de una célula ancestral común. La evolución implica dos procesos esenciales: (1) la aparición de una *variación* al azar en la información genética transmitida de un individuo a sus descendientes, y (2) la *selección* de la información genética que ayuda a su portador a sobrevivir y multiplicarse. La evolución es el principio central de la biología, ya que nos ayuda a comprender la asombrosa diversidad del mundo vivo.

Este capítulo, al igual que todo el libro, se ocupa de la progresión desde las moléculas hasta los organismos pluricelulares. Estudia la evolución de la célula, primero como unidad viva constituida por partes menores, y luego como bloque constitutivo de estructuras mayores. A través de la evolución presentamos los componentes y actividades celulares que se tratarán con mayor detalle en los capítulos siguientes, y en una secuencia más o menos igual. Empezando con los orígenes de la primera célula en la Tierra, estudiamos cómo las propiedades de ciertos tipos de grandes moléculas permiten que se transmita y exprese la información hereditaria y permiten que se produzca la evolución. Rodeadas por una membrana, estas moléculas constituyen la parte esencial de una célula que se replica a sí misma. Luego describimos la transmisión principal que se produjo en el transcurso de la evolución, desde unas pequeñas células parecidas a bacterias hasta unas células mucho mayores y complejas, tales como las que se encuentran en los animales y plantas actuales. Finalmente, sugerimos la manera en que las células aisladas, de vida libre, dieron lugar quizás a los grandes organismos pluricelulares, especializándose y cooperando en la formación de órganos tan complejos como el cerebro.

Es evidente que presentar la célula a través de su evolución tiene sus riesgos: las grandes lagunas de nuestro conocimiento sólo pueden superarse por medio de especulaciones quizás erróneas en muchos detalles. No podemos retroceder en el tiempo para conocer los fenómenos moleculares que tuvieron lugar hace

miles de millones de años. Pero algunos sucesos antiguos han dejado muchas huellas para nuestro análisis. Plantas ancestrales, animales y también bacterias están preservadas como fósiles. Aún más importante, todos los organismos actuales proporcionan evidencias de las características de los seres vivos del pasado. Concretamente, las moléculas biológicas actuales son una fuente rica de información sobre el curso de la evolución, ya que ponen en evidencia semejanzas fundamentales entre los más dispares organismos vivos y nos permiten organizar las diferencias que existen entre ellos construyendo una escala objetiva universal. Estas diferencias y similitudes moleculares representan para nosotros un problema semejante al que se enfrenta un literato que intenta establecer cuál es el texto original de un autor antiguo, comparando varios manuscritos diferentes que han sido variados por repetidas copias y ediciones. La tarea es dura y la evidencia es incompleta, pero al menos es posible proponer conjeturas inteligentes acerca de las principales fases de la evolución de las células vivas.

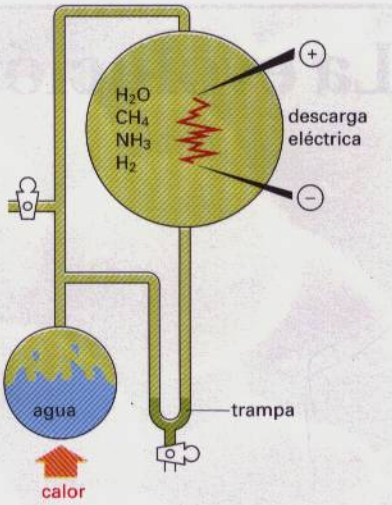


Figura 1-1 Típico experimento que simula las condiciones en la Tierra primitiva. Se calienta agua en un aparato cerrado que contiene CH_4, NH_3 y H_2, y se hace pasar una descarga eléctrica a través de la mezcla gaseosa. En el tubo en U se acumulan compuestos orgánicos.

Desde las moléculas hasta la primera célula[1]

En condiciones prebióticas se pueden formar moléculas biológicas[1,2]

Las condiciones que reinaban en la Tierra durante los primeros mil millones de años son aún tema de discusión. ¿Estaba inicialmente fundida la superficie terrestre? ¿Contenía la atmósfera amoníaco, o metano? Sin embargo, todo el mundo parece estar de acuerdo en que la Tierra era un lugar violento, con erupciones volcánicas, relámpagos y lluvias torrenciales. Existía muy poca, o ninguna, cantidad de oxígeno libre, y no existía una capa de ozono que absorbiera la radiación ultravioleta del sol. La radiación, mediante su acción fotoquímica, pudo haber contribuido a que la atmósfera fuese rica en moléculas reactivas y alejadas de su equilibrio químico.

Es probable que bajo estas condiciones se produjeran moléculas orgánicas (es decir, moléculas que contienen carbono) simples. La prueba más clara de ello procede de experimentos de laboratorio. Si se toman mezclas de gases como CO_2, CH_4, NH_3 y H_2, se calientan con agua y se activan mediante descargas eléctricas o radiación ultravioleta, se observa cómo los gases reaccionan formando pequeñas moléculas orgánicas –por lo general, un pequeño número de moléculas diferentes, cada una de ellas producida en grandes cantidades (Figura 1-1). Entre estos productos se cuentan diversos compuestos, tales como el cianuro de hidrógeno (HCN) y el formaldehído (HCHO), que en solución acuosa sufren rápidamente reacciones posteriores (Figura 1-2). Y lo que es más importante, se generan moléculas representativas de la mayoría de las principales clases de moléculas orgánicas encontradas en las células como *aminoácidos, azúcares* y las *purinas* y *pirimidinas* necesarias para sintetizar *nucleótidos*.

Aunque estos experimentos no pueden reproducir con toda exactitud las condiciones primitivas de la Tierra, ponen de manifiesto el hecho de que la formación de moléculas orgánicas es sorprendentemente fácil. Y la Tierra en formación tenía inmensas ventajas sobre cualquier experimentador humano; era muy grande y podía producir una amplia gama de condiciones. Pero, sobre todo, disponía de mucho más tiempo –cientos de millones de años. En tales circunstancias, parece muy posible que, en algún lugar y en algún momento determinados, muchas de las moléculas orgánicas simples que se encuentran en las células actuales se acumularan en concentraciones elevadas.

HCHO	formaldehído
HCOOH	ácido fórmico
HCN	cianuro de hidrógeno
CH_3COOH	ácido acético
NH_2CH_2COOH	glicina
$CH_3CH(OH)COOH$	ácido láctico
$NH_2CH(CH_3)COOH$	alanina
$NH(CH_3)-CH_2COOH$	sarcosina
$NH_2-C(=O)-NH_2$	urea
$NH_2CH(CH_2COOH)COOH$	ácido aspártico

Figura 1-2 Algunos de los compuestos que se pueden formar en el experimento descrito en la Figura 1-1. Los compuestos indicados en color son componentes importantes de las células vivas actuales.

Pueden desarrollarse sistemas químicos complejos en un entorno alejado de su equilibrio químico

Las moléculas orgánicas simples como los aminoácidos y los nucleótidos se pueden asociar formando grandes *polímeros*. Un aminoácido puede unirse a

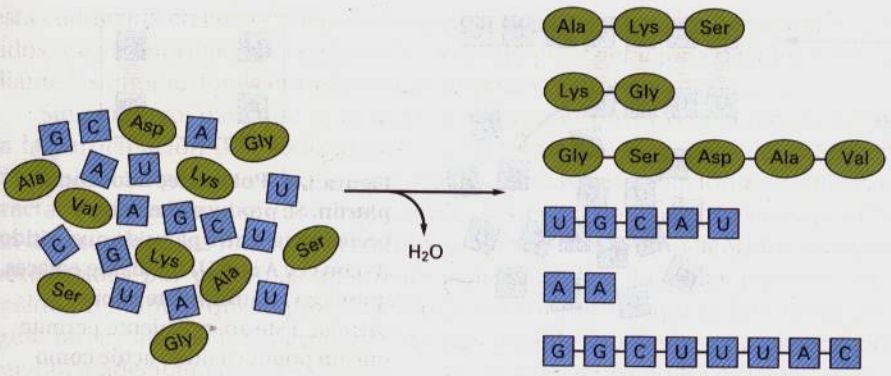


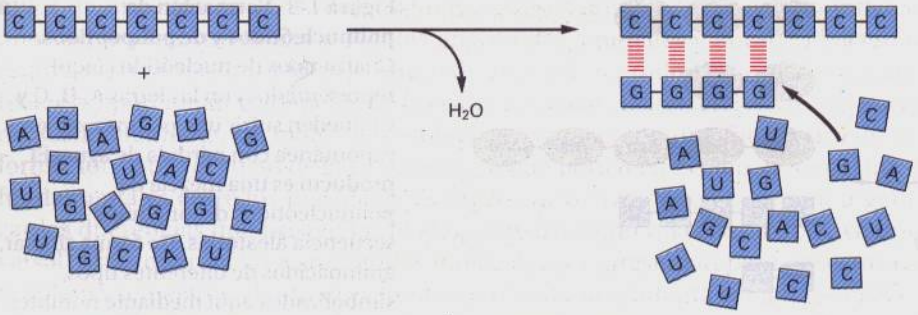
Figura 1-3 Formación de polinucleótidos y de polipéptidos. Cuatro tipos de nucleótidos (aquí representados con las letras A, U, G y C) pueden sufrir una polimerización espontánea con pérdida de agua. El producto es una mezcla de polinucleótidos de longitud y secuencia aleatorias. De forma similar, aminoácidos de diferentes tipos, simbolizados aquí mediante nombres abreviados de tres letras, pueden polimerizar entre ellos formando polipéptidos. Las proteínas actuales están formadas a partir de un conjunto estándar de 20 tipos de aminoácidos.

otro formando un enlace peptídico, mientras que dos nucleótidos se pueden unir entre ellos mediante un enlace fosfodiéster. La repetición de estas reacciones da lugar a polímeros lineales conocidos como polipéptidos y polinucleótidos, respectivamente. En los organismos vivos actuales, los polipéptidos –conocidos como **proteínas**– y los polinucleótidos –en forma de **ácidos ribonucleicos (RNA)** y **ácidos desoxirribonucleicos (DNA)**– son considerados habitualmente los constituyentes más importantes. Un restringido conjunto de 20 aminoácidos forman los bloques constitutivos universales de las proteínas, mientras que las moléculas de RNA y DNA están construidas a partir de cuatro tipos de nucleótidos cada una. Aunque no sabemos por qué se seleccionaron estos conjuntos de monómeros en particular para biosíntesis en lugar de otros químicamente similares, veremos que las propiedades químicas de los polímeros correspondientes los hacen especialmente adecuados para desempeñar sus funciones específicas en la célula.

Los primeros polímeros pudieron formarse de varias maneras –por ejemplo, mediante el calentamiento de compuestos orgánicos secos o gracias a la actividad catalítica de las elevadas concentraciones de polifosfatos inorgánicos u otros catalizadores inorgánicos crudos. Los productos obtenidos de reacciones similares en el laboratorio son polímeros de longitud variable y de secuencia aleatoria, en los que la adición de un aminoácido o de un nucleótido en un momento dado depende principalmente del azar (Figura 1-3). Sin embargo, una vez formado, un polímero puede influir sobre reacciones químicas posteriores actuando como un catalizador.

El origen de la vida requirió que en un conjunto de moléculas de este tipo hubiera algunas que tuvieran, al menos en parte, una propiedad crucial: la capacidad de catalizar reacciones que generaran, directa o indirectamente, la producción de más moléculas del propio catalizador. La producción de catalizadores con esta propiedad autogenerativa especial estuvo favorecida y las moléculas más eficientes en generar su propia producción captaron los materiales crudos eliminándolos de los procesos de producción de otras substancias. De esta manera puede concebirse el desarrollo gradual de un sistema químico complejo de monómeros orgánicos y de polímeros que actuaban juntos generando más moléculas de los mismos tipos, alimentadas por materiales crudos simples del entorno. Un sistema **autocatalítico** como éste tendría las mismas propiedades que creemos que son las características de la materia viva: estaría formado por una gran cantidad de moléculas interactivas seleccionadas al azar; tendería a autorreproducirse; competiría con otros sistemas dependientes de la misma materia prima; y si se eliminara esta materia prima o si se mantuviera a temperaturas erróneas que alteraran el balance de las velocidades de reacción progresaría hacia el equilibrio químico y "moriría".

Pero, ¿qué tipo de moléculas pudo haber tenido propiedades autocatalíticas como éstas? En las células actuales los catalizadores mas versátiles son dos polipéptidos, compuestos de muchos aminoácidos diferentes con cadenas laterales quimicamente diversas y por tanto capaces de adoptar diferentes formas tridi-



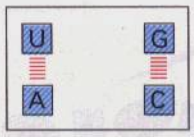


Figura 1-4 Polinucleótidos como patrón. Se produce el enlace preferencial entre pares de nucleótidos (C con G y A con U) mediante enlaces químicos relativamente débiles (*arriba*). Este apareamiento permite que un polinucleótido actúe como patrón para la síntesis de otro polinucleótido (*izquierda*).

mensionales erizadas de lugares reactivos. Sin embargo aunque los polipéptidos son versátiles como catalizadores no conocemos sistemas por los que una de estas moléculas pueda autorreproducirse especificando directamente la formación de otra de la misma secuencia.

Los polinucleótidos son capaces de dirigir su propia síntesis[3]

Los polinucleótidos tienen propiedades que contrastan con las de los polipéptidos. Su capacidad como catalizadores es más limitada pero pueden dirigir directamente la formación de copias exactas de su propia secuencia. Esta capacidad depende del **apareamiento complementario** de subunidades de nucleótidos, el cual permite a un polinucleótido actuar como **patrón** en la formación de otro. En el caso más simple un polímero compuesto por un nucleótido (por ejemplo, ácido policitidílico o poli C) puede alinear en su superficie las subunidades necesarias para generar otro polinucleótido, (en este ejemplo el ácido poliguanílico o poli G) favoreciendo así su polimerización formando poli G (Figura 1-4). Debido a que las subunidades C se unen preferentemente a las subunidades G, y viceversa, a su vez la molécula de poli G favorecerá la síntesis de más poli C.

Consideremos ahora un polinucleótido con una secuencia de subunidades más compleja, concretamente una molécula de RNA formada por cuatro tipos de nucleótidos con las bases uracilo (U), adenina (A), citosina (C) y guanina (G) dispuestas siguiendo una secuencia particular. Debido al apareamiento complementario entre las bases A y U, y entre las bases G y C, cuando esta molécula se añade a una mezcla de nucleótidos activados y bajo condiciones adecuadas, dirigirá la polimerización de una secuencia complementaria a la suya. La nueva molécula de RNA resultante será una especie de molde del original, de manera que cada A del original corresponderá con una U en la copia, y así sucesivamente. La secuencia de nucleótidos de la cadena original de RNA contiene una información que esencialmente se conserva en las cadenas complementarias recién formadas: una segunda operación de copia, tomando la cadena complementaria como patrón, da lugar a la secuencia original (Figura 1-5).

Estos mecanismos de **molde o patrón complementario** son elegantemente sencillos y se hallan en la base de los procesos de transferencia de información de los sistemas biológicos. La información genética contenida en cada célula

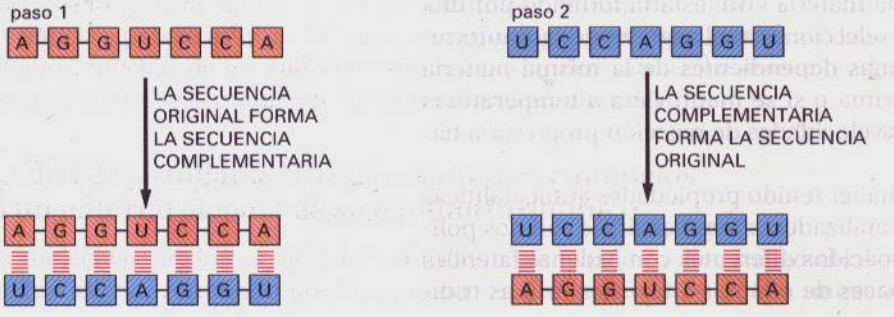


Figura 1-5 Replicación de una secuencia de polinucleótido (en este caso una molécula de RNA). En el paso 1, la molécula original de RNA actúa como patrón en la formación de una molécula de RNA de secuencia complementaria. En el paso 2, esta molécula complementaria de RNA actúa a su vez como patrón, formando moléculas de RNA de secuencia igual a la original. Puesto que cada molécula patrón puede producir numerosas copias de la hebra complementaria, estas reacciones pueden dar lugar a la "multiplicación" de la secuencia original.

está codificada en las secuencias de nucleótidos de sus moléculas de polinucleótidos, y esta información se transmite (hereda) de generación en generación mediante las interacciones entre los pares de bases complementarios.

Sin embargo, para que se produzcan estos mecanismos de molde se necesita la participación de catalizadores: sin una catálisis específica, la polimerización sobre un patrón es lenta e ineficaz y además la formación de réplicas correctas está claramente dificultada por la existencia de reacciones competitivas. En la actualidad las funciones catalíticas que replican polinucleótidos están proporcionadas por proteínas altamente especializadas, llamadas enzimas. En el "caldo prebiótico" quizá hubiera polipéptidos primitivos que colaboraron en alguna tarea catalítica. Sin embargo la existencia de moléculas con especificidad catalítica adecuada debió ser escasa a no ser que el propio RNA fuese capaz, de alguna manera, de favorecer su *propia* producción. Volveremos a estudiar las relaciones recíprocas entre las síntesis de RNA y las síntesis de proteínas, de crucial importancia en todas las células vivas. Pero primero consideraremos qué puede ocurrir con el RNA, ya que las moléculas de RNA pueden presentar varias propiedades catalíticas además de actuar como patrones de su propia replicación. Concretamente, una molécula de RNA con una secuencia de nucleótidos adecuada puede actuar como catalizador en la replicación apropiada de otra molécula de RNA –el patrón– cuya secuencia puede ser arbitraria. Se cree que la especial versatilidad de las moléculas de RNA ha jugado un papel central en los procesos del origen de la vida.

Las moléculas autorreplicantes están sometidas a la selección natural[3, 4]

Las moléculas de RNA no son únicamente cadenas de símbolos que contienen información de una manera abstracta. También tienen personalidades químicas concretas que afectan a su comportamiento. Concretamente, la secuencia de nucleótidos determina el modo en que la cadena se pliega en solución. Del mismo modo que los nucleótidos de un polinucleótido se pueden aparear con nucleótidos complementarios libres de su entorno formando un nuevo polímero, también se pueden aparear con residuos complementarios de nucleótidos del propio polímero. Una secuencia GGGG de una región de una cadena polinucleotídica puede formar una asociación relativamente fuerte con una secuencia CCCC de otra región de la misma molécula. Dichas asociaciones producen diversos pliegues tridimensionales, y el conjunto de la molécula adopta una forma típica que depende completamente de la secuencia de sus nucleótidos (Figura 1-6).

La estructura plegada tridimensional de un polinucleótido afecta a su estabilidad, a su acción sobre otras moléculas y a su capacidad de replicación, de modo que no todas las formas de polinucleótidos tendrán igual éxito en una mezcla de replicación. Además resulta inevitable que en cualquier proceso de copia se produzcan errores y las copias imperfectas del original se irán propagando. Por lo tanto tras repetidas replicaciones se generarán continuamente nuevas secuencias variantes de nucleótidos. En estudios de laboratorio se ha demostrado que los sistemas replicantes de moléculas de RNA sufren una especie de selección natural a través de la cual predominan diferentes secuencias favorables, según cuáles sean las condiciones experimentales utilizadas. Lo que es más importante, las moléculas de RNA pueden ser seleccionadas por su capacidad de unir específicamente casi cualquier otro tipo de moléculas. Esto también se ha demostrado en experimentos *in vitro* que se inician con una preparación de cortas moléculas de RNA de secuencias de nucleótidos al azar sintetizadas artificialmente. Esta mezcla se hace pasar a través de una columna llena de una resina a la que se ha unido alguna substancia determinada. Las moléculas de RNA que no se unen a esta substancia pasan a través de la columna y son eliminadas; el pequeño número de moléculas que se unen a ella es retenido y utilizado como patrón para dirigir la producción de múltiples copias de su propia secuencia. Esta nueva preparación de RNA, enriquecida en secuencias que se unen a la

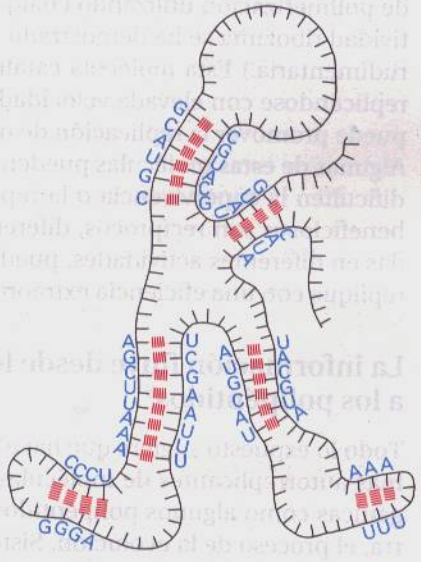


Figura 1-6 Conformación de una molécula de RNA. El apareamiento de nucleótidos entre diferentes regiones de la propia cadena de polinucleótido (RNA) hace que la molécula adopte una forma particular.

substancia escogida, se utiliza entonces como material de partida para repetir de nuevo el proceso. Tras varios de estos ciclos de selección y reproducción la mezcla de RNA consiste en múltiples copias de un relativamente pequeño número de secuencias, cada una de las cuales se une a la substancia de ensayo casi específicamente.

Por consiguiente, una molécula de RNA tiene dos características especiales: transporta información codificada en su secuencia de nucleótidos que puede transmitir mediante el proceso de replicación, y tiene una estructura plegada única que determina la manera en que interactuará con otras moléculas y responderá a las condiciones ambientales. Estos dos rasgos –uno de información y el otro de función– son las dos propiedades esenciales que se necesitan para la evolución. La secuencia de nucleótidos de una molécula de RNA es análoga al **genotipo** –la información hereditaria– de un organismo. La estructura tridimensional plegada es análoga al **fenotipo** –la expresión de la información genética en la que actúa la selección natural.

Algunas moléculas especializadas de RNA pueden catalizar reacciones bioquímicas[5]

La selección natural depende del entorno, y para una molécula de RNA que se replica, un componente crítico del entorno es el conjunto de las otras moléculas de RNA de la mezcla. Además de actuar como patrón para su propia replicación, estas moléculas de RNA pueden catalizar la rotura y la formación de enlaces covalentes, incluyendo uniones entre nucleótidos. Por ejemplo, algunas moléculas de RNA especializadas pueden catalizar cambios en otras moléculas de RNA cortando la secuencia de nucleótidos en un punto determinado; otros tipos de moléculas de RNA eliminan espontáneamente una porción de su propia secuencia y reúnen los extremos cortados (un proceso conocido como "automaduración por corte y empalme", self-splicing). Cada reacción catalizada por una molécula de RNA depende de una ordenación específica de los átomos que forman la superficie de esta molécula de RNA catalítica (la *ribozima*), la cual hace que algunos grupos químicos de uno o más de sus nucleótidos sean altamente reactivos.

Ciertas actividades catalíticas pudieron tener una importancia capital en el caldo primordial. Consideremos una molécula de RNA que catalice el proceso de polimerización utilizando cualquier molécula de RNA como patrón. (Esta actividad ribozima se ha demostrado directamente *in vitro* al menos de una forma rudimentaria.) Esta molécula catalítica puede actuar sobre copias de sí misma, replicándose con elevada velocidad y eficiencia (Figura 1-7A). Al mismo tiempo, puede promover la replicación de otras moléculas de RNA vecinas (Figura 1-7B). Algunas de estas moléculas pueden desarrollar acciones catalíticas que ayuden o dificulten la supervivencia o la replicación del RNA en otras vías. Si los efectos beneficiosos son recíprocos, diferentes tipos de moléculas de RNA, especializadas en diferentes actividades, pueden desarrollar un sistema cooperativo que se replique con una eficiencia extraordinaria.

La información fluye desde los polinucleótidos a los polipéptidos[6]

Todo lo expuesto sugiere que hace entre 3,5 y 4 mil millones de años, unos sistemas autorreplicantes de moléculas de RNA, mezcladas con otras moléculas orgánicas como algunos polipéptidos simples, iniciaron, en algún lugar de la Tierra, el proceso de la evolución. Sistemas con diferentes dotaciones de polímeros compitieron por los materiales precursores disponibles para construir copias de ellos mismos, tal y como compiten los organismos actualmente; el éxito dependió de la exactitud y de la rapidez con que se producían las copias, y de la estabilidad de las mismas.

Sin embargo, como destacamos anteriormente, aunque la estructura de los polinucleótidos está bien adaptada al almacenamiento y replicación de la infor-

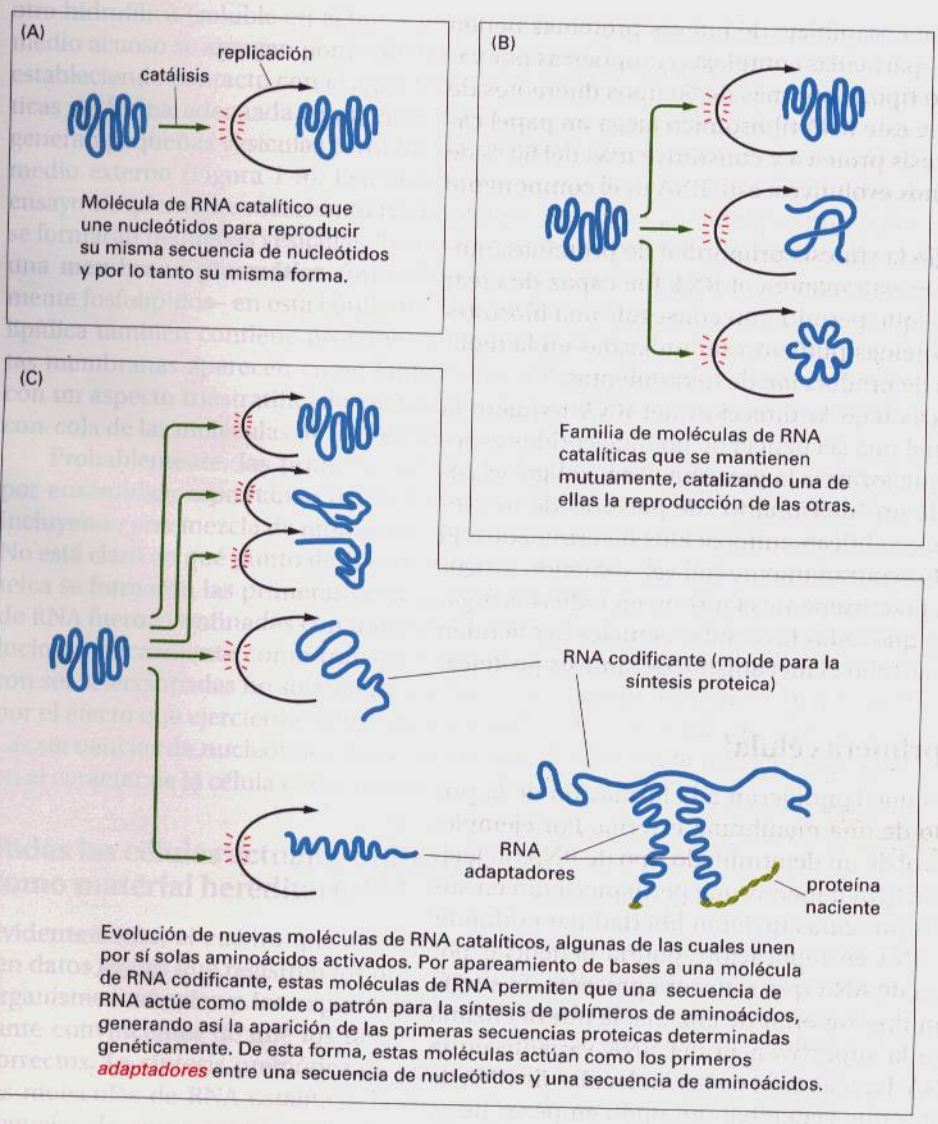


Figura 1-7 Diagrama de tres pasos sucesivos en la evolución del sistema autorreplicante de moléculas de RNA que son capaces de dirigir la síntesis proteica.

mación, sus capacidades catalíticas son limitadas respecto a las de los polipéptidos, y en las células modernas la replicación eficiente de los polinucleótidos es absolutamente dependiente de las proteínas. En el origen de la vida cualquier polinucleótido que dirigió la síntesis de un polipéptido útil debió tener en el ambiente competitivo de la evolución una gran ventaja para sobrevivir.

Sin embargo, ¿de qué manera podía la información codificada en sus secuencias determinar las secuencias de otro tipo de polímeros? Sin duda, los polinucleótidos debieron actuar como catalizadores uniendo determinados aminoácidos entre sí. En los organismos actuales, un sistema de colaboración de moléculas de RNA juega un papel central en la dirección de la síntesis de polipéptidos –la **síntesis proteica**– pero en el proceso también colaboran otras proteínas previamente sintetizadas. La maquinaria bioquímica para la síntesis proteica está notablemente elaborada. Una molécula de RNA contiene la información genética de un polipéptido determinado, en forma de código, mientras que otras moléculas de RNA actúan como adaptadores, uniendo cada una de ellas un aminoácido específico. Estos dos tipos de moléculas de RNA forman pares de bases complementarias entre sí, permitiendo que las secuencias de nucleótidos del RNA codificante dirijan la incorporación de aminoácidos específicos, transportados por el RNA adaptador, a la cadena polipeptídica en crecimiento. Probablemente los precursores de estos dos tipos de moléculas de RNA dirigieron la primera síntesis proteica sin la ayuda de proteínas (Figura 1-7C).

En la actualidad, estos procesos de ensamblaje de nuevas proteínas tienen lugar en la superficie de los *ribosomas* –partículas complejas compuestas por varias grandes moléculas de RNA de otro tipo, y por más de 50 tipos diferentes de proteínas. En el Capítulo 5 veremos que este RNA ribosómico juega un papel catalítico central en el proceso de la síntesis proteica y constituye más del 60 % de la masa ribosomal. Al menos en términos evolutivos, este RNA es el componente fundamental del ribosoma.

Así pues, parece que el RNA dirigió la síntesis primordial de proteínas, quizás de una forma torpe y primitiva. De esta manera el RNA fue capaz de crear herramientas –en forma de proteínas– que permitieron conseguir una biosíntesis más eficiente. Algunas de estas proteínas pudieron ser utilizadas en la replicación del RNA y en el propio proceso de producción de herramientas.

La síntesis de proteínas específicas bajo la dirección del RNA requiere la evolución de un código a través del cual una secuencia de polinucleótidos especifique la secuencia de aminoácidos que formará la proteína. Este código –el *código genético*– se deletrea en forma de un "diccionario" de palabras de tres letras: diferentes tripletes de nucleótidos codifican aminoácidos determinados. El código parece haber sido seleccionado arbitrariamente (tal vez sometido a algunos condicionantes), y todavía hoy es prácticamente el mismo en todos los organismos vivos. Esto sugiere claramente que todas las células actuales descienden de una línea celular primitiva que desarrolló el mecanismo de síntesis proteica.

Las membranas definieron la primera célula[7]

Uno de los acontecimientos cruciales que condujeron a la formación de la primera célula debió de ser el desarrollo de una membrana externa. Por ejemplo, las proteínas sintetizadas bajo el control de un determinado tipo de RNA no facilitarían la reproducción de este tipo de RNA a menos que permanecieran en sus proximidades; además, mientras estas proteínas tuvieran libertad para difundir entre la población de moléculas de RNA en replicación, podría beneficiar por igual a cualquier especie competidora de RNA que estuviera presente. Si surgía una variante de RNA que producía un tipo superior de enzima, la nueva enzima no podía contribuir *selectivamente* a la supervivencia del RNA variante en la competencia de éste con los otros RNA. La selección de las moléculas de RNA de acuerdo con la calidad de las proteínas que generaban no pudo empezar hasta que apareció alguna forma de compartimiento que retuviera las proteínas producidas por cada molécula de RNA y que por lo tanto hiciera que estas proteínas quedaran disponibles sólo para el RNA que las produjo (Figura 1-8).

Esta necesidad de contener es ejecutada fácilmente por otro tipo de moléculas que poseen la sencilla propiedad fisicoquímica de ser *anfipáticas*, lo cual consiste en que una zona de la molécula es hidrofóbica (insoluble en agua) y

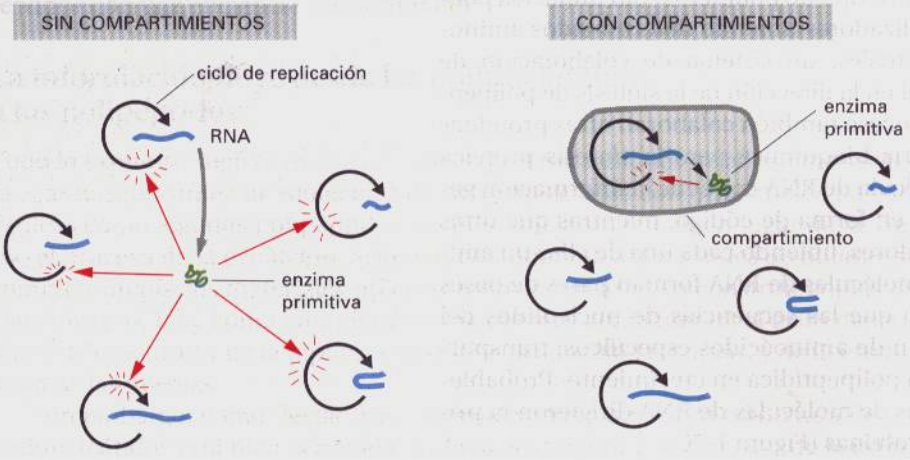


Figura 1-8 Dibujo esquemático que muestra la ventaja evolutiva que suponen los compartimientos semejantes a una célula. En una mezcla de moléculas de RNA autorreplicantes capaces de realizar la síntesis proteica (tal como se ilustra en la Figura 1-7), cualquier forma de RNA mejorada que sea capaz de producir una proteína más útil debe compartir esta proteína con todas sus competidoras. Sin embargo, si el RNA está encerrado en un compartimiento, como por ejemplo una membrana lipídica, cualquier proteína que produzca quedará confinada para su uso exclusivo; entonces, el RNA puede ser seleccionado en base a su capacidad de sintetizar una proteína mejor.

otra hidrofílica (soluble en agua). Cuando tales moléculas se encuentran en un medio acuoso se agregan poniendo en íntimo contacto sus zonas hidrofóbicas y estableciendo contacto con el agua por sus zonas hidrofílicas. Moléculas anfipáticas de forma adecuada se agregan espontáneamente formando *bicapas*, que generan pequeñas vesículas cerradas cuyo contenido acuoso se halla aislado del medio externo (Figura 1-9). Este fenómeno se puede reproducir en el tubo de ensayo simplemente mezclando fosfolípidos y agua: en condiciones apropiadas, se formarán pequeñas vesículas. Todas las células actuales están delimitadas por una **membrana plasmática** formada por moléculas anfipáticas –mayoritariamente fosfolípidos– en esta configuración; en las membranas celulares la bicapa lipídica también contiene proteínas anfipáticas. Al microscopio electrónico estas membranas aparecen como láminas de aproximadamente 5 nm de grosor, con un aspecto triestratificado característico, debido al empaquetamiento cola-con-cola de las moléculas de fosfolípidos.

Probablemente, las primeras células rodeadas de membrana se formaron por ensamblaje espontáneo de moléculas de fosfolípidos del caldo prebiótico, incluyendo una mezcla de moléculas autorreplicantes de RNA y otras moléculas. No está claro en qué punto de la evolución de la catálisis biológica y síntesis proteica se formaron las primeras células. En cualquier caso, cuando las moléculas de RNA fueron confinadas con una membrana cerrada pudieron empezar a evolucionar eficazmente como transportadores de instrucciones genéticas: pudieron ser seleccionadas no solamente en base a su propia estructura, sino también por el efecto que ejercieron sobre otras moléculas de su mismo compartimiento. Las secuencias de nucleótidos de las moléculas de RNA pudieron ser expresadas en el carácter de la célula como un todo.

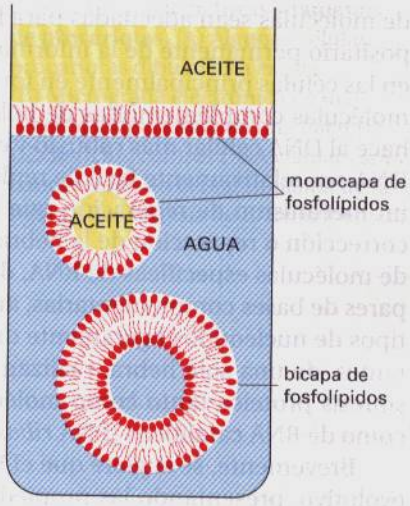


Figura 1-9 Formación de membranas por fosfolípidos. Dado que estas moléculas tienen una cabeza hidrofílica y unas colas lipofílicas, en una interfase aceite-agua se alinean espontáneamente con la cabeza hacia el agua y las colas en el aceite. En agua se asocian formando bicapas vesiculares cerradas, en las cuales las colas lipofílicas están en contacto con otras colas y las cabezas hidrofílicas están expuestas al agua.

Todas las células actuales utilizan el DNA como material hereditario[3, 6, 8]

Evidentemente, el cuadro que acabamos de presentar es especulativo: no existen datos fósiles que registren los orígenes de la primera célula. Sin embargo, los organismos actuales y los experimentos realizados proporcionan pruebas bastante convincentes de que los rasgos principales de esta historia evolutiva son correctos. La síntesis prebiótica de pequeñas moléculas, la autorreplicación de las moléculas de RNA catalítico, la traducción de las secuencias de RNA a secuencias de aminoácidos y el ensamblaje de las moléculas lipídicas formando compartimientos rodeados de membrana: todo esto debió de ocurrir durante la génesis de la célula primitiva hace unos 3,5 o 4 mil millones de años.

Resulta útil comparar estas células primitivas con las células actuales más sencillas, los **micoplasmas**. Son pequeñas bacterias de un tipo degenerado que normalmente llevan una vida parasitaria en estrecha asociación con células vegetales o animales (Figura 1-10). Algunos tienen un diámetro de aproximadamente 0,3 µm y sólo contienen el ácido nucleico suficiente para codificar la síntesis de unas 400 proteínas diferentes. Algunas de estas proteínas son enzimas, otras son proteínas estructurales; otras se hallan en el interior de la célula; otras están incluidas en su membrana. En conjunto los micoplasmas sintetizan las pequeñas moléculas esenciales que no se encuentran accesibles en el entorno, redistribuyen la energía necesaria para conducir las reacciones biosintéticas y mantienen las condiciones apropiadas en el interior de la célula.

Probablemente, las primeras células de la Tierra fueron menos sofisticadas y se dividían más lentamente y con menor eficiencia. Pero existía una diferencia más fundamental entre las células primitivas y un micoplasma o cualquier otra célula actual: la información hereditaria en todas las células vivas actuales está almacenada en el DNA y no en el RNA, que es como se supone que las células primitivas almacenaban la información hereditaria. Ambos tipos de polinucleótidos se encuentran en las células actuales, pero actúan de una manera cooperativa, ya que cada uno ha evolucionado en el sentido de desempeñar tareas especializadas. Pequeñas diferencias químicas hacen que cada uno de los dos tipos

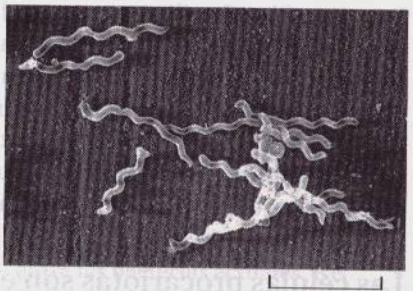


Figura 1-10 *Spiroplasma citrii*, un micoplasma que crece en células vegetales. (Por cortesía de J. Burgess.)

de moléculas sean adecuadas para funciones diferentes. El DNA actúa como depositario permanente de la información genética y a diferencia del RNA se halla en las células principalmente en forma de doble hebra, compuesta por un par de moléculas complementarias de polinucleótidos. Esta estructura de doble hebra hace al DNA celular más robusto y estable que el RNA; también determina que el DNA sea relativamente fácil de replicar (véase el Capítulo 3) y permite que actúe un mecanismo de reparación que utiliza la hebra intacta como patrón para la corrección o reparación de la hebra lesionada asociada. El DNA dirige la síntesis de moléculas específicas de RNA, de nuevo por el principio de apareamiento de pares de bases complementarias, aunque el apareamiento se produce aquí entre tipos de nucleótidos ligeramente diferentes. Luego, las moléculas de RNA resultantes, de una sola hebra, realizan otras dos funciones primordiales: dirigen la síntesis proteica tanto como moléculas de RNA codificantes (RNA *mensajeros*) como de RNA catalíticos (RNA *ribosómicos* y otros no mensajeros).

Brevemente, se sugiere que el RNA apareció antes que el DNA en el proceso evolutivo, presentando las propiedades genética y catalítica; posteriormente, el DNA tomó el relevo de la funció genética primaria y las proteínas se constituyeron en los principales catalizadores, mientras que el RNA quedó relegado a principal intermediario entre ambos (Figura 1-11). Con el advenimiento del DNA, las células pudieron ser cada vez más complejas, ya que pudieron contener y transmitir una cantidad de información genética mayor de la que podía almacenarse de forma estable en las moléculas de RNA.

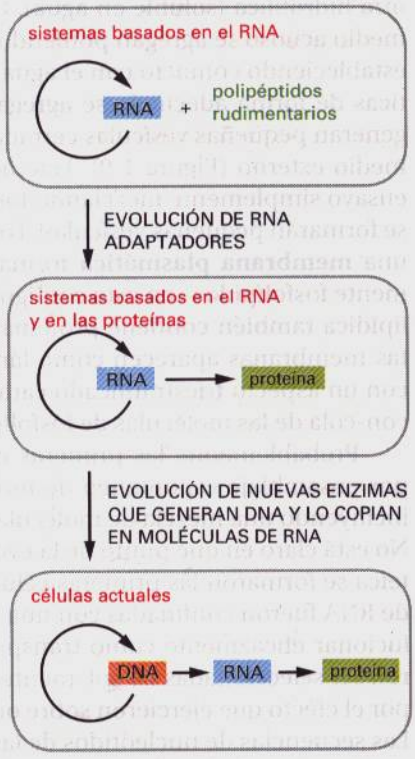


Figura 1-11 Estadios propuestos para la evolución desde sencillos sistemas autorreplicantes de moléculas de RNA hasta las células actuales. Actualmente el DNA es el depositario de la información genética y el RNA actúa mayoritariamente como intermediario de la síntesis proteica.

Resumen

Las células vivas surgieron probablemente en la Tierra gracias a la agregación espontánea de moléculas, hace aproximadamente 3,5 mil millones de años. Sobre la base de nuestros conocimientos acerca de los organismos actuales y de las moléculas que contienen, parece probable que el desarrollo de los mecanismos autocatalíticos fundamentales para los sistemas vivientes empezara con la evolución de familias de moléculas de RNA que podían catalizar su propia replicación. Con el tiempo, una de estas familias de RNA catalíticos cooperativos debió de desarrollar la habilidad de dirigir la síntesis de polipéptidos. Finalmente, debido a que la acumulación de catalizadores proteicos permitió la evolución de células más complejas y eficientes, el DNA de doble hebra substituyó al RNA como molécula más estable para el almacenaje de las cantidades crecientes de información genética requerida por estas células.

De los procariotas a los eucariotas[9]

Se cree que todos los organismos que viven actualmente sobre la Tierra derivan de una única célula primitiva nacida hace más de tres mil millones de años. Esta célula, superando a sus competidoras, tomó la delantera en el proceso de división celular y evolución y, con el tiempo, cubrió de verde la Tierra y cambió la composición de su atmósfera, convirtiéndola en el hogar de la vida inteligente. Los parecidos familiares entre todos los organismos son demasiado acusados para ser explicados de otra manera. Un hito importante a lo largo de este camino evolutivo se produjo hace 1,5 mil millones de años, cuando ocurrió la transición desde las células pequeñas con una estructura interna relativamente sencilla –las denominadas células **procariotas**, que incluyen los diversos tipos de bacterias– hasta las células *eucariotas*, mayores y radicalmente más complejas, tal como las encontramos hoy en los animales y plantas superiores.

Las células procariotas son estructuralmente simples pero bioquímicamente diversas[10]

Las **bacterias** son los organismos más sencillos que se encuentran en la mayoría de hábitats naturales. Se trata de células esféricas o alargadas, generalmente de

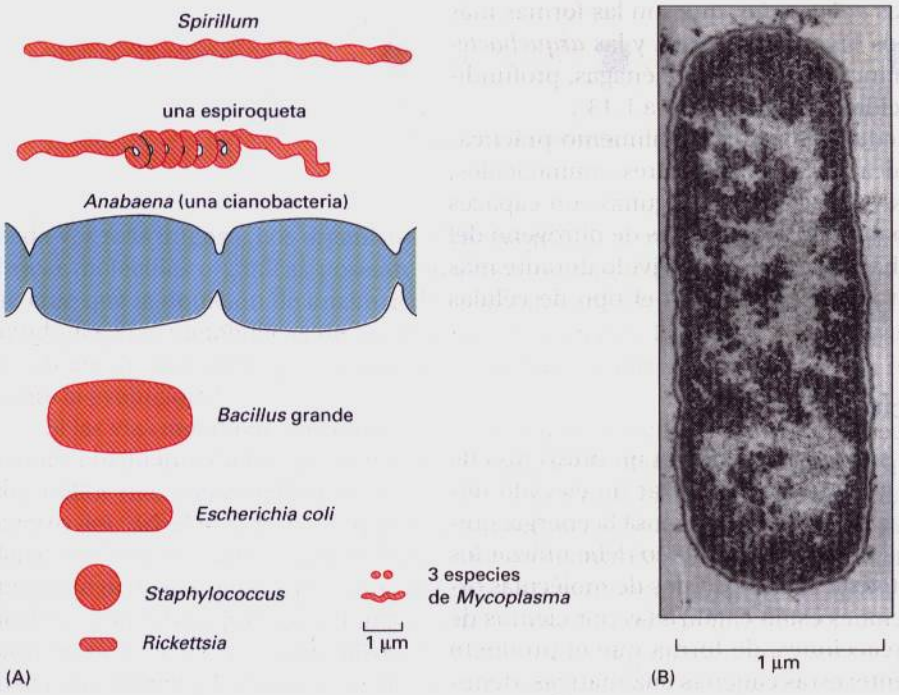


Figura 1-12 Estructuras y tamaños de procariotas. (A) Algunas células procariotas dibujadas a escala. (B) Micrografía electrónica de una sección longitudinal de una bacteria (*Escherichia coli*); el DNA celular está concentrado en la región pálida de la figura. (Por cortesía de E. Kellenberger.)

un diámetro de varios micrómetros (Figura 1-12). A menudo poseen una envoltura protectora resistente, denominada *pared celular*, por debajo de la cual una membrana plasmática rodea a un único compartimiento citoplasmático que contiene DNA, RNA, proteínas y pequeñas moléculas. Al microscopio electrónico, este interior celular aparece como una matriz de textura variable y sin ninguna estructura interna organizada evidente (véase la Figura 1-12B).

Las bacterias son pequeñas y se pueden replicar a gran velocidad, simplemente dividiéndose en dos mediante *fisión binaria*. Cuando el alimento es abundante, "la supervivencia del más apto" significa generalmente la supervivencia de los que pueden reproducirse con mayor rapidez. En condiciones óptimas, una misma célula procariota se puede dividir cada 20 minutos, y por lo tanto dar lugar a 5 mil millones de células (aproximadamente el mismo número de la población humana mundial actual) en menos de 11 horas. La capacidad de dividirse con rapidez permite que las poblaciones de bacterias se adapten rápidamente a los cambios de su ambiente. Por ejemplo, en condiciones de laboratorio una población de bacterias mantenida en un gran recipiente evoluciona en unas cuantas semanas, mediante mutación espontánea y selección natural, y consigue utilizar como fuente de carbono nuevos tipos de moléculas de azúcar.

En la Naturaleza las bacterias viven en una gran variedad de nichos ecológicos y muestran la riqueza correspondiente a su composición bioquímica. Se

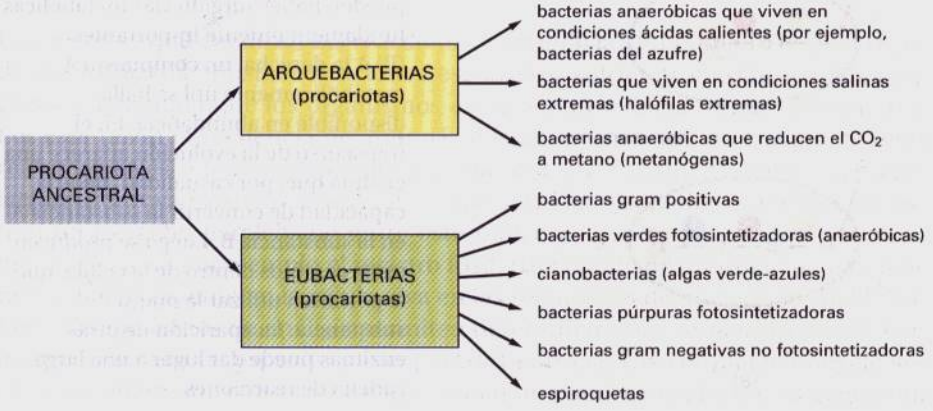


Figura 1-13 Relaciones familiares entre las bacterias actuales. Las flechas indican posibles vías de evolución. El origen de las células eucariotas se discute más adelante en el texto.

pueden reconocer dos grupos distintos: las *eubacterias*, que son las formas más habituales y viven en el suelo, el agua y los organismos vivos; y las *arquebacterias*, que se encuentran en ambientes tan incómodos como ciénagas, profundidades marinas, aguas salobres y fuentes ácidas calientes (Figura 1-13).

Existen especies de bacterias que pueden utilizar como alimento prácticamente cualquier tipo de molécula orgánica, incluidos azúcares, aminoácidos, grasas, hidratos de carbono, polipéptidos y polisacáridos. Algunas son capaces incluso de obtener los átomos de carbono del CO_2 y los átomos de nitrógeno del N_2. A pesar de su simplicidad relativa, las bacterias han sobrevivido durante más tiempo que cualquier otro organismo y todavía constituyen el tipo de células más abundante de la Tierra.

Las reacciones metabólicas evolucionan[10, 11]

Una bacteria que crezca en una solución salina que contenga un único tipo de fuente de carbono, como por ejemplo la glucosa, debe realizar un elevado número de reacciones químicas. No sólo debe obtener de la glucosa la energía química necesaria para muchos procesos vitales, sino que también debe utilizar los átomos de carbono de la glucosa para sintetizar todos los tipos de moléculas orgánicas que la célula necesita. Estas reacciones están catalizadas por cientos de enzimas que trabajan en "cadenas" de reacciones, de forma que el producto de una reacción es el sustrato de la siguiente; estas cadenas enzimáticas, denominadas *vías metabólicas*, se estudiarán en el capítulo siguiente.

Probablemente cuando empezó la vida sobre la Tierra estas elaboradas reacciones metabólicas eran poco necesarias. Las células podían sobrevivir y crecer gracias a las moléculas de su entorno. Pero a medida que se agotaron estos recursos naturales, la competencia por estas limitadas fuentes de recursos fue

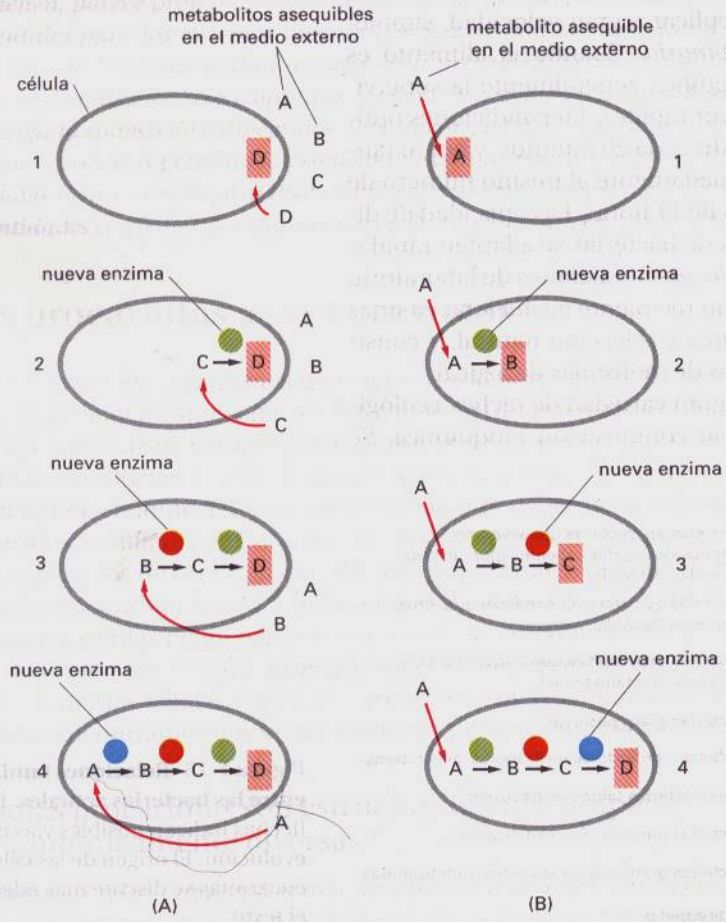


Figura 1-14 Dos maneras posibles a través de las cuales pudieron evolucionar las vías metabólicas. (A) La célula de la izquierda tiene a su disposición una serie de substancias afines (A, B, C, D) producidas por síntesis prebiótica. Una de ellas, la substancia D, es metabólicamente útil. Cuando la célula agota la reserva disponible de D, obtiene una ventaja selectiva con la evolución de una nueva enzima que puede producir D a partir de la substancia afín C. Mediante una serie de pasos similares pueden haber surgido vías metabólicas fundamentalmente importantes. (B) A la derecha, un compuesto A metabólicamente útil se halla disponible en abundancia. En el transcurso de la evolución aparece una enzima que, por casualidad, tiene la capacidad de convertir la substancia A en la substancia B. Luego se producen otros cambios dentro de la célula, que le permiten utilizar la nueva substancia. La aparición de otras enzimas puede dar lugar a una larga cadena de reacciones.

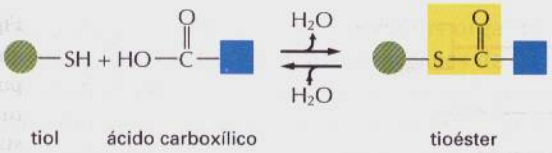


Figura 1-15 El enlace tioéster.

cada vez más intensa. Los organismos que habían desarrollado enzimas para fabricar moléculas orgánicas poseían una gran ventaja selectiva. De esta manera, se cree que la dotación de enzimas de las células aumentó gradualmente, generando las vías metabólicas de los organismos actuales. La Figura 1-14 muestra dos maneras plausibles por las que podría haber surgido una vía metabólica durante la evolución.

Si las vías metabólicas evolucionaron por adición secuencial de nuevas reacciones enzimáticas a las ya existentes, las reacciones más antiguas, al igual que los anillos más viejos del tronco de un árbol, deben de hallarse más próximas al centro del "árbol metabólico", donde se sintetizan los bloques constitutivos moleculares básicos más esenciales. Esta posición central del metabolismo está claramente ocupada por los procesos químicos en los que intervienen los azúcares fosfato. Entre estos procesos el más central probablemente es la secuencia de reacciones conocida como **glucolisis** mediante la cual la glucosa puede ser degradada en ausencia de oxígeno (es decir, de forma *anaeróbica*). Las vías metabólicas más antiguas debieron ser anaeróbicas ya que no existía oxígeno libre en la atmósfera de la Tierra primitiva. La glucolisis se produce prácticamente en todas las células vivas e impulsa la formación del compuesto *adenosín trifosfato* o ATP, que es utilizado por todas las células como una versátil fuente de energía química. Algunos compuestos *tioéster* desempeñan un papel fundamental en las reacciones de transferencia de energía de la glucolisis y en un gran número de otros procesos bioquímicos básicos en los que dos moléculas orgánicas (un grupo tiol y un ácido carboxílico) se unen mediante un enlace rico en energía en el que interviene el azufre (Figura 1-15). Se ha argumentado que esta simple pero poderosa estrategia es una reliquia de procesos prebióticos, que refleja las reacciones que tuvieron lugar en el ambiente sulfuroso volcánico de la tierra primitiva, antes incluso de que el RNA hubiera empezado a evolucionar.

Conectados a estas reacciones centrales de la glucolisis se encuentran cientos de procesos químicos distintos. Algunos de ellos son responsables de la síntesis de pequeñas moléculas, muchas de las cuales son utilizadas en reacciones posteriores para producir los grandes polímeros específicos del organismo. Otras reacciones se utilizan para degradar a unidades químicas más simples moléculas complejas ingeridas como alimento. Uno de los rasgos más notables de estas reacciones metabólicas consiste en que se producen en todos los tipos de organismos, lo cual sugiere que su origen es extremadamente antiguo.

Comparando secuencias de DNA se pueden deducir relaciones evolutivas[12]

Las enzimas que catalizan las reacciones metabólicas fundamentales, sin dejar de desarrollar las mismas funciones esenciales, sufrieron modificaciones progresivas a medida que los organismos evolucionaron hacia formas divergentes. Por esta razón la secuencia de aminoácidos del mismo tipo de enzima de diferentes especies actuales proporciona un índice extremadamente valioso de la relación evolutiva existente entre estas especies. Los resultados obtenidos muestran un estrecho paralelismo entre este índice y los proporcionados por otros métodos, como por ejemplo el registro fósil. Una fuente de información aún más rica se halla presente en la célula viva en las secuencias de nucleótidos del DNA. Métodos modernos de análisis permiten determinar estas *secuencias de DNA* en un gran número de especies y compararlas entre sí. Las comparaciones de secuencias altamente conservadas, que tienen un papel central y por consiguiente

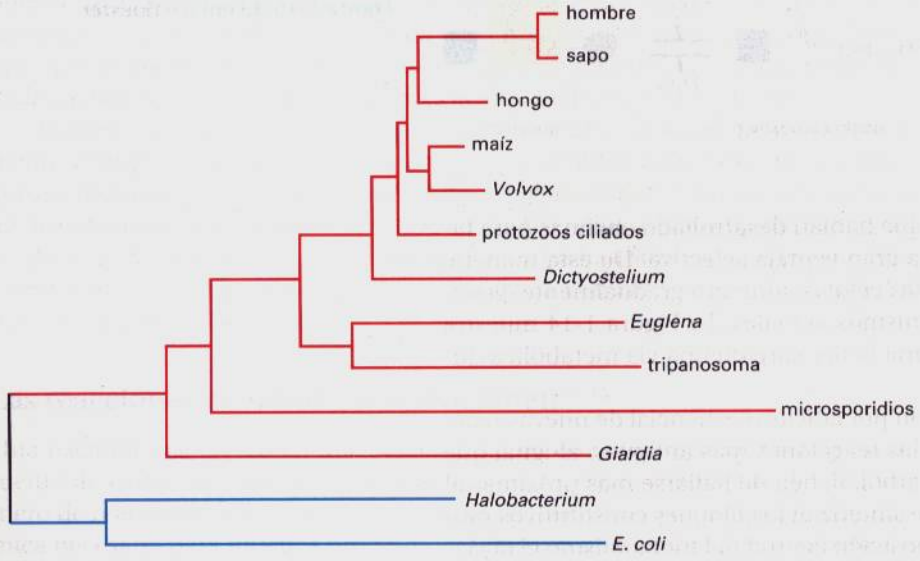


Figura 1-16 Relaciones evolutivas entre los organismos, deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos de los genes de la subunidad ribosómica pequeña. Estos genes presentan secuencias altamente conservadas, que han cambiado tan lentamente que pueden ser utilizadas para medir las relaciones filogenéticas abarcando el conjunto entero de los organismos vivos. Los datos sugieren que los linajes de las plantas, animales y hongos divergieron de un ancestro común relativamente tarde en la historia de las células eucariotas. *Halobacterium* y *E. coli* son procariotas; el resto son eucariotas. *Giardia*, los microsporidios, los tripanosomas, *Euglena*, y los protozoos ciliados son protistas (eucariotas unicelulares). (Adaptado de M.L. Sogin, J.H. Gunderson, H.J. Elwood, R.A. Alonso and D.A. Peattie, *Science* 243:75-77, 1989. © 1989 the AAAS.)

durante la evolución sólo cambian lentamente, pueden poner de manifiesto parentescos entre organismos que divergieron hace tiempo (Figura 1-16), mientras que secuencias que evolucionan rápidamente pueden utilizarse para determinar cómo evolucionan especies íntimamente relacionadas. Es de esperar que la continua aplicación de estos métodos permitirá seguir el curso de la evolución con una exactitud sin precedentes hasta el momento.

Las cianobacterias pueden fijar CO_2 y N_2[13]

A medida que se intensificó la competencia por los materiales crudos necesarios para síntesis orgánica, los organismos capaces de utilizar directamente de la atmósfera átomos de carbono y de nitrógeno (en forma de CO_2 y de N_2) tuvieron más ventaja. Sin embargo, aunque el CO_2 y el N_2 eran muy abundantes, también resultaban muy estables, por lo que era necesaria una gran cantidad de energía y un elevado número de reacciones químicas complicadas para transformarlos en formas utilizables –es decir, en moléculas orgánicas como los azúcares simples.

En el caso del CO_2, el mecanismo principal que apareció para conseguir esta transformación fue la **fotosíntesis**, en la que la energía radiante obtenida del sol se utiliza para facilitar la conversión de CO_2 en compuestos orgánicos. La interacción de la luz solar con una molécula de pigmento, la *clorofila*, excita un electrón que pasa a un estado de mayor energía. Cuando el electrón cae de nuevo a un nivel de menor energía, la energía que se desprende impulsa unas reacciones químicas, facilitadas y dirigidas por moléculas proteicas.

Probablemente una de las primeras reacciones impulsadas por la luz solar fue la generación de "poder reductor". Los átomos de carbono y de nitrógeno del CO_2 y del N_2 atmosféricos se hallan en un estado oxidado e inerte. Una manera de conseguir que sean más reactivos para que participen en las reacciones de biosíntesis consiste en reducirlos –es decir, en proporcionarles una mayor cantidad de electrones. Ello se consigue en varias etapas. En la primera, se liberan electrones de dadores débiles de electrones, y se transfieren a un dador fuerte de electrones, por medio de la clorofila, a través de una reacción en la que interviene la luz; en el proceso de reducción el dador fuerte de electrones se utiliza para reducir el CO_2 o el N_2. El estudio de los mecanismos de fotosíntesis en diversas bacterias actuales sugiere que una de las primeras fuentes de electrones fue el H_2S, siendo el producto residual primario el azufre elemental. Más tarde se llevó a cabo el proceso mucho más difícil, pero en último término más rentable, de obtener electrones del H_2O y el O_2 fue liberado en grandes cantidades como producto residual.

Actualmente las *cianobacterias* (conocidas también como algas azules) son una vía principal a través de la cual el carbono y el nitrógeno son transformados

en moléculas orgánicas, penetrando así en la *biosfera*. Constituyen los organismos más autosuficientes de los que viven en la actualidad. Al ser capaces de "fijar" el CO_2 y el N_2 en moléculas orgánicas están capacitadas, en una primera aproximación, para vivir únicamente del agua, del aire y de la luz solar; es probable que los mecanismos mediante los cuales lo consiguen hayan permanecido esencialmente constantes durante varios miles de millones de años. Conjuntamente con otras bacterias que tienen algunas de estas capacidades, crearon las condiciones adecuadas para la evolución de otros tipos de organismos más complejos: en cuanto algún tipo de organismos fue capaz de sintetizar a partir de material inorgánico crudo la gama completa de componentes orgánicos celulares, otros organismos pudieron subsistir alimentándose de los sintetizadores primarios y de sus productos.

Las bacterias pueden realizar la oxidación aeróbica de las moléculas nutritivas[13]

Actualmente mucha gente está preocupada, y con razón, por las consecuencias ambientales de las actividades humanas. Sin embargo, en el pasado otros organismos provocaron también (aunque mucho más lentamente) cambios revolucionarios en el medio ambiente de la Tierra. Este cambio resulta especialmente evidente en cuanto a la composición de la atmósfera terrestre, que a través de la fotosíntesis (proceso que liberó oxígeno) fue transformándose desde una mezcla prácticamente carente de oxígeno hasta una mezcla en la que el oxígeno constituye un 21% del total (Figura 1-17).

Puesto que el oxígeno es un elemento químico extremadamente reactivo, que puede interaccionar con la mayoría de los constituyentes citoplasmáticos, debió de ser tóxico para muchos organismos primitivos, al igual que lo es para muchas bacterias anaeróbicas actuales. Sin embargo, esta reactividad también proporciona una fuente de energía química, y por tanto no es sorprendente que haya sido utilizada por los organismos en el transcurso de la evolución. Utilizando oxígeno, los organismos pueden oxidar de manera más completa las moléculas que ingieren. Por ejemplo, en ausencia de oxígeno, la glucosa únicamente puede ser degradada hasta ácido láctico o etanol, los productos finales de la glucolisis anaeróbica. Pero en presencia de oxígeno, la glucosa puede ser degradada completamente a CO_2 y H_2O. De esta manera se puede obtener mucha más energía por cada gramo de glucosa. La energía liberada en la **respiración** –la oxidación aeróbica de las moléculas alimenticias– se utiliza para impulsar la síntesis de ATP, de una manera muy parecida a la que los organismos fotosintéticos

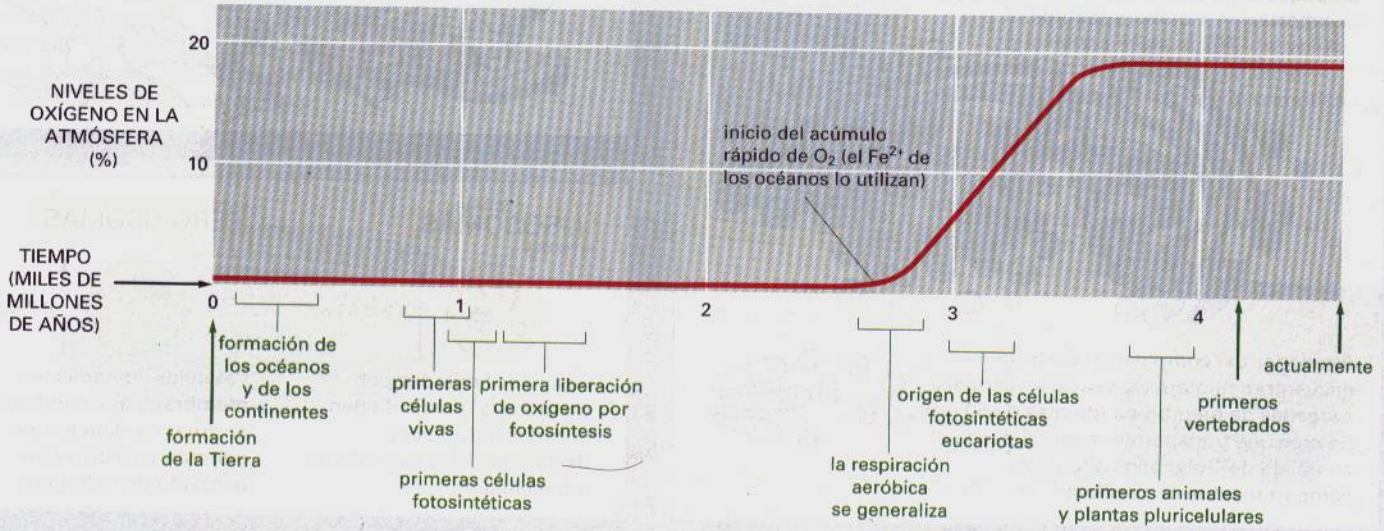
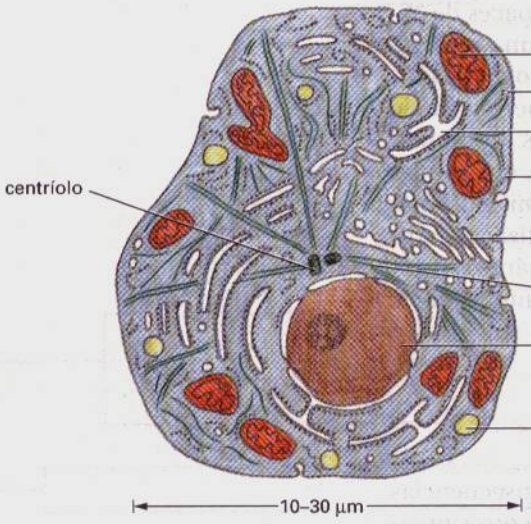


Figura 1-17 El oxígeno atmosférico y el curso de la evolución. Relación entre los cambios en los niveles de oxígeno atmosférico y algunas de las principales etapas que al parecer ocurrieron durante la evolución de los organismos vivos sobre la Tierra. Como se indica, las evidencias geológicas sugieren que pasaron más de mil millones de años entre la aparición de las cianobacterias (probablemente el primer organismo que liberó oxígeno) y el momento en que los niveles de oxígeno empezaron a acumularse en la atmósfera. Se cree que este intervalo fue debido fundamentalmente al rico aporte de hierro ferroso disuelto en los océanos, que reaccionó con el oxígeno liberado formando enormes depósitos de óxido de hierro.

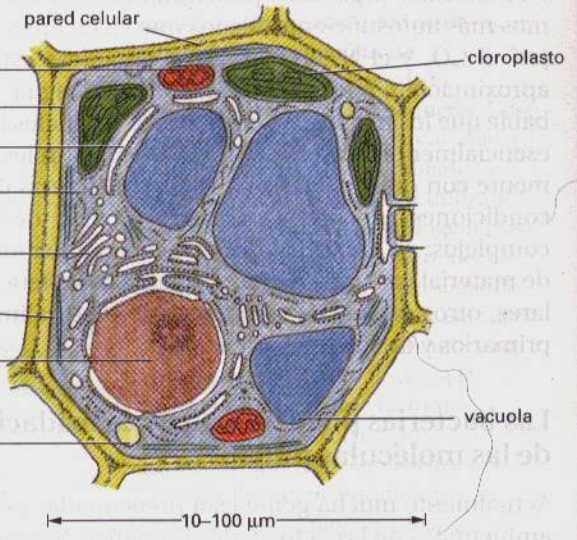
CÉLULA ANIMAL

sección ultrafina de una célula animal indiferenciada



CÉLULA VEGETAL

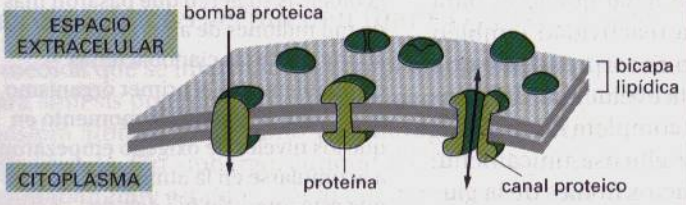
sección ultrafina de una célula indiferenciada de una planta superior



EL SISTEMA DE MEMBRANAS DE LA CÉLULA

MEMBRANA PLASMÁTICA

El límite externo de la célula es la membrana plasmática, una capa continua de moléculas lipídicas de unos 4-5 nm de grosor, en la que están incluidas varias proteínas.



Algunas de estas proteínas actúan como bombas y canales para el transporte de moléculas específicas hacia fuera y dentro de la célula.

RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

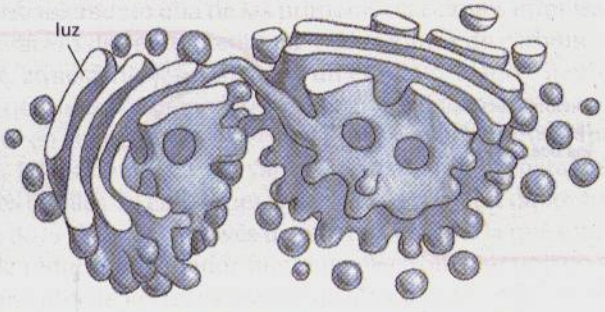
Por todo el citoplasma de las células eucarióticas se extiende un sistema de membrana formando cisternas, sáculos y tubos aplanados, ocupando rodeando un amplio espacio intracelular. La membrana del RE se halla en continuidad estructural con la membrana externa de la envoltura nuclear y está especializada en la síntesis y en el transporte de lípidos y proteínas de membrana.

El retículo endoplasmático rugoso (ER rugoso) se suele presentar como sáculos aplanados y exteriormente está recubierto por ribosomas, dedicados a la síntesis proteica.

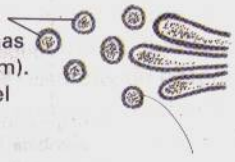
El retículo endoplasmático liso (ER liso) suele ser más tubular y carece de ribosomas. Su principal función se centra en el metabolismo lipídico.

COMPLEJO DE GOLGI

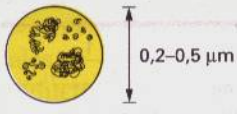
Un sistema de sáculos apilados, limitados por membrana y aplanados, implicados en la modificación, selección y empaquetamiento de macromoléculas para la secreción o para la exportación a otros órganulos.



Alrededor del complejo de Golgi se encuentran numerosas vesículas pequeñas rodeadas de membrana (de más de 50 nm). Se cree que transportan material desde el complejo de Golgi a los diferentes compartimentos de la célula.

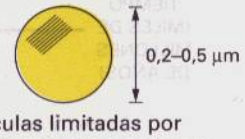


LISOSOMAS



vesículas limitadas por membrana que contienen enzimas hidrolíticas destinadas a las digestiones intracelulares

PEROXISOMAS

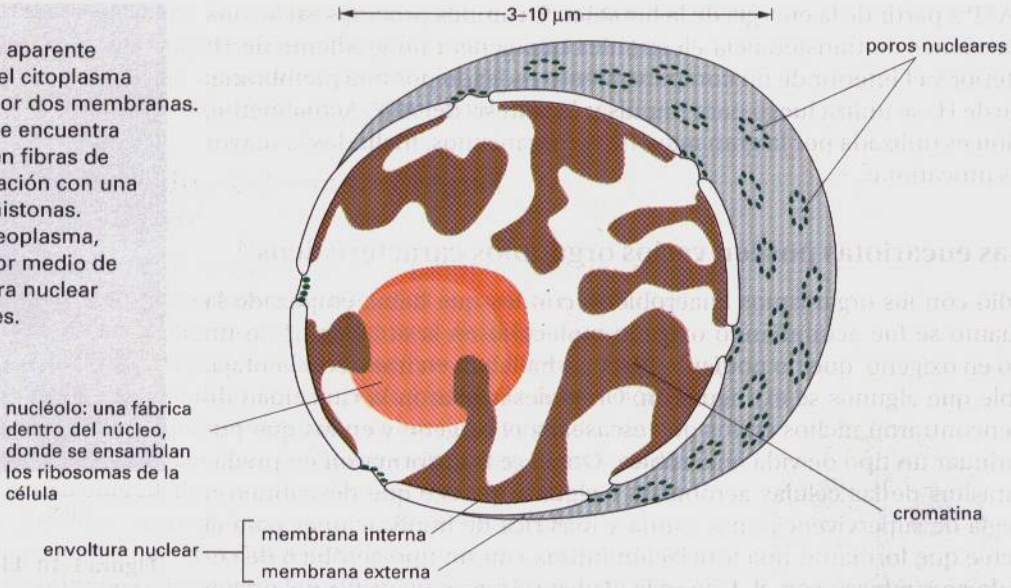


vesículas limitadas por membrana que contienen enzimas oxidativas que generan y destruyen el peróxido de hidrógeno

 Panel 1-1 Células eucariotas: esquema de sus principales orgánulos.

NÚCLEO

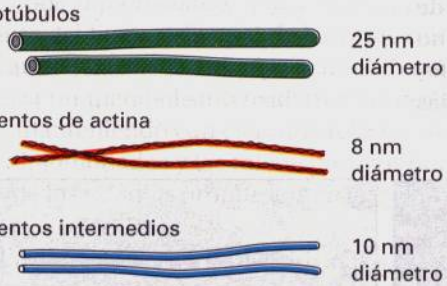
El núcleo es el orgánulo más aparente de la célula. Está separado del citoplasma por una envoltura formada por dos membranas. Todo el DNA cromosómico se encuentra en el núcleo, empaquetado en fibras de cromatina gracias a su asociación con una cantidad igual de proteínas histonas. El contenido nuclear, el nucleoplasma, se comunica con el citosol por medio de unas aberturas de la envoltura nuclear denominadas poros nucleares.



CITOESQUELETO

En el citosol, unas agrupaciones de filamentos proteicos forman redes que le confieren a la célula su forma y que constituyen la base de sus movimientos. Los tres principales tipos de elementos del citoesqueleto son:

1. microtúbulos — 25 nm diámetro
2. filamentos de actina — 8 nm diámetro
3. filamentos intermedios — 10 nm diámetro

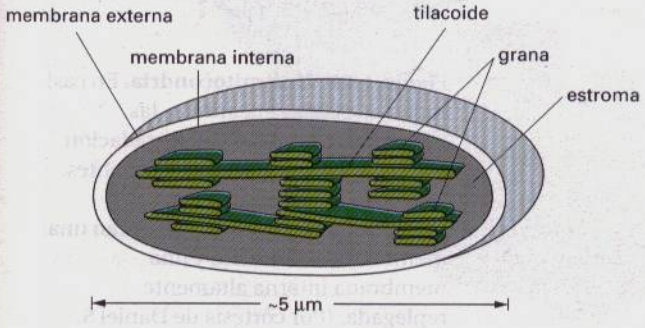


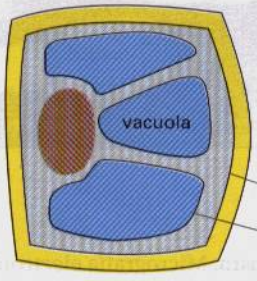
MITOCONDRIAS

Aproximadamente del tamaño de las bacterias, las mitocondrias son las centrales energéticas de todas las células eucariotas; utilizan la energía obtenida combinando oxígeno con moléculas nutritivas para producir ATP.

ORGÁNULOS ESPECIALES DE LA CÉLULA VEGETAL

Cloroplastos: Estos plastos, que contienen clorofila, son orgánulos rodeados por una doble membrana, y se encuentran en todas las plantas superiores. Un elaborado sistema de membranas en el interior del cloroplasto contiene el aparato fotosintetizador.



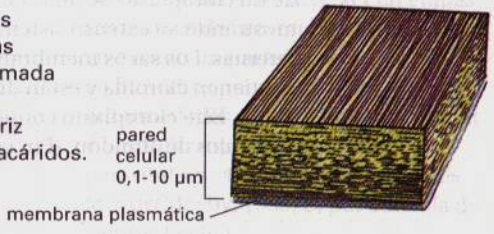


Vacuola: Una vesícula muy grande, limitada por una membrana unitaria, que ocupa hasta el 90% del volumen celular; la vacuola actúa en la regulación de la presión osmótica y también en la digestión intracelular.

membrana plasmática

membrana de la vacuola (tonoplasto)

Pared celular: Las células vegetales están rodeadas por una pared rígida formada por fibrillas de celulosa depositadas en una matriz formada por otros polisacáridos.



producen ATP a partir de la energía de la luz solar. En ambos procesos existe una serie de reacciones de transferencia electrónica que genera un gradiente de H^+ entre el exterior y el interior de un compartimiento rodeado por una membrana; el gradiente de H^+ se utiliza luego para impulsar la síntesis del ATP. Actualmente, la respiración es utilizada por la gran mayoría de organismos, incluidos la mayor parte de los procariotas.

Las células eucariotas poseen varios orgánulos característicos[14]

¿Qué sucedió con los organismos anaeróbicos, con los que había empezado la vida, en cuanto se fue acumulando oxígeno molecular en la atmósfera? En un mundo rico en oxígeno, que no podían utilizar, se hallaban en franca desventaja. Es indudable que algunos se extinguieron. Otros desarrollaron la capacidad de respirar o encontraron nichos en los que escaseaba el oxígeno y en los que pudieron continuar un tipo de vida anaeróbica. Otros, se transformaron en predadores o parásitos de las células aeróbicas. Y algunos parece que descubrieron una estrategia de supervivencia más astuta y más rica de implicaciones para el futuro: se cree que formaron una asociación íntima con un tipo aeróbico de célula, viviendo en *simbiosis* con él. Ésta es la explicación más plausible del origen de las células actuales de tipo **eucariota** (Panel 1-1, págs. 18-19), que constituyen el tema principal de este libro.

Por definición, y a diferencia de las células procariotas, las células eucariotas tienen un *núcleo* ("*caryon*" en griego), que contiene la mayor parte del DNA celular y que está rodeado por una doble membrana (Figura 1-18). Por consiguiente, el DNA se mantiene en un compartimiento, separado del resto del contenido celular, el **citoplasma**, que es donde se producen la mayoría de las reacciones metabólicas de la célula. Además, en el citoplasma se pueden distinguir muchos *orgánulos* característicos. Entre ellos destacan dos pequeños tipos de corpúsculos, las *mitocondrias* y los *cloroplastos* (Figuras 1-19 y 1-20). Cada uno de ellos está rodeado por su propia doble membrana, que es químicamente diferente de la membrana que envuelve al núcleo. La presencia de mitocondrias

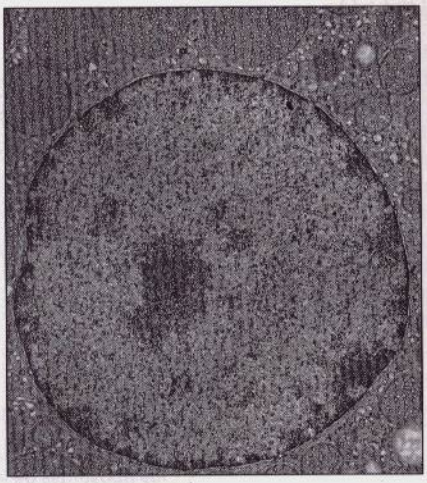


Figura 1-18 El núcleo celular. El núcleo contiene la mayor parte del DNA de la célula eucariota. La figura lo muestra en un corte ultrafino de una célula de mamífero, observada al microscopio electrónico. No sabemos cómo y cuándo se generó el núcleo; en la Figura 12-5 se presentan algunas especulaciones sobre este origen. (Por cortesía de Daniel S. Friend.)

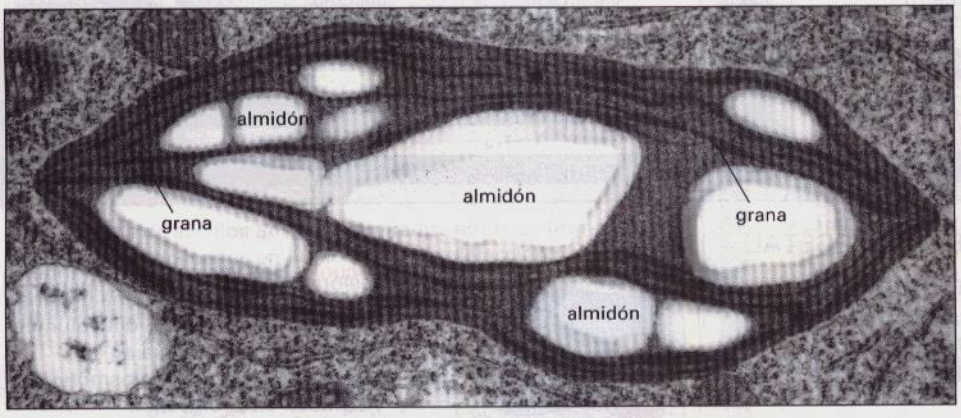


Figura 1-19 Un cloroplasto. Micrografía electrónica de un cloroplasto de una célula de musgo, mostrando su extenso sistema de membranas internas. Los sacos membranosos aplanados contienen clorofila y están dispuestos en pilas, o *grana*. Este cloroplasto contiene también grandes acúmulos de almidón. (Por cortesía de J. Burgess.)

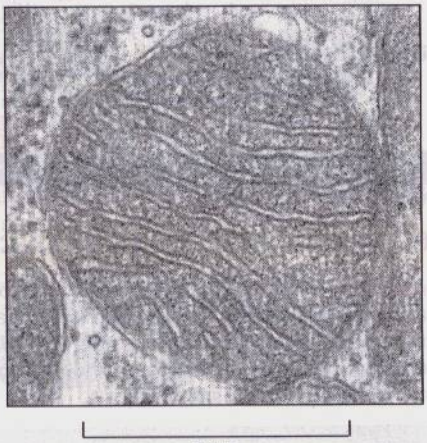


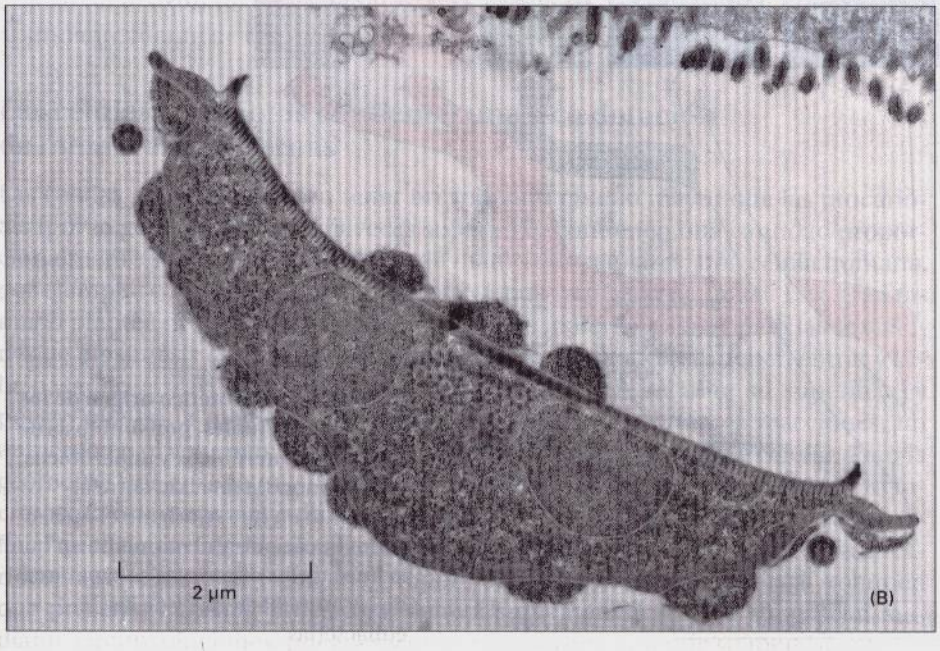
Figura 1-20 Una mitocondria. En casi todas las células eucariotas, las mitocondrias realizan la degradación oxidativa de las moléculas nutrientes. Tal como se observa en esta micrografía electrónica, presentan una membrana externa lisa y una membrana interna altamente replegada. (Por cortesía de Daniel S. Friend.)

constituye un rasgo casi universal de las células eucariotas*, mientras que los cloroplastos se encuentran únicamente en aquellas células eucariotas que pueden realizar fotosíntesis –es decir, en las plantas, pero no en los animales ni en los hongos. Se cree que ambos orgánulos tienen un origen simbiótico.

Las células eucariotas dependen de las mitocondrias para su metabolismo oxidativo[15]

Las **mitocondrias** muestran muchas similitudes con los organismos procariotas de vida libre: por ejemplo, se parecen a menudo a las bacterias en cuanto a tamaño y forma, contienen DNA, fabrican proteínas y se reproducen dividiéndose en dos. Rompiendo las células eucariotas y separando los elementos que las constituyen, es posible demostrar que las mitocondrias son responsables de la respiración y que este proceso no se produce en ninguna otra parte de la célula eucariota. Sin las mitocondrias, las células de los animales y de los hongos serían organismos anaeróbicos que para obtener su energía dependerían del proceso relativamente poco eficaz y antiguo de la glucolisis. Muchas bacterias actuales respiran igual que las mitocondrias, y parece probable que las células eucariotas sean descendientes de organismos anaeróbicos primitivos que sobrevivieron en un mundo que había pasado a ser rico en oxígeno incorporando bacterias anaeróbicas –manteniéndolas en simbiosis, debido a su capacidad de consumir el oxígeno atmosférico y producir energía. Ciertos microorganismos actuales muestran claras evidencias de la viabilidad de esta secuencia evolutiva. Existen varios cientos de especies unicelulares de organismos eucariotas que se parecen a la hipotética célula eucariota ancestral en que viven en condiciones pobres de oxígeno (por ejemplo, en el intestino de los animales) y no presentan mitocondrias. Recientemente, análisis comparativos de secuencias nucleotídicas han sugerido que al menos dos grupos de estos organismos, los *diplomonados* y los *microsporidios*, pudieron divergir muy tempranamente del linaje principal de las otras células eucariotas (Figura 1-21). Existe otro eucariota, la ameba *Pelomyxa palustris* que a pesar de que carece de mitocondrias, realiza un metabolismo oxidativo hospedando bacterias aeróbicas en su citoplasma, manteniendo con ellas una relación simbiótica permanente. Por consiguiente, los diplomonados y los microsporidios por una parte y *Pelomyxa* por otra, parecen dos de los estadios propuestos en la evolución de los eucariotas.

* *(N. del T.)* Únicamente los microsporidios, protozoos endoparásitos, carecen de mitocondrias.



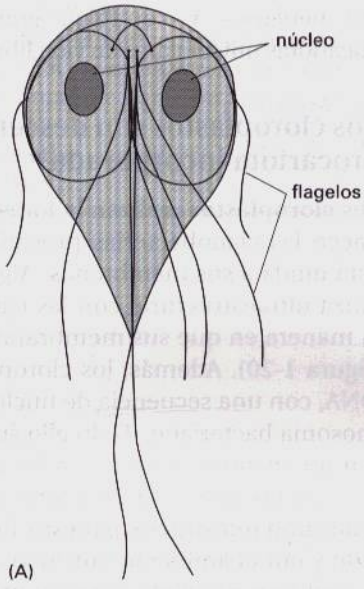


Figura 1-21 El diplomonado *Giardia*. (A) Dibujo, tal como se ve al microscopio óptico. (B) Micrografía electrónica de una sección a través del aplanado cuerpo de la célula. Se cree que *Giardia* es uno de los tipos celulares más primitivos de célula eucariota. Es nucleado (de hecho tiene dos nucleos idénticos), presenta citoesqueleto con actina y tubulina y se desplaza mediante flagelos típicos que contienen microtúbulos; sin embargo no tiene ni mitocondrias ni cloroplastos ni un retículo endoplasmático normal ni complejo de Golgi. Estudios de secuencias de nucleótidos indican que está al menos tan relacionado con las bacterias como con otros eucariotas, de los que debió de diverger en etapas tempranas de la evolución. *Giardia* vive como un parásito en el intestino y en humanos puede causar enfermedades. (A, según G.D. Schmidt y L.S. Roberts, Foundations of parasitology, 4th Ed. St. Louis: Times Mirror/Mosby, 1989; B, por cortesía de Dennis Feely.)

La adquisición de mitocondrias debió de tener muchas repercusiones. La membrana plasmática, por ejemplo, está fuertemente comprometida en el metabolismo energético en las células procariotas pero no en las eucariotas, en las que esta función crucial ha sido relegada a la mitocondria. Parece probable que la separación de funciones dejó libre a la membrana plasmática eucariota para desarrollar otras características importantes. Concretamente, dado que las células eucariotas no necesitan mantener un marcado gradiente de H^+ a través de su membrana plasmática, tal como requieren las procariotas para la producción de ATP, fue posible utilizar cambios controlados de la permeabilidad iónica de la membrana plasmática con finalidad de señales celulares. Así, aproximadamente al mismo tiempo en que surgieron las células eucariotas, aparecieron en la membrana plasmática varios tipos de canales iónicos. En la actualidad, en organismos superiores estos canales median elaborados procesos de señales eléctricas –especialmente en el sistema nervioso– y controlan gran parte del comportamiento de organismos eucariotas unicelulares de vida libre como los protozoos (ver más adelante).

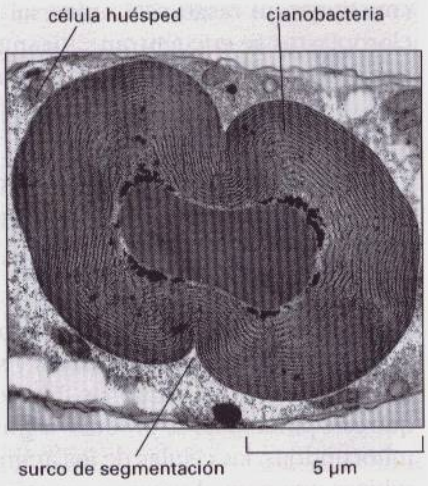


Figura 1-22 Un pariente próximo de las cianobacterias actuales, que vive en una relación simbiótica permanente dentro de otra célula. Los dos organismos reciben el nombre conjunto de *Cyanophora paradoxa*. La "cianobacteria" está en el proceso de división. (Por cortesía de Jeremy D. Pickett-Heaps.)

Los cloroplastos son descendientes de una célula procariota incorporada[16]

Los **cloroplastos** realizan la fotosíntesis de una manera muy parecida a como lo hacen las cianobacterias procariotas, captando la luz solar en la clorofila que está unida a sus membranas. Algunos cloroplastos guardan una estrecha semejanza ultraestructural con las cianobacterias, siendo similares en tamaño y en la manera en que sus membranas portadoras de clorofila están apiladas (véase Figura 1-20). Además, los cloroplastos se reproducen por división y contienen DNA, con una secuencia de nucleótidos casi idéntica a la de fragmentos del cromosoma bacteriano. Todo ello sugiere claramente que los cloroplastos comparten un ancestro común con las cianobacterias y que evolucionaron a partir de procariotas que pasaron a vivir dentro de células eucariotas. Estos procariotas realizaron fotosíntesis para sus huéspedes como contraprestación por la protección y por el ambiente nutritivo que estos últimos les suministraban. De hecho, la simbiosis de células fotosintetizadoras con otros tipos celulares es un fenómeno común, y se pueden encontrar algunas células eucariotas actuales que contienen auténticas cianobacterias (Figura 1-22).

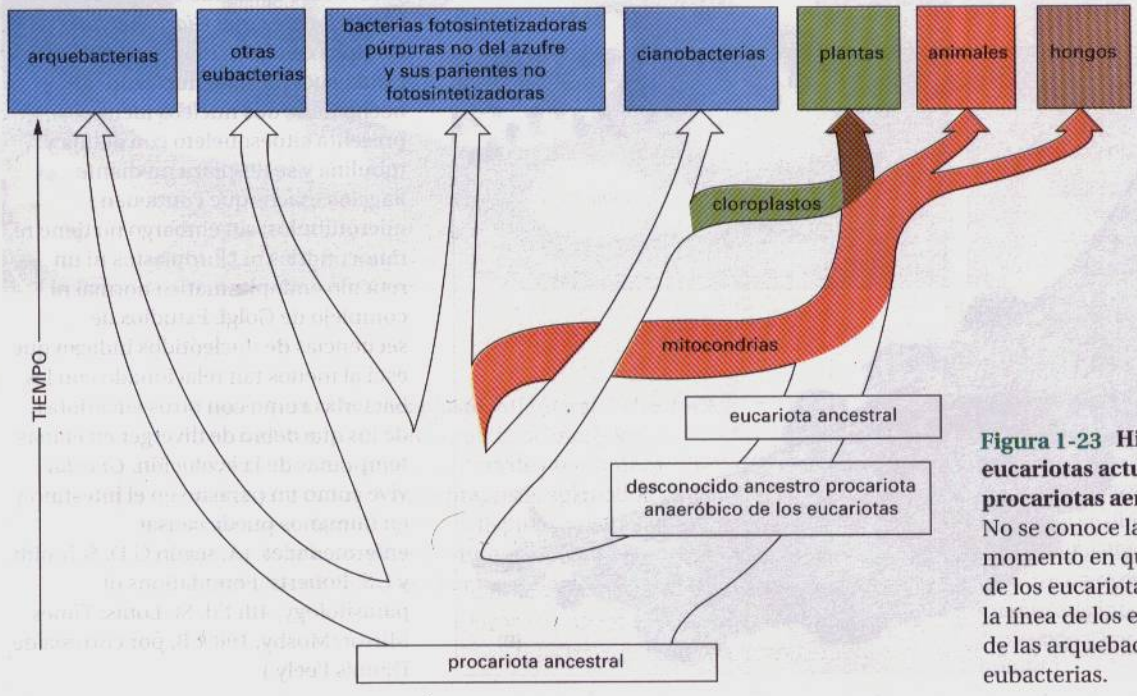


Figura 1-23 Hipotético origen de los eucariotas actuales, por simbiosis de procariotas aeróbicos y anaeróbicos. No se conoce la relación entre el momento en que se originó el núcleo de los eucariotas y el momento en que la línea de los eucariotas se separaron de las arquebacterias y de las eubacterias.

Tabla 1-1 Comparación entre organismos procariotas y eucariotas

	Procariotas	Eucariotas
Organismos	bacterias y cianobacterias	protistas, hongos, plantas y animales
Tamaño celular	generalmente de 1 a 10 µm en dimensión lineal	generalmente de 5 a 100 µm en dimensión lineal
Metabolismo	anaeróbico o aeróbico	aeróbico
Orgánulos	pocos o ninguno	núcleo, mitocondrias, cloroplastos, retículo endoplasmático, etc.
DNA	DNA circular en el citoplasma	moléculas lineales de DNA muy largas que contienen muchas regiones no codificantes; organizado en cromosomas y rodeado por la envoltura nuclear
RNA y proteína	RNA y proteína sintetizados en el mismo compartimiento	RNA sintetizado y procesado en el núcleo; proteínas sintetizadas en el citoplasma
Citoplasma	sin citoesqueleto: corrientes citoplasmáticas, endocitosis y exocitosis ausentes	citoesqueleto compuesto por filamentos proteicos; corrientes citoplasmáticas, endocitosis y exocitosis
División celular	separación de cromosomas por unión a la membrana plasmática	separación de cromosomas mediante un aparato: el huso mitótico
Organización celular	principalmente unicelular	principalmente pluricelular, con diferenciación de muchos tipos celulares

La Figura 1-23 muestra los orígenes evolutivos de los eucariotas, de acuerdo con la teoría simbiótica. Sin embargo, debemos subrayar que las mitocondrias y los cloroplastos muestran, además de similitudes, importantes diferencias con respecto a las bacterias aeróbicas y a las cianobacterias actuales respectivamente. Por ejemplo, su cantidad de DNA es muy reducida, de forma que la mayor parte de las moléculas a partir de las cuales están constituidos, son sintetizadas en algún otro lugar de la célula eucariota e importadas al orgánulo. Si bien parece que se originaron como bacterias simbióticas, han sufrido importantes cambios evolutivos y han pasado a ser altamente dependientes de sus huéspedes y sujetos a su control.

La mayoría de los eucariotas actuales tienen en común las mitocondrias y toda una constelación de rasgos que los distinguen de los procariotas (Tabla 1-1). Todos estos rasgos actúan conjuntamente proporcionando a las células eucariotas un gran número de capacidades diferentes de forma que tan sólo es posible especular sobre cuál de ellos surgió primero. Sin embargo, la adquisición de mitocondrias por una célula eucariota anaeróbica debe de haber sido un paso crucial en el éxito de los eucariotas al proporcionarles el medio de utilizar una abundante fuente de energía para la dirección de sus complejas actividades.

Las células eucariotas contienen una rica dotación de membranas internas

Las células eucariotas suelen tener un volumen mucho mayor que las procariotas (por lo general, más de mil veces superior) y contienen una cantidad proporcionalmente superior de la mayoría de materiales celulares; una célula humana, por ejemplo, contiene 1000 veces más DNA que una bacteria típica. Este gran tamaño plantea problemas. Puesto que todas las materias primas para las reacciones de biosíntesis que se producen en el interior de una célula deben entrar y salir pasando a través de la membrana plasmática que recubre su superficie, y puesto que en la membrana también se producen importantes reacciones, un aumento en el volumen celular exige un aumento en la superficie celular. Pero la geometría nos enseña que un aumento simple de la escala de una estructura incrementa el volumen al cubo de la dimensión lineal, mientras que el área superficial queda aumentada sólo al cuadrado. Por consiguiente, si la gran célula eucariota ha de conservar la misma proporción de superficie respecto al volumen que presenta la célula procariota, deberá suplementar su área superficial mediante circunvoluciones, pliegues y otras transformaciones de su membrana.

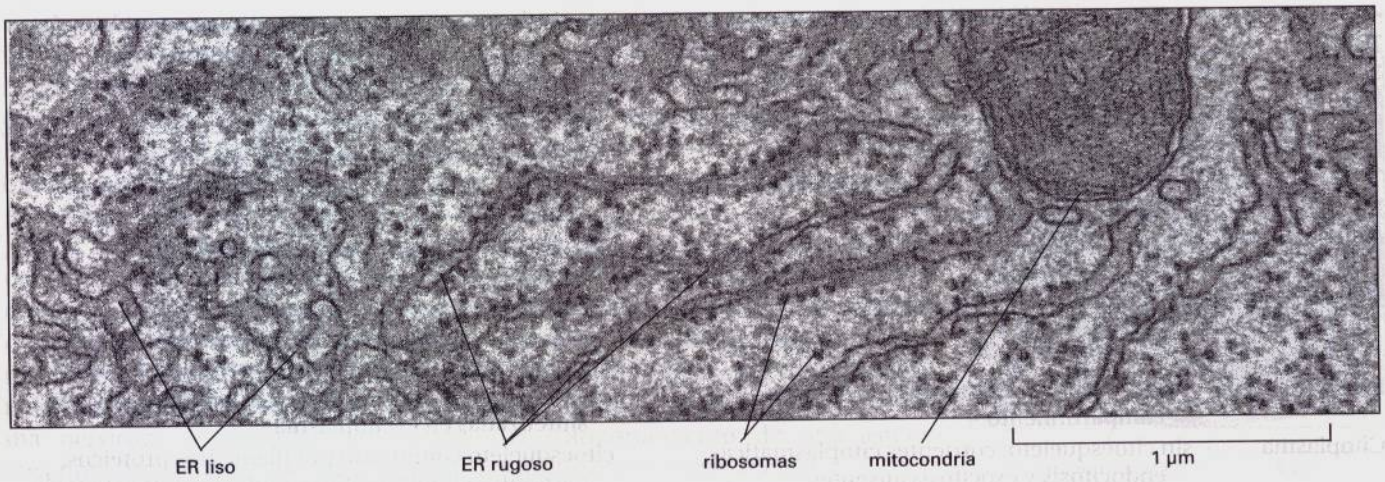


Figura 1-24 Retículo endoplasmático. Micrografía electrónica de un corte ultrafino de una célula de mamífero, mostrando zonas lisas y zonas rugosas del retículo endoplasmático (ER). Las regiones lisas están implicadas en el metabolismo lipídico mientras que las regiones rugosas, tapizadas de ribosomas, son lugares de síntesis de proteínas destinadas a abandonar el citosol y entrar en otros compartimientos de la célula. (Por cortesía de George Palade.)

Es probable que esto explique en parte la compleja profusión de **membranas internas**, que es una característica básica de todas las células eucariotas. Las membranas rodean al núcleo, a las mitocondrias y (en las células vegetales) a los cloroplastos. Forman un compartimiento laberíntico denominado **retículo endoplasmático** (Figura 1-24), donde son sintetizados los lípidos y las proteínas de las membranas celulares, así como el material destinado a ser exportado por la célula. También forman agrupaciones de sáculos aplanados, que constituyen el **complejo de Golgi** (Figura 1-25), que participa en la modificación y en el transporte de las moléculas fabricadas en el retículo endoplasmático. Las membranas rodean a los **lisosomas**, los cuales contienen reservas de las enzimas necesarias para la digestión intracelular, enzimas que de este modo no pueden atacar a las proteínas y ácidos nucleicos de la propia célula. De la misma manera, las membranas rodean a los **peroxisomas**, donde se generan y degradan peróxidos peligrosamente reactivos durante la oxidación por el oxígeno de varios tipos de moléculas. Las membranas también forman pequeñas vesículas y, en las plantas, una gran *vacuola* llena de líquido. Todas estas estructuras rodeadas de membrana corresponden a distintos compartimientos intracitoplasmáticos. En una célula animal típica, estos compartimientos (u orgánulos) ocupan casi la mitad del volumen celular total. El restante compartimiento del citoplasma, que incluye todos los elementos celulares salvo los orgánulos delimitados por una membrana, suele recibir el nombre de **citosol**.

Todas las estructuras membranosas que acabamos de citar se encuentran dentro de la célula. Por consiguiente, ¿cómo pueden ayudar a solucionar el problema mencionado al principio y suministrar a la célula un área superficial que sea suficiente para su gran volumen? La respuesta es que hay un intercambio continuo entre los compartimientos internos delimitados por membrana y el exterior de la célula. Esto se consigue mediante la *endocitosis* y la *exocitosis*, procesos que se presentan únicamente en las células eucariotas. En la endocitosis, porciones de la membrana superficial externa se invaginan y separan por estrangulación, formando unas vesículas citoplasmáticas, rodeadas de membrana y que contienen sustancias que se hallaban presentes en el medio externo o que fueron adsorbidas en la superficie celular. Partículas muy grandes o incluso células extrañas enteras son capturadas por *fagocitosis* –una forma especial de endocitosis. La exocitosis es el proceso inverso, por el cual unas vesículas rodeadas de membrana, presentes en el interior de la célula, se fusionan con la membrana plasmática y liberan su contenido al medio externo. De esta manera, las membranas que limitan a los compartimientos situados dentro de la célula incrementan el área superficial efectiva de la célula para los intercambios de materia con el medio exterior.

Como veremos en capítulos posteriores, las diversas membranas y compartimientos rodeados por membrana de las células eucariotas han llegado a ser altamente especializados, algunos para la secreción, otros para la absorción, otros para procesos específicos de biosíntesis, etc.

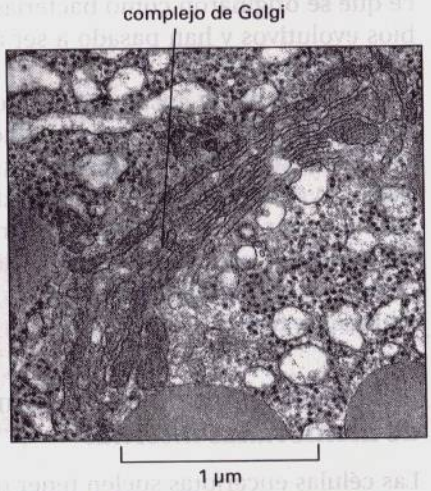


Figura 1-25 El complejo de Golgi. Micrografía electrónica de un corte ultrafino de una célula de mamífero, mostrando el aparato o complejo de Golgi, que está compuesto por sáculos membranosos aplanados dispuestos en múltiples filas (véase también el Panel 1-1, págs. 18-19). El complejo de Golgi interviene en la síntesis y empaquetamiento de moléculas destinadas a ser segregadas por la célula, así como en el transporte de proteínas recién sintetizadas hacia el compartimiento celular adecuado. (Por cortesía de Daniel S. Friend.)

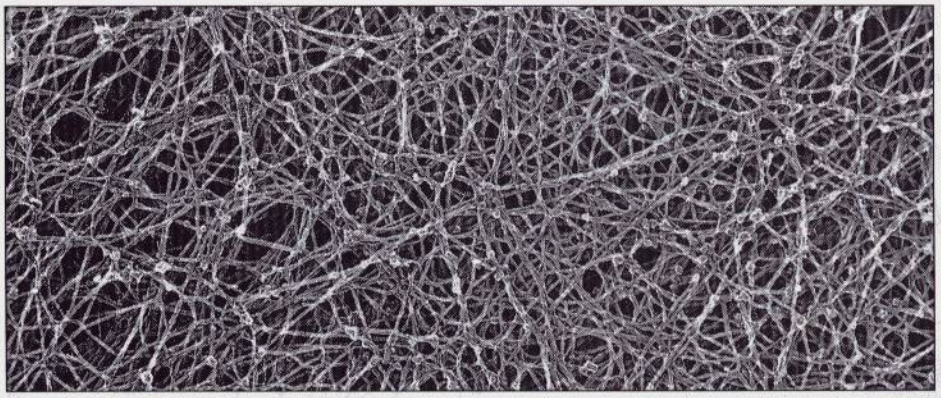


Figura 1-26 Actina. En esta micrografía electrónica, preparada por la técnica de sublimación, se observa una red de filamentos de actina subyacente a la membrana plasmática de una célula animal. (Cortesía de John Heuser.)

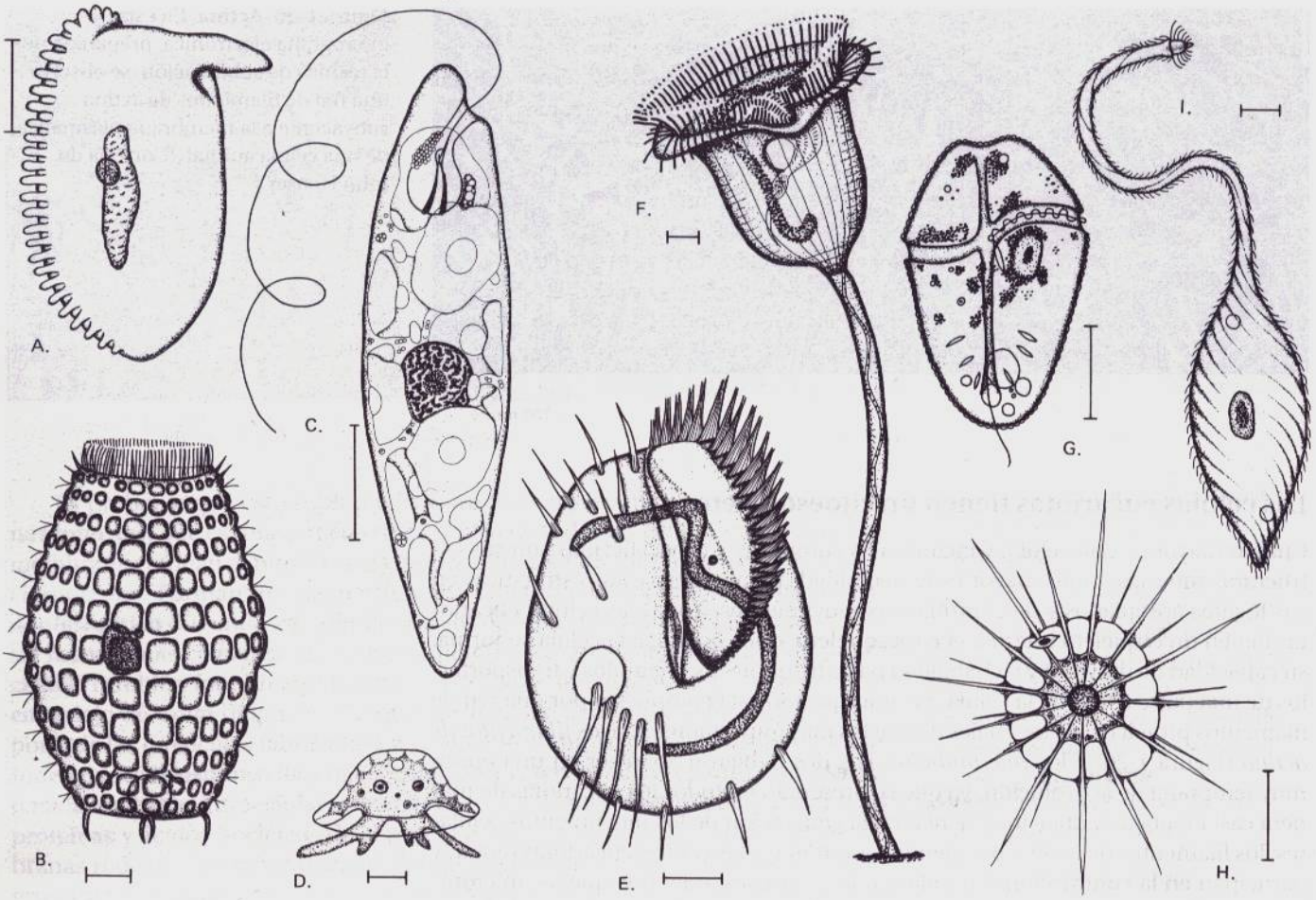
Las células eucariotas tienen un citoesqueleto

Cuanto mayor es una célula, y cuanto más complejas y especializadas son sus estructuras internas, tanto mayor es la necesidad de mantener estas estructuras en sus lugares apropiados y de controlar sus movimientos. Todas las células eucariotas tienen un esqueleto interno, el **citoesqueleto**, que confiere a la célula su forma, su capacidad de moverse y su habilidad para distribuir sus orgánulos y transportarlos de una parte a otra de la célula. El citoesqueleto está compuesto por una red de filamentos proteicos, de los cuales dos de los más importantes son los *filamentos de actina* (Figura 1-26) y los *microtúbulos*. Los dos debieron aparecer en una época muy temprana de la evolución, ya que se presentan en todos los eucariotas de manera casi idéntica. Ambos intervienen en la generación de los movimientos celulares; los filamentos de actina, por ejemplo, permiten a las células eucariotas reptar, y participan en la contracción muscular en los animales; mientras que los microtúbulos son los principales elementos estructurales y generadores de fuerza de los *cilios* y los *flagelos* –las largas proyecciones que existen en la superficie de algunas células, que se mueven como látigos y que sirven de instrumentos de propulsión.

Los filamentos de actina y los microtúbulos también son imprescindibles para los movimientos internos que tienen lugar en el citoplasma de todas las células eucariotas. Así, los microtúbulos del *huso mitótico* son una parte esencial de la maquinaria utilizada habitualmente para distribuir el DNA en dos partes iguales entre las dos células hijas, cuando una célula eucariota se divide. Por consiguiente, la célula eucariota no se podría reproducir sin los microtúbulos. En este y en otros casos, el movimiento mediante difusión libre sería demasiado lento o demasiado aleatorio para resultar eficaz. De hecho, a menudo los orgánulos de una célula eucariota parecen estar adheridos de manera directa o indirecta al citoesqueleto y cuando se mueven, ser propulsados a lo largo de las vías citoesqueléticas.

Entre los protozoos se encuentran las células más complejas conocidas[17]

La complejidad que puede alcanzar una célula eucariota se pone de manifiesto sobre todo en los protistas (Figura 1-27). Se trata de eucariotas unicelulares, de vida generalmente libre, que son evolutivamente diversos (véase Figura 1-16) y que muestran una asombrosa variedad de formas y comportamientos distintos: pueden ser fotosintetizadores o carnívoros, móviles o sedentarios. A menudo su anatomía celular es compleja e incluye estructuras tales como cirros sensoriales, fotorreceptores, flagelos, apéndices a modo de patas, piezas bucales, flechas urticantes y haces contráctiles parecidos a músculos. Aunque son células aisladas, pueden ser tan complicadas y versátiles como muchos organismos pluricelulares. Esto es válido sobre todo para el grupo de protistas conocido como **protozoos**, y está particularmente bien ilustrado en el grupo conocido como **ciliados**.



Didinium es un protozoo carnívoro. Tiene un cuerpo globular, de aproximadamente 150 µm de diámetro rodeado por dos hileras de cilios; su extremo frontal es aplanado salvo una protrusión parecida a un hocico (Figura 1-28). *Didinium* se desplaza en el agua nadando a gran velocidad mediante el batido sincrónico de sus cilios. Cuando encuentra una presa apropiada, por lo general *Paramecium*, otro tipo de protozoo, despide desde la región de su hocico un gran número de pequeños dardos paralizantes. Luego *Didinium* se fija a *Paramecium* y lo devora, invirtiéndose como una pelota hueca y rodeando a la otra célula, que es tan grande como él mismo. La mayor parte de este complejo comportamiento –natación, paralización y captura de la presa– se genera por estructuras citoesqueléticas situadas inmediatamente por debajo de la membrana plasmática. En este córtex celular se encuentran, por ejemplo, los haces paralelos de microtúbulos que forman la parte central de cada cilio y que le permiten su movimiento de "remar".

Comportamientos depredadores de este tipo y el conjunto de características de las que depende –tamaño grande, capacidad de fagocitosis y habilidad para moverse en persecución de la presa– son típicas de los eucariotas. De hecho es probable que estas características aparecieran en un estadio temprano de la evolución, haciendo posible la captura de bacterias para su domesticación como mitocondrias y cloroplastos.

Figura 1-27 Grupo de protistas, ilustrando algunas de las enormes variedades que pueden hallarse entre esta clase de organismos unicelulares. Estos dibujos están realizados a diferente escala, pero en cada caso la barra representa 10 µm. Los organismos en (A), (B), (E), (F) e (I) son ciliados; (C) es un euglenoide; (D) es una ameba; (G) es un dinoflagelado; (H) es un heliozoo. (De M.A. Sleigh, The Biology of Protozoa. London: Edward Arnold, 1973.)

En las células eucariotas el material genético está empaquetado de forma compleja

Las células eucariotas contienen una gran cantidad de DNA. Como hemos dicho anteriormente, las células humanas contienen unas mil veces más DNA que una bacteria típica. La longitud del DNA de las células eucariotas es tan grande que

el peligro de enmarañamiento y rotura resulta muy elevado. Probablemente por esta razón, aparecieron unas proteínas que sólo se encuentran en los eucariotas, las *histonas*, que se unen al DNA y lo enrollan formando **cromosomas**, compactos y manejables (Figura 1-29). El denso empaquetamiento del DNA en los cromosomas es una parte esencial de los preparativos para la división celular en los eucariotas (Figura 1-30). Todos los eucariotas (salvo una pequeña excepción) tienen histonas unidas a su DNA, y la importancia de estas proteínas se refleja en su notable conservación a lo largo de la evolución: varias de las histonas de una planta de guisante son casi exactamente iguales, aminoácido a aminoácido, a las de una vaca.

Las membranas que envuelven el núcleo de las células eucariotas protegen la estructura del DNA y la delicada maquinaria de control asociada, previenen que se embrollen con el citoesqueleto móvil y las resguardan de muchos de los cambios químicos que se producen en el citoplasma. También permiten separar e independizar dos pasos cruciales de la expresión génica: (1) el copiado de las secuencias de DNA a secuencias de RNA (*transcripción del DNA*) y (2) la utilización de estas secuencias de RNA para dirigir la síntesis de proteínas específicas (*traducción del RNA*). En las células procariotas no existe la división de estos procesos en compartimientos –la traducción de las secuencias de RNA a proteínas empieza en cuanto estas secuencias se transcriben, incluso antes de que su síntesis haya terminado. Pero en los eucariotas (salvo en las mitocondrias y en los cloroplastos que en este aspecto, como en otros, se parecen más a las bacterias), los dos pasos que conducen desde el gen hasta la proteína están estrictamente separados: la transcripción ocurre en el núcleo, la traducción en el citoplasma. El RNA ha de abandonar el núcleo antes de poder ser utilizado para guiar la síntesis proteica. Mientras se halla en el núcleo sufre una serie de complicadas transformaciones, durante las cuales se eliminan unas zonas determinadas de la molécula de RNA y otras se modifican (*procesamiento del RNA*).

Debido a estas complejidades, el material genético de una célula eucariota ofrece muchas más oportunidades de control que las existentes en las bacterias.

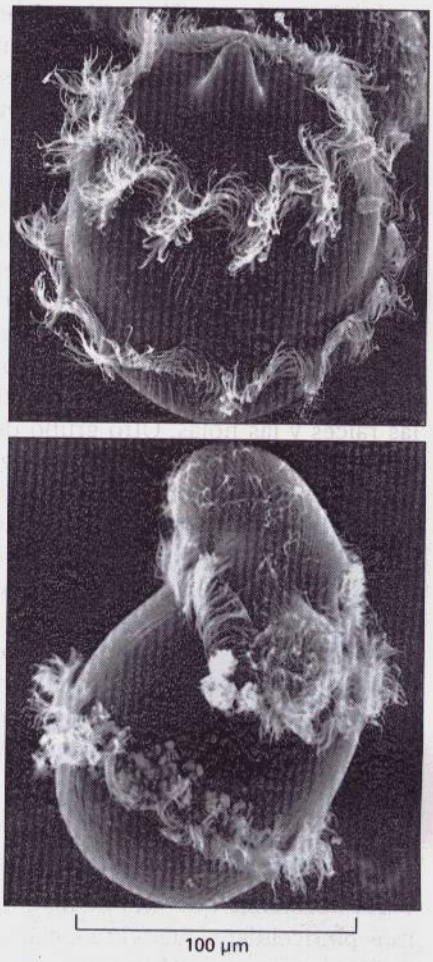


Figura 1-28 Un protozoo devorando a otro. Los ciliados son animales unicelulares que presentan una inmensa diversidad de formas y comportamientos. La fotografía superior muestra *Didinium*, un protozoo ciliado con posee dos bandas de cilios móviles y una protuberancia a modo de hocico en su extremo anterior, con la que captura sus presas. En la micrografía inferior *Didinium* está devorando otro protozoo, *Paramecium*. (Por cortesía de D. Barlow.)

Resumen

Las células vivas actuales se clasifican en procariotas (bacterias y organismos afines) y eucariotas. Aunque presentan estructuras relativamente sencillas, las células procariotas pueden ser bioquímicamente versátiles y muy diferentes: por ejemplo, en las bacterias pueden encontrarse todas las vías metabólicas principales, incluidos los tres procesos energéticos fundamentales, o sea la glucolisis, la respiración y la fotosíntesis. Las células eucariotas son mayores y más complejas que las células procariotas, y contienen más DNA, además de otros componentes que permiten que este DNA sea modificado de manera compleja. El DNA de la célula eucariota está situado en un núcleo rodeado por una doble membrana, mientras que el citoplasma contiene muchos otros orgánulos también delimitados por una doble membrana, entre los que se cuentan las mitocondrias, que realizan la oxidación de las moléculas del alimento, y en las células vegetales, los cloroplastos, que realizan la fotosíntesis. Diversos tipos de pruebas sugieren que las mitocondrias y los cloroplastos son descendientes de células procariotas primitivas que se establecieron como simbiontes dentro de una gran célula anaeróbica. Las células eucariotas presentan también la característica de poseer un citoesqueleto de filamentos proteicos que ayuda a organizar el citoplasma y proporciona la maquinaria para el movimiento.

De las células simples a los organismos pluricelulares[18]

Los organismos unicelulares, tales como las bacterias y los protozoos, han tenido tanto éxito al adaptarse a una gran variedad de ambientes distintos, que constituyen más de la mitad de la biomasa total de la Tierra. A diferencia de los

organismos superiores, muchos de estos organismos unicelulares pueden sintetizar a partir de unos cuantos nutrientes simples todas las sustancias que necesitan y algunos de ellos se dividen más de una vez cada hora. ¿Cuál fue entonces la ventaja selectiva que condujo a la evolución de los **organismos pluricelulares**?

La respuesta más sencilla es que los organismos pluricelulares pueden explotar recursos que ninguna célula aislada podría utilizar tan bien. Este principio, aplicado por primera vez a una simple asociación de células, ha llegado al límite en los organismos pluricelulares que conocemos. La pluricelularidad, por ejemplo, permite que una planta llegue a ser físicamente grande; que tenga raíces en el suelo, donde un grupo de células pueden absorber agua y nutrientes; y que tenga hojas en el aire, donde otro grupo de células puede captar eficazmente energía radiante del sol. En el tronco de la planta existen células especializadas que forman conductos para el transporte del agua y de los nutrientes entre las raíces y las hojas. Otro grupo de células especializadas forma una capa de corteza que impide la pérdida de agua y hace posible un ambiente interno protegido (véase el Panel 1-2, págs. 30-31). La planta en conjunto no compite directamente con los organismos unicelulares por su nicho ecológico; ha encontrado una manera radicalmente diferente de sobrevivir y multiplicarse.

A medida que aparecieron los diferentes tipos de animales y plantas, alteraron el medio ambiente en el que se produjo la evolución posterior. La supervivencia en una jungla exige características diferentes a las requeridas para sobrevivir en mar abierto. Las innovaciones en el movimiento, la percepción sensorial, la comunicación, la organización social –todo ello permitió a los organismos eucariotas competir, propagarse y sobrevivir de manera cada vez más compleja.

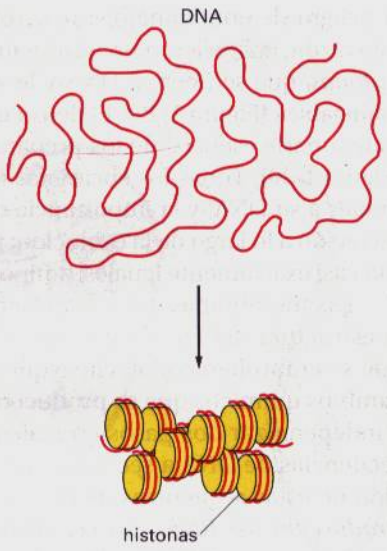


Figura 1-29 Dibujo esquemático que ilustra como las proteínas denominadas histonas, de carga positiva, favorecen el plegado del DNA en los cromosomas.

Las células se pueden asociar formando colonias

Parece probable que uno de los primeros pasos en la evolución de los organismos pluricelulares fuera la asociación de organismos unicelulares formando colonias. La manera más sencilla de conseguirlo consiste en que las células hijas permanezcan asociadas después de cada división celular. Algunas células procariotas muestran incluso un comportamiento social semejante, aunque de una manera primitiva. Las mixobacterias, por ejemplo, viven en el suelo y se alimentan de moléculas orgánicas insolubles que degradan mediante las enzimas degradantes que segregan. Se mantienen unidas en colonias laxas, en las que las enzimas digestivas segregadas por las distintas células se ponen en común, con lo que aumenta la eficiencia de la alimentación (el efecto "flotilla"). Estas células representan de hecho una sofisticación máxima entre los procariotas, ya que cuando el alimento disponible se agota, las células forman agregados más densos y constituyen un *cuerpo fructífero* pluricelular (Figura 1-31), dentro del cual las bacterias se diferencian a esporas que pueden sobrevivir incluso en condiciones extremadamente hostiles. Cuando las condiciones vuelven a ser más favorables, las esporas del cuerpo fructífero germinan y producen un nuevo enjambre de bacterias.

Las *algas verdes* (que no deben ser confundidas con las "algas azules" procariotas o cianobacterias) son eucariotas que existen en formas unicelulares, formas coloniales y formas pluricelulares (Figura 1-32). Las diferentes especies de algas verdes se pueden estudiar en orden de complejidad, ilustrándose así el tipo de progresión que ocurrió probablemente durante la evolución de los animales y plantas superiores. Las algas verdes unicelulares, como por ejemplo *Chlamydomonas*, se parecen a protozoos flagelados, salvo en que presentan cloroplastos que les permiten realizar la fotosíntesis. En géneros estrechamente emparentados, grupos de células flageladas viven en colonias, unidas por una matriz de moléculas extracelulares segregadas por las propias células. Las especies más sencillas (las del género *Gonium*) presentan la forma de un disco cóncavo formado por 4, 8, 16 o 32 células. Sus flagelos se mueven de manera independiente, pero puesto que todos están orientados en la misma dirección pueden

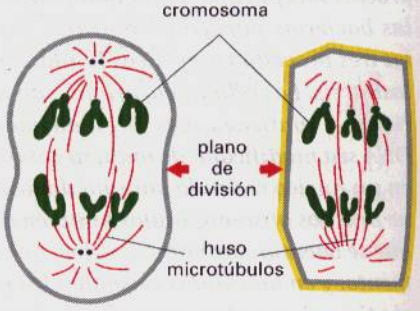


Figura 1-30 Dibujo esquemático de células eucariotas en mitosis. A la izquierda se muestra una célula animal y a la derecha una célula vegetal. La envoltura nuclear se ha roto, y el DNA, una vez replicado, se ha condensado en dos dotaciones completas de cromosomas. Cada una de las dos células en formación recibe una dotación de cromosomas, los cuales son desplazados por el huso mitótico que está compuesto mayoritariamente por microtúbulos.

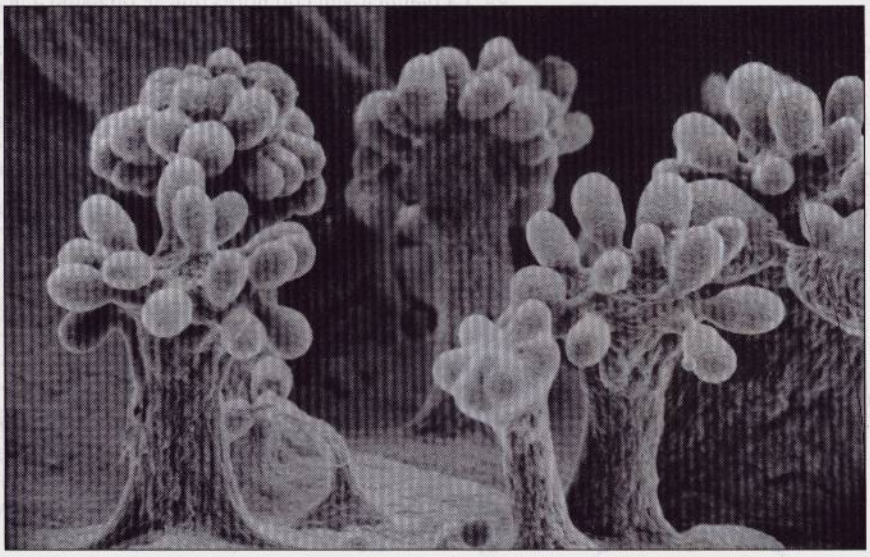


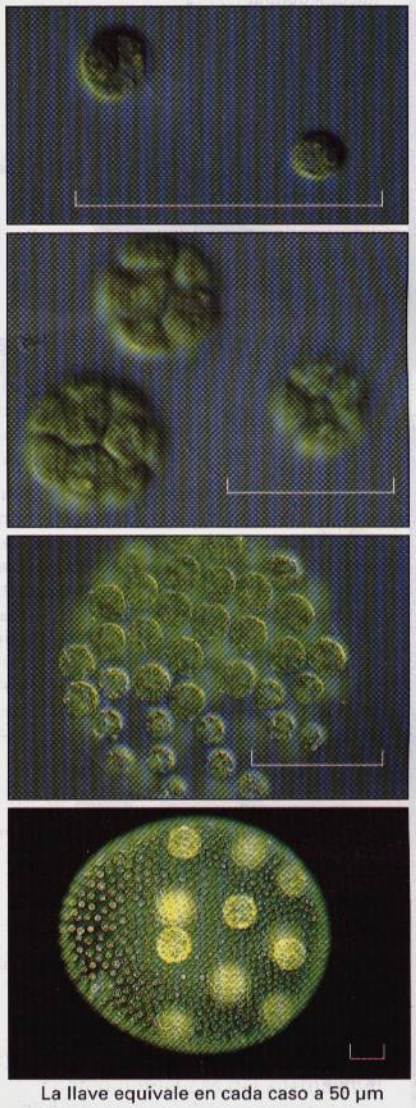
Figura 1-31 Micrografía electrónica de barrido, de los cuerpos fructíferos formados por un myxobacterium (*Chondromyces crocatus*). Cada cuerpo fructífero, empaquetado con esporas, está formado por la agregación y diferenciación de aproximadamente un millón de mixobacterias. (De P.L. Grilione y J. Pangborn, *J. Bacteriol.* 124:1558-1565, 1975.)

propulsar a la colonia por el agua. Todas las células son equivalentes entre sí, y cada una de ellas se puede dividir dando lugar a una nueva colonia. En otros géneros se encuentran colonias mayores, siendo las más espectaculares las del género *Volvox*, algunas de cuyas especies viven en colonias de 50 000 o más células unidas formando una esfera hueca. En *Volvox*, las distintas células que forman una colonia están conectadas mediante finos puentes citoplasmáticos, de modo que el batido de sus flagelos está coordinado para propulsar a toda la colonia como una pelota (Figura 1-32). Dentro de la colonia de *Volvox* existe un cierto reparto del trabajo entre las células; un reducido número de ellas se ha especializado en la reproducción, sirviendo de precursoras de nuevas colonias. Las otras células son tan dependientes unas de otras que no pueden vivir aisladas, y el organismo muere si se destruye la colonia.

Las células de un organismo superior se especializan y cooperan

En algunos aspectos, *Volvox* es más parecido a un organismo pluricelular que a una simple colonia. Todos sus flagelos se mueven sincrónicamente cuando la colonia se desplaza en el agua, de forma que la colonia está estructural y funcionalmente polarizada y puede nadar hacia una fuente lejana de luz. Las células reproductoras suelen estar confinadas en un extremo de la colonia, donde se dividen formando nuevas colonias en miniatura que inicialmente permanecen dentro de la esfera madre. Así, y aunque de una manera primitiva, *Volvox* muestra los dos rasgos esenciales de todos los organismos pluricelulares: sus células se *especializan* y *cooperan*. Mediante la especialización y la cooperación las células se combinan formando un único organismo coordinado, con capacidades mayores que las de cualquiera de las partes que lo componen.

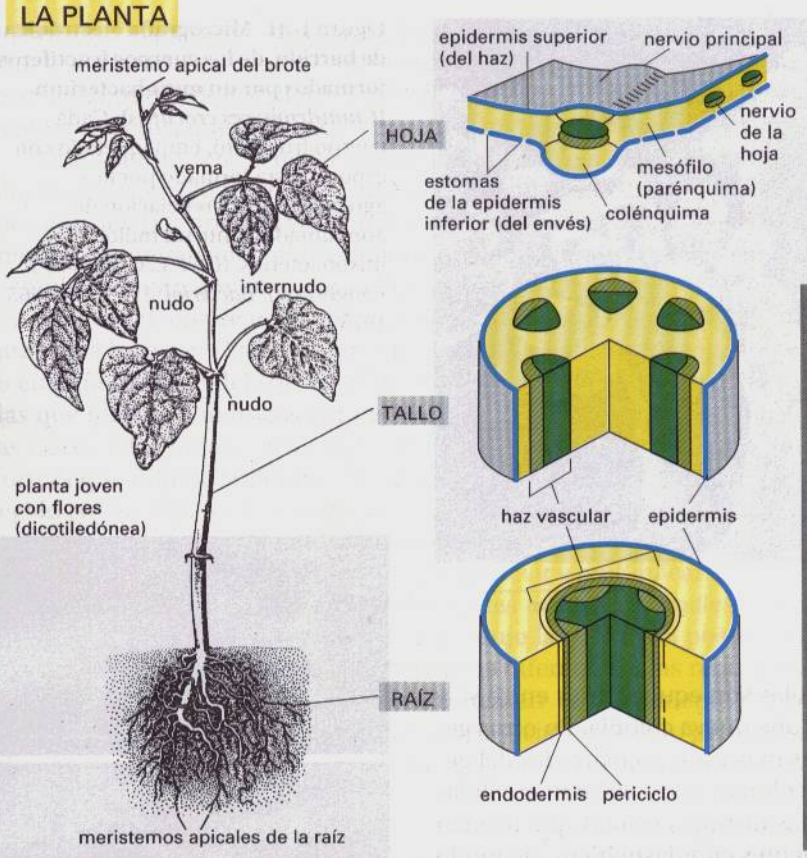
Los esquemas organizados de diferenciación celular se presentan incluso en algunos procariotas. Por ejemplo, muchos tipos de cianobacterias permanecen agrupados después de la división celular, formando cadenas filamentosas que pueden alcanzar hasta un metro de longitud. A lo largo del filamento, y a intervalos regulares, las distintas células adquieren un carácter distintivo y se vuelven capaces de incorporar nitrógeno atmosférico en moléculas orgánicas. Estas escasas células especializadas realizan la fijación del nitrógeno para las células vecinas y comparten con ellas los productos. Pero las células eucariotas han llegado mucho más lejos en este tipo de distribución organizada del trabajo; ellas, a diferencia de las células procariotas, son las unidades vivas a partir de las cuales están construidos todos los organismos pluricelulares más complejos.



La llave equivale en cada caso a 50 µm

Figura 1-32 Cuatro géneros de algas verdes, estrechamente emparentados, mostrando una progresión desde una organización unicelular hasta una organización colonial y multicelular. (Por cortesía de David Kirk.)

LA PLANTA



La planta joven con flores que se presenta a la *izquierda* está constituida por tres tipos de órganos: hojas, tallos y raíces. A su vez, cada órgano vegetal está formado por tres sistemas histológicos: el básico, el dérmico y el vascular.

En último término, los tres sistemas histológicos derivan de la actividad proliferativa de una célula de los meristemos apicales del brote y de la raíz, y cada uno de ellos contiene un número relativamente reducido de tipos celulares especializados. En este Panel se describen estos tres sistemas histológicos comunes, y las células que los forman.

LOS TRES SISTEMAS HISTOLÓGICOS

La división celular, el crecimiento y la diferenciación dan lugar a sistemas histológicos confunciones especializadas.

TEJIDO EPIDÉRMICO (■): Se trata del recubrimiento externo protector de la planta que está en contacto con el medio. Facilita la captación de agua y de iones en las raíces y regula el intercambio gaseoso en las hojas y en los tallos.

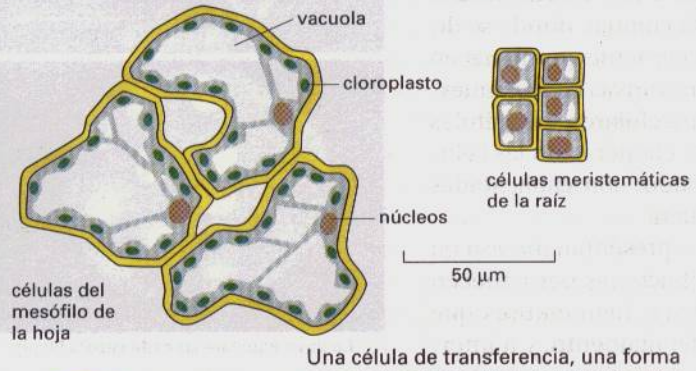
TEJIDO VASCULAR: El floema (■) y el xilema (■) forman conjuntamente un sistema vascular continuo a través de la planta. Este tejido conduce agua y solutos entre los órganos y también proporciona soporte mecánico.

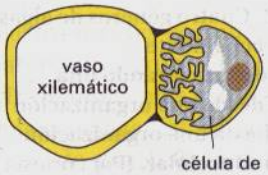
TEJIDO BÁSICO (■): Este tejido de empaquetamiento y de soporte ocupa la mayor parte del volumen de la planta joven. También interviene en la fabricación y almacenamiento de alimento.

TEJIDO BÁSICO

El sistema histológico básico contiene tres tipos celulares principales llamados parénquima, colénquima y esclerénquima.

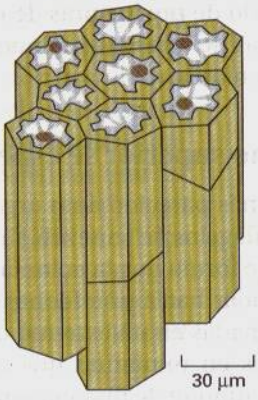
Las células parenquimáticas se encuentran en todos los sistemas histológicos. Son células vivas, generalmente capaces de dividirse posteriormente, y que presentan una pared celular primaria delgada. Estas células tienen varias funciones. Las células meristemáticas apical y lateral de los brotes y de las raíces suministran nuevas células necesarias para el crecimiento. La producción de alimento y de almacén tiene lugar en las células fotosintéticas de la hoja (denominadas células del mesófilo) y del tallo; el parénquima de reserva forma el volumen de muchos frutos y verduras. A causa de su capacidad proliferativa, las células parenquimáticas actúan como células madre cicatrizando las heridas e interviniendo en la regeneración.

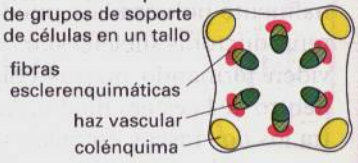




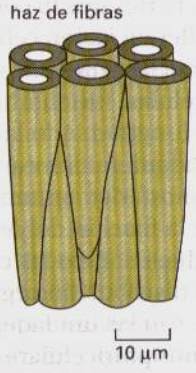
Una célula de transferencia, una forma especializada de célula parenquimática, se identifica fácilmente gracias a unas complejas invaginaciones de la pared celular primaria. El incremento del área de la membrana plasmática bajo estas paredes facilita el rápido transporte de solutos hacia y desde las células del sistema vascular.

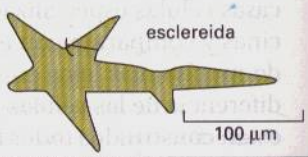
El colénquima está formado por células vivas similares a las células parenquimáticas excepto en que tienen paredes celulares muy gruesas y en que habitualmente son alargadas y están empaquetadas en fibras a modo de cuerdas. Son capaces de alargarse y de proporcionar soporte mecánico al sistema histológico básico de las regiones de la planta en crecimiento. Las células colenquimatosas son especialmente abundantes en las regiones subepidérmicas de los tallos.





El esclerénquima, como el colénquima, tiene funciones de refuerzo y de soporte. Sin embargo, normalmente está formado por células muertas, con gruesas paredes celulares secundarias lignificadas incapaces de alargarse cuando la planta crece. Los dos tipos comunes son las fibras, que a menudo forman largos haces, y las esclereidas, que son células más cortas y ramificadas existentes en las cubiertas de la semilla y en el fruto.

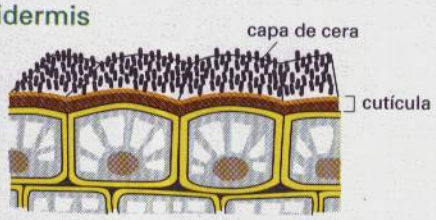




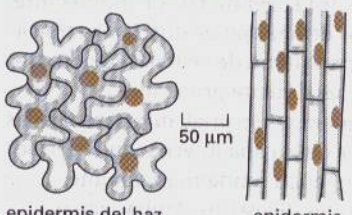
TEJIDO DÉRMICO

La epidermis es la cubierta primaria protectora externa del cuerpo de la planta. Las células de la epidermis también están modificadas formando los estomas y varios tipos de pelos.

Epidermis



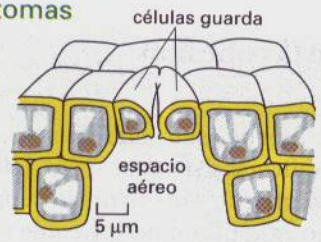
La epidermis (normalmente de una sola capa de células de grosor) cubre completamente el tallo, la hoja y la raíz de la planta joven. Las células están vivas, tienen gruesas paredes celulares primarias, y están recubiertas apicalmente por una cutícula especial con una capa externa de cera. Las células están íntimamente unidas siguiendo diferentes ordenaciones.



epidermis del haz de una hoja

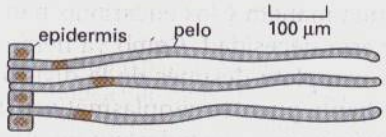
epidermis de un tallo

Estomas



Los estomas son aberturas de la epidermis, principalmente en la cara inferior de la hoja (envés), que regulan el intercambio gaseoso en la planta. Están formados por dos células epidérmicas especializadas llamadas *células guarda,* las cuales regulan el diámetro del poro. En cada epidermis, los estomas están distribuidos siguiendo diferentes ordenaciones específicas de la especie.

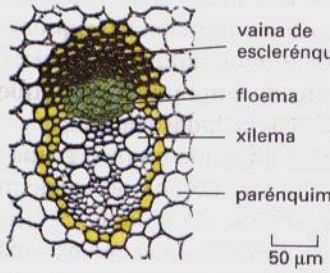
Los pelos (o tricomas) son apéndices derivados de las células epidérmicas. Existe una gran variedad de formas; normalmente se encuentran en todas las partes de la planta. Los pelos intervienen en la protección, absorción y secreción; ejemplos:



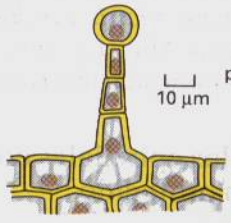
pelos unicelulares jóvenes de la epidermis de la semilla del algodón. Cuando éstos crecen, las paredes se engruesan secundariamente con celulosa formando las fibras de algodón.

Haces vasculares

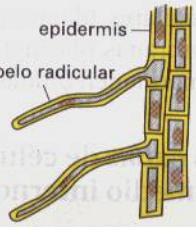
Normalmente en las raíces hay un solo haz vascular, pero en los tallos hay varios haces. En las dicotiledóneas estos haces están ordenados siguiendo una estricta simetría radial, pero en las monocotiledóneas están dispersos de forma más irregular.



un haz vascular típico de un tallo joven de un ranúnculo.



un pelo pluricelular glandular de una hoja de geranio

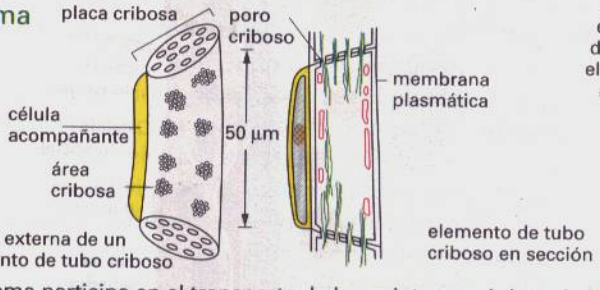


los pelos radiculares desempeñan una importante función en la captación de agua e iones

TEJIDO VASCULAR

El floema y el xilema forman conjuntamente un sistema vascular continuo por toda la planta. En plantas jóvenes normalmente están asociadas a varios tipos celulares distintos en los *haces vasculares.* El floema y el xilema son tejidos complejos. Sus elementos conductores están asociados con células parenquimáticas que mantienen e intercambian materiales con ellos. Además, varios grupos de células colenquimáticas y esclerenquimáticas proporcionan soporte mecánico.

Floema



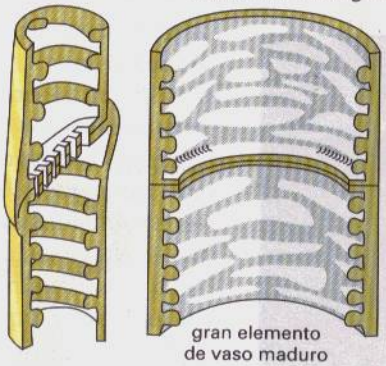
visión externa de un elemento de tubo criboso

elemento de tubo criboso en sección

El floema participa en el transporte de los solutos orgánicos de la planta. Las células conductoras principales (elementos) están alineadas formando tubos llamados *tubos cribosos.* Los elementos de los tubos cribosos maduros son células vivas, interconectadas por perforaciones en sus paredes terminales que son plasmodesmos ampliados y modificados (placas cribosas). Estas células mantienen su membrana plasmática pero han perdido sus núcleos y gran parte de su citoplasma; por lo tanto, para su mantenimiento necesitan el concurso de *células acompañantes* asociadas. Estas células acompañantes tienen la función adicional de activar el transporte de moléculas alimenticias solubles hacia dentro y hacia fuera de los elementos del tubo criboso a través de las áreas cribosas de la pared.

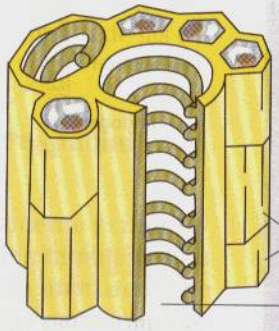
Xilema

El xilema transporta por la planta agua e iones disueltos. Las principales células conductoras son los elementos del vaso mostradas aquí, que en la madurez son células muertas que han perdido la membrana plasmática. La pared celular se ha engrosado secundariamente y se ha lignificado fuertemente. Como se ve en la figura, gran parte de las paredes terminales se han eliminado, lo cual permite la formación de tubos continuos muy largos.



pequeño elemento de vaso en el extremo radicular

gran elemento de vaso maduro



Los elementos del vaso están íntimamente asociadoss con células parenquimáticas del xilema que transportan activamente solutos seleccionados hacia dentro y hacia fuera de los elementos a través de su membrana plasmática.

células parenquimáticas del xilema

elemento del vaso

La organización pluricelular depende de la cohesión entre las células

Para formar un organismo pluricelular las células han de estar unidas entre sí de alguna manera y los eucariotas han desarrollado diversos sistemas para satisfacer esta necesidad. Como ya hemos dicho las células de *Volvox* no se separan por completo después de la división celular sino que permanecen conectadas mediante puentes citoplasmáticos. En las plantas superiores, las células no sólo permanecen conectadas por puentes citoplasmáticos (denominados *plasmodesmos*), sino que además quedan encerradas en un rígido conjunto de cámaras con paredes celulósicas que han segregado las propias células (*paredes celulares*).

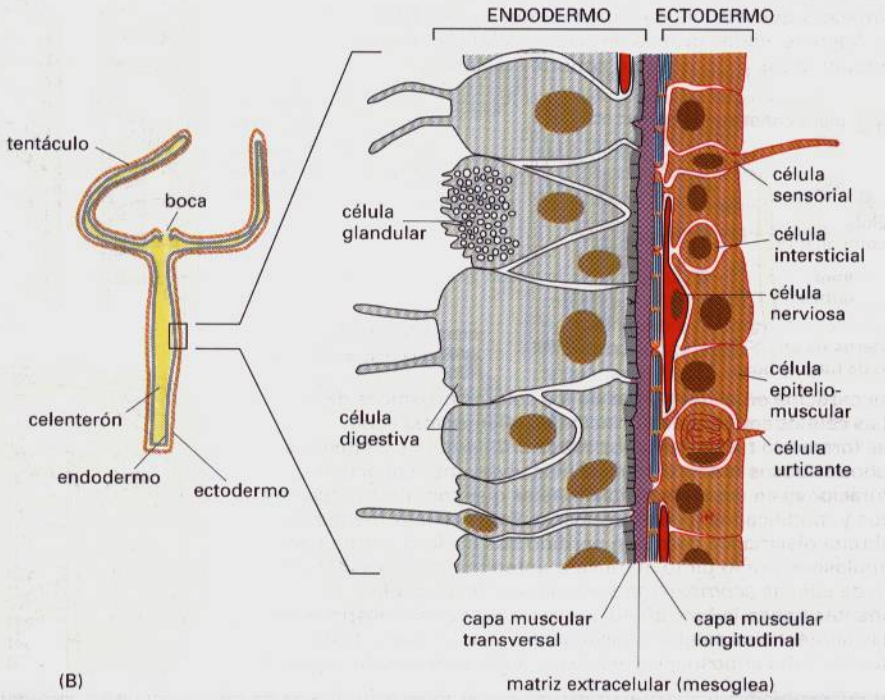
Las células de la mayoría de los animales carecen de paredes rígidas y los puentes citoplasmáticos son poco frecuentes. En lugar de ello, las células se hallan unidas por una red relativamente laxa de grandes moléculas orgánicas extracelulares (denominada *matriz extracelular*) y por las adherencias entre sus membranas plasmáticas. Muy a menudo las uniones lado-a-lado entre células las mantienen unidas formando una capa pluricelular o **epitelio**.

Las capas de células epiteliales envuelven un medio interno protegido

De todos los sistemas a través de los que las células animales están relacionadas formando los tejidos pluricelulares, quizás la disposición epitelial es la que tiene una importancia más fundamental. La capa epitelial tiene para la evolución de los organismos pluricelulares complejos un significado muy parecido al que la membrana celular tiene para la evolución de las células aisladas complejas.

La importancia de las capas epiteliales está bien ilustrada en otro grupo inferior de animales, el de los *celentéreos*. Este grupo incluye las anémonas de mar, las medusas y los corales, así como el pequeño organismo de agua dulce *Hydra*. Los celentéreos están constituidos por dos capas de epitelio, una capa externa, o *ectodermo*, y una capa interna o *endodermo*. La capa endodérmica rodea una cavidad, el *celenterón*, en donde se digiere el alimento (Figura 1-33). Entre las células endodérmicas existen algunas que segregan enzimas digestivas al celenterón,

(A)



(B)

Figura 1-33 Organización corporal de *Hydra*. (A) *Hydra oligactis* en su entorno natural; en estas especies de *Hydra* los tentáculos se retraen para capturar las presas. Las proyecciones que se producen por gemación del cuerpo son hijos que se separarán del padre. (B) Diagrama de la arquitectura celular del cuerpo de una *Hydra* típica. La capa externa de células (ectodermo) es esencialmente protectora, predadora y sensorial, mientras que las células de la capa interna (endodermo) desempeñan fundamentalmente funciones digestivas. Ambas capas epiteliales tienen también una función contráctil o muscular que permite al animal moverse. Los movimientos están coordinados por células nerviosas que ocupan una posición protejida en el interior de cada epitelio, formando una malla interconectada. (A, por cortesía de Richard Manuel.)

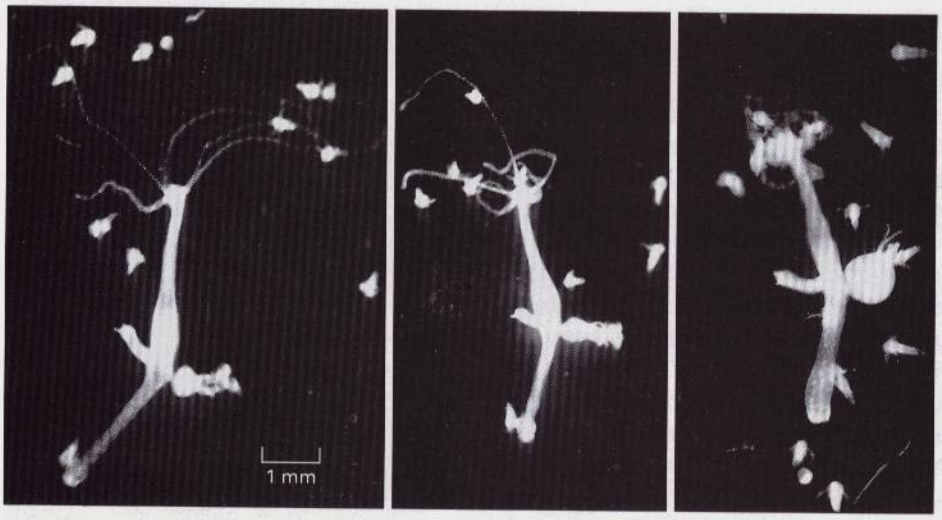


Figura 1-34 *Hydra* alimentándose. *Hydra* puede realizar una amplia gama de actividades bastante complejas. Aquí se ha fotografiado un organismo solitario capturando con sus tentáculos pequeñas pulgas de agua; en el último panel se halla introduciendo estas presas en su celenterón para su digestión. (Cortesía de Amata Hornbruch.)

mientras que otras absorben, continuando la digestión de las moléculas de nutrientes que aquellas enzimas habían transformado. Al formar una capa epitelial densa y coherente que impide que todas estas moléculas se pierdan hacia el exterior, las células endodérmicas crean por sí mismas un medio ambiente en el celenterón que es apropiado para sus propias tareas digestivas. Las células ectodérmicas, orientadas hacia el exterior permanecen especializadas para el contacto con el mundo exterior. En el ectodermo, por ejemplo, se hallan células que contienen una cápsula venenosa con un dardo enrollado que puede ser disparado para matar los pequeños animales de los que se alimenta *Hydra*. La mayoría de las demás células ectodérmicas o endodérmicas tienen propiedades parecidas a las musculares, permitiendo el movimiento de *Hydra*, tal como debe hacerlo un predador.

Entre la doble capa de ectodermo y endodermo, se encuentra otro compartimiento separado tanto del celenterón como del medio exterior. Aquí, se hallan las *células nerviosas*, ocupando estrechos espacios entre las células epiteliales, por debajo de la superficie externa donde las *uniones celulares* (*"cell junctions"*) especializadas entre las células epiteliales forman una barrera impermeable. El animal puede cambiar su forma y moverse por medio de contracciones de células del epitelio semejantes a las de las células musculares, y las células nerviosas transmiten señales eléctricas controlando y coordinando estas contracciones (Figuras 1-33, 1-34 y 1-35). Como veremos más adelante, las concentraciones de iones orgánicos simples en el medio que rodea a una célula nerviosa son cruciales para su funcionamiento. La mayoría de células nerviosas –incluidas las nuestras– están diseñadas para trabajar cuando se hallan en un medio que tenga una composición iónica similar a la del agua de mar. Este hecho probablemente refleja las condiciones en las que evolucionaron las primeras células nerviosas. La mayoría de celentéreos, aunque no todos, todavía viven en el mar. *Hydra*, concretamente, vive en el agua dulce. Es evidente que ha sido capaz de colonizar este nuevo hábitat, sobre todo, gracias a que sus células nerviosas se hallan contenidas en un espacio aislado del exterior mediante capas de células epiteliales que mantienen el ambiente interno necesario para el funcionamiento de las células nerviosas.

La comunicación célula-célula controla el esquema espacial de los organismos pluricelulares[19]

Las células de *Hydra* no están únicamente agrupadas mecánicamente y conectadas mediante uniones que aíslan el interior del ambiente exterior; también están comunicadas entre sí a lo largo de todo el cuerpo. Si se secciona un extremo de una *Hydra*, las células restantes reaccionan ante la ausencia de la parte amputa-

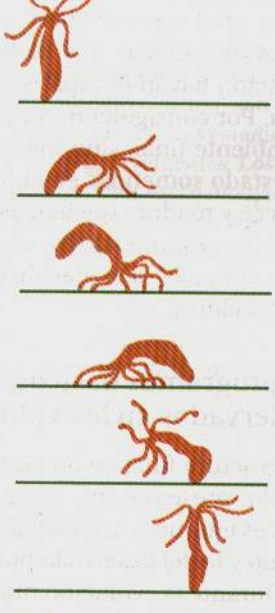


Figura 1-35 *Hydra* nadando. *Hydra* puede nadar, deslizarse sobre su base o, como muestra el dibujo, desplazarse dando volteretas.

da adaptando sus características y reordenándose regenerando un animal completo. Es evidente que ciertas señales pasan de una parte del organismo a otra, gobernando el desarrollo de su esquema corporal –que presenta tentáculos y una boca en un extremo y un pie en el otro. Además, estas señales son independientes del sistema nervioso. Si una *Hydra* en desarrollo se trata con una droga que impide la formación de células nerviosas, el animal resulta incapaz de moverse, de atrapar las presas o de alimentarse. Sin embargo, su sistema digestivo funciona aún con normalidad por lo que el animal puede ser mantenido vivo por cualquiera que tenga la paciencia de introducirle su alimento normal en la boca. En estos animales alimentados artificialmente se mantiene el patrón corporal normal de modo que las zonas perdidas son regeneradas, tal como ocurre en los animales que tienen el sistema nervioso intacto.

Los animales superiores más complejos han evolucionado a partir de unos humildes antepasados parecidos a los celentéreos. Estos animales superiores deben su complejidad a un aprovechamiento más sofisticado de los mismos principios básicos de cooperación celular en los que se basa la construcción de *Hydra*. Las capas de células epiteliales, revisten todas las superficies externas e internas del cuerpo, creando compartimientos resguardados y ambientes internos controlados en los que las células diferenciadas realizan funciones especializadas. Las células especializadas interaccionan y se comunican entre sí estableciendo señales que determinan el carácter de cada célula de acuerdo con su situación en el conjunto de la estructura. Pero para mostrar cómo es posible generar organismos pluricelulares con un tamaño, una complejidad y una precisión como las existentes en un árbol, una mosca o un mamífero, es necesario estudiar con mayor detalle la secuencia de procesos que tienen lugar durante el **desarrollo**.

La memoria celular permite el desarrollo de patrones complejos

Las células de casi todos los organismos pluricelulares proceden de la división repetida de una única célula precursora; estas células constituyen un *clon*. A medida que continúa la proliferación y el clon crece, algunas de las células, como ya hemos visto, se diferencian de las otras en respuesta a los datos que les proporcionan las células vecinas, adoptando normalmente una estructura diferente, unas características químicas diferentes y una función diferente. Es notable que las células eucariotas y su progenie persistan en sus estados especializados incluso después de que las influencias que dirigieron originariamente su diferenciación hayan desaparecido –en otras palabras, estas células tienen una *memoria*. Por consiguiente, su carácter final no está determinado simplemente por su ambiente final, sino más bien por toda la secuencia de influencias a las que han estado sometidas en el transcurso del desarrollo. Así, a medida que el cuerpo crece y madura quedan especificados detalles progresivamente más finos del esquema corporal adulto, creando un organismo de complejidad creciente cuya forma última es la expresión de una larga historia de desarrollo que es recordada por las células.

Los programas básicos de desarrollo tienden a ser conservados en la evolución[20]

La estructura final de un animal refleja su historia evolutiva la cual, como el desarrollo, presenta una crónica de progreso desde lo simple hasta lo complejo. ¿Cuál es entonces la conexión entre estas dos perspectivas, la de la evolución por un lado y la del desarrollo por otro?

Durante la evolución muchos de los dispositivos de desarrollo que surgieron en los organismos pluricelulares más sencillos se han conservado como principios básicos para la construcción de sus descendientes más complejos. Ya hemos mencionado, por ejemplo, la organización de las células en epitelios. Algunos de los tipos celulares especializados, como por ejemplo las células nerviosas,

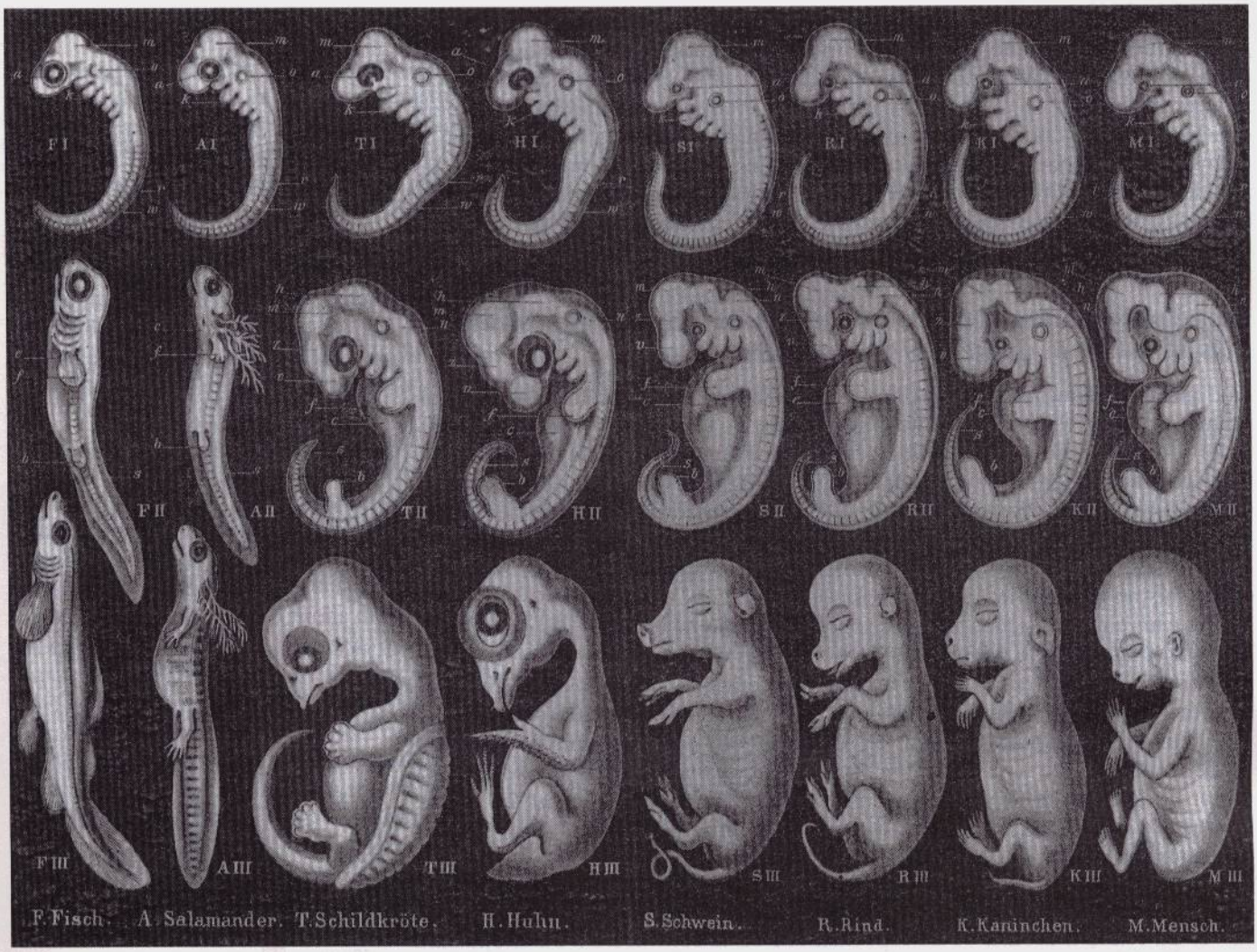


Figura 1-36 Comparación del desarrollo embrionario de un pez, de un anfibio, de un reptil, de un pájaro y de una selección de mamíferos. Los estadios tempranos (*arriba*) son muy similares pero los últimos estadios (*abajo*) son más divergentes. Los estadios tempranos están dibujados más o menos a escala y los últimos estadios no. (De E. Haeckel, Anthropogenie, oder Entwickelungsgeschichte des Menschen. Leipzig: Engelmann, 1874. Por cortesía de the Bodleian Library, Oxford.)

se encuentran a nivel de casi todo el reino animal, desde *Hydra* hasta el hombre. Estudios moleculares, que discutiremos más adelante en este libro, revelan un sorprendentemente elevado número de parecidos de desarrollo a un nivel genético fundamental, incluso entre especies tan remotamente relacionadas como los mamíferos y los insectos. Además, en términos anatómicos las primeras fases del desarrollo de animales cuyas formas adultas son radicalmente diferentes son a menudo sorprendentemente similares; se necesita experiencia para distinguir, por ejemplo, un embrión temprano de pollo de un embrión temprano humano (Figura 1-36).

Observaciones de este tipo no son difíciles de comprender. Consideremos el proceso mediante el cual, en el transcurso de la evolución, aparece un nuevo rasgo anatómico –por ejemplo, un pico alargado. Se produce una mutación aleatoria que modifica la secuencia de aminoácidos de una proteína y, por lo tanto, su actividad biológica. Esta alteración puede afectar por casualidad a las células responsables de la formación del pico, de tal manera que produzcan un pico más largo. Pero la mutación ha de ser también compatible con el desarrollo del resto del organismo: sólo entonces será propagada por la selección natural. La formación de un pico más largo tendría poca ventaja selectiva si, en el proceso, se perdiera la lengua o no llegaran a desarrollarse los oídos. Una catástrofe de este tipo es mucho más probable si la mutación afecta a acontecimientos que se producen en las primeras fases del desarrollo que si afecta a los que ocurren cerca del final. Las primeras células de un embrión son como los naipes de la base de un castillo de naipes –casi todo depende de ellas: una pequeña alteración de sus propiedades, probablemente dará como resultado un desastre. Los pasos

fundamentales han sido "congelados" en procesos de desarrollo, del mismo modo que el código genético o los mecanismos de síntesis proteica han quedado congelados en la organización bioquímica básica de la célula. En cambio, las células producidas hacia el final del desarrollo (o producidas tempranamente pero que forman estructuras accesorias como la placenta, que no se incorporan al cuerpo adulto) tienen más libertad para cambiar. Probablemente ésta es la razón de que los embriones de las diferentes especies se parezcan a menudo entre sí en las primeras fases y de que, a medida que se desarrollan, repitan los pasos de la evolución.

Las células somáticas del cuerpo de los vertebrados muestran más de 200 tipos diferentes de especialización

La riqueza de especializaciones diferentes que se encuentra en las células de un animal superior es incomparablemente mayor a la que puede presentar cualquier procariota. En un vertebrado se pueden distinguir fácilmente más de 200 **tipos celulares** diferentes y es probable que muchos de estos tipos de células incluyan, bajo un mismo nombre, a un elevado número de variedades con diferencias sutiles. El Panel 1-3 (págs. 38-39) muestra una pequeña selección de ellos. En esta profusión de comportamientos especializados se puede observar, en un mismo organismo, la asombrosa versatilidad de la célula eucariota. Gran parte de los conocimientos actuales sobre las propiedades generales de las células eucariotas procede del estudio de estos tipos especializados de células que muestran individualmente, hasta un grado excepcional, aspectos que son básicos para todas las células. Cada rasgo y cada orgánulo de cada prototipo celular que hemos esbozado en el Panel 1-1 (págs. 18-19) está desarrollado hasta un grado extraordinario o revelado con especial claridad en algún tipo celular. Para tomar un ejemplo arbitrario, consideremos la *unión neuromuscular*, en la que intervienen sólo tres tipos de células: una célula muscular, una célula nerviosa y una célula de Schwann. Cada una de ellas desempeña un papel muy distinto (Figura 1-37).

1. La célula muscular se ha especializado en la contracción. Su citoplasma está lleno de filamentos proteicos, incluido un elevado número de filamentos de actina, dispuestos organizadamente. Existen también numerosas mitocondrias distribuidas entre los filamentos proteicos, que suministran ATP como combustible para el aparato contráctil.

2. La célula nerviosa estimula al músculo a contraerse; transmite al músculo una señal excitadora procedente del cerebro o de la médula espinal. Por consiguiente, la célula nerviosa es extraordinariamente alargada: su cuerpo principal, que contiene el núcleo, puede hallarse a más de un metro de la unión con el músculo. El citoesqueleto está desarrollado de forma correspondiente manteniendo esta forma poco habitual de la célula y transportando eficazmente los materiales desde un extremo al otro de la misma. Pero la especialización más crucial de la célula nerviosa radica en su membrana plasmática, la cual contiene proteínas que actúan como *bombas* de iones y como *canales* iónicos, provocando un movimiento de iones que equivale a un flujo de electricidad. Aunque todas las células contienen estos canales y bombas en sus membranas plasmáticas, la célula nerviosa los ha aprovechado de tal manera que un pulso de electricidad se puede propagar en una fracción de segundo desde un extremo al otro de la célula, transmitiendo así una señal.

3. Finalmente, las células de Schwann están especializadas en la producción masiva de membrana plasmática, que disponen alrededor de la porción alargada de la célula nerviosa, depositando una tras otra sucesivas capas de membrana, como si fuera un rollo de cinta, formando una *vaina de mielina* que actúa de aislante.

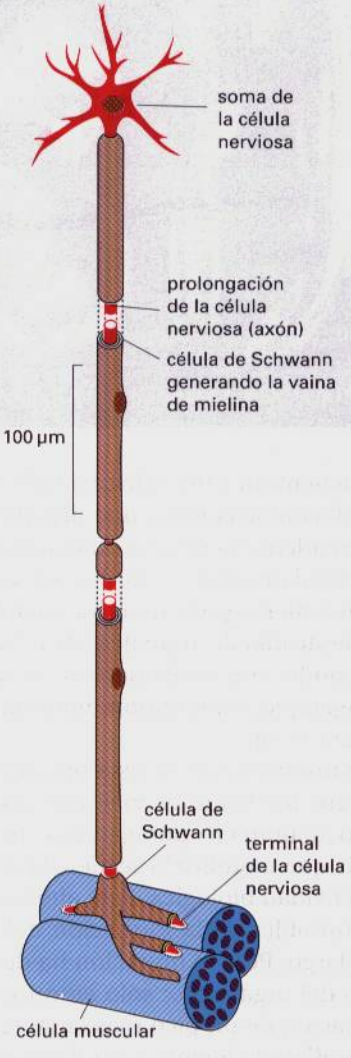


Figura 1-37 Esquema de una célula nerviosa, con sus células de Schwann asociadas, entrando en contacto con una célula muscular a través de una unión neuromuscular. Diagrama esquemático.

Los genes pueden ser activados y desactivados

Diversos tipos celulares especializados de un mismo animal o planta superior a menudo aparecen tan radicalmente distintos como pueden serlo dos células. Esto puede parecer paradójico ya que todas las células de un organismo pluricelular están estrechamente relacionadas al haberse formado recientemente a partir de una misma célula precursora –el óvulo fecundado. Un linaje común implica genes similares; ¿cómo aparecen entonces las diferencias? En algunos casos la especialización celular implica la pérdida de material genético. Un ejemplo extremo lo constituyen los eritrocitos de los mamíferos, que en el transcurso de la diferenciación pierden por completo el núcleo. Pero la inmensa mayoría de las células de la mayor parte de especies animales y vegetales conservan toda la información genética contenida en el óvulo fecundado. La especialización depende de alteraciones de la *expresión génica* y no de la pérdida o adquisición de genes.

Incluso las bacterias no producen simultáneamente todos sus tipos de proteínas, sino que son capaces de ajustar el nivel de síntesis a las condiciones externas. Las proteínas específicamente necesarias para el metabolismo de la lactosa, por ejemplo, son producidas por algunas bacterias sólo cuando pueden disponer de este azúcar. Otras bacterias detienen la mayor parte de los procesos metabólicos normales; cuando las condiciones son desfavorables para la proliferación celular, algunas bacterias detienen la mayor parte de los procesos metabólicos normales y forman *esporas* que presentan una pared externa, resistente, impermeable y un citoplasma de composición alterada.

Las células eucariotas han desarrollado mecanismos mucho más complejos para controlar la expresión génica, y estos mecanismos afectan a sistemas enteros de productos génicos interactivos. Los grupos de genes son activados o inhibidos en respuesta a señales tanto externas como internas. La composición de las membranas, el citoesqueleto, los productos secretores, incluso el metabolismo y otros muchos rasgos, deben variar de manera coordinada cuando las células se diferencian. Los controles que hacen posible estos cambios han evolucionado en los eucariotas hasta un grado no alcanzado por los procariotas, definiendo las complejas reglas del comportamiento celular que pueden generar un organismo pluricelular organizado a partir de un simple huevo.

Comparaciones entre secuencias revelan centenares de familias de genes homólogos[12, 21]

A parte de las apariencias, la evolución ha transformado el universo de las cosas vivientes hasta un grado que no tiene parangón. Un ser humano, una mosca, una margarita, un hongo, una bacteria... parecen tan diferentes entre sí que difícilmente tiene sentido compararlos. Todos ellos son descendientes de un ancestro común y a medida que vamos estudiando su interior, encontramos más y más evidencias de sus orígenes comunes. Ahora conocemos que la maquinaria molecular básica de la vida se ha conservado hasta un grado tal que probablemente habría sorprendido a los padres de la teoría de la evolución. Como hemos visto, todas las formas de vida tienen esencialmente la misma química, basada en aminoácidos, azúcares, ácidos grasos y nucleótidos; todas sintetizan estos costituyentes químicos de una manera esencialmente similar; todas almacenan la información genética en el DNA y la expresan a través del RNA y de las proteínas. El grado de conservación de la evolución es todavía más sorprendente cuando examinamos en detalle las secuencias de nucleótidos de determinados genes y de aminoácidos en determinadas proteínas. La suerte es que las enzimas bacterianas que catalizan cualquier reacción en particular, como la rotura de un azúcar de seis carbonos en dos azúcares de tres carbonos a través de la glucolisis, tienen una secuencia de aminoácidos (y una estructura tridimensional) inequívocamente similar a la de las enzimas que catalizan la misma reacción en los seres humanos. Ambas enzimas –y de forma equivalente los genes que las es-

TIPOS CELULARES

Existen más de 200 tipos diferentes de células en el cuerpo humano. Se hallan formando diversos tipos de tejidos como

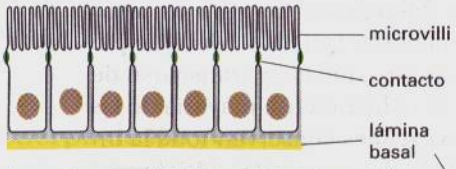
- epitelios
- tejido conjuntivo
- músculo
- tejido nervioso

La mayoría de tejidos están formados por combinaciones de varios tipos celulares.

EPITELIOS

Las células epiteliales forman capas celulares coherentes denominadas epitelios, que revisten las caras internas y externas del cuerpo. Existen muchos tipos especializados de epitelios.

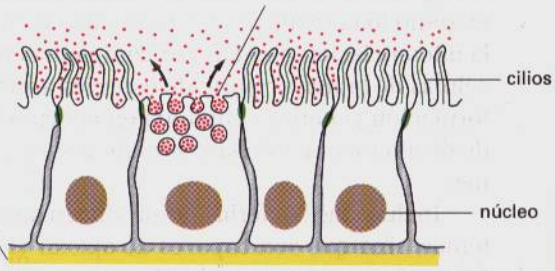
Las células absorbentes (enterocitos) tienen muchos microvilli que se proyectan a la superficie libre aumentando el área de absorción.



Las células epiteliales adyacentes están unidas mediante uniones que confieren a la capa celular su fuerza mecánica y que la hacen también impermeable a las moléculas pequeñas. La capa descansa sobre una lámina basal.

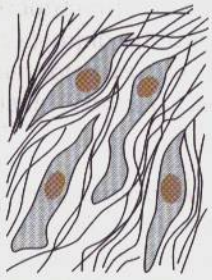
Células ciliadas: tienen cilios en su superficie libre que baten sincrónicamente para desplazar sustancias (p.ej., mucosidades) por encima de la capa epitelial.

Células secretoras: se hallan en la mayoría de las capas epiteliales. Estas células especializadas segregan sustancias hacia la superficie de la capa celular.



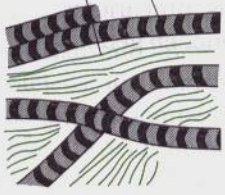
TEJIDO CONJUNTIVO

Los espacios entre órganos y tejidos del cuerpo están ocupados por tejido conjuntivo, formado principalmente por una red de fibras proteicas resistentes inmersas en un gel polisacárido. Esta matriz extracelular está segregada principalmente por los fibroblastos.



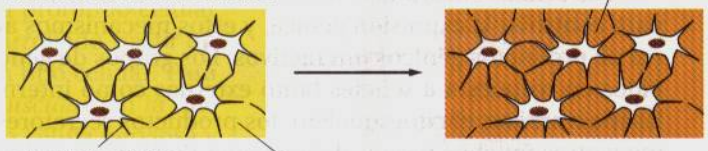
fibroblastos en tejido conjuntivo laxo

Dos tipos fundamentales de fibra proteica extracelular son la colágena y la elastina.

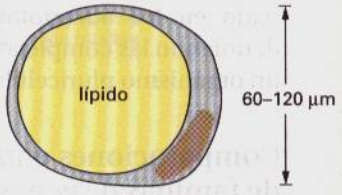


El hueso está producido por células denominadas osteoblastos, que segregan una matriz extracelular en la que más tarde se depositarán cristales de fosfato cálcico.

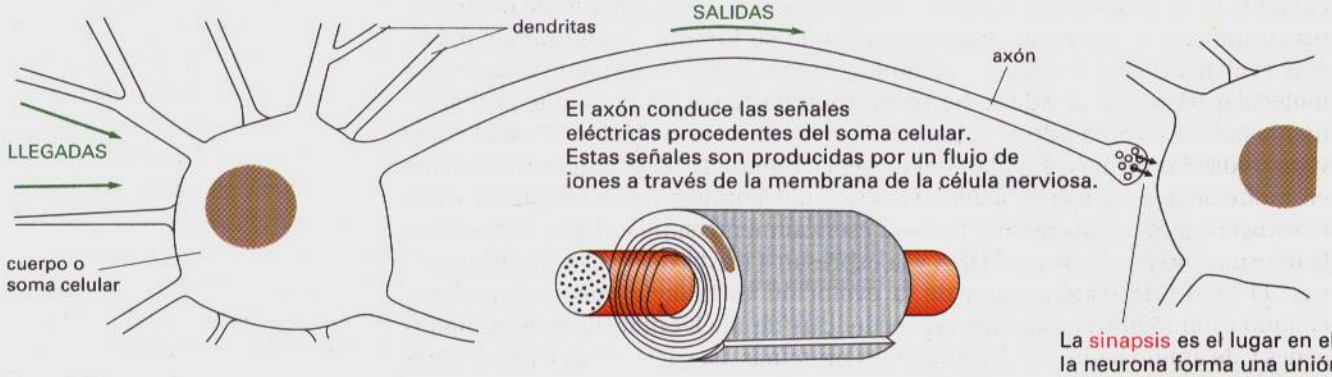
Las sales de calcio se depositan en la matriz extracelular.



Las células adiposas son unas de las mayores del cuerpo. Estas células son responsables de la producción y almacenamiento de grasa. El núcleo y el citoplasma están desplazados hacia la periferia de la célula por una gran gota de lípido.



TEJIDO NERVIOSO



El axón conduce las señales eléctricas procedentes del soma celular. Estas señales son producidas por un flujo de iones a través de la membrana de la célula nerviosa.

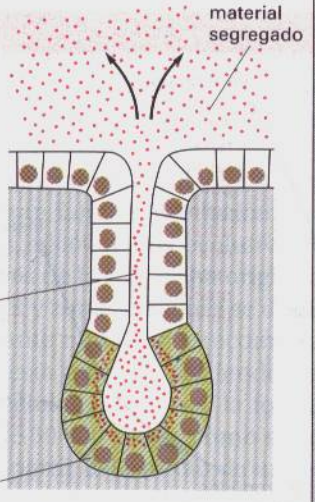
Las células nerviosas, o neuronas, están especializadas en la comunicación. El cerebro y la médula espinal, por ejemplo, están compuestos de una red de neuronas con células gliales de sostén.

Unas células especializadas, denominadas células de Schwann u oligodendrocitos, se disponen alrededor del axón formando una vaina multilaminar.

La sinapsis es el lugar en el que la neurona forma una unión especializada con otra neurona (o con una célula muscular). En la sinapsis, las señales pasan de una neurona a otra (o de una neurona a una célula muscular).

 Panel 1-3 Algunos de los diferentes tipos de células existentes en el cuerpo de un vertebrado.

A menudo las células epiteliales secretoras están agrupadas formando una glándula que se especializa en la secreción de una sustancia particular. Tal como se ilustra, las glándulas exocrinas segregan determinados productos (como lágrimas, mucosidades y jugos gástricos) al interior de conductos. Las glándulas endocrinas segregan hormonas a la sangre.



SANGRE

Los eritrocitos (glóbulos rojos) son células muy pequeñas, normalmente sin núcleo ni membranas internas, y contienen hemoglobina, proteína que se une al oxígeno.

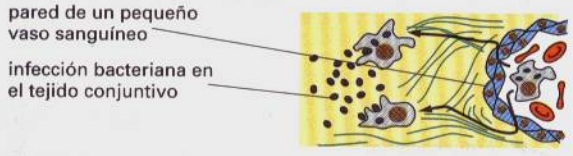
1 cm^3 de sangre contiene 5000 millones de eritrocitos

su forma normal es la de un disco bicóncavo

Los glóbulos blancos (leucocitos) protegen de las infecciones. La sangre contiene aproximadamente un leucocito por cada 100 glóbulos rojos. Aunque viajan por sangre, pueden pasar a través de las paredes de los vasos sanguíneos para realizar su función en los tejidos vecinos. Existen varios tipos distintos, entre ellos:

linfocitos: responsables de las respuestas inmunitarias, tales como la producción de anticuerpos.

macrófagos y neutrófilos: se desplazan hacia los focos de infección, donde ingieren bacterias y residuos.



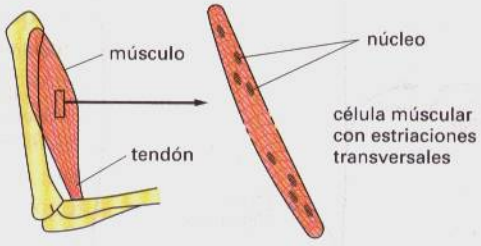
CÉLULAS GERMINALES

Tanto los espermatozoides como los óvulos son *haploides*, es decir, que contienen una sola dotación de cromosomas. Un espermatozoide del macho se une a un óvulo de la hembra, formando, por sucesivas divisiones, un nuevo organismo diploide.

MÚSCULO

Mediante su contracción, las células musculares generan fuerza mecánica. En los vertebrados existen tres tipos principales:

músculo esquelético: mueve las articulaciones por medio de su contracción potente y rápida. Cada músculo está formado por un haz de fibras musculares, cada una de las cuales es una enorme célula plurinucleada.

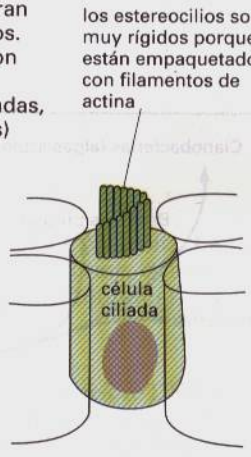


músculo liso: se halla en las paredes del tracto digestivo, la vejiga, las arterias y las venas; está compuesto por finas células alargadas (no estriadas), cada una con un solo núcleo.

músculo cardíaco: de carácter intermedio entre el músculo esquelético y el músculo liso. Produce el latido cardíaco. Las células adyacentes están asociadas por uniones eléctricamente conductoras, que hacen que las células se contraigan sincrónicamente

CÉLULAS SENSORIALES

Entre las células más complejas del cuerpo de los vertebrados se encuentran las que detectan los estímulos externos. Las células ciliadas del oído interno son las detectoras primarias del sonido. Se trata de células epiteliales modificadas, con microvilli especiales (estereocilios) en su superficie. El movimiento de estos estereocilios en respuesta a las vibraciones sonoras provoca una señal eléctrica que pasa al cerebro.



Los bastones de la retina del ojo son células especializadas en la respuesta a la luz. La región fotosensible contiene una gran cantidad de discos membranosos (en *rojo*) en cuyas membranas se encuentra el pigmento sensible a la luz, la rodopsina. La luz actúa como una señal eléctrica (flecha *verde*), que se transmite a células nerviosas del ojo, las cuales canalizan la señal hasta el cerebro.

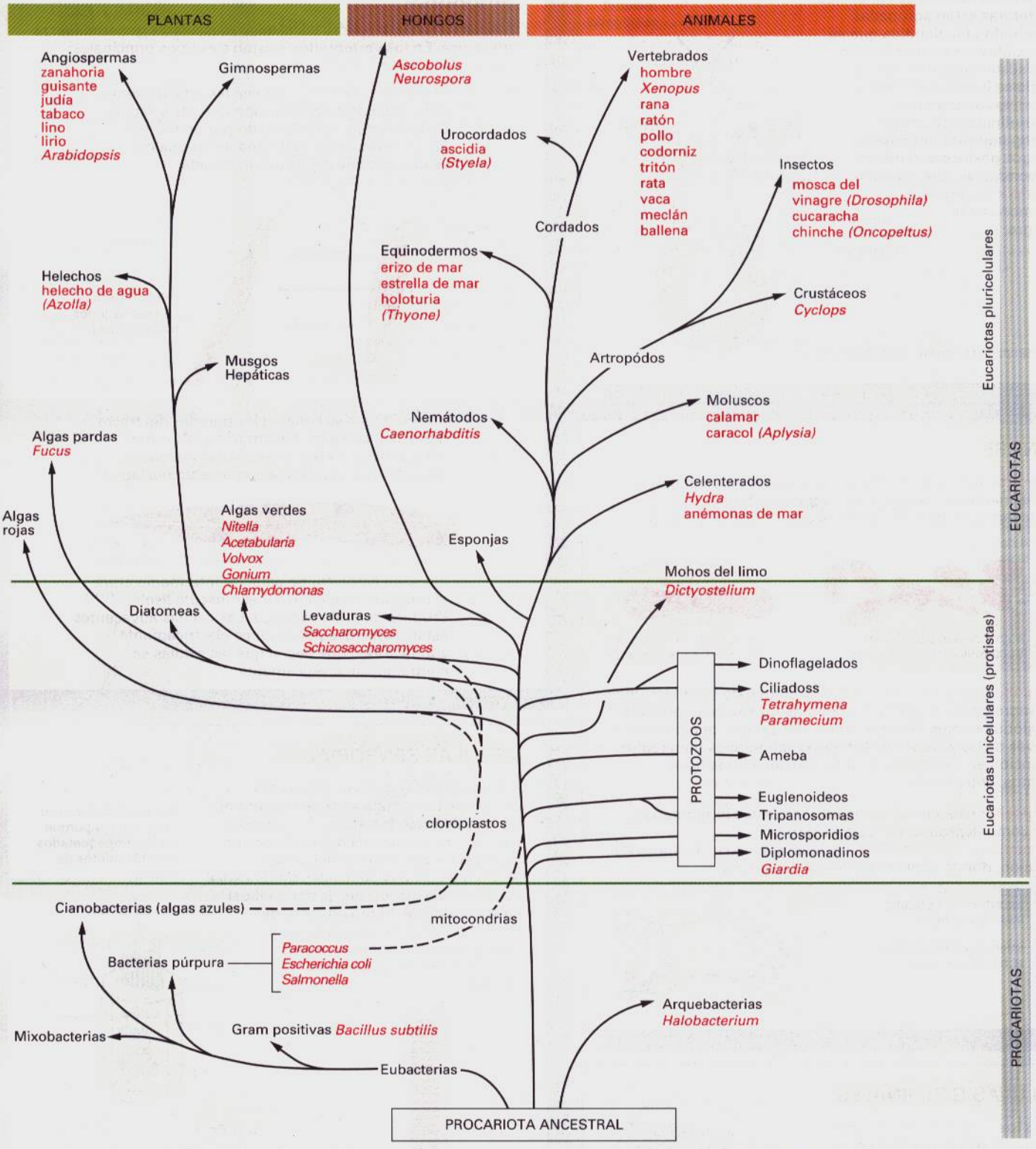


Figura 1-38 Relaciones evolutivas entre algunos de los organismos mencionados en este libro. Las ramas del árbol muestran vías de descendencia común, pero su longitud no indica el paso del tiempo. (Téngase en cuenta así mismo que el eje vertical del diagrama muestra categorías principales de organismos, pero no tiempo.)

pecifican– no sólo tienen una función similar sino también casi con seguridad un origen evolutivo común. Se pueden utilizar estas relaciones para dibujar los caminos evolutivos más antiguos; comparando secuencias de genes y reconociendo homologías se descubren paralelismos ocultos y similitudes entre organismos diferentes.

A menudo también se encuentran parecidos familiares entre genes que codifican proteínas que realizan funciones relacionadas en un mismo organismo. Estos genes también están relacionados evolutivamente y su existencia revela una estrategia básica a través de la cual se ha originado la complejidad creciente de los organismos: los genes y zonas de genes se duplican y las nuevas copias divergen de la original mediante mutación y recombinación, para realizar nuevas funciones adicionales. De esta manera, partiendo de un número relativamente pequeño de genes en las células primitivas, la forma de vida más compleja ha llegado a desarrollar más de 50 000 genes, como se cree que presenta un animal o una planta superiores. A partir del estudio de un gen o de una proteína, avanzamos en el conocimiento de toda una familia de genes o proteínas homólogos a ella. Así la biología molecular subraya la unidad del mundo viviente y nos proporciona herramientas para descubrir los mecanismos generales que están en la base de su infinita variedad de invenciones.

En el próximo capítulo empezaremos la discusión de estos mecanismos con el estudio del componente mas básico del kit de construcción biológica –las moléculas pequeñas a partir de las que se sintetizan todos los componentes mayores de las células vivas.

Resumen

La evolución de los grandes organismos pluricelulares dependió de la capacidad de las células eucariotas para expresar su información hereditaria de muchas maneras diferentes y para actuar de forma cooperativa como un colectivo único. En los animales uno de los primeros desarrollos fue probablemente la formación de capas de células epiteliales que separaron del ambiente exterior el espacio interior del cuerpo. Además de estas células epiteliales también se desarrollaron célullas nerviosas, células musculares y células del tejido conjuntivo, todas las cuales se hallan actualmente en los animales más sencillos. La evolución de los animales y de las plantas superiores (Figura 1-38) dependió de la producción de un número cada vez mayor de tipos celulares especializados y de métodos mas sofisticados de coordinación entre ellos, reflejando un número cada vez mayor de elaborados sistemas de control de la expresión de los genes en los distintos tipos celulares.

Bibliografía

General

Bendall, D.S., ed. Evolution from Molecules to Men. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1983.

Evolution of Catalytic Function. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52, 1987.

Curtis, H.; Barnes, N.S. Biology, 5th ed. New York: Worth, 1989.

Darnell, J.E.; Lodish, H.F.; Baltimore, D. Biología Celular y Molecular, 2.ª ed., Capítulo 26. Barcelona: Ediciones Omega, S.A., 1993.

Darwin, C. On the Origin of Species. London: Murray, 1859. Reprinted, New York: Penguin, 1984.

Dawkins, R. The Blind Watchmaker. New York: Viking Penguin, 1988.

Margulis, L.M.; Schwartz, K.V. Five Kingdoms: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth, 2nd ed. New York: W.H. Freeman, 1988.

Watson, J.D.; Hopkins, N.H.; Roberts, J.W.; Steitz, J.A.; Weiner, A.M. Molecular Biology of the Gene, 4th ed., Chapter 28. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings, 1987.

Citas

1. Lazcano, A.; Fox, G.E.; Oró, J.F. Life before DNA: the origin and evolution of early archaean cells. In The Evolution of Metabolic Function (R.P. Mortlock, ed.), pp. 237-295. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992.

   Schopf, J.W.; Hayes, J.M.; Walter, M.R. Evolution of earth's earliest ecosystems: recent progress and unsolved problems. In Earth's Earliest Biosphere: Its Origin and Evolution (J.W. Schopf, ed.), pp. 361-384. Princeton, NJ: Princeton University Press, 1983.

2. Miller, S.L. Which organic compounds could have occurred on the prebiotic earth? *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52:17-27, 1987.

3. Orgel, L.E. Molecular replication. *Nature* 358:203-209, 1992.

4. Ellington, A.D.; Szostak, J..W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346:818-822, 1990.

Joyce, G.F. Directed molecular evolution. *Sci. Am.* 267(6):90-97, 1992.

5. Bartel, D.P.; Szostak, J.W. Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences. *Science* 261:1411-1418, 1993.

Cech, T.R. RNA as an enzyme. *Sci. Am.* 255(5):64-75, 1986.

6. Alberts, B.M. The function of the hereditary materials: biological catalyses reflect the cell's evolutionary history. *Am. Zool.* 26:781-796, 1986.

Maizels, N.; Weiner, A.M. Peptide-specific ribosomes, genomic tags, and the origin of the genetic code. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52:743-749, 1987.

7. Cavalier-Smith, T. The origin of cells: a symbiosis between genes, catalysts, and membranes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 52:805-824, 1987.

8. Muto, A., Andachi, Y.; Yuzawa, H.; Yamao, F.; Osawa, S. The organization and evolution of transfer RNA genes in *Mycoplasma capricolum. Nucl. Acid Res.* 18:5037-5043, 1990.

9. Sogin, M.L. Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Devel.* 1:457-463, 1991.

Vidal, G. The oldest eukaryotic cells. *Sci. Am.* 250(2):48-57, 1984.

10. Woese, C.R. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271, 1987.

Zillig, W. Comparative biochemistry of *Archaea* and *Bacteria. Curr. Opin. Genet. Devel.* 1:544-551, 1991.

11. Clarke, P.H. Enzyme in bacterial populations. In Biochemical Evolution (H. Gutfreund, ed.), pp. 116-149. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1981.

De Duve, C. Blueprint for a Cell: The Nature and Origin of Life. Burlington, NC: Neil Patterson Publishers, 1991.

12. Li, W.-H.; Graur, D. Fundamentals of Molecular Evolution. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1991.

Sidow, A.; Bowman, B.H. Molecular phylogeny. *Curr. Opin. Genet. Devel.* 1:451-456, 1991.

13. Dickerson, R.E. Cytochrome c and the evolution of energy metabolism. *Sci. Am.* 242(3):136-153, 1980.

14. Cavalier-Smith, T. The origin of eukaryote and archaebacterial cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 503:17-54, 1987.

Gray, M.W. The evolutionary origins of organelles, *Trends Genet.* 5:294-299, 1989.

Margulis, L. Symbiosis in Cell Evolution. New York: W.H. Freeman, 1981.

15. Gray, M.W. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:25-50, 1989.

Sogin, M.L.; Gunderson, J.H.; Elwood, H.J.; Alonso, R.A.; Peattie, D.A. Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia. Science* 243:75-77, 1989.

Vossbrinck, C.R.; Maddox, J.V.; Friedman, S.; Debrunner-Vossbrinck, B.A.; Woese, C.R. Ribosomal RNA sequence suggest microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 326:411-414, 1987.

16. Bryant, D.A. Puzzles of chloroplast ancestry. *Curr. Biol.* 2:240-242, 1992.

17. Sleigh, M.A. Protozoa and Other Protists. London: Edward Arnold, 1989.

18. Buchsbaum, R., et al. Animals Without Backbones, 3rd ed. Chicago: University of Chicago Press, 1987.

Field, K.G., et al. Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science* 239:748-753, 1988.

Knoll, A.H. The end of the proterozoic eon. *Sci. Am.* 265(4):64-73, 1991.

Levinton, J.S. The big bang of animal evolution. *Sci. Am.* 267(5):84-91, 1992.

Shapiro, J.A. Bacteria as multicellular organisms. *Sci. Am.* 258(6):82-89, 1988.

Valentine, J.W. The evolution of multicellular plants and animals. *Sci. Am.* 239(3):140-158, 1978.

19. Bode, P.M.; Bode, H.R. Patterning in Hydra. In Pattern Formation (G.M. Malacinski, S.V. Bryant, eds.), pp. 213-244. New York: Mcmillan, 1984.

20. Raff, R.A.; Kaufman, T.C. Embryos, Genes, and Evolution. New York: Macmillan, 1983.

Slack, J.M.W.; Holland, P.W.H.; Graham, C.F. The zootype and the phylotypic stage. *Nature* 361:490-492, 1993.

21. Chothia, C. One thousand families for the molecular biologist. *Nature* 357:543-544, 1992.

Miklos, G.L.; Campbell, H.D. The evolution of protein domains and the organizational complexities of metazoans. *Curr. Opin. Genet. Devel.* 2:902-906, 1992.

Pequeñas moléculas, energía y biosíntesis

2

- Los componentes químicos de una célula
- Orden biológico y energía
- El alimento y la obtención de la energía celular
- La biosíntesis y la creación de orden
- Coordinación entre catabolismo y biosíntesis

"Debo anunciarles que puedo preparar urea sin necesidad de ningún riñón ni de ningún animal, ya sea un hombre o un perro." Esta frase, escrita hace 165 años por el joven químico alemán Wöhler, significó el final de la creencia en una fuerza vital especial existente en los organismos vivos que da lugar a sus propiedades y productos característicos. Pero lo que en la época de Wöhler fue una revelación, actualmente es de común conocimiento –las criaturas vivas están hechas de compuestos químicos. En la visión contemporánea de la vida no hay lugar para el vitalismo –o para cualquier cosa que quede fuera de las leyes de la química y de la física. Esto no quiere decir que en biología ya no existan misterios: existen muchas áreas de ignorancia, tal como se pondrá de manifiesto en capítulos posteriores. Pero deberíamos empezar a subrayar la gran cantidad de fenómenos que se conocen.

Actualmente, disponemos de información detallada sobre las moléculas esenciales de la célula –no sólo de un reducido número de moléculas, sino de miles de ellas. En muchos casos conocemos sus estructuras químicas exactas y sabemos con exactitud cómo son producidas y degradadas. En términos generales, conocemos cómo la energía química impulsa las reacciones biosintéticas de la célula, cómo actúan en las células los principios de la termodinámica generando un orden molecular, y también cómo son controladas y coordinadas las miríadas de cambios químicos que se producen continuamente dentro de las células.

En este capítulo y en el siguiente resumimos brevemente la química de la célula viva. Aquí nos ocuparemos de los procesos en los que intervienen las moléculas pequeñas: de aquellos mecanismos a través de los cuales la célula sintetiza sus componentes químicos fundamentales y obtiene su energía. El Capítulo 3 describe las moléculas gigantes de la célula, que son polímeros de las moléculas pequeñas y cuyas propiedades son las responsables de la especificidad de los procesos biológicos y de la transferencia de la información biológica.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA DE CIENCIAS DE LA SALUD BIBLIOTECA CENTRAL

Los componentes químicos de una célula

La química celular se basa en los compuestos de carbono[1]

Una célula viva está compuesta por un restringido conjunto de elementos, cuatro de los cuales (C, H, N y O) constituyen aproximadamente el 99 % de su peso. Esta composición difiere notablemente de la de la corteza terrestre y pone de re-

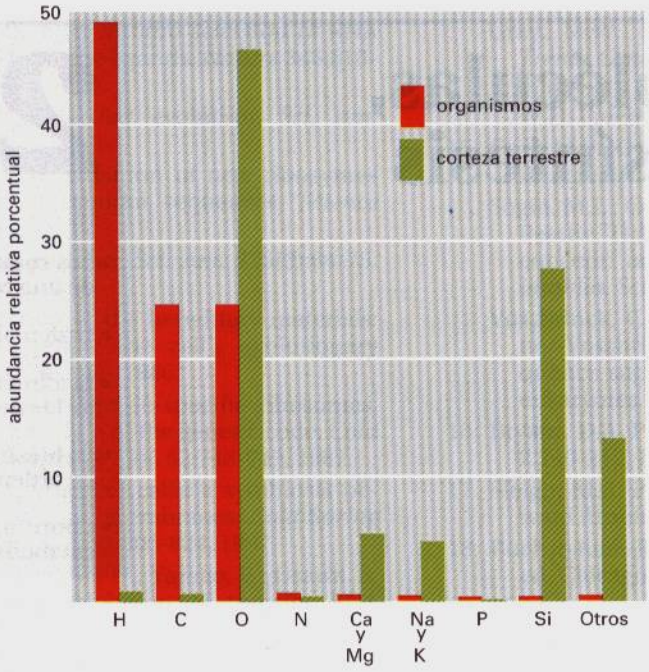


Figura 2-1 Abundancia relativa de los elementos químicos encontrados en la corteza terrestre (el mundo inanimado), comparada con la encontrada en los tejidos blandos de los organismos vivos. La abundancia relativa se expresa como el porcentaje del *número* total de átomos presentes. Así, por ejemplo, aproximadamente cerca del 50 % de los átomos de los organismos vivos son átomos de hidrógeno.

lieve un tipo característico de química (Figura 2-1). ¿Cuál es esta química especial y cómo surgió?

La substancia más abundante de la célula viva es el agua. Constituye aproximadamente el 70 % del peso de las células. La mayoría de reacciones intracelulares ocurren en un medio acuoso. La vida en este planeta empezó en el mar, y las condiciones que reinaban en aquel ambiente primitivo imprimieron un sello permanente en la química de la materia viva. Todos los organismos han sido diseñados en base a las propiedades características del agua, tales como su carácter polar, su habilidad para formar enlaces de hidrógeno y su alta tensión superficial. Por ejemplo, el agua rodea completamente a las moléculas polares mientras que tiende a reunir las moléculas no polares, formando grandes agregados. En el Panel 2-1 (págs. 50-51) se resumen algunas propiedades importantes del agua.

Aparte del agua, la gran mayoría de las otras moléculas de una célula son compuestos de carbono, centro de atención de la **química orgánica**. El carbono destaca entre todos los elementos de la Tierra por su capacidad de formar grandes moléculas; en este aspecto le sigue el silicio, muy por debajo de él. Debido a su reducido tamaño y a los cuatro electrones de la capa externa el átomo de carbono puede formar cuatro enlaces covalentes fuertes con otros átomos. Y, lo que es más importante, se puede unir a otros átomos de carbono formando cadenas y anillos, generando así moléculas grandes y complejas cuyo tamaño no tiene un límite superior obvio. Los otros átomos abundantes en la célula (H, N y O) también son pequeños y capaces de formar enlaces covalentes muy fuertes (Panel 2-2, págs. 52-53).

Un enlace covalente típico de una molécula biológica tiene una energía de entre 15 y 170 kcal/mol, en función de los átomos que estén implicados. Como por término medio la energía térmica a la temperatura corporal solamente es de 0,6 kcal/mol, incluso una colisión energética con otra molécula, muy poco probable, no será capaz de romper un enlace covalente. Sin embargo, catalizadores específicos pueden romper o reorganizar rápidamente los enlaces covalentes. La Biología es posible gracias a la combinación de estabilidad de los enlaces covalentes en condiciones fisiológicas y la capacidad de los catalizadores biológicos (denominados *enzimas*) de romper y reorganizar estos enlaces de una manera controlada y en determinadas moléculas.

En principio, las simples reglas del enlace covalente entre el carbono y otros elementos permiten un número infinitamente elevado de compuestos. Aunque el número de compuestos diferentes de carbono de una célula es muy grande, única-

mente representa una diminuta fracción de los que son teóricamente posibles. En algunos casos podemos encontrar una buena razón para explicar que este o aquel compuesto realiza una función biológica determinada; pero con mayor frecuencia parece que el compuesto "elegido"' fue una alternativa entre otras muchas razonables, algo así como un accidente (Figura 2-2). Ciertos patrones y elementos de reacción, una vez establecidos en las células más antiguas, fueron preservados con algunas variaciones a lo largo de la evolución. Aparentemente, el desarrollo de nuevas clases de compuestos fue necesario o útil en muy contadas ocasiones.

Las células utilizan cuatro tipos básicos de moléculas pequeñas[2]

Ciertas combinaciones simples de átomos –tales como los grupos metilo ($-CH_3$), hidroxilo (–OH), carboxilo (–COOH) y amino ($-NH_2$)– se presentan repetidamente en las moléculas biológicas. Cada uno de estos grupos tiene propiedades químicas y físicas distintas que influyen sobre el comportamiento de cualquier molécula en que se presente el grupo. El Panel 2-2 (págs. 52-53) resume los tipos principales de grupos químicos y algunas de sus propiedades sobresalientes.

Los pesos atómicos de H, C, N y O son 1, 12, 14 y 16 respectivamente. Las **moléculas orgánicas pequeñas** de la célula tienen pesos moleculares que oscilan entre 100 y 1000 y contienen hasta unos 30 átomos de carbono. Normalmente se hallan libres en solución, donde algunas de ellas forman un acervo de intermediarios a partir de los cuales se construyen largos polímeros, denominados **macromoléculas**. También existen intermediarios esenciales en las reacciones químicas que transforman la energía derivada de los alimentos en formas útiles de energía (lo cual se discute más adelante).

Las moléculas pequeñas representan una décima parte del total de materia orgánica de una célula y (a grandes rasgos) sólo existen del orden de un millar de tipos diferentes de ellas (Tabla 2-1). Todas las moléculas biológicas se sintetizan a partir de los mismos compuestos simples y se degradan a estos mismos compuestos, ocurriendo la síntesis y la degradación a través de secuencias de cambios químicos de alcance limitado y siguiendo reglas precisas. Por consiguiente, los compuestos de una célula pueden ser clasificados en un reducido número de familias distintas. Dado que las macromoléculas de una célula, que constituyen el tema del Capítulo 3 de este libro, están formadas a partir de estas mismas moléculas pequeñas, pertenecen a sus mismas familias.

A grandes rasgos, podemos decir que las células poseen cuatro grandes familias de moléculas orgánicas pequeñas: los **azúcares** simples, los **ácidos grasos**, los **aminoácidos** y los **nucleótidos**. Cada una de estas familias contiene muchos miembros diferentes, que presentan rasgos químicos comunes. Aunque algunos compuestos celulares no pueden clasificarse en estas categorías, las cuatro familias, junto con las macromoléculas formadas a partir de ellas, constituyen un porcentaje sorprendentemente elevado de la masa celular total (Tabla 2-1).

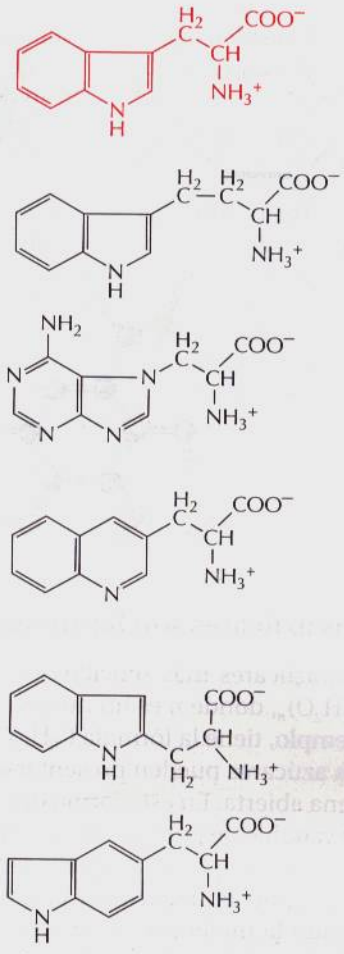


Figura 2-2 Los organismos vivos únicamente sintetizan un reducido número de las moléculas orgánicas, que en principio podrían producir. De los seis aminoácidos que se muestran en la figura, únicamente el de la parte superior (el triptófano) es sintetizado por las células.

Tabla 2-1 Composición química aproximada de una célula bacteriana

	Porcentaje del peso celular total	Número de tipos de cada molécula
Agua	70	1
Iones inorgánicos	1	20
Azúcares y precursores	1	250
Aminoácidos y precusores	0,4	100
Nucleótidos y precursores	0,4	100
Ácidos grasos y precursores	1	50
Otras moléculas pequeñas	0,2	~300
Macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos)	26,0	~3000

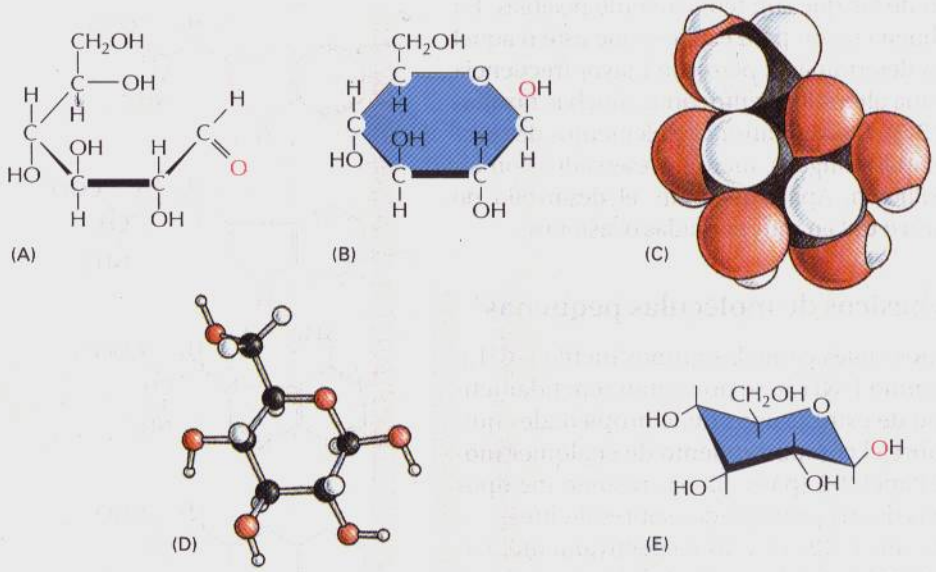


Figura 2-3 La estructura del monosacárido glucosa, una hexosa simple. (A) Forma de cadena abierta del azúcar, que está en equilibrio con la forma cíclica o de anillo, más estable, que se muestra en (B). (C) y (D) son modelos de espacio lleno y de bolas y varillas, respectivamente, de esta forma cíclica (β-D-glucosa). La forma de silla (E) es una representación alternativa que se utiliza frecuentemente debido a que refleja de una forma más exacta la estructura del azúcar. En (A), (B) y (E) las O de color *rojo* indican el átomo de oxígeno del grupo aldehído. Para una revisión de las estructuras y de las propiedades químicas de los azúcares, véase el Panel 2-3, págs. 54-55.

Los azúcares son las moléculas alimenticias de la célula[3]

Los azúcares más sencillos –los **monosacáridos**– presentan la fórmula general $(CH_2O)_n$, donde n es un número entero comprendido entre 3 y 7. La *glucosa*, por ejemplo, tiene la fórmula $C_6H_{12}O_6$ (Figura 2-3). Como se muestra en la Figura 2-3, los azúcares pueden presentarse tanto en forma de anillo como en forma de cadena abierta. En esta forma de cadena abierta, los azúcares presentan un número variable de grupos hidroxilo y un grupo aldehído ($_H\!>C=O$) o un grupo cetona ($>C=O$). El grupo aldehído o cetona desempeña un papel especial. En primer lugar, pueden reaccionar con un grupo hidroxilo de la misma molécula convirtiendo la molécula en un anillo; en esta forma de anillo, puede reconocerse el carbono del aldehído o de la cetona originales ya que es el único que está unido a dos átomos de oxígeno. En segundo lugar, una vez formado el anillo, este carbono puede unirse a uno de los carbonos con un grupo hidroxilo de otro azúcar, generando un *disacárido* (Panel 2-3, págs. 54-55). De esta misma forma la adición de más monosacáridos da lugar a **oligosacáridos** de longitud creciente (trisacáridos, tetrasacáridos, y así sucesivamente), hasta llegar a las grandes moléculas de **polisacáridos** con miles de unidades de monosacáridos. Puesto que cada monosacárido tiene varios grupos hidroxilo libres que pueden formar un enlace con otro monosacárido (o con algún otro compuesto), el número de estructuras posibles de polisacáridos es enormemente elevado. Incluso un disacárido simple, formado por dos residuos de glucosa, puede existir en 11 variedades diferentes (Figura 2-4), mientras que tres hexosas diferentes ($C_6H_{12}O_6$) se pueden unir formando varios miles de trisacáridos diferentes. Por esta razón resulta muy difícil determinar la estructura de un polisacárido determinado, ya que es necesario conocer los lugares de unión de cada azúcar a sus vecinos. Con los métodos actuales, por ejemplo, se tarda más tiempo en determinar la disposición de media docena de azúcares unidos (por ejemplo, los de una glucoproteína), que en determinar la secuencia de nucleótidos de una molécula de DNA que contenga muchos miles de nucleótidos en la que cada unidad se une a la siguiente exactamente de la misma forma).

La glucosa es el principal compuesto alimenticio de muchas células. Una serie de reacciones oxidativas (véase pág. 65) conducen desde esta hexosa hasta varios derivados más pequeños y, finalmente, hasta CO_2 y H_2O. El resultado neto se puede indicar así:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + \text{energía}$$

En el transcurso de la degradación de la glucosa se genera energía y "poder reductor", ambos esenciales para las reacciones de biosíntesis, que son captados y

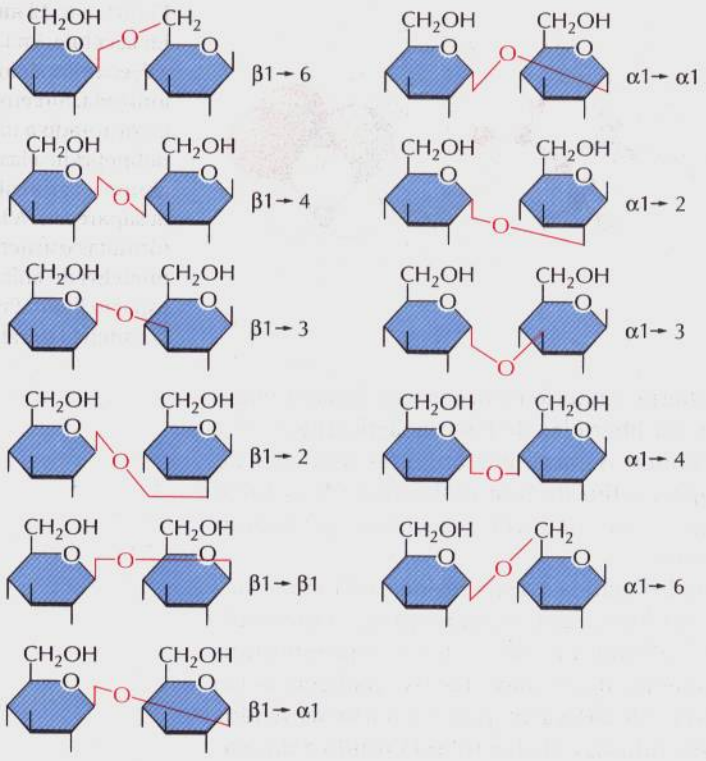


Figura 2-4 Once disacáridos formados por dos unidades de D-glucosa. Aunque se diferencian únicamente en el tipo de enlace entre las dos unidades de glucosa, son químicamente diferentes. Puesto que los oligosacáridos asociados a las proteínas y a los lípidos pueden tener más de seis tipos diferentes de azúcares unidos, a través de enlaces como los ilustrados aquí, en disposiciones lineales y ramificadas, el número de tipos distintos posibles de oligosacáridos de que puede disponer la célula es extremadamente elevado.

transportados fundamentalmente por dos moléculas cruciales, denominadas ATP y NADH, respectivamente. Más adelante, en este mismo capítulo discutimos la estructura y las funciones de estas dos moléculas cruciales.

Los polisacáridos simples, compuestos sólo por residuos de glucosa –principalmente el *glucógeno* en las células animales y el *almidón* en las células vegetales– son utilizados para almacenar energía que se utilizará en el futuro. Pero los azúcares no se utilizan exclusivamente para la producción y el almacenamiento de energía. Importantes compuestos estructurales extracelulares (tales como la celulosa) están formados por polisacáridos sencillos, y a menudo secuencias no repetitivas de cadenas de moléculas de azúcares, más pequeñas pero más complejas, están unidas covalentemente a proteínas, formando *glucoproteínas*, o a lípidos, formando *glucolípidos*.

Los ácidos grasos son componentes de las membranas celulares[4]

Una molécula de ácido graso, como por ejemplo el *ácido palmítico* (Figura 2-5) presenta dos regiones características: una larga cadena hidrocarbonada hidrofóbica (insoluble en agua) y químicamente no muy reactiva, y un grupo de ácido carboxílico, ionizado en solución (COO^-), extremadamente hidrofílico (soluble en agua) y que fácilmente reacciona con un grupo hidroxilo o un grupo amino de otra molécula formando ésteres y amidas. De hecho casi todas las moléculas de ácido graso de una célula están unidas covalentemente a otras moléculas, mediante su grupo ácido carboxílico. El gran número de ácidos grasos distintos que se encuentran en las células difieren en características químicas tales como la longitud de la cadena hidrocarbonada y en el número y la posición de los dobles enlaces carbono-carbono que contienen (Panel 2-4, págs. 56-57).

Los ácidos grasos son una importante fuente de alimento ya que pueden ser degradados produciendo por unidad de peso más del doble de energía útil que produce la glucosa. Se almacenan en el citoplasma en forma de *triacilglicéridos*, compuestos de tres cadenas de ácidos grasos unidas a una molécula de glicerol (Panel 2-4, págs. 56-57); Estas moléculas constituyen las grasas animales que nos

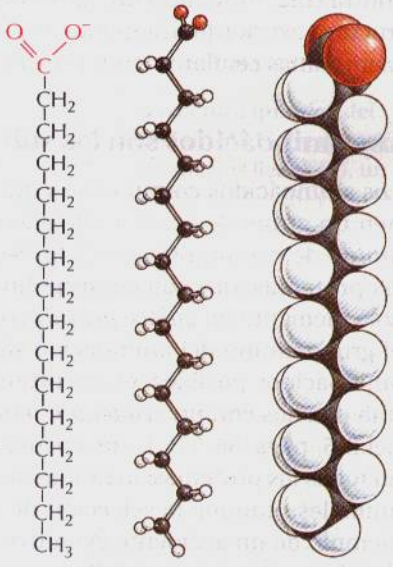


Figura 2-5 Ácido palmítico. El grupo ácido carboxílico (en *rojo*) está representado en forma ionizada. En el *centro* se presenta un modelo de bolas y varillas y a la *derecha* un modelo tridimensional de espacio lleno.

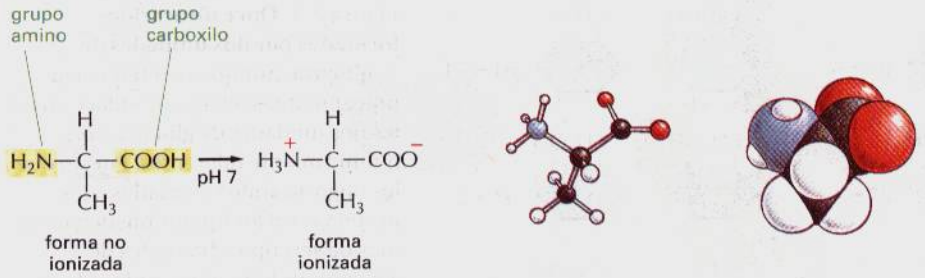


Figura 2-6 El aminoácido alanina. En la célula, en la que el pH es cercano a 7, el aminoácido se halla en forma ionizada. Sin embargo, al ser incorporado a una cadena polipeptídica las cargas de los grupos amino y carboxilo del aminoácido libre desaparecen. A la derecha de las fórmulas estructurales se muestran modelos de bolas y varillas y de espacio lleno. En el caso de la alanina, la cadena lateral es un grupo $-CH_3$.

son familiares en nuestra experiencia diaria. Cuando es necesario obtener energía, las cadenas de ácido graso pueden ser liberadas de los triacilglicéridos y ser degradadas hasta unidades de dos carbonos. A continuación, estas unidades de dos carbonos, que constituyen el grupo acetilo de una molécula hidrosoluble denominada *acetil CoA*, son degradadas a través de varias reacciones que liberan energía y que describiremos más adelante.

Pero la función más importante de los ácidos grasos reside en la construcción de las membranas de la célula. Estas finas capas semipermeables que limitan a todas las células y envuelven sus orgánulos internos están compuestas fundamentalmente de **fosfolípidos**, pequeñas moléculas que se parecen a los triaciglicéridos en que están construidas en su mayor parte a partir de ácidos grasos y glicerol. En los fosfolípidos, sin embargo, el glicerol está unido a dos cadenas de ácido graso y no a tres. El lugar restante del glicerol está acoplado a un grupo fosfato, que a su vez está unido a otro pequeño compuesto hidrofílico como la *etanolamina*, la *colina* o la *serina*.

Cada molécula de fosfolípido tiene una cola hidrofóbica –compuesta por las dos cadenas de ácido graso– y una cabeza polar hidrofílica en la que se encuentra el fosfato. Si se coloca una pequeña cantidad de fosfolípido en agua, se extenderá sobre la superficie formando una *monocapa* de moléculas de fosfolípido; en esta lámina las colas de las moléculas quedan densamente empaquetadas unas con otras y dirigidas hacia el aire y las cabezas se hallan en contacto con el agua (Panel 2-4, págs. 56-57). Dos de estas láminas se pueden combinar, cola contra cola, formando un "sandwich"' de fosfolípidos, o **bicapa lipídica**, una estructura extraordinariamente importante que es la base estructural de todas las membranas celulares (como se discute en el Capítulo 10).

Los aminoácidos son las subunidades de las proteínas[5]

Los aminoácidos comunes son químicamente variados, pero todos ellos contienen un grupo de ácido carboxílico y un grupo amino, ambos unidos al mismo átomo de carbono (Figura 2-6). Se utilizan como subunidades en la síntesis de las **proteínas**, que son largos polímeros lineales de aminoácidos unidos cabeza-cola mediante un *enlace peptídico* entre el grupo carboxílico de un aminoácido y el grupo amino del aminoácido siguiente (Figura 2-7). Aunque existen muchos aminoácidos posibles, en las proteínas sólo hay 20 aminoácidos comunes, cada uno de ellos con una *cadena lateral* diferente unida al átomo de carbono α (Panel 2-5, págs. 58-59). Estos mismos 20 aminoácidos se presentan una y otra vez en todas las proteínas, incluidas las producidas por las bacterias, las plantas y los animales. Aunque la selección de estos 20 aminoácidos probablemente sea un ejemplo de un accidente evolutivo, la versatilidad química que proporcionan es de una importancia vital. Por ejemplo, 5 de los 20 aminoácidos presentan cadenas laterales que pueden transportar una carga (Figura 2-8) mientras que los otros no están cargados pero son reactivos de formas diferentes (Panel 2-5, págs. 58-59). Como veremos, las propiedades de las cadenas laterales de los aminoácidos determinan las propiedades de las proteínas y constituyen la base de las distintas y sofisticadas funciones desempeñadas por ellas.

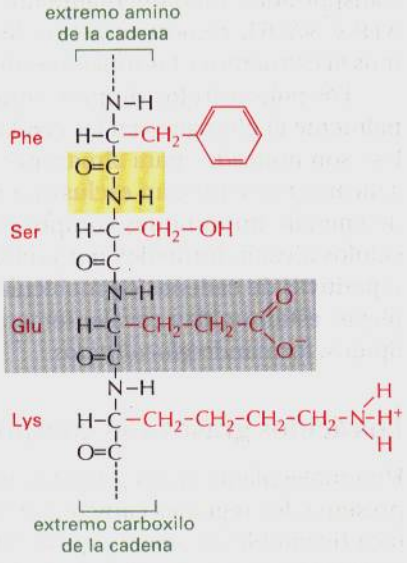


Figura 2-7 Pequeña parte de una molécula proteica, mostrando cuatro aminoácidos. Cada aminoácido está unido al siguiente mediante un enlace covalente que recibe el nombre de *enlace peptídico*. Uno de estos enlaces peptídicos se destaca sombreado de *amarillo*. Por lo tanto, las proteínas se denominan a veces *polipéptidos*. Las *cadenas laterales* de los aminoácidos se representan en *rojo* y los átomos de un aminoácido (el ácido glutámico) se destacan mediante el *sombreado gris*.

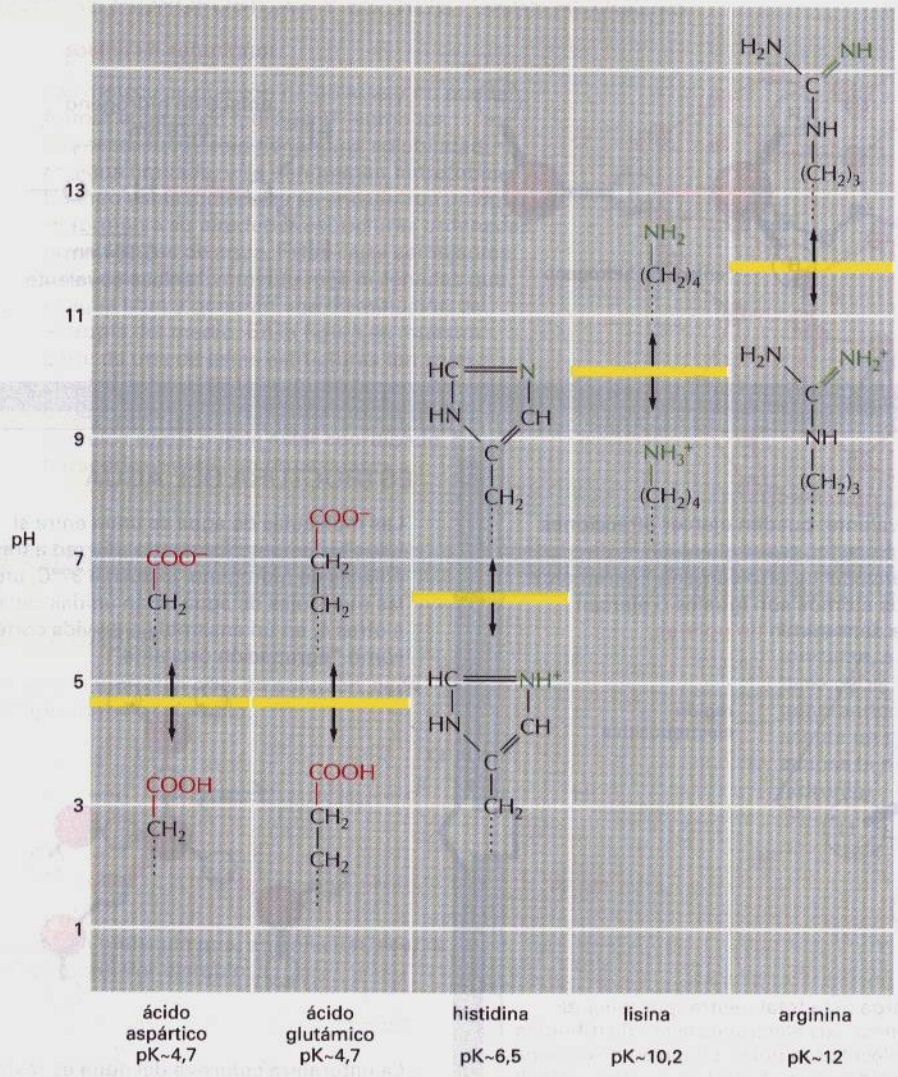


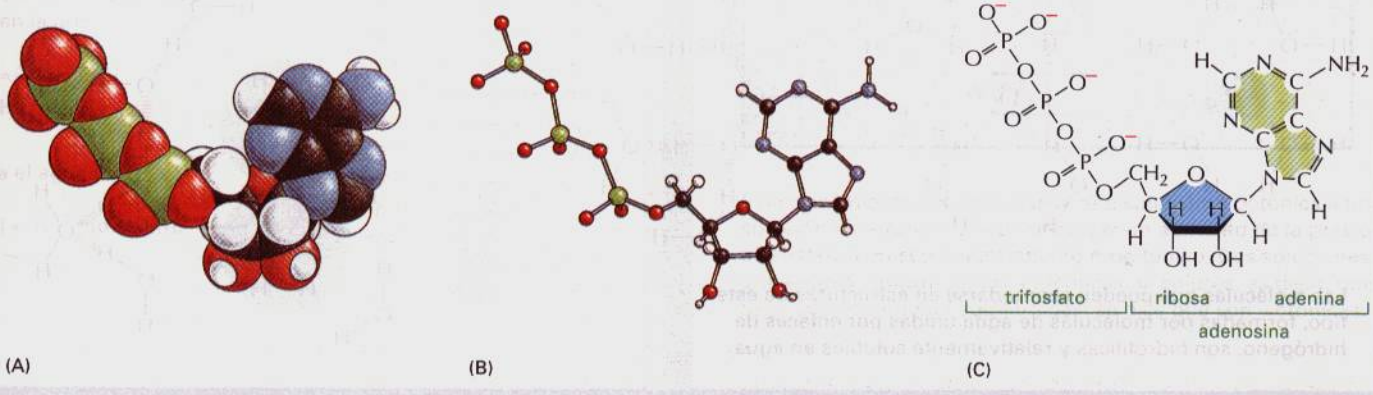
Figura 2-8 La carga de las cadenas laterales de los aminoácidos depende del pH. En solución acuosa los ácidos carboxílicos pierden fácilmente un H^+, formando un ion de carga negativa que se nombra mediante el sufijo "-ato"', como por ejemplo aspart*ato* o glutam*ato*. Con las aminas se produce una situación parecida ya que en solución acuosa toman H^+ formando un ion de carga positiva (que no recibe ningún nombre especial). Estas reacciones son rápidamente reversibles, y la cantidad presente de las dos formas, con carga y sin carga, depende del pH de la solución. A un pH elevado, los ácidos carboxílicos tienden a estar cargados y las aminas sin carga; a un pH bajo sucede lo contrario –los ácidos carboxílicos carecen de carga y las aminas están cargadas. El pH en el que están cargados exactamente la *mitad* de los residuos de ácido carboxílico o amina, recibe el nombre de pK del aminoácido en cuestión.

En la célula, el pH es próximo a 7, y casi todos los ácidos carboxílicos y las aminas se encuentran en forma cargada.

Los nucleótidos son las subunidades del DNA y del RNA[6]

En los nucleótidos, uno de los diversos compuestos cíclicos que contienen nitrógeno (denominados a menudo *bases* porque en soluciones ácidas pueden combinarse con H^+) está unido a un azúcar de cinco carbonos (*ribosa* o *desoxirribosa*) que también contiene un grupo fosfato. Existe un claro parecido entre los diferentes anillos nitrogenados de los nucleótidos. La *citosina* (C), la *timina* (T) y el *uracilo* (U) reciben el nombre de *pirimidinas* puesto que todos ellos derivan de un anillo de pirimidina hexagonal; la *guanina* (G) y la *adenina* (A) son *purinas*, compuestas por un segundo anillo pentamérico unido al anillo hexamérico.

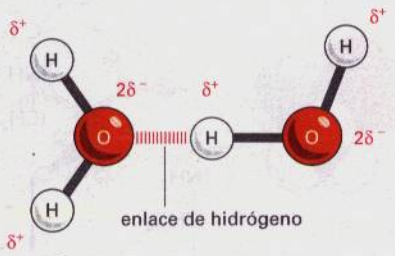
Figura 2-9 Estructura química del adenosín trifosfato (ATP). Se muestra un modelo de espacios llenos (A), un modelo de bolas y varillas (B) y la fórmula estructural (C). Nótese la presencia de cargas negativas en cada uno de los tres fosfatos.



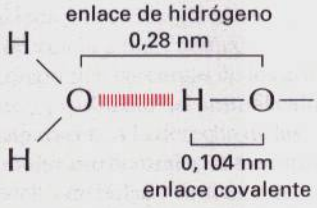
ENLACES DE HIDRÓGENO

Debido a que están polarizadas, dos moléculas de agua adyacentes pueden formar una unión conocida como enlace de hidrógeno. Los enlaces de hidrógeno tienen una fuerza de alrededor de 1/20 la de un enlace covalente.

Los enlaces de hidrógeno son más fuertes cuando los 3 átomos se encuentran en línea recta.

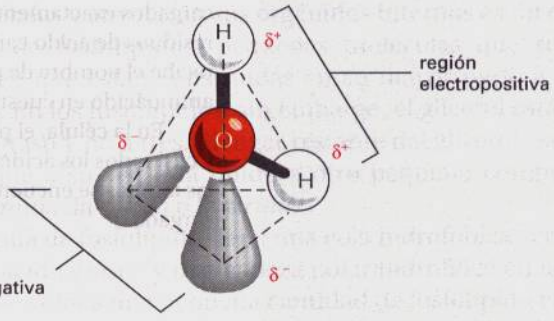


longitudes de enlace



EL AGUA

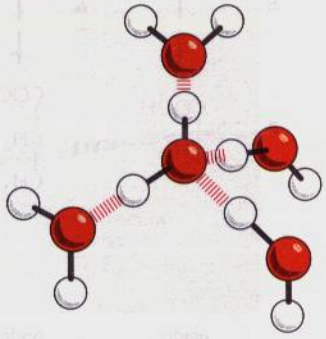
Dos átomos, conectados por un enlace covalente, pueden ejercer atracciones diferentes sobre los electrones del enlace. En estos casos el enlace es dipolar, con un extremo cargado ligeramente negativo (δ^-) y otro cargado ligeramente positivo (δ^+). Los enlaces en los que los dos átomos son iguales o ejercen atracciones iguales sobre los electrones se denominan no polares.



Aunque una molécula de agua tiene una carga neta total neutra (por tener el mismo número de protones que de electrones), sus electrones están distribuidos de forma asimétrica, lo cual hace que la molécula sea polar. El núcleo de oxígeno desplaza a los electrones de los núcleos de hidrógeno, dejándolo a estos núcleos con una pequeña carga neta positiva. El exceso de densidad electrónica sobre el átomo de oxígeno genera regiones débilmente negativas cerca del átomo de oxígeno en los otros dos vértices de un tetraedro imaginario.

ESTRUCTURA DEL AGUA

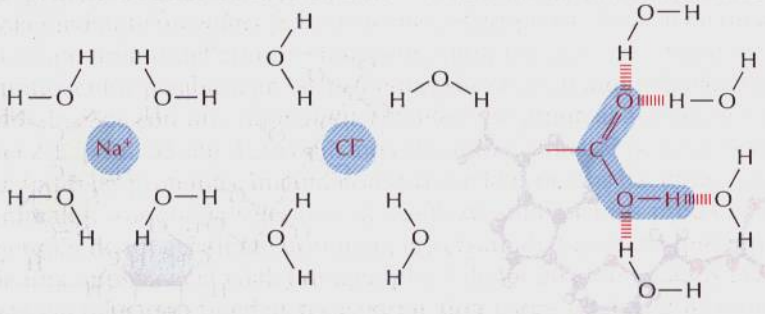
Las moléculas de agua se unen entre sí transitoriamente formando una red a través de enlaces de hidrógeno. Incluso a 37°C, un 15% de las moléculas de agua están unidas cada una a a otras 4, en un ensamblaje de vida corta conocido como "agrupación oscilante".



La naturaleza cohesiva del agua es responsable de muchas de sus propiedades extraordinarias, tales como la elevada tensión superficial, el alto calor específico y el elevado calor de vaporización.

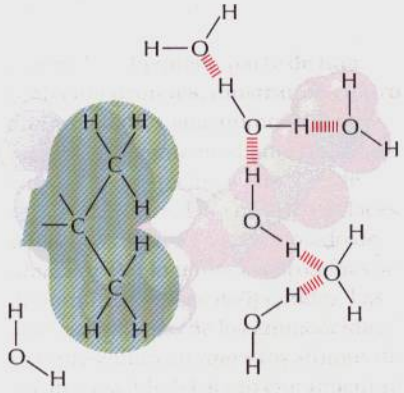
MOLÉCULAS HIDROFÍLICAS E HIDROFÓBICAS

Debido a su naturaleza polar, las moléculas de agua se agrupan alrededor de los iones y de otras moléculas polares.



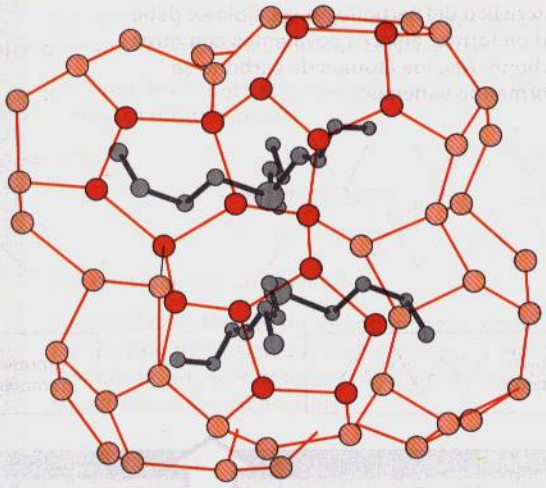
Las moléculas que pueden acomodarse en estructuras de este tipo, formadas por moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno, son hidrofílicas y relativamente solubles en agua.

Las moléculas no polares interrumpen la estructura del agua formada por enlaces de H, sin formar interacciones favorables con moléculas de agua. Por lo tanto son hidrofóbicas y casi insolubles en agua.



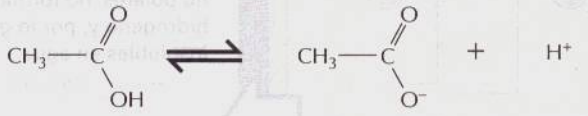
MOLÉCULAS HIDROFÓBICAS Y ESTRUCTURAS ACUOSAS

Las moléculas que son no polares y no pueden formar enlaces de hidrógeno –como los hidrocarbonos– sólo tienen una solubilidad en agua limitada, y se denominan hidrofóbicas. Cuando estas moléculas se encuentran en agua, se forman a su alrededor estructuras ordenadas de moléculas de agua. Estas cajas semejantes a hielo son relativamente más ordenadas que el agua libre y generan una disminución de entropía del medio. En la figura se muestra parte de una de estas estructuras (en *rojo*) alrededor de un hidrocarbono (en *negro*). En la estructura intacta cada átomo de oxígeno (*círculos rojos*) puede estar coordinado tetraédricamente con otros cuatro.



ÁCIDOS Y BASES

Un ácido es una molécula que, en solución, cede un ion H^+ (protón). Por ejemplo,

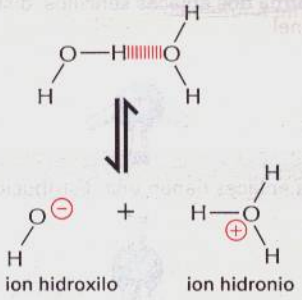


ácido — base — protón

Una base es una molécula que, en solución, acepta un ion H^+ (protón). Por ejemplo,

base — protón — ácido

El agua, por sí misma, tiene una ligera tendencia a ionizarse, actuando tanto como ácido débil y como base débil. Cuando actúa como ácido libera un protón, generando un ion hidroxilo. Cuando actúa como base acepta un protón formando un ion hidronio. En solución acuosa la mayoría de protones están como iones hidronio.



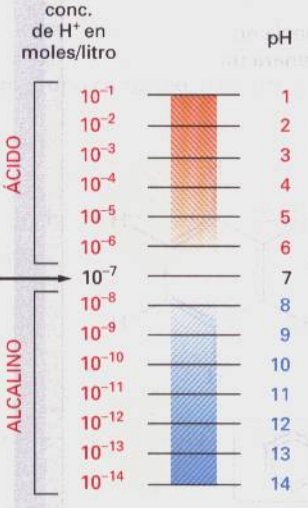
pH

La acidez de una solución se define como la concentración de iones H^+ que posee. Por comodidad, utilizamos la escala de pH en la que

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

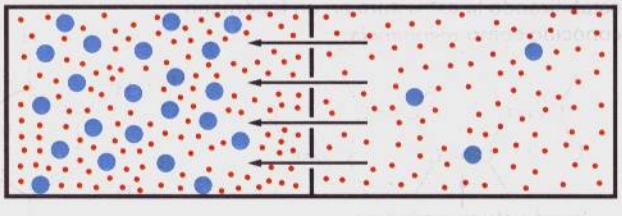
Para el agua pura

$[H^+] = 10^{-7}$ moles/litro



ÓSMOSIS

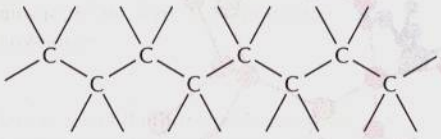
Si 2 soluciones acuosas están separadas por una membrana que únicamente permite el paso de las moléculas de agua, ésta pasará hacia la solución que contiene la mayor concentración de moléculas solubles, un proceso denominado ósmosis.



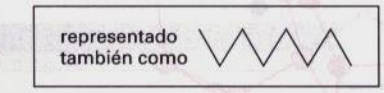
Este movimiento del agua desde una solución hipotónica a una solución hipertónica, puede provocar un aumento de la presión hidrostática en el compartimiento hipertónico. Dos soluciones que tengan concentraciones idénticas de solutos, es decir, que sean osmóticamente equilibradas, se dice que son isotónicas.

ESQUELETOS CARBONADOS

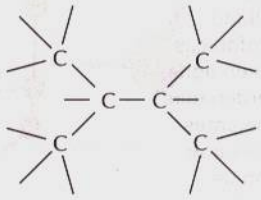
El papel característico del carbono en la célula se debe a su capacidad de formar enlaces covalentes con otros átomos de carbono. Así, los átomos de carbono se pueden unir formando cadenas.



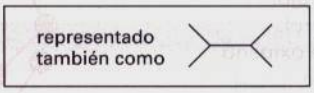
representado también como



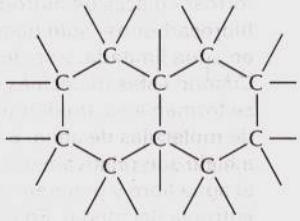
o estructuras ramificadas



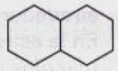
representado también como



o anillos



representado también como

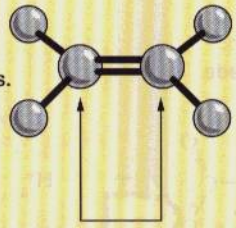


ENLACES COVALENTES

Un enlace covalente se forma cuando dos átomos se acercan suficientemente y comparten uno o más de sus electrones. En un enlace sencillo se comparte un electrón de cada uno de los dos átomos; en un enlace doble se comparten un total de cuatro electrones.

Cada átomo forma un número determinado de enlaces covalentes, siguiendo una distribución espacial definida. Por ejemplo, el carbono forma cuatro enlaces sencillos distribuidos hacia los vértices de un tetraedro mientras que el nitrógeno forma tres enlaces sencillos y el oxígeno forma dos enlaces sencillos, distribuidos como se muestra en este panel.

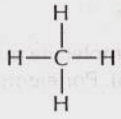
Los dobles enlaces tienen una distribución espacial diferente.



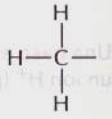
Dos átomos unidos por dos o más enlaces covalentes no pueden rotar libremente alrededor del eje del enlace. Esta restricción constituye el factor limitante principal sobre la distribución tridimensional de muchas macromoléculas.

HIDROCARBUROS

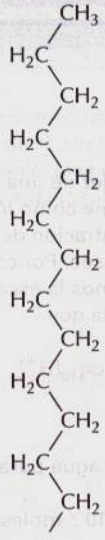
El carbono y el hidrógeno forman juntos unos compuestos estables denominados hidrocarburos. Son no polares, no forman enlaces de hidrógeno y, por lo general, son insolubles en agua.



metano



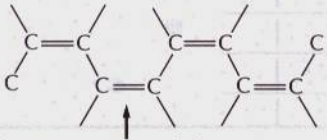
grupo metilo



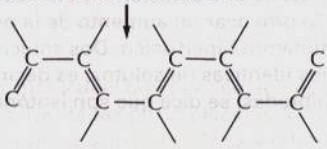
parte de la cadena de un ácido graso

RESONANCIA Y AROMATICIDAD

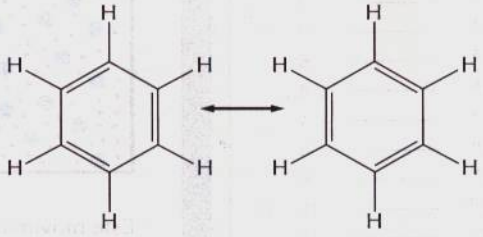
La cadena de carbonos pueden incluir dobles enlaces. Si éstos se encuentran en átomos de carbonos alternos, los electrones de enlace se mueven dentro de la molécula, estabilizando la estructura en un fenómeno conocido como resonancia.



la estructura verdadera se halla entre estas dos



Cuando se produce resonancia en un compuesto cíclico, se genera un anillo aromático.

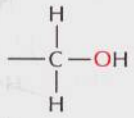


representado a menudo como

COMPUESTOS C—O

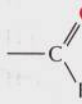
Muchos compuestos biológicos contienen un carbono unido a un oxígeno. Por ejemplo:

alcohol

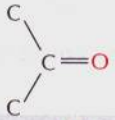


El —OH recibe el nombre de grupo hidroxilo.

aldehído

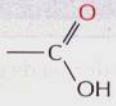


cetona



El C=O recibe el nombre de grupo carbonilo.

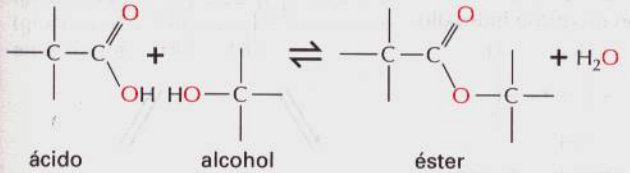
ácido carboxílico



El —COOH recibe el nombre de grupo carboxilo. En el agua pierde un ión H^+ y se convierte en $—COO^-$.

ésteres

Los ésteres están formados por la combinación de un ácido y un alcohol:

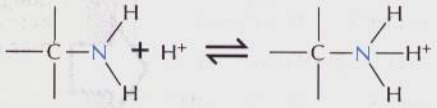


ácido alcohol éster

COMPUESTOS C—N

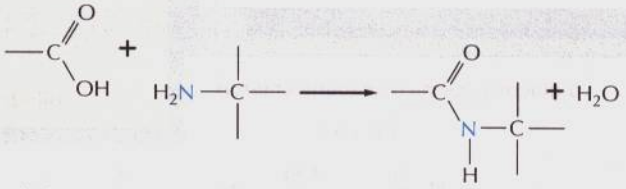
Las aminas y amidas son dos importantes ejemplos de compuestos que contienen un carbono unido a un nitrógeno.

En agua, las aminas se combinan con un ion H^+ y quedan cargadas positivamente.

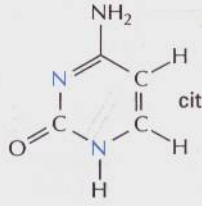


Por consiguiente, son básicas.

Las amidas se forman por la combinación de un ácido y una amina. Son más estables que los ésteres. A diferencia de las aminas, en solución acuosa no poseen carga. Un ejemplo lo constituye el enlace peptídico.



El nitrógeno se presenta también en diversos compuestos cíclicos: purinas y pirimidinas

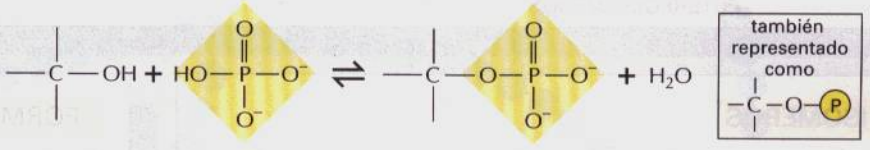


citosina (una pirimidina)

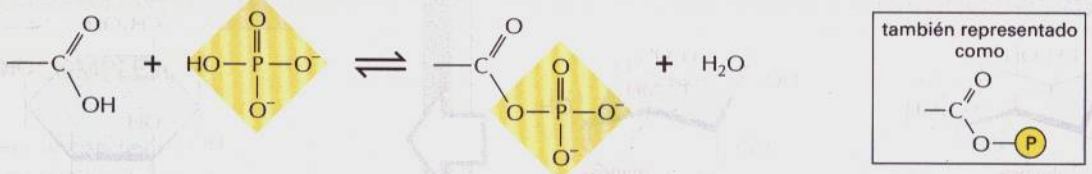
FOSFATOS

El fosfato inorgánico es un ion estable formado a partir del ácido fosfórico, H_3PO_4. A menudo se representa como P_i.

Se pueden formar ésteres fosfato entre un fosfato y un grupo hidroxilo libre.



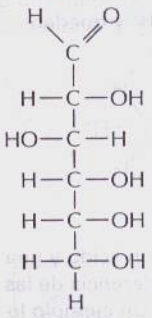
La combinación de un fosfato y un grupo carboxilo, o de dos o más grupos fosfato, da lugar a un anhídrido ácido.



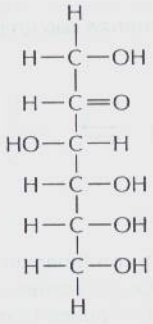
HEXOSAS $n = 6$

Las hexosas más comunes son

glucosa



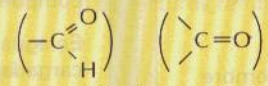
fructosa



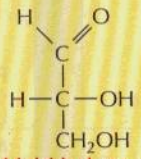
MONOSACÁRIDOS

Los monosacáridos son

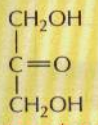
aldehídos o cetonas



que tienen también dos o más grupos de hidroxilo. Su fórmula general es $(CH_2O)_n$. Los más simples son las triosas ($n = 3$) tales como



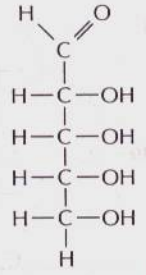
gliceraldehído (una aldosa)



dihidroxiacetona (una cetosa)

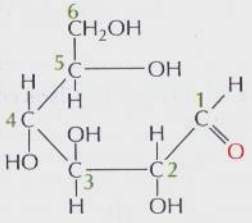
PENTOSAS $n = 5$

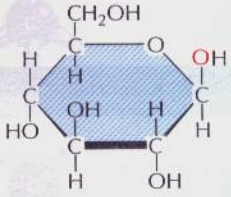
Una pentosa frecuente es



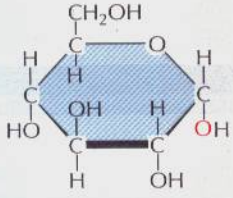
ribosa

D-glucosa (forma de cadena abierta)





β-D-glucosa

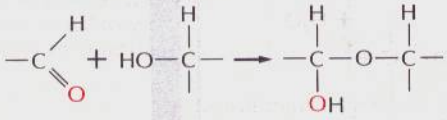


α-D-glucosa

ESTEREOISÓMEROS

FORMACIÓN DEL ANILLO

El grupo aldehído o cetona de un azúcar puede reaccionar con un grupo hidroxilo.

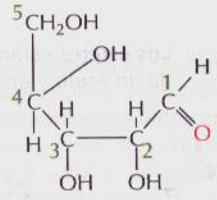


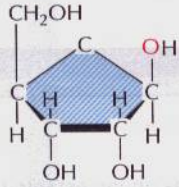
En los azúcares mayores ($n > 4$), esto puede ocurrir dentro de la misma molécula, formándose un anillo de 5 o 6 miembros.

SISTEMA DE NUMERACIÓN

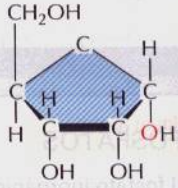
Los átomos de carbono de un azúcar se numeran a partir del extremo más cercano al aldehído o la cetona.

D-ribosa (forma de cadena abierta)





β-D-ribosa

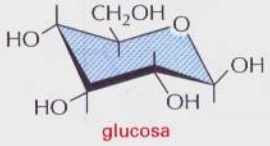


α-D-ribosa

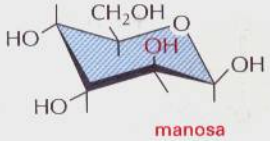
ESTEREOISÓMEROS

ISÓMEROS

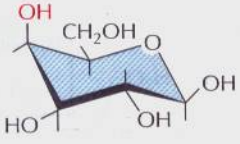
Los monosacáridos tienen muchos isómeros que únicamente se diferencian en la orientación de sus grupos hidroxilo –por ejemplo, la glucosa, la galactosa y la manosa son isómeros entre sí.



glucosa



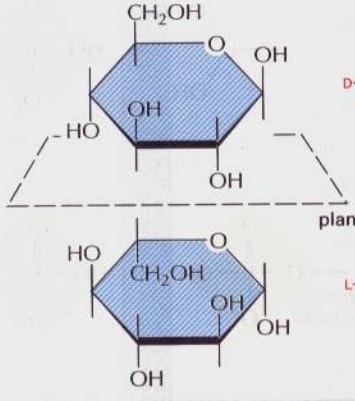
manosa



galactosa

FORMAS D Y L

Dos isómeros que sean imágenes especulares uno del otro tienen las mismas propiedades químicas y por ello reciben el mismo nombre, distinguiéndolos mediante el prefijo D o L.



D-glucosa

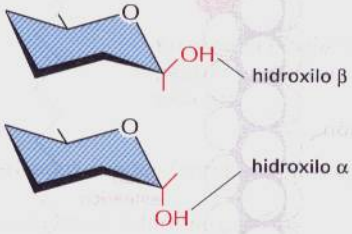
plano especular

L-glucosa

54 Panel 2-3 Algunos de los tipos de azúcares encontrados habitualmente en las células.

ENLACES α Y β

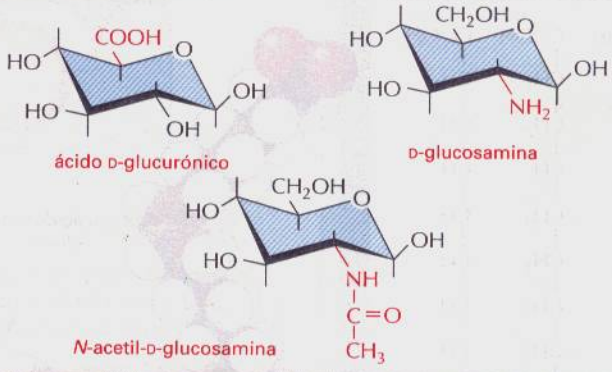
El grupo hidroxilo del carbono que presente el aldehído o la cetona puede pasar rápidamente de una posición a otra. Estas dos posiciones reciben el nombre de α y β.



En cuanto un azúcar se une a otro, se congela la forma α o β.

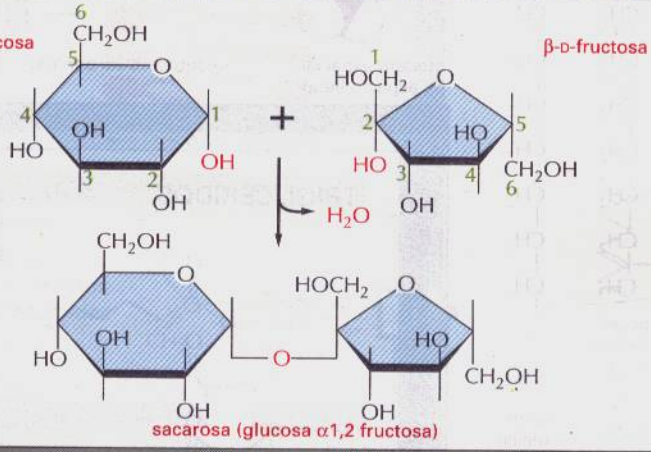
DERIVADOS DE LOS AZÚCARES

Los grupos hidroxilo de un monosacárido simple pueden ser sustituidos por otros grupos. Por ejemplo:



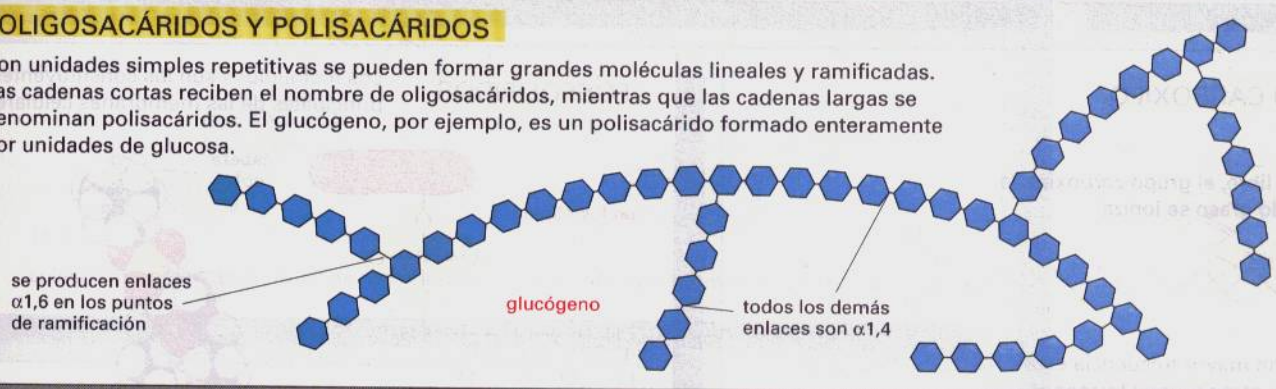
DISACÁRIDOS

El carbono que lleva el grupo aldehído o cetona puede reaccionar con cualquier grupo hidroxilo de otra molécula, formando un enlace glucosídico. Tres disacáridos frecuentes son la maltosa (glucosa α1,4 glucosa), la lactosa (galactosa β1,4 glucosa) y la sacarosa (glucosa α1,2 fructosa). La sacarosa se muestra en la figura.



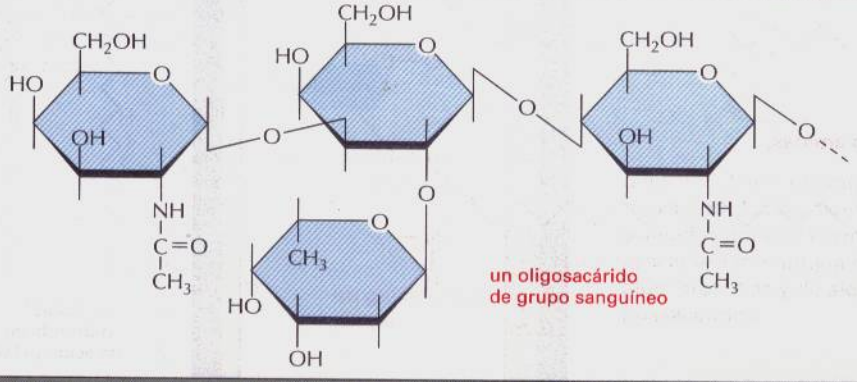
OLIGOSACÁRIDOS Y POLISACÁRIDOS

Con unidades simples repetitivas se pueden formar grandes moléculas lineales y ramificadas. Las cadenas cortas reciben el nombre de oligosacáridos, mientras que las cadenas largas se denominan polisacáridos. El glucógeno, por ejemplo, es un polisacárido formado enteramente por unidades de glucosa.



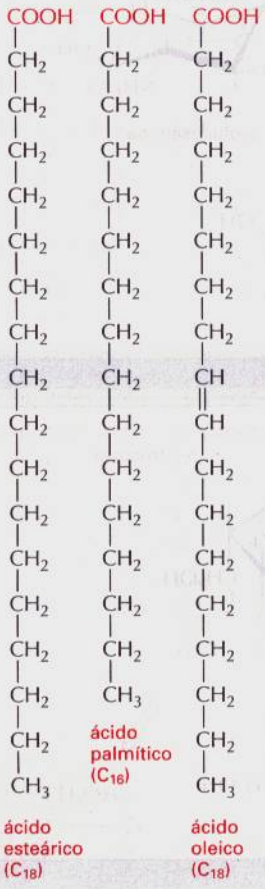
OLIGOSACÁRIDOS COMPLEJOS

En muchos casos, una secuencia de azúcares es no repetitiva. Son posibles muchas moléculas diferentes. Tales oligosacáridos complejos suelen estar unidos a proteínas o a lípidos.



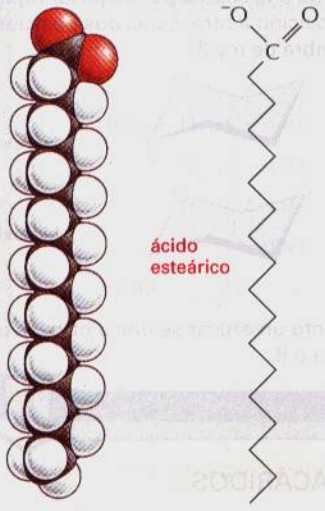
ÁCIDOS GRASOS FRECUENTES

Se trata de ácidos carboxílicos con una larga cola hidrocarbonada.



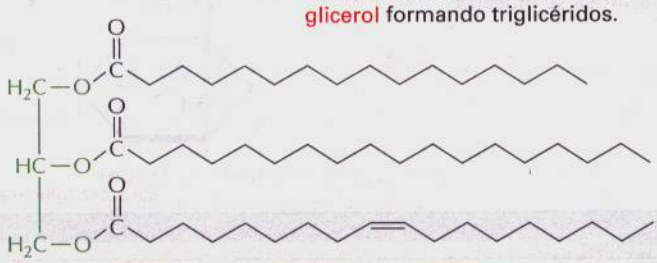
Existen centenares de tipos distintos de ácidos grasos. Algunos tienen uno o más dobles enlaces y se dice que son insaturados.

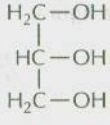
Este doble enlace origina una inclinación en la cadena hidrocarbonada. El resto de la cadena puede girar libremente a través de los otros enlaces C—C.



TRIGLICÉRIDOS

Los ácidos grasos se almacenan como reserva energética (grasa) mediante su unión al glicerol formando triglicéridos.

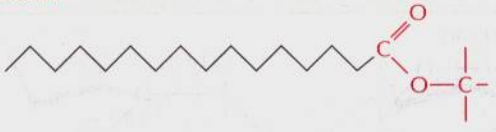




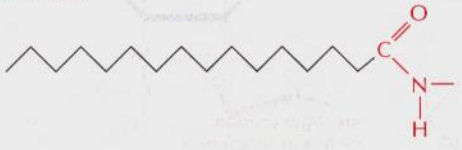
GRUPO CARBOXILO

Si está libre, el grupo carboxilo de un ácido graso se ioniza.

Pero con mayor frecuencia está unido a otros grupos formando ésteres

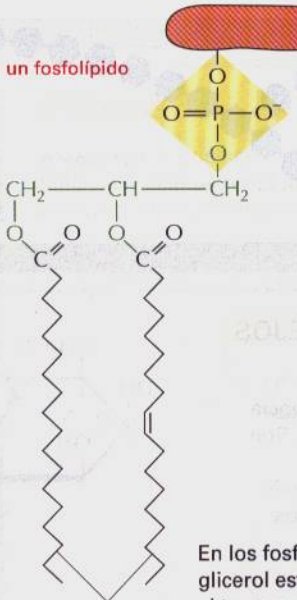


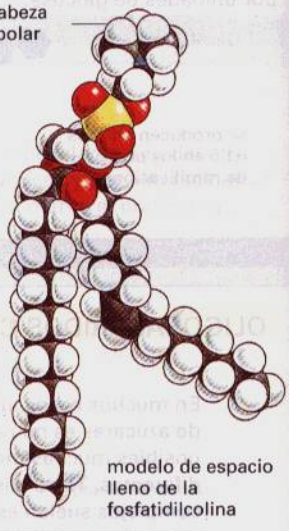
o amidas.



FOSFOLÍPIDOS

Los fosfolípidos son los constituyentes principales de las membranas celulares.





En los fosfolípidos, dos de los grupos –OH del glicerol están unidos a ácidos grasos, mientras que el tercer grupo –OH está unido al ácido fosfórico. El fosfato está unido además a un pequeño grupo polar (alcoholes) de entre varios posibles.

56 Panel 2-4 Algunos de los tipos de ácidos grasos encontrados habitualmente en las células y las estructuras que forman.

AGREGADOS LIPÍDICOS

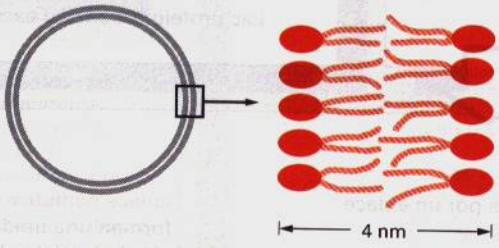
Los ácidos grasos tienen una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica.

En el agua pueden formar una película superficial o pequeñas micelas.

Sus derivados pueden formar grandes agregados unidos por fuerzas hidrofóbicas:

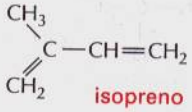
Los triacilglicéridos forman grandes gotas esféricas en el citoplasma celular.

Los fosfolípidos y glucolípidos forman bicapas lipídicas que se cierran sobre sí mismas y constituyen la base de todas las membranas celulares.



OTROS LÍPIDOS

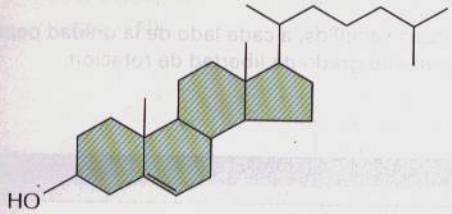
Los lípidos se definen como compuestos solubles en disolventes orgánicos. Otros dos tipos frecuentes de lípidos son los esteroides y los poliisoprenoides. Ambos están formados por unidades de isopreno.



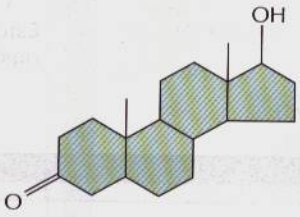
isopreno

ESTEROIDES

Los esteroides tienen una estructura común formada por múltiples anillos.



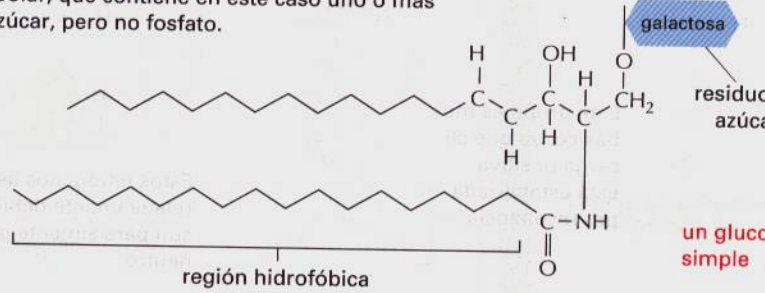
colesterol—presente en muchas membranas



testosterona—hormona esteroide masculina

GLUCOLÍPIDOS

Al igual que los fosfolípidos, estos compuestos están formados por una región hidrofóbica, que contiene dos largas colas hidrocarbonadas, y una región polar, que contiene en este caso uno o más residuos de azúcar, pero no fosfato.



un glucolípido simple

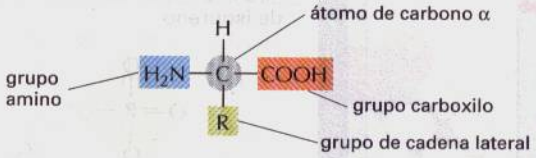
POLIISOPRENOIDES

largos polímeros lineales de isopreno

dolicol fosfato—utilizado para transportar los azúcares activados durante la síntesis asociada a membrana de las glucoproteínas y de algunos polisacáridos.

EL AMINOÁCIDO

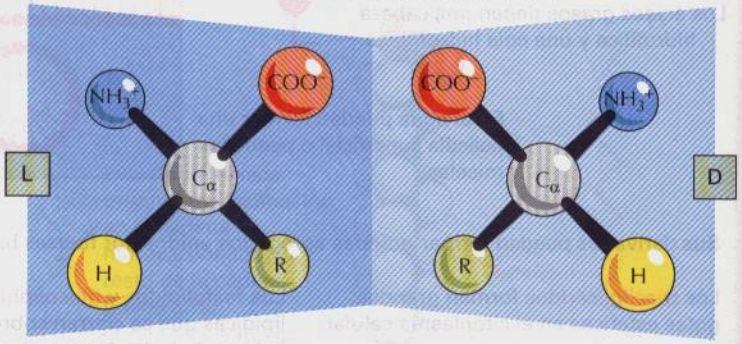
La fórmula general de un aminoácido es



Habitualmente R es una cadena lateral de entre 20 posibles. A pH 7 el grupo amino y el grupo carboxilo están ionizados.

ISÓMEROS ÓPTICOS

El átomo de carbono α es asimétrico, por lo que existen dos isómeros especulares (o estereoisómeros), D y L.

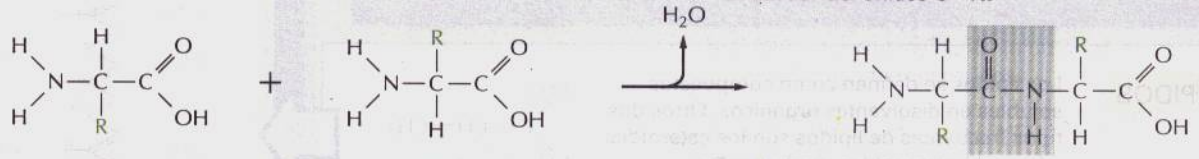


Las proteínas constan exclusivamente de aminoácidos L.

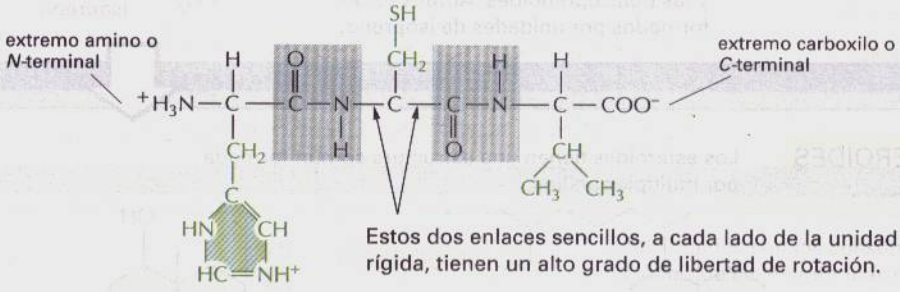
ENLACES PEPTÍDICOS

Habitualmente, los aminoácidos están unidos por un enlace amida denominado enlace peptídico.

enlace peptídico: los cuatro átomos de cada *recuadro gris* forman una unidad plana rígida. No existe libertad de rotación alrededor del enlace C—N.



Las proteínas son largos polímeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y siempre se escriben con el extremo *N*-terminal hacia la izquierda. La secuencia de este tripéptido es His Cys Val.



Estos dos enlaces sencillos, a cada lado de la unidad peptídica rígida, tienen un alto grado de libertad de rotación.

FAMILIAS DE AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos comunes se clasifican según si sus cadenas laterales son

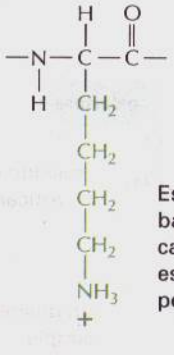
ácidas
básicas
polares no cargadas
no polares

Estos 20 aminoácidos se pueden abreviar de dos formas: por medio de tres letras y por medio de una sola letra.

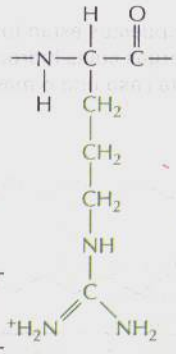
Así: alanina = Ala = A

CADENAS LATERALES BÁSICAS

lisina (Lys o K)

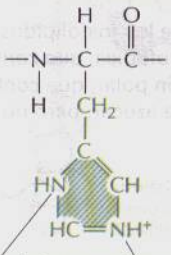


arginina (Arg o R)



Este grupo es muy básico, ya que su carga positiva está estabilizada por resonancia.

histidina (His o H)

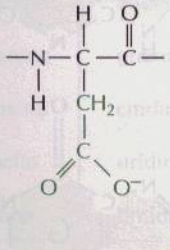


Estos nitrógenos tienen una afinidad relativamente débil por el H^+ y sólo son parcialmente positivos a pH neutro.

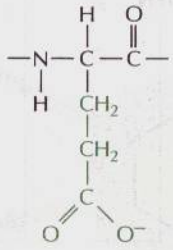
 Panel 2-5 Los 20 aminoácidos que intervienen en la síntesis de las proteínas.

CADENAS LATERALES ÁCIDAS

ácido aspártico
(Asp o D)



ácido glutámico
(Glu o E)



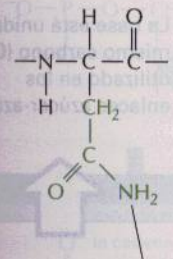
Los aminoácidos cuyas cadenas laterales no polares no cargadas son relativamente hidrofílicos y normalmente se sitúan en el exterior de las proteínas, mientras que las cadenas laterales de aminoácidos no polares tienden a agregarse en el interior de las proteínas. Los aminoácidos con cadenas laterales ácidas son muy polares y casi siempre se hallan en la superfície de las moléculas proteicas.

El código de una letra, en orden alfabético:

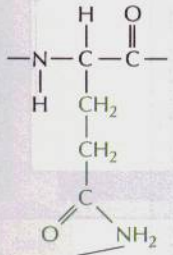
A = Ala	G = Gly	M = Met	S = Ser
C = Cys	H = His	N = Asn	T = Thr
D = Asp	I = Ileu	P = Pro	V = Val
E = Glu	K = Lys	Q = Gln	W = Trp
F = Phe	L = Leu	R = Arg	Y = Tyr

CADENAS LATERALES POLARES NO CARGADAS

asparagina
(Asn o N)

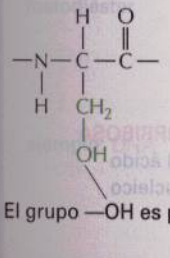


glutamina
(Gln o Q)

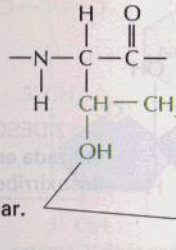


Aunque la amida N no está cargada a un pH neutro, es polar.

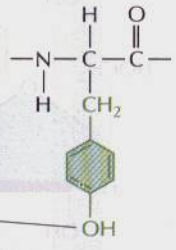
serina
(Ser o S)



treonina
(Thr o T)

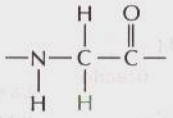


tirosina
(Tyr o Y)



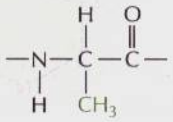
El grupo —OH es polar.

CADENAS LATERALES NO POLARES

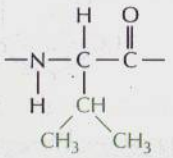


glicina
(Gly o G)

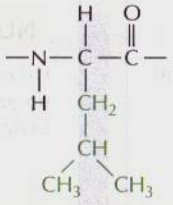
alanina
(Ala o A)



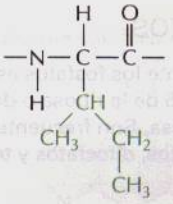
valina
(Val o V)



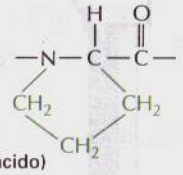
leucina
(Leu o L)



isoleucina
(Ileu o I)

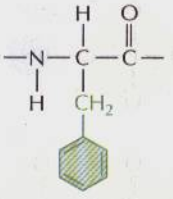


prolina
(Pro o P)

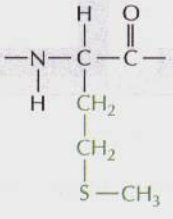


(en realidad es un iminoácido)

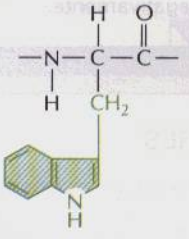
fenilalanina
(Phe o F)

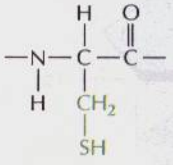


metionina
(Met o M)



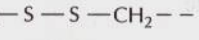
triptófano
(Trp o W)



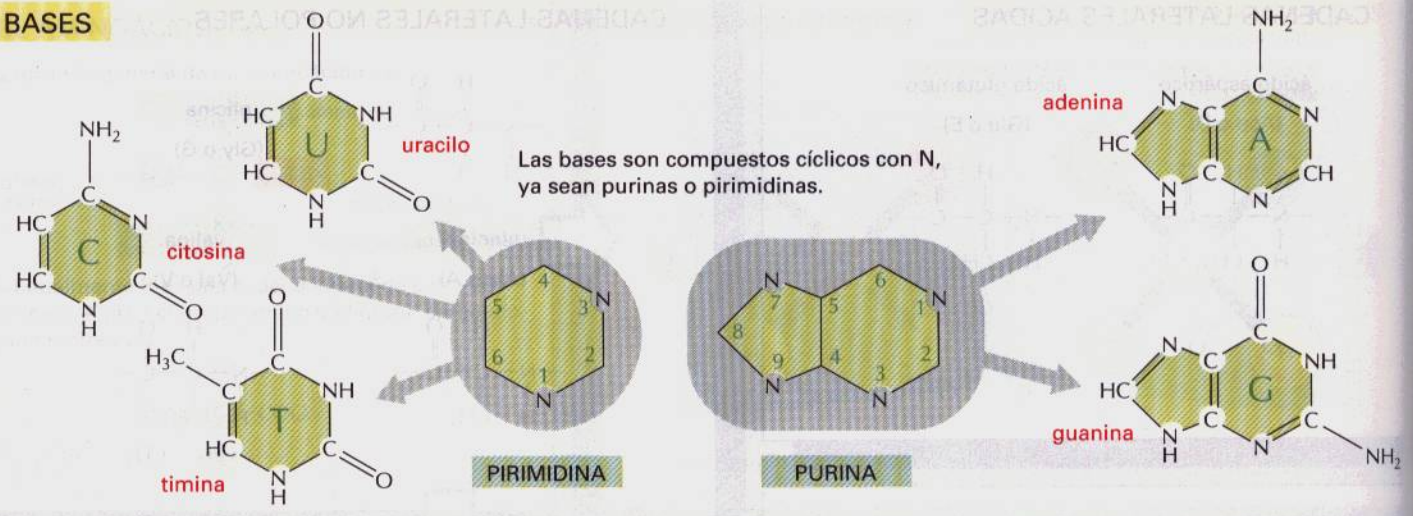


cisteína
(Cys o C)

Las cisteínas apareadas permiten que se formen enlaces disulfuro en las proteínas.

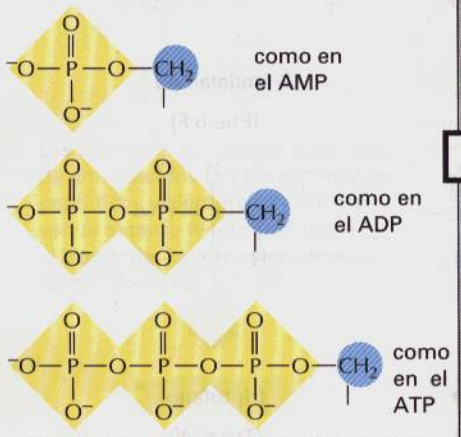


BASES



FOSFATOS

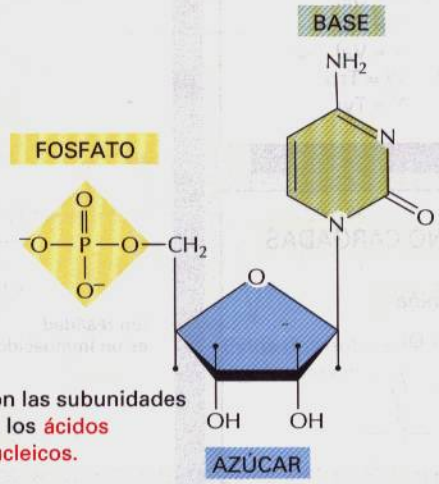
Normalmente los fosfatos están unidos al hidroxilo C5 de la ribosa o de la desoxirribosa. Son frecuentes los monofosfatos, difosfatos y trifosfatos.



El fosfato hace que un nucleótido esté cargado negativamente.

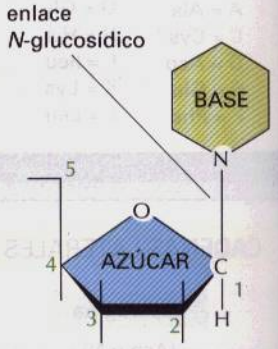
NUCLEÓTIDOS

Un nucleótido consiste en una base nitrogenada, un azúcar de 5 carbonos y uno o varios grupos fosfato.



Son las subunidades de los ácidos nucleicos.

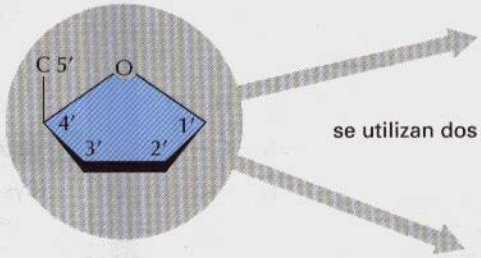
ENLACE BASE-AZÚCAR



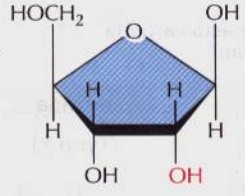
La base está unida al mismo carbono (C1) utilizado en los enlaces azúcar-azúcar.

AZÚCARES

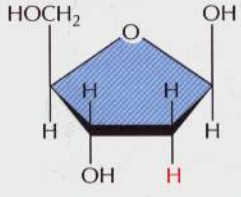
PENTOSA
un azúcar de 5 carbonos



se utilizan dos tipos



β-D-RIBOSA
utilizada en el ácido ribonucleico



β-D-2-DESOXIRRIBOSA
utilizada en el ácido desoxirribonucleico

Cada uno de los carbonos numerados de un azúcar se escribe con una "prima"; así hablamos de "carbono 5-prima", etc.

60 Panel 2-6 Resumen de los principales tipos de nucleótidos y sus derivados existentes en las células.

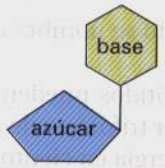
NOMENCLATURA

Los nombres pueden inducir a confusión, pero las abreviaturas son claras.

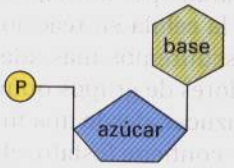
BASE	NUCLEÓSIDO	ABREV.
adenina	adenosina	A
guanina	guanosina	G
citosina	citidina	C
uracilo	uridina	U
timina	timidina	T

Los nucleótidos se abrevian con tres letras mayúsculas, de la siguiente manera:

AMP = adenosina monofosfato
dAMP = desoxiadenosina monofosfato
UDP = uridina difosfato
ATP = adenosina trifosfato



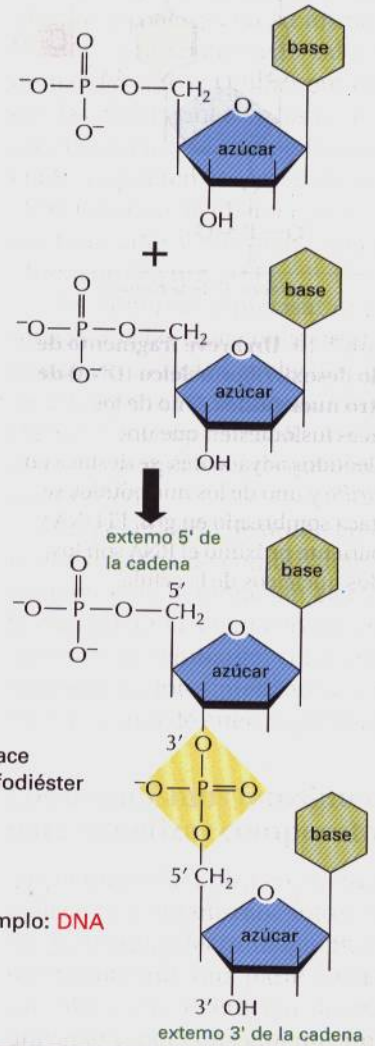
BASE + AZÚCAR = NUCLEÓSIDO



BASE + AZÚCAR + FOSFATO = NUCLEÓTIDO

ÁCIDOS NUCLEICOS

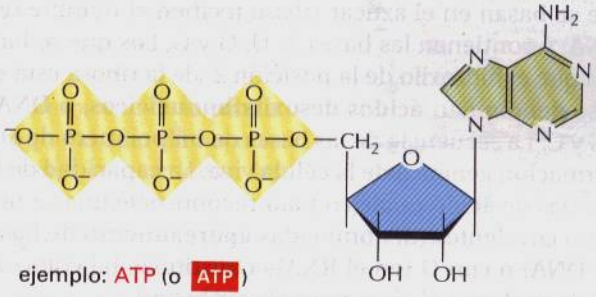
Los nucleótidos están unidos mediante un enlace fosfodiéster entre los carbonos 5' y 3', formando ácidos nucleicos. La secuencia lineal de los nucleótidos de una cadena de ácido nucleico se suele abreviar mediante un código de una letra, A—G—C—T—T—A—C—A, con el extremo 5' de la cadena a la izquierda.



ejemplo: DNA

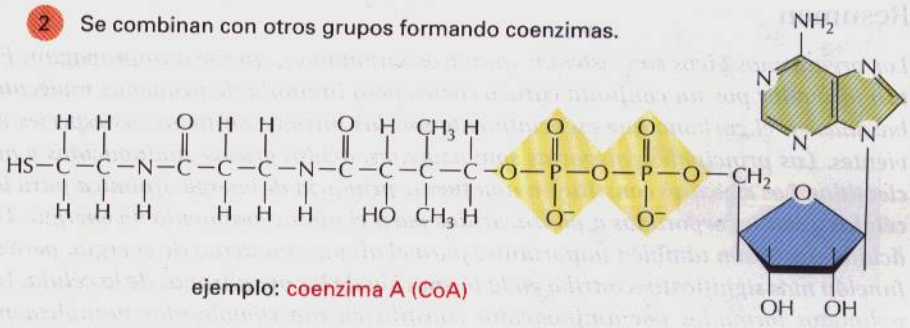
LOS NUCLEÓTIDOS TIENEN OTRAS MUCHAS FUNCIONES

1. Transportan energía en sus enlaces ácido-anhídrido, que son fácilmente hidrolizables.



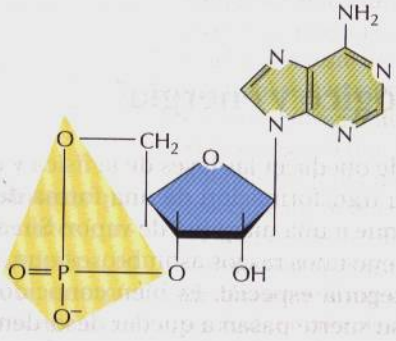
ejemplo: ATP (o ATP)

2. Se combinan con otros grupos formando coenzimas.



ejemplo: coenzima A (CoA)

3. En la célula son utilizados como moléculas señalizadoras específicas.



ejemplo: AMP cíclico (cAMP)

Cada nucleótido se nombra en referencia a la única base que contiene (Panel 2-6, págs. 60-61).

Los nucleótidos pueden actuar como transportadores de energía química. Destaca el éster trifosfato de adenina, **ATP** (Figura 2-9), que participa en la transferencia de energía en cientos de reacciones celulares distintas. Su fosfato terminal se añade utilizando la energía de la oxidación de los alimentos, y puede ser fácilmente separado por hidrólisis liberando energía, la cual es utilizada en cualquier lugar de la célula en reacciones biosintéticas energéticamente desfavorables. Como discutiremos más adelante, otros derivados de nucleótidos actúan de transportadores de grupos químicos particulares como átomos de hidrógeno o residuos de azúcar, desde una molécula a otra. Además, un derivado cíclico de la adenina que contiene fosfato, el *AMP cíclico*, se utiliza como molécula universal de señalización dentro de las células y controla la velocidad de numerosas reacciones intracelulares diferentes.

La importancia especial de los nucleótidos estriba en el almacenamiento de la información biológica. Los nucleótidos constituyen los elementos de construcción de los **ácidos nucleicos**, largos polímeros en los que las subunidades de nucleótidos están unidas covalentemente gracias a la formación de un éster fosfato entre el grupo hidroxilo 3' del residuo de azúcar de un nucleótido y el grupo fosfato 5' del nucleótido siguiente (Figura 2-10). Existen dos tipos principales de ácidos nucleicos que se diferencian en el tipo de azúcar de su esqueleto polimérico. Los que se basan en el azúcar *ribosa* reciben el nombre de **ácidos ribonucleicos**, o **RNA**, y contienen las bases A, U, G y C. Los que se basan en la *desoxirribosa* (en la que el hidroxilo de la posición 2' de la ribosa está sustituido por un hidrógeno) se denominan **ácidos desoxirribonucleicos**, o **DNA** y contienen las bases A, T, G y C. La secuencia de las bases de un polímero de DNA o RNA representa la información genética de la célula viva. La capacidad de las bases de diferentes moléculas de ácido nucleico para reconocerse unas a otras mediante interacciones no covalentes (denominadas **apareamiento de bases**) –G con C y A con T (en el DNA) o con U (en el RNA)– constituye, tal como se explicará en el Capítulo 3, la base de toda la herencia y la evolución.

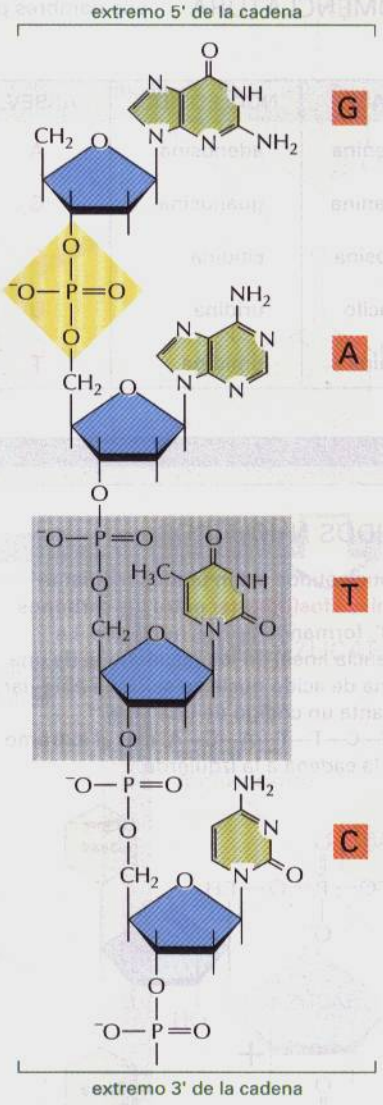


Figura 2-10 Un breve fragmento de ácido desoxirribonucleico (DNA) de cuatro nucleótidos. Uno de los enlaces fosfodiéster, que une nucleótidos adyacentes, se destaca en *amarillo* y uno de los nucleótidos se destaca sombreado en *gris*. El DNA y su pariente próximo el RNA son los ácidos nucleicos de la célula.

Resumen

Los organismos vivos son sistemas químicos autónomos, que se autopropagan. Están formados por un conjunto característico pero limitado de pequeñas moléculas basadas en el carbono que esencialmente son las mismas en todas las especies vivientes. Las principales categorías son: azúcares, ácidos grasos, aminoácidos y nucleótidos. Los azúcares constituyen una fuente primaria de energía química para las células y son incorporados a polisacáridos para el almacenamiento de energía. Los ácidos grasos son también importantes para el almacenamiento de energía, pero su función más significativa estriba en la formación de las membranas de la célula. Los polímeros formados por aminoácidos constituyen macromoléculas notablemente diversas y versátiles conocidas como proteínas. Los nucleótidos desempeñan un papel central en la transferencia de energía y también son las subunidades a partir de las cuales se construyen las macromoléculas de información, RNA y DNA.

Orden biológico y energía[7]

Las células han de obedecer las leyes de la física y de la química. Las reglas de la mecánica y de la transformación de una forma de energía en otra se aplican a una célula igual que a una máquina de vapor. Sin embargo, es necesario admitir que una célula tiene unos rasgos asombrosos que, a primera vista, parecen colocarla en una categoría especial. Es bien conocido que con el tiempo las cosas abandonadas a su suerte pasan a quedar desordenadas: los edificios se derrumban, los organismos muertos se descomponen, etc. Esta tendencia general se

halla expresada en la *segunda ley de la termodinámica*, que afirma que el grado de desorden del universo (o de cualquier sistema aislado) sólo puede aumentar.

Lo asombroso es que los organismos vivos mantienen, a todos los niveles, un alto grado de orden; y como se alimentan, se desarrollan y crecen, parece que crean este orden a partir de materiales alimenticios que carecen de él. El orden resulta claramente aparente en grandes estructuras como el ala de una mariposa o el ojo de un pulpo, en estructuras intracitoplasmáticas como una mitocondria o un cilio, o en la forma y disposición de las moléculas a partir de las que están construidas estas estructuras. Los átomos que las constituyen han sido capturados, en último término, desde su estado relativamente desorganizado del medio ambiente y unidos formando una estructura determinada. Incluso una célula que no crezca, requiere para sobrevivir unos procesos constantes de ordenación, puesto que todas sus estructuras organizadas están sujetas a alteraciones y deben ser reparadas continuamente. ¿Cómo es esto posible desde el punto de vista termodinámico? Veremos que la respuesta se halla en el hecho de que la célula emite constantemente calor a su ambiente y, por consiguiente, no es un sistema aislado en el sentido termodinámico del término.

El orden biológico resulta posible gracias a la liberación de energía calorífica por parte de las células[8]

Como acabamos de ver, la segunda ley de la termodinámica afirma que la cantidad de orden del universo (es decir, de la célula más su entorno) siempre debe disminuir. Por consiguiente, el aumento de orden dentro de la célula viva ha de ir acompañado de un aumento aún mayor de *des*orden en el ambiente de la célula. El calor es energía en su forma más desordenada –el choque al azar de las moléculas– y la célula cede calor al medio mediante reacciones que ordenan las moléculas que la célula contiene. El incremento del movimiento al azar, incluidas las distorsiones de los enlaces, de las moléculas del resto de universo genera un desorden que compensa con creces el incremento de orden en la célula, tal como requieren las leyes de la termodinámica para los procesos espontáneos. De esta forma, la liberación de calor de una célula al medio le permite ordenarse internamente al mismo tiempo que el universo en su conjunto se vuelve más desordenado (Figura 2-11).

Es importante precisar que la célula no consigue nada produciendo calor a menos que las reacciones productoras de calor estén asociadas con los procesos que generan orden molecular en la célula. Se dice que las reacciones asociadas de esta forma están *acopladas*, tal como explicaremos más adelante. Lo que distingue el metabolismo de una célula de la combustión ruinosa de un fuego es el estrecho acoplamiento que existe entre la producción de calor y el incremento de orden.

La generación de orden en el interior de las células se produce a expensas de la degradación de combustible energético. Para las plantas la energía deriva inicialmente de la radiación electromagnética del sol; para los animales deriva de la energía almacenada en los enlaces covalentes de las moléculas orgánicas que ingieren. Sin embargo, como estos nutrientes han sido producidos, a su vez, por organismos fotosintetizadores como las plantas verdes, de hecho el sol es la fuente última de energía para ambos tipos de organismos.

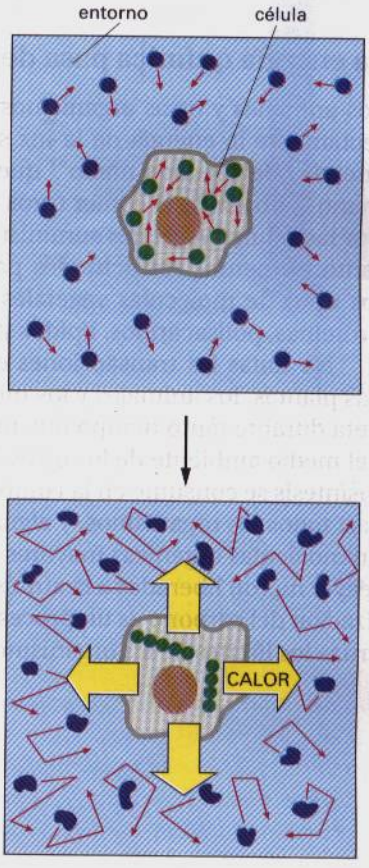


Figura 2-11 Análisis termodinámico simple de una célula viva. En el esquema superior las moléculas de la célula y del resto del universo (su entorno) se han representado en un estado relativamente desordenado. En el esquema inferior, la célula (*gris*) ha liberado calor por medio de una reacción que ordena las moléculas de su interior (*verde*). El calor incrementa el desorden en el entorno de la célula, de forma que aunque la célula crezca y se divida se cumple el segundo principio de la termodinámica.

Los organismos fotosintetizadores utilizan la luz solar para sintetizar compuestos orgánicos[9]

La energía solar entra en el mundo vivo (la *biosfera*) gracias a la **fotosíntesis** que realizan los organismos fotosintetizadores –plantas o bacterias. En la fotosíntesis, la energía electromagnética se transforma en energía de enlace químico. Al mismo tiempo, una parte de la energía de la luz solar se transforma en energía calorífica, y la liberación de este calor al entorno incrementa el desorden del universo y, por consiguiente, impulsa el proceso fotosintético.

Las reacciones de la fotosíntesis se describen con detalle en el Capítulo 14. En términos generales, podemos decir que se pueden distinguir dos etapas distintas. En la primera etapa (la de las *reacciones activadas por la luz* o *fase luminosa*), la radiación visible captada por una molécula de pigmento impulsa la transferencia de electrones desde el agua hasta el NADPH, y al mismo tiempo proporciona la energía necesaria para la síntesis de ATP. En la segunda (la *fase oscura*), el ATP y el NADPH se utilizan para impulsar una serie de reacciones de "fijación de carbono"', en las que el CO_2 del aire se utiliza para formar moléculas de azúcar (Figura 2-12).

El resultado *neto* de la fotosíntesis, en lo que se refiere a la planta verde, se puede resumir en la siguiente ecuación:

$$\text{energía} + CO_2 + H_2O \rightarrow \text{azúcar} + O_2$$

Esta ecuación simple esconde la compleja naturaleza de las reacciones de la fase oscura, que abarcan numerosas reacciones consecutivas. Además, y aunque la fijación inicial del CO_2 da lugar a azúcares, las reacciones metabólicas subsiguientes los convierten rápidamente en otras moléculas, grandes y pequeñas, esenciales para la célula vegetal.

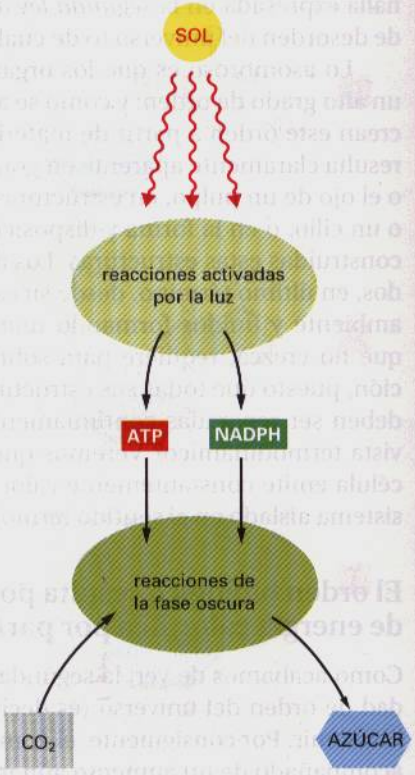


Figura 2-12 La fotosíntesis. Las dos fases de la fotosíntesis en una planta verde.

La energía química pasa de las plantas a los animales

Los animales y otros organismos no fotosintetizadores no pueden capturar directamente la energía de la luz solar y, por ello, han de sobrevivir gracias a la energía "de segunda mano"' que obtienen al ingerir plantas o a la de "tercera mano"', obtenida al comer otros animales. Las moléculas orgánicas producidas por las células vegetales suministran a los organismos que se alimentan de ellas tanto elementos estructurales para la construcción como combustible. Todos los tipos de moléculas vegetales pueden servir para este propósito –azúcares, proteínas, polisacáridos, lípidos y otros muchos compuestos.

No todas las transacciones entre plantas y animales son unidireccionales. Las plantas, los animales y los microorganismos han existido juntos en este planeta durante tanto tiempo que muchos se han convertido en una parte esencial del medio ambiente de los otros. Por ejemplo, el oxígeno liberado durante la fotosíntesis se consume en la combustión de las moléculas orgánicas realizada por casi todos los organismos, y algunas de las moléculas de CO_2 que hoy se "fijan"' en moléculas orgánicas mayores en una hoja verde mediante la fotosíntesis, anteayer fueron liberadas a la atmósfera por la respiración de un animal. Así, la utilización del carbono es un proceso cíclico que abarca el conjunto de la biosfera y cruza los límites de los organismos individuales (Figura 2-13). Análogamente, los

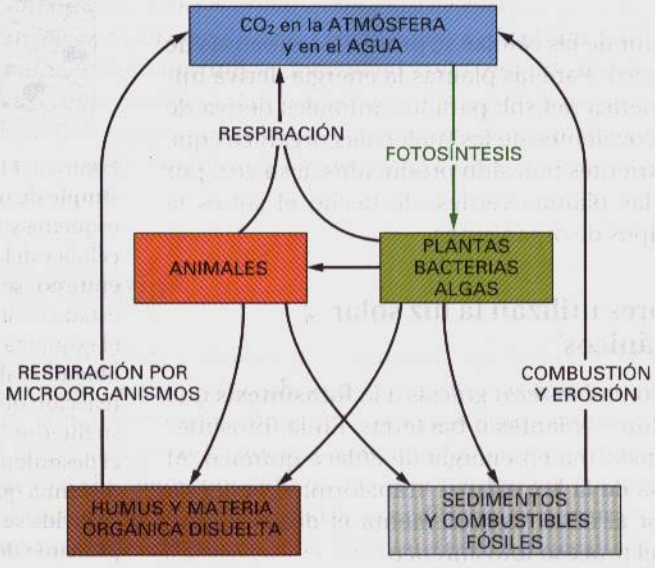


Figura 2-13 El ciclo del carbono. Los átomos de carbono se incorporan a las moléculas orgánicas del mundo vivo gracias a la actividad fotosintetizadora de las plantas, las bacterias y las algas marinas. Pasan luego a los animales, a los microorganismos y al material orgánico del suelo y de los océanos, a través de vías cíclicas. El CO_2 vuelve a la atmósfera cuando las moléculas orgánicas son oxidadas por las células o quemadas por el hombre en forma de combustibles fósiles.

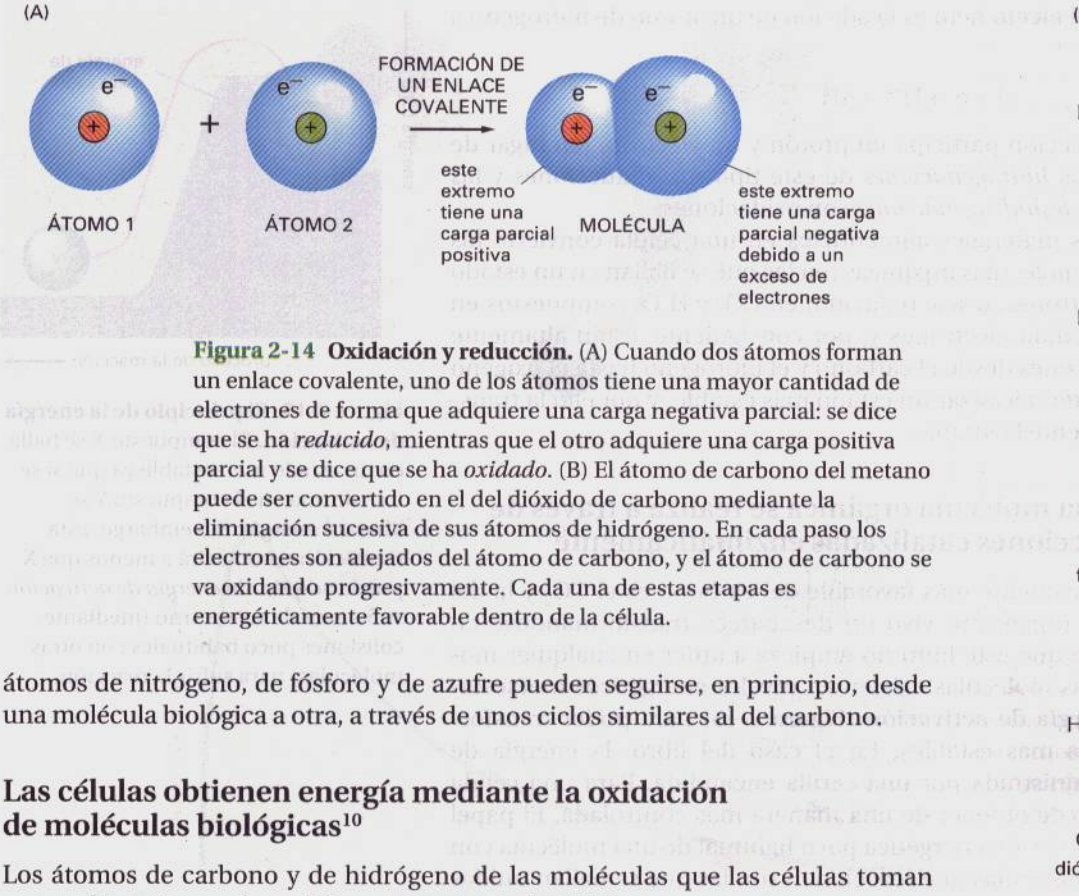


Figura 2-14 Oxidación y reducción. (A) Cuando dos átomos forman un enlace covalente, uno de los átomos tiene una mayor cantidad de electrones de forma que adquiere una carga negativa parcial: se dice que se ha *reducido*, mientras que el otro adquiere una carga positiva parcial y se dice que se ha *oxidado*. (B) El átomo de carbono del metano puede ser convertido en el del dióxido de carbono mediante la eliminación sucesiva de sus átomos de hidrógeno. En cada paso los electrones son alejados del átomo de carbono, y el átomo de carbono se va oxidando progresivamente. Cada una de estas etapas es energéticamente favorable dentro de la célula.

átomos de nitrógeno, de fósforo y de azufre pueden seguirse, en principio, desde una molécula biológica a otra, a través de unos ciclos similares al del carbono.

Las células obtienen energía mediante la oxidación de moléculas biológicas[10]

Los átomos de carbono y de hidrógeno de las moléculas que las células toman como alimento pueden utilizarse como combustible porque no se encuentran en su forma más estable. La atmósfera terrestre contiene una gran cantidad de oxígeno, y en presencia de oxígeno la forma energéticamente más estable del carbono es el CO_2, y la del hidrógeno es el H_2O. Por consiguiente, una célula puede obtener energía de las moléculas de glucosa o de las de proteína, permitiendo que sus átomos de carbono e hidrógeno se combinen con oxígeno produciendo CO_2 y H_2O, respectivamente. Sin embargo, la célula no oxida las moléculas en un solo paso, como ocurre en la combustión. A través de la acción de catálisis específica mediante enzimas específicas, hace pasar las moléculas a través de un gran número de reacciones que sólo rara vez implican la adición directa de oxígeno. Antes de estudiar estas reacciones y de poder comprender la fuerza impulsora que las mueve, debemos aclarar qué entendemos por un proceso de oxidación.

En el sentido que antes hemos utilizado, la oxidación no significa únicamente la adición de átomos de oxígeno: el término se aplica de manera más general a cualquier reacción en la que se transfieran electrones de un átomo a otro. **Oxidación**, en este sentido, hace referencia a la eliminación de electrones, y **reducción** –lo contrario de oxidación– significa la adición de electrones. Así, el Fe^{2+} se oxida si pierde un electrón convitiéndose en Fe^{3+}, y un átomo de cloro se reduce si acepta un electrón convirtiéndose en Cl^-. También se utilizan estos mismos términos cuando sólo se produce un desplazamiento parcial de electrones entre átomos unidos por un enlace covalente (Figura 2-14A). Por ejemplo, cuando un átomo de carbono forma un enlace covalente con un átomo con una gran afinidad por los electrones, como el oxígeno, el cloro o el azufre, cede más que su parte correspondiente de electrones, adquiriendo una carga positiva parcial y entonces se dice que se ha oxidado. Contrariamente un átomo de carbono en un enlace C–H tiene una carga de electrones mayor que la que le corresponde y por ello se dice que está reducido (Figura 2-14B).

A menudo, cuando una molécula capta un electrón (e^-) también capta un protón (H^+) (en solución acuosa hay una gran cantidad de protones libremente

asequibles). En este caso el efecto neto es la adición de un átomo de hidrógeno a la molécula

$$A + e^- + H^+ \rightarrow AH$$

A pesar de que en esta reacción participa un protón y un electrón, (en lugar de solamente un electrón), las *hidrogenaciones* de este tipo son reducciones y las reacciones contrarias , las *deshidrogenaciones* son oxidaciones.

La combustión de los materiales alimenticios en una célula convierte los átomos de C y de H de las moléculas orgánicas (en las que se hallan en un estado relativamente rico en electrones, o sea, reducido) en CO_2 y H_2O, compuestos en los que el C y el H han cedido electrones y, por consiguiente, están altamente oxidados. El paso de electrones desde el carbono y el hidrógeno hasta el oxígeno permite a todos estos átomos alcanzar un estado más estable, y por ello la transformación es energéticamente favorable.

La degradación de una molécula orgánica se realiza a través de una secuencia de reacciones catalizadas enzimáticamente[11]

Aunque la forma energéticamente más favorable del carbono es el CO_2 y la del hidrógeno es el H_2O, un organismo vivo no desaparece transformándose en humo por la misma razón que este libro no empieza a arder en cualquier momento: en ambos casos las moléculas existen en niveles energéticos metaestables y necesitan una **energía de activación** (Figura 2-15) para poder transformarse en configuraciones más estables. En el caso del libro, la energía de activación puede ser suministrada por una cerilla encendida. Para una célula viva, la combustión se puede obtener de una manera más controlada. El papel de la cerilla lo realiza una colisión energética poco habitual de una molécula con otra. Además, las únicas moléculas que reaccionan son las que se hallan unidas a la superficie de las *enzimas*.

Como se explica en el Capítulo 3, las **enzimas** son *catalizadores* proteicos altamente especializados. Como todos los demás tipos de catalizadores, aceleran las reacciones reduciendo la energía de activación de un cambio químico determinado. Las enzimas se unen fuertemente a las moléculas de su substrato y las mantienen de tal forma que reducen notablemente la energía de activación de una determinada reacción que reordena algunos enlaces covalentes. Al reducir selectivamente la energía de activación de una determinada reacción de las que puede sufrir la molécula unida, las enzimas determinan cuál de las diferentes vías alternativas de rotura o formación de enlaces covalentes se producirá (Figura 2-16). El producto liberado por la enzima tras la reacción enzimática podrá unirse a una segunda enzima que catalice otra reacción. De esta manera, cada una de las muchas moléculas de una célula pasan de una a otra enzima siguiendo vías *específicas* de reacciones, determinando así la química celular. Más adelante discutiremos algunas vías centrales del metabolismo energético.

El éxito de los organismos vivos se puede atribuir a la habilidad de las células para producir muchos tipos diferentes de enzimas, cada uno con propiedades específicas. Cada enzima tiene una forma única y une un conjunto determinado de moléculas (llamadas *substratos*), de tal manera que la enzima acelera una reacción determinada normalmente unas 10^{14} veces. Como otros catalizadores, las moléculas de la enzima no cambian después de participar en una reacción y por lo tanto pueden actuar una y otra vez.

Parte de la energía liberada en las reacciones de oxidación se acopla a la reacción de formación de ATP[12]

Las células obtienen energía útil a partir de la "combustión" de la glucosa, únicamente porque la queman de una manera muy compleja y controlada. Mediante vías de reacción dirigidas por enzimas, las reacciones químicas de síntesis, o reacciones anabólicas, que generan el orden biológico, están estrechamente

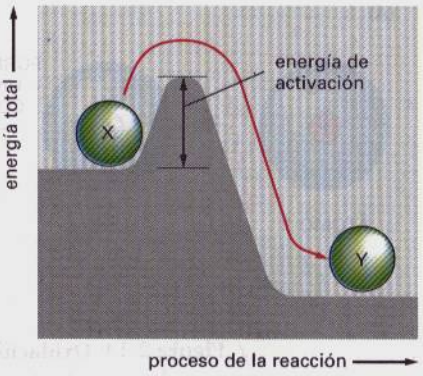


Figura 2-15 El principio de la energía de activación. El compuesto X se halla en un estado metaestable ya que si se transforma en el compuesto Y se liberará energía. Sin embargo, esta transición no ocurrirá a menos que X pueda adquirir la *energía de activación* suficiente de su entorno (mediante colisiones poco habituales con otras moléculas) para sufrir la reacción.

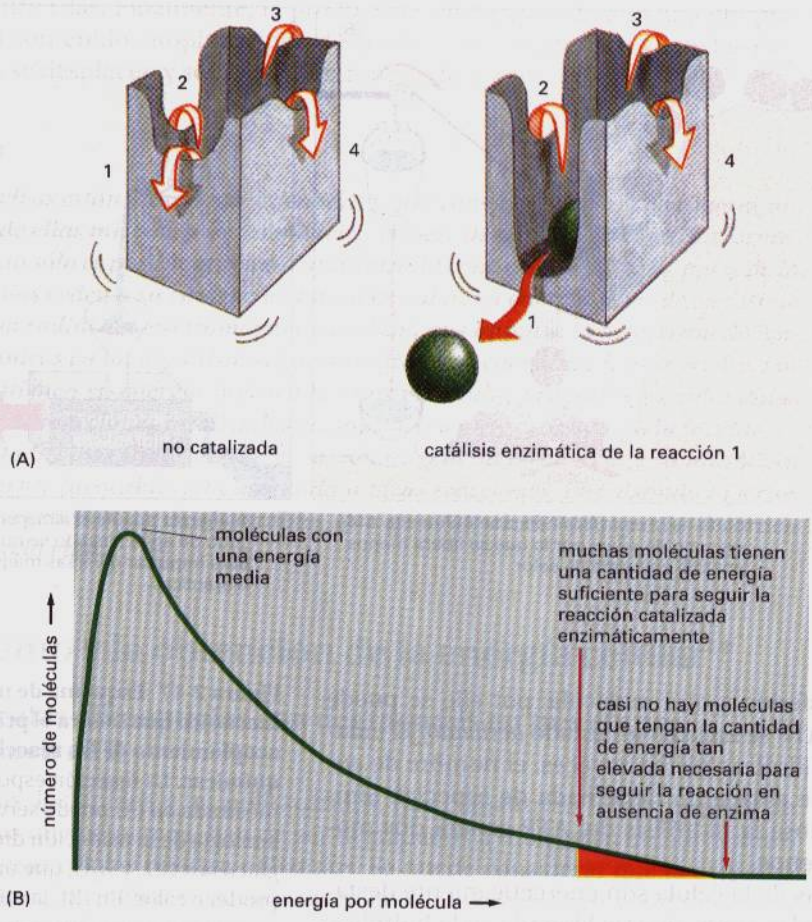


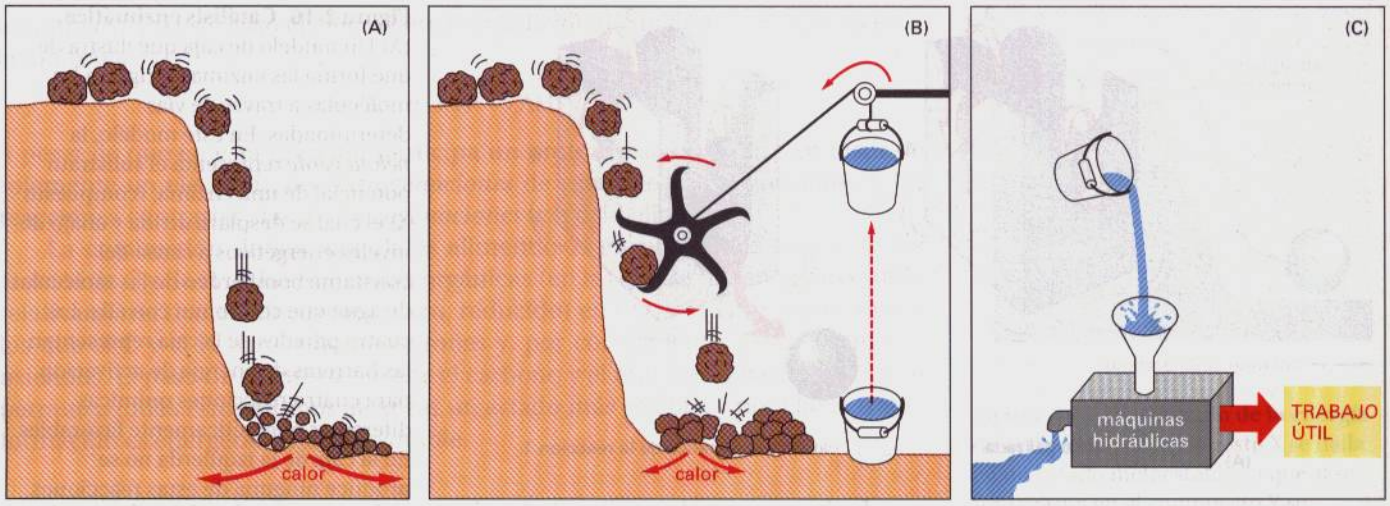
Figura 2-16 Catálisis enzimática. (A) Un modelo de caja que ilustra de qué forma las enzimas dirigen a las moléculas a través de vías determinadas. En este modelo, la *pelota verde* representa el substrato potencial de una enzima, (compuesto X) el cual se desplaza arriba y abajo de niveles energéticos a causa del constante bombardeo de las moléculas de agua que colisionan con ella. Las cuatro paredes de la caja representan las barreras de energía de activación para cuatro reacciones químicas diferentes energéticamente favorables. En la caja de la izquierda no se produce ninguna de estas reacciones, ya que la energía disponible gracias a las colisiones es insuficiente para superar ninguna de las barreras energéticas. En la caja de la derecha, la catálisis enzimática reduce la energía de activación únicamente para la reacción número 1. Así permite que, con la energía disponible, se produzca esta reacción de forma que el compuesto X se transforma en el compuesto Y. Entonces, el compuesto Y se puede unir a otra enzima que lo transforme en el compuesto Z, y así sucesivamente. (B) Distribución de energías en una población de moléculas idénticas. Para que se produzca una reacción química determinada, la energía de la molécula (en forma de movimientos de traslación, vibración y rotación) ha de exceder la energía de activación; en la mayoría de los casos esto nunca ocurre si no se produce una catálisis enzimática.

acopladas a las reacciones de degradación, o *catabólicas*, que proporcionan la energía. La diferencia crucial entre una reacción **acoplada** y una reacción no acoplada se ilustra mediante una analogía mecánica en la Figura 2-17, en la que una reacción química energéticamente favorable se representa por las rocas que caen desde un acantilado. Normalmente la energía cinética de las rocas que caen se desperdiciaría completamente en forma del calor generado cuando chocan contra el suelo (sección A). Pero mediante un cuidadoso dispositivo parte de la energía cinética podría ser utilizada para accionar una rueda de palas que eleva un cubo de agua (sección B). Puesto que en la sección B las rocas sólo pueden llegar al suelo accionando la rueda de palas, decimos que la reacción espontánea de la caída de las rocas ha sido acoplada directamente a la reacción no espontánea de elevación del cubo de agua. Dado que ahora parte de la energía se utiliza para realizar un trabajo, las rocas llegan al suelo con una velocidad menor que en la sección A y se pierde menos energía en forma de calor.

En las células las enzimas desempeñan el papel de la rueda de palas de nuestra analogía, y acoplan la combustión espontánea de los alimentos a reacciones que generan el nucleósido trifosfato, ATP. De la misma forma que la energía acumulada en el cubo de agua elevado de la Figura 2-17 se puede utilizar poco a poco para impulsar diversas máquinas hidráulicas (sección C), el ATP actúa como dador conveniente y versátil de energía, impulsando muchas reacciones químicas diferentes necesarias para la célula (Figura 2-18).

La hidrólisis del ATP genera orden en las células[13]

¿De qué forma actúa el ATP como transportador de energía química? En las condiciones existentes en el citoplasma, la hidrólisis del ATP liberando fosfato inorgánico (P_i), se produce gracias a la catálisis de una enzima, y libera una gran cantidad de energía utilizable. Un grupo químico que se halle unido mediante un



la energía cinética se transforma únicamente en energía calorífica

parte de la energía cinética se utiliza elevando un cubo de agua, por lo que se libera menos energía en forma de calor

la energía potencial almacenada en el cubo de agua elevado se puede utilizar para impulsar diversas máquinas hidráulicas.

Figura 2-17 Esquema de un modelo mecánico que ilustra el principio de acoplamiento de las reacciones químicas. La reacción espontánea mostrada en (A) puede servir como analogía de la oxidación directa de la glucosa a CO_2 y H_2O, que únicamente produce calor. En (B), la misma reacción está acoplada a una segunda reacción; esta segunda reacción puede servir como analogía de la síntesis de ATP. La energía producida en una forma más versátil, en (B) puede ser utilizada para impulsar otros procesos celulares, como se ve en (C). El ATP es la forma de energía más versátil de las células.

enlace reactivo de este tipo será transferido a otra molécula; por ello se puede considerar que el fosfato terminal del ATP se halla en un estado *activado*. El enlace que se rompe en esta reacción de hidrólisis recibe, a veces, el nombre de *enlace de alta energía*. Sin embargo, este enlace no tiene nada de especial. Simplemente ocurre que en solución acuosa la hidrólisis del ATP genera dos moléculas (ADP y P_i) de energía mucho menor.

Muchas de las reacciones químicas de la célula son energéticamente desfavorables. Estas reacciones son impulsadas por la energía liberada en la hidrólisis del ATP a través de enzimas que acoplan directamente la reacción determinada desfavorable con la reacción favorable de la hidrólisis del ATP. Entre estas reacciones se encuentran las que intervienen en la síntesis de las moléculas biológicas, en el transporte activo de las moléculas a través de las membranas celulares y en la generación de fuerza y de movimiento. Estos procesos desempeñan un papel vital en el establecimiento del orden biológico. Por ejemplo, las macromoléculas formadas en las reacciones de biosíntesis transportan información, catalizan reacciones específicas y son ensambladas en estructuras altamente ordenadas. Unas bombas situadas en las membranas mantienen la composición interna especial de las células y permiten que las señales pasen al interior de las

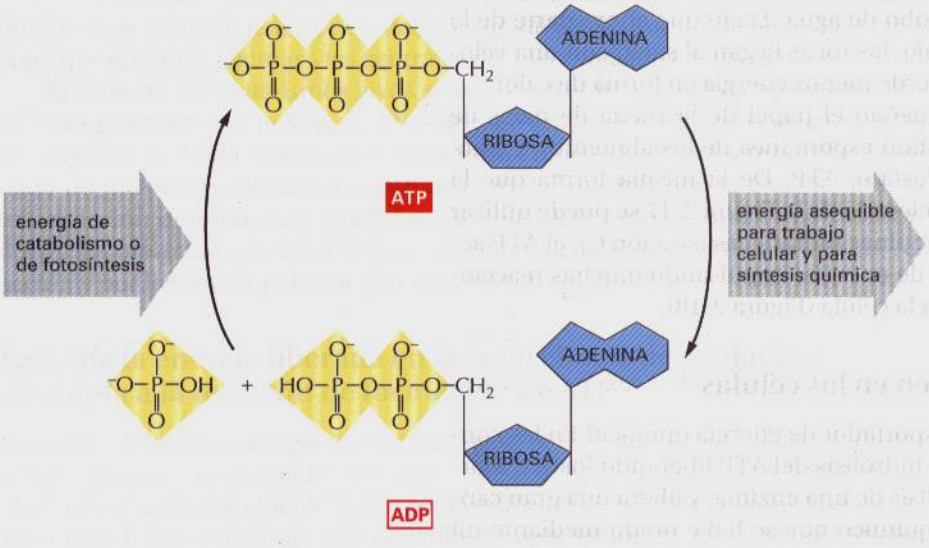


Figura 2-18 La molécula de ATP sirve como transportador de energía en las células. Como se indica, la formación de ATP desde ADP y fosfato inorgánico, energéticamente desfavorable, está acoplada a la oxidación de moléculas alimenticias, energéticamente favorable (véase la Figura 2-17B). La hidrólisis de este ATP hasta ADP y fosfato inorgánico proporciona la energía necesaria para impulsar muchas reacciones celulares importantes.

células y entre ellas. Finalmente, la producción de fuerza y de movimiento permite que el contenido citoplasmático de la célula sea organizado y que las propias células se desplacen y se ensamblen formando tejidos.

Resumen

Las células vivas están altamente ordenadas y, por consiguiente, han de generar orden dentro de ellas mismas para sobrevivir y crecer. Desde el punto de vista termodinámico esto sólo es posible gracias a una entrada continua de energía, parte de la cual las células ceden a su entorno en forma de calor. La energía procede en último término de la radiación electromagnética del sol, que impulsa la formación de moléculas orgánicas en los organismos fotosintetizadores como las plantas verdes. Los animales obtienen su energía ingiriendo estas moléculas orgánicas y oxidándolas en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente y acopladas a la formación de ATP. En todas las células el ATP es un dador general de energía y su hidrólisis, energéticamente favorable, está acoplada a otras reacciones, impulsando diversos procesos energéticamente desfavorables que generan el elevado grado de orden esencial para la vida.

El alimento y la obtención de la energía celular[14]

Las moléculas alimenticias son degradadas en tres etapas, para producir ATP

Las proteínas, los lípidos y los polisacáridos, que constituyen la mayor parte de los alimentos que comemos, han de ser degradados a moléculas menores antes de que nuestras células puedan utilizarlos. Se puede considerar que la degradación enzimática, o catabolismo, de estas moléculas ocurre en tres etapas (Figura 2-19). Haremos un breve esbozo de estas etapas antes de estudiar con mayor detalle dos de ellas.

La fase 1, llamada **digestión**, ocurre principalmente en el intestino. Las grandes moléculas poliméricas se escinden en sus subunidades monoméricas –las proteínas en aminoácidos, los polisacáridos en azúcares y las grasas en ácidos grasos y glicerol– mediante la acción de enzimas segregadas. La fase 2 ocurre en el citoplasma después de que las pequeñas moléculas resultantes de la fase 1 penetren en las células, donde sufren una degradación posterior. La mayoría de los átomos de carbono e hidrógeno de los azúcares se transforman en *piruvato*, que penetra luego en las mitocondrias, donde se transforma en los grupos acetilo del componente químicamente reactivo *acetil coenzima A* (*acetil CoA*) (Figura 2-20). También se producen grandes cantidades de acetil CoA mediante la oxidación de los ácidos grasos. En la fase 3, el grupo acetilo del acetil CoA se degrada completamente hasta CO_2 y H_2O en la mitocondria. En esta fase final se genera la mayor parte del ATP. Mediante una serie de reacciones químicas acopladas, alrededor de la mitad de la energía que teóricamente se puede obtener de la combustión de los carbohidratos y de las grasas hasta H_2O y CO_2 se canaliza para impulsar la reacción energéticamente desfavorable P_i + ADP → ATP. Puesto que el resto de la energía de combustión se cede por la célula en forma de calor, esta síntesis de ATP crea un desorden neto en el universo, de acuerdo con la segunda ley de la termodinámica.

A través de la formación de ATP, la energía derivada originariamente de la combustión de los carbohidratos y de las grasas se redistribuye en una forma de energía química convenientemente empaquetada. Aproximadamente unas 10^9 moléculas de ATP se encuentran en solución por todo el espacio intracelular de una célula típica, donde su hidrólisis a ADP y fosfato es energéticamente favorable y proporciona la energía que impulsará un gran número de diferentes reacciones acopladas que, en sí mismas, son energéticamente desfavorables por lo que de lo contrario no se producirían.

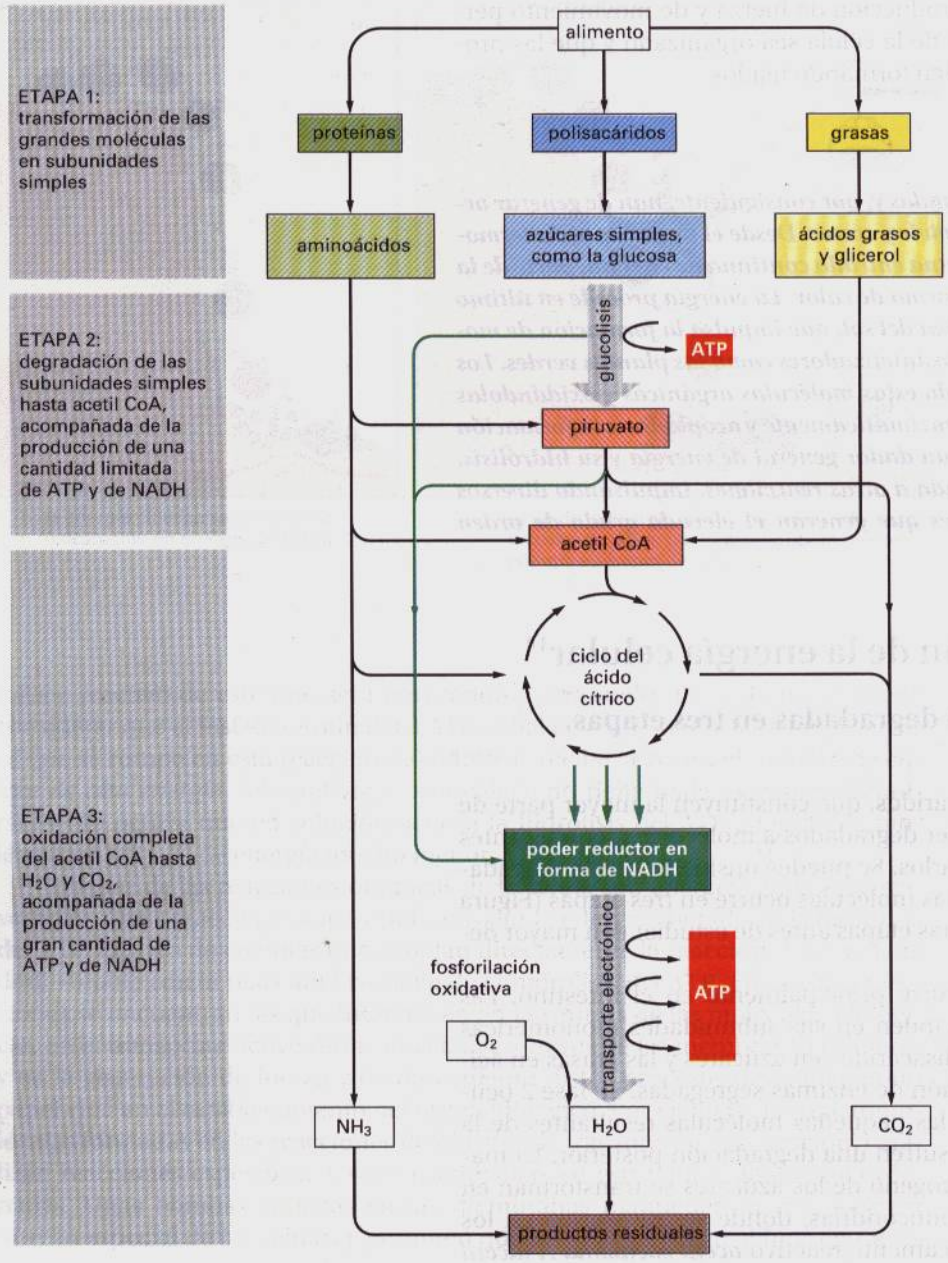


Figura 2-19 Diagrama simplificado de las tres etapas del catabolismo que conducen desde el alimento hasta los productos residuales. Esta serie de reacciones produce ATP, que luego es utilizado para impulsar reacciones de biosíntesis y otros procesos celulares que requieren energía.

La glucolisis puede producir ATP incluso en ausencia de oxígeno

La parte más importante de la fase 2 del catabolismo es una secuencia de reacciones conocida como **glucolisis** –la lisis (rotura) de la glucosa. La glucolisis puede producir ATP en ausencia de oxígeno, y probablemente apareció pronto en la historia de la vida, antes de que las actividades de los organismos fotosintéticos introdujeran oxígeno en la atmósfera. En la glucolisis una molécula de glucosa, de seis átomos de carbono, se transforma en dos moléculas de piruvato, de tres átomos de carbono cada una. Esta conversión se produce a través de una secuencia de nueve etapas enzimáticas que generan intermediarios que contienen fosfato (Figura 2-21). La célula hidroliza dos moléculas de ATP para impulsar las primeras etapas, pero produce cuatro moléculas de ATP en las etapas finales, de forma que se produce una ganancia neta de ATP.

Desde un punto de vista lógico, la secuencia de reacciones se puede dividir en tres partes: (1) en las etapas 1 a 4, la glucosa se transforma en dos moléculas de tres átomos de carbono cada una, el *gliceraldehído 3-fosfato*, transformación

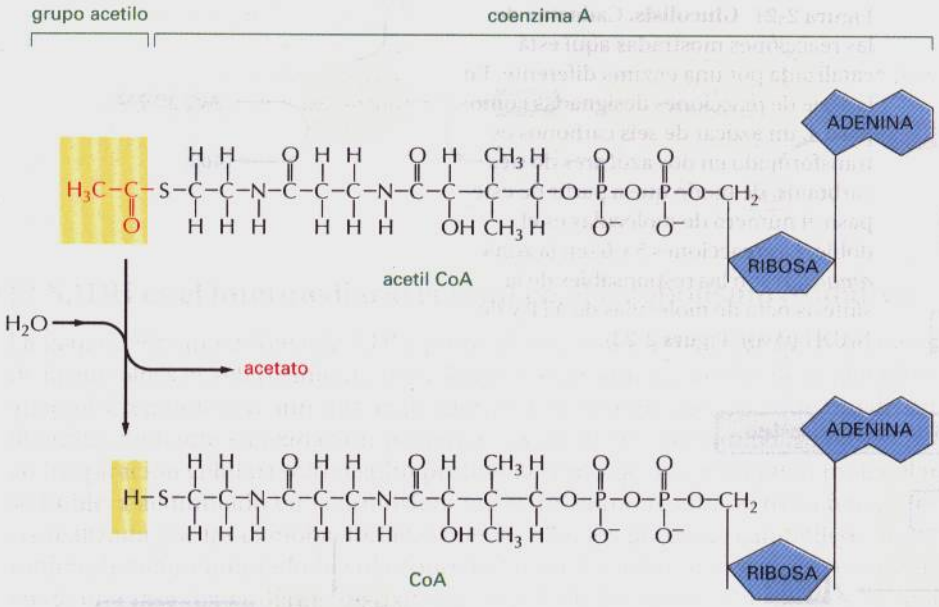


Figura 2-20 El acetil coenzima A (acetil CoA). Este intermediario metabólico crucial se genera cuando los grupos acetilo producidos en la fase 2 del catabolismo se unen covalentemente al coenzima A (CoA).

que requiere un aporte de energía en forma de hidrólisis de ATP para suministrar dos fosfatos; (2) en las reacciones 5 y 6, el grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato se oxida a ácido carboxílico y la energía de esta reacción se acopla a la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico; y (3), en las reacciones 7, 8 y 9, las mismas moléculas de fosfato que fueron añadidas a los azúcares en la primera secuencia de reacciones son transferidas de nuevo al ADP formando ATP, recuperándose así la inversión original de dos moléculas de ATP hidrolizadas en la primera secuencia de reacciones (véase Figura 2-21).

Al final de la glucolisis, el balance energético (por molécula de glucosa) es un beneficio neto de las dos moléculas de ATP que fueron producidas en las reacciones 5 y 6. Puesto que estas dos reacciones son las únicas reacciones de la secuencia en las que se forma un enlace fosfato rico en energía a partir de fosfato inorgánico, constituyen el corazón de la glucolisis. Por otra parte, estas reacciones constituyen un excelente ejemplo de cómo las reacciones de la célula se pueden acoplar para aprovechar la energía liberada en las oxidaciones (Figura 2-22). El resultado total es que un grupo aldehído de un azúcar se oxida a ácido carboxílico, que un grupo fosfato inorgánico se transfiere a un enlace de alta energía del ATP y que una molécula de NAD^+ se reduce a NADH, una molécula que desempeña un papel central en el metabolismo energético, como discutiremos más adelante. Este elegante conjunto de reacciones acopladas fue probablemente una de las primeras etapas metabólicas que aparecieron en la célula durante su evolución.

Para la mayoría de las células animales la glucolisis únicamente es un preludio de la fase 3 del catabolismo, ya que el ácido pirúvico que se forma penetra rápidamente en las mitocondrias donde será oxidado completamente a CO_2 y H_2O. Sin embargo, en el caso de los organismos anaeróbicos (los que no utilizan oxígeno molecular) y para algunos tejidos como el músculo esquelético que pueden verse sometidos a condiciones anaeróbicas, la glucolisis por sí sola se puede convertir en la fuente principal de ATP de la célula. Las reacciones productoras de energía y anaeróbicas de este tipo, reciben el nombre de *fermentaciones*. En estos casos las moléculas de piruvato no son degradadas en la mitocondria sino que permanecen en el citosol y, según el organismo de que se trate, pueden ser transformadas en etanol y CO_2 (en las levaduras) o en lactato (en el músculo), compuestos que luego son excretados. Estas reacciones posteriores del piruvato utilizan el potencial reductor producido en la reacción 5 de la glucolisis, regenerando así el NAD^+ que se requiere para que continúe la glucolisis, como discutiremos en el Capítulo 14.

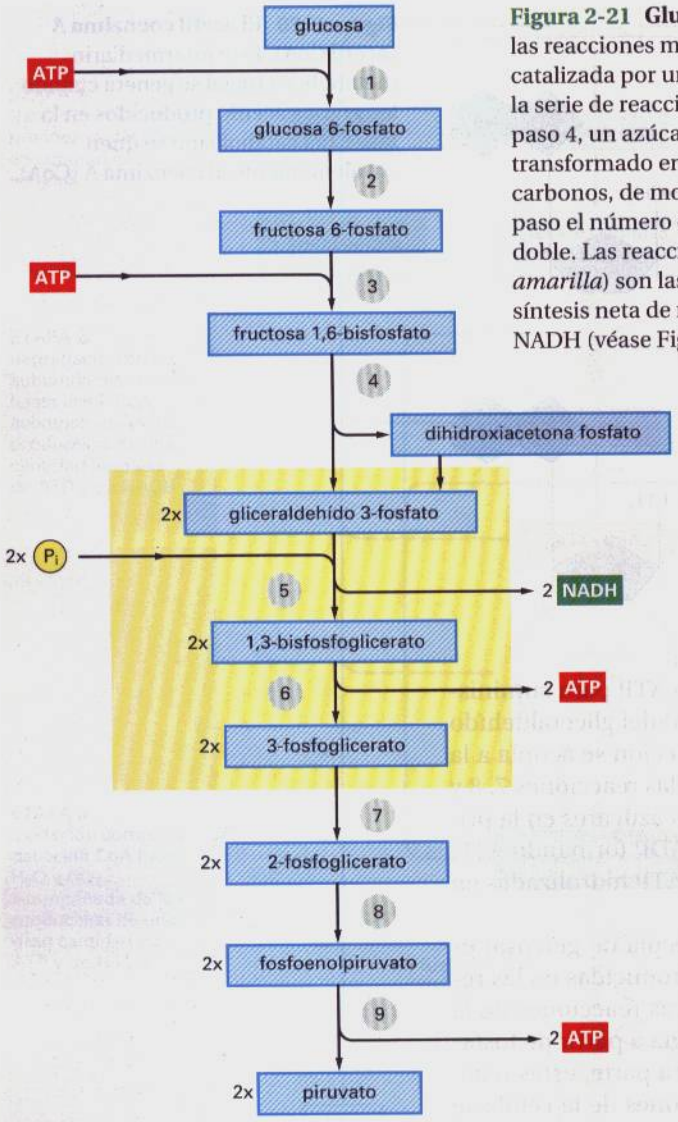


Figura 2-21 Glucolisis. Cada una de las reacciones mostradas aquí está catalizada por una enzima diferente. En la serie de reacciones designadas como paso 4, un azúcar de seis carbonos es transformado en dos azúcares de tres carbonos, de modo que a partir de este paso el número de moléculas es el doble. Las reacciones 5 y 6 (en la zona *amarilla*) son las responsables de la síntesis neta de moléculas de ATP y de NADH (véase Figura 2-22).

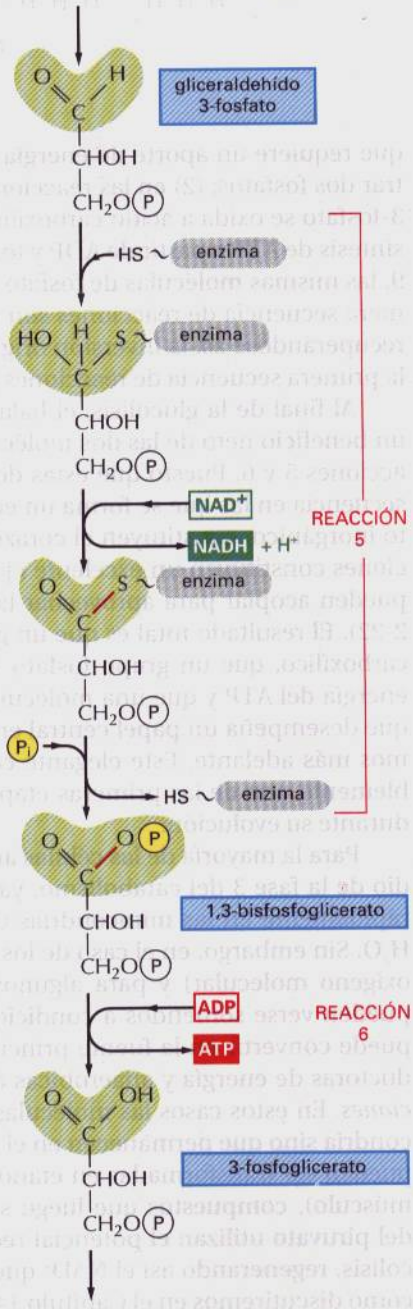


Figura 2-22 Reacciones 5 y 6 de la glucolisis. En estas reacciones la oxidación de un aldehído a un ácido carboxílico está acoplada a la formación de ATP y de NADH (véase también Figura 2-21). Como se indica aquí, la reacción 5 empieza cuando la enzima *gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa* (véase Figura 3-42) forma un enlace covalente con el carbono del grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato. Después, el hidrógeno (como ion hidruro –un protón con dos electrones) es eliminado del grupo aldehído del gliceraldehído 3-fosfato y se transfiere al importante transportador de hidrógeno NAD^+ (véase Figura 2-24). Este paso de oxidación genera un grupo carbonilo de un azúcar unido a la enzima mediante un enlace de alta energía (mostrado en *rojo*). Entonces, un ion fosfato (P_i) de la solución rompe este enlace generando en su lugar un enlace azúcar-fosfato de alta energía (*enlace rojo*). En estas dos últimas reacciones la enzima ha *acoplado* el proceso energéticamente favorable de oxidación de un aldehído con la formación energéticamente desfavorable de un enlace fosfato de alta energía, permitiendo que la segunda reacción sea dirigida por la primera. Finalmente, en el paso 6 de la glucolisis el grupo fosfato reactivo recientemente creado es transferido al ADP para formar ATP, dejando un grupo carboxílico libre en el azúcar oxidado.

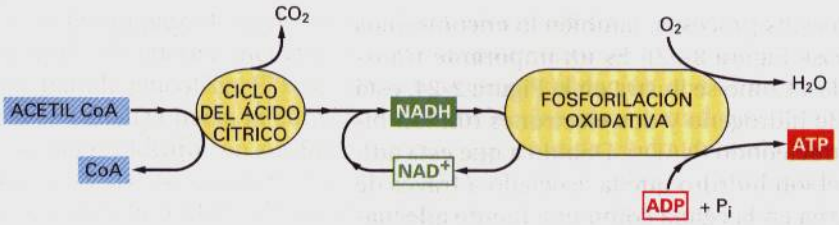


Figura 2-23 Esquema simplificado de la etapa 3 del catabolismo. El proceso produce primariamente grandes cantidades de ATP a partir de ADP y de fosfato inorgánico (P_i). El ciclo del ácido cítrico produce NADH, que luego es utilizado para dirigir la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa. Así pues, el NADH actúa como intermediario central en la oxidación de grupos acetilo hasta CO_2 y H_2O (también juega un papel similar, aunque en menor cantidad, el $FADH_2$).

El NADH es el intermediario central en el catabolismo oxidativo

La generación anaeróbica de ATP a partir de glucosa y a través de las reacciones de la glucolisis es relativamente ineficiente. Los productos finales de la glucolisis anaeróbica contienen aún una gran cantidad de energía química que puede ser liberada mediante su oxidación posterior. La evolución del *catabolismo oxidativo* (respiración celular) sólo resultó posible después de que el oxígeno molecular se hubiera acumulado en la atmósfera terrestre, como resultado de la fotosíntesis realizada por las cianobacterias. Antes de ello, los procesos catabólicos anaeróbicos habían dominado la vida sobre la Tierra. La adición al proceso catabólico de una fase dependiente de oxígeno (fase 3 de la Figura 2-19) proporcionó a las células un método mucho más potente y eficaz de extraer energía de las moléculas alimenticias. Esta tercera fase empieza con el *ciclo del ácido cítrico* (denominado también ciclo de los ácidos tricarboxílicos o también, ciclo de Krebs) y termina con la *fosforilación oxidativa*, procesos que se producen tanto en las bacterias aeróbicas como en las mitocondrias de las células eucariotas.

En la Figura 2-23 se presenta una versión simplificada de los dos procesos centrales del catabolismo oxidativo. En primer lugar, en el ciclo del ácido cítrico los grupos acetilo de las moléculas de acetil CoA son oxidados hasta CO_2 y NADH. A continuación, en el proceso de fosforilación oxidativa el NADH generado reacciona con el oxígeno molecular (O_2) produciendo ATP y H_2O, a través de una complicada serie de etapas que implican un transporte de electrones a través de una membrana.

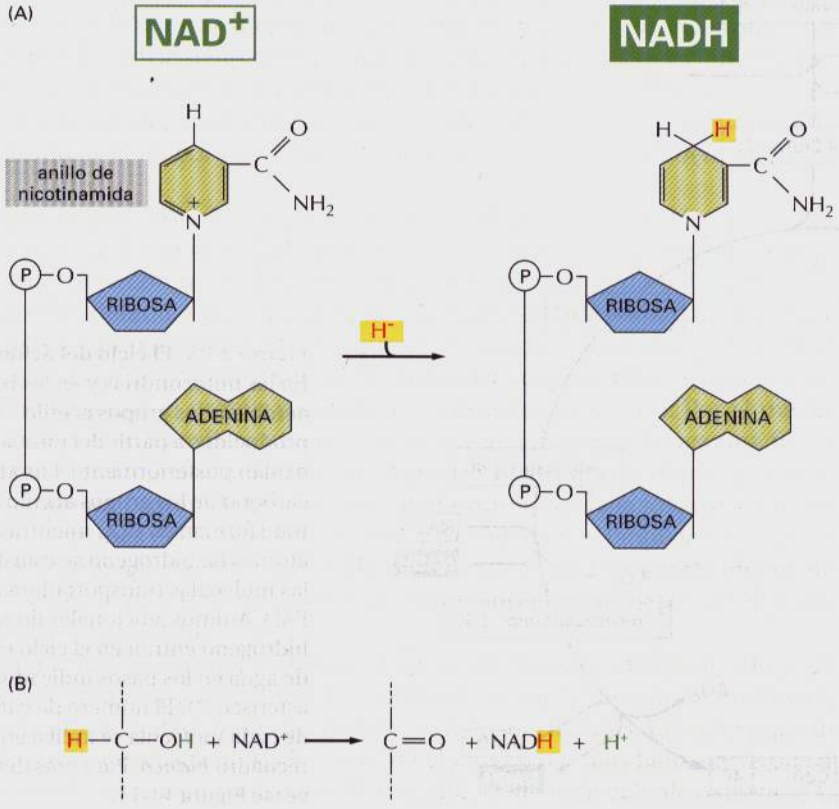


Figura 2-24 El NAD^+ y el NADH. Estas dos moléculas son los transportadores de electrones más importantes en las reacciones catabólicas. Sus estructuras se muestran en (A). NAD^+ es la abreviatura de *nicotinamida adenina dinucleótido*, reflejando el hecho de que la mitad derecha de la molécula, tal como se indica en el dibujo, es el monofosfato de adenosina (AMP). La parte de la molécula del NAD^+ conocida como el anillo de nicotinamida (sombreada en *gris*) es capaz de aceptar dos electrones y un protón (en total un ion hidruro, H^-), formando NADH. En esta forma reducida, el anillo de nicotinamida tiene una estabilidad reducida debido a que ya no está estabilizada por resonancia. Como consecuencia de ello, el ion hidruro incorporado está *activado* en el sentido de que es fácilmente transferido a otras moléculas.

(B) Ejemplo de una reacción en la que participan el NAD^+ y el NADH. En la oxidación biológica de una molécula de substrato, como un alcohol, el substrato pierde dos átomos de hidrógeno. Uno de ellos se añade como ion hidruro al NAD^+, produciendo NADH, mientras que el otro se libera a la solución como un protón (H^+).

El NADH, intermediario central en estos procesos, también lo encontramos como un producto de la glucolisis (véase Figura 2-22). Es un imporante transportador de poder reductor en las células. Como se ilustra en la Figura 2-24, está formado por la adición de un núcleo de hidrógeno y dos electrones (un ion hidruro H^-) a la adenina nicotinamida dinucleótido (NAD^+). Debido a que esta adición tiene lugar de una forma tal que el ion hidruro queda asociado a través de una unión rica en energía, el NADH actúa en la célula como una fuente adecuada de electrones fácilmente transferibles, de una forma semejante a como el ATP actúa como una fuente adecuada de grupos fosfato fácilmente transferibles.

El metabolismo está dominado por el ciclo del ácido cítrico[15]

La función primaria del ciclo del ácido cítrico consiste en oxidar los grupos acetilo que entran en el ciclo en forma de moléculas de acetil CoA. Las reacciones forman un ciclo porque el grupo acetilo no se oxida directamente, sino después de haberse unido covalentemente a una molécula mayor, el *oxalacetato*, que se regenera al final de cada vuelta del ciclo. Tal como se ilustra en la Figura 2-25, el ciclo empieza con la reacción que tiene lugar entre el acetil CoA y el oxalacetato, formando una molécula de un ácido tricarboxílico denominada *ácido cítrico* (o *citrato*). Luego se producen una serie de reacciones en las que dos de los seis átomos de carbono del citrato se oxidan a CO_2, formando otra molécula de oxalacetato, que inicia de nuevo el ciclo. (Puesto que los carbonos que entran en cada ciclo se incorporan en lugares del citrato diferentes a los que se oxidan a CO_2, no serán oxidados hasta después de varias vueltas del ciclo.) El CO_2 producido en estas reacciones sale de la mitocondria (o de la bacteria) por difusión y abandona de la célula.

La energía que se libera cuando se oxidan los enlaces C–H y C–C del citrato puede ser capturada de varias maneras diferentes en el transcurso del ciclo del

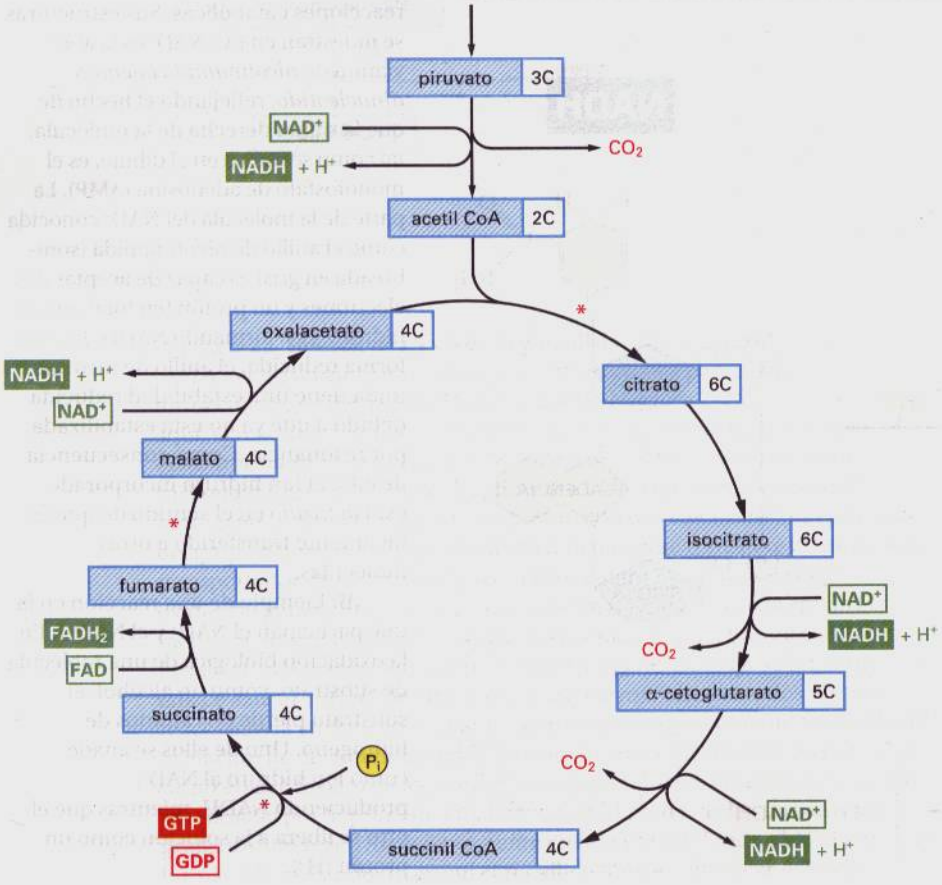


Figura 2-25 El ciclo del ácido cítrico. En las mitocondrias y en las bacterias aeróbicas los grupos acetilo producidos a partir del piruvato se oxidan posteriormente. Los átomos de carbono de los grupos acetilo se transforman en CO_2, mientras que los átomos de hidrógeno se transfieren a las moléculas transportadoras NAD^+ y FAD. Átomos adicionales de oxígeno e hidrógeno entran en el ciclo en forma de agua en los pasos indicados con un asterisco (*). El número de carbonos de cada molécula se indica en el recuadro *blanco*. Para más detalles véase Figura 14-14.

ácido cítrico. En un paso del ciclo (de succinil CoA a succinato) se genera un enlace fosfato rico en energía mediante un mecanismo parecido al que se ha descrito antes para la glucolisis. El resto de la energía de oxidación que se captura en el ciclo se canaliza hacia la conversión de moléculas transportadoras de hidrógeno –o iones hidruro– en sus formas reducidas; en cada vuelta del ciclo, tres moléculas de NAD^+ se convierten en NADH y un *flavín adenín dinucleótido* (FAD) se convierte en $FADH_2$. La energía transportada por el hidrógeno activado de estas moléculas transportadoras se utiliza en las reacciones de la *fosforilación oxidativa* (que será considerada con más detalle más adelante), las únicas reacciones descritas aquí que requieren oxígeno molecular de la atmósfera.

Los átomos de oxígeno adicionales necesarios para producir CO_2 a partir de los grupos acetilo que entran en el ciclo del ácido cítrico no son suministrados por el oxígeno molecular, sino por el agua. En cada vuelta del ciclo, tres moléculas de agua se rompen y sus átomos de oxígeno se utilizan produciendo CO_2. Algunos de sus átomos de hidrógeno entran a formar parte de moléculas del sustrato y, como los átomos de hidrógeno de los grupos acetilo, finalmente serán transferidos a moléculas transportadoras como el NADH.

En la célula eucariota, las mitocondrias son el centro donde confluyen todos los procesos catabólicos, tanto si empiezan desde azúcares, desde grasas o desde proteínas. En efecto, además del piruvato, los ácidos grasos y algunos aminoácidos también pasan desde el citosol a las mitocondrias, y allí son transformados a acetil CoA o a alguno de los otros intermediarios del ciclo del ácido cítrico. La mitocondria también actúa como punto de partida de reacciones de biosíntesis, al producir unos compuestos de carbono vitales, tales como el *oxalacetato* y el *α-cetoglutarato*. Estas sustancias pueden ser transferidas de nuevo desde la mitocondria al citosol donde actúan como precursoras para la síntesis de moléculas esenciales, como por ejemplo algunos aminoácidos.

En la fosforilación oxidativa, la transferencia de electrones al oxígeno impulsa la formación de ATP[10, 16]

La **fosforilación oxidativa** es el último paso del catabolismo y el proceso en que se libera la mayor parte de la energía metabólica. En este proceso, las moléculas de NADH y de $FADH_2$ transfieren al oxígeno molecular (O_2) los electrones que han obtenido de la oxidación de las moléculas alimenticias. La reacción, que formalmente es equivalente a la combustión del hidrógeno en el aire formando agua, libera una gran cantidad de energía química. Parte de esta energía se utiliza para producir la mayor parte del ATP de la célula; el resto se libera en forma de calor.

Aunque el proceso químico general de la oxidación del NADH y del $FADH_2$ implica una transferencia de hidrógeno hasta el oxígeno, cada átomo de hidrógeno se transfiere como un *electrón* y un protón (el núcleo de hidrógeno, H^+). Esto es posible debido a que el átomo de hidrógeno puede ser fácilmente disociado en el electrón y el protón (H^+) que lo constituyen. Entonces, el electrón puede ser transferido por separado a una molécula que únicamente acepta electrones, mientras que el protón permanece en la solución acuosa. Por el mismo razonamiento, si se transfiere un electrón a una molécula que tenga una fuerte afinidad por el hidrógeno, automáticamente se reconstituirá un átomo de hidrógeno tomando un protón de la solución. En el transcurso de la fosforilación oxidativa los electrones del NADH y del $FADH_2$ descienden a lo largo de una cadena de moléculas transportadoras, conocida como **cadena de transporte electrónico**. La presencia o ausencia de átomos de hidrógeno intactos depende de la naturaleza del transportador.

En una célula eucariota, esta serie de transferencias electrónicas a lo largo de la cadena de transporte electrónico ocurre en la membrana mitocondrial interna, en la que se hallan todas las moléculas transportadoras. En cada paso de la transferencia, los electrones caen a un nivel energético más bajo, hasta que al final son transferidos a las moléculas de oxígeno. Cada molécula de oxígeno (O_2)

toma cuatro electrones de la cadena de transporte de electrones y cuatro protones de la solución acuosa formando dos moléculas de agua. Las moléculas de oxígeno tienen una gran afinidad por los electrones, por lo que los electrones unidos al oxígeno se encuentran en su estado energético más bajo.

La cadena de transporte de electrones es importante para la célula porque la energía que se libera cuando estos electrones caen a estados energéticos más bajos se aprovecha de una manera remarcable. Como describimos en el Capítulo 14, transferencias particulares de electrones hacen que se bombeen protones a través de la membrana, desde el compartimiento mitocondrial interno hacia el exterior (Figura 2-26). Así, se genera un *gradiente electroquímico de protones* a través de la membrana mitocondrial interna. A su vez, este gradiente impulsa un flujo de protones a través de un complejo enzimático especial de la misma membrana mitocondrial haciendo que la enzima (*ATP sintasa*) añada un grupo fosfato al ADP, generando por consiguiente ATP dentro de la mitocondria. Finalmente, el ATP recién sintetizado se transfiere desde la mitocondria al resto de la célula.

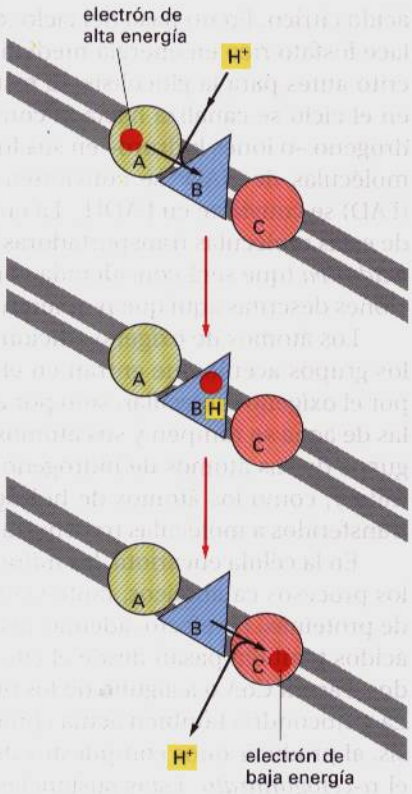


Figura 2-26 Generación de un gradiente de H^+ a través de una membrana, mediante reacciones de transporte electrónico. Un electrón de alta energía (por ejemplo, derivado de la oxidación de un metabolito) recorre secuencialmente los transportadores A, B y C hasta un estado energético inferior. En este esquema el transportador B está dispuesto en la membrana de tal manera que mientras pasa el electrón toma el H^+ de un lado de la membrana y lo libera al otro lado. El gradiente resultante de H^+ corresponde a una forma de energía almacenada, utilizada por otras proteínas de membrana de la mitocondria para favorecer la formación de ATP, como se discute en el Capítulo 14 .

Los aminoácidos y los nucleótidos forman parte del ciclo del nitrógeno

Hasta aquí hemos centrado nuestra discusión fundamentalmente en el metabolismo de los carbohidratos. No hemos hablado aún del metabolismo del nitrógeno o del azufre. Estos dos elementos son constituyentes de las proteínas y de los ácidos nucleicos, los cuales son las dos clases de macromoléculas más importantes en la célula y constituyen aproximadamente las dos terceras partes de su peso seco. Los átomos de nitrógeno y de azufre pasan desde un compuesto hasta otro y entre los organismos y su ambiente a través de una serie de ciclos reversibles.

Aunque el nitrógeno molecular es abundante en la atmósfera terrestre, en forma de gas es no reactivo químicamente. Únicamente algunas especies vivientes son capaces de incorporarlo a moléculas orgánicas, proceso denominado **fijación del nitrógeno**. La fijación del nitrógeno ocurre en ciertos microorganismos y en algunos procesos geofísicos, como por ejemplo en la descarga de un rayo. Es esencial para toda la biosfera, pues sin esta fijación no existiría la vida en este planeta. Pero únicamente una pequeña parte de los compuestos nitrogenados de los organismos actuales representa productos frescos de fijación del nitrógeno atmosférico. La mayor parte del nitrógeno orgánico ha estado en circulación durante mucho tiempo, pasando de un organismo vivo a otro. Por consiguiente, se puede decir que las reacciones de fijación del nitrógeno realizan la función de mantener llena al máximo la reserva total de nitrógeno.

Los vertebrados reciben prácticamente todo su nitrógeno a través de la ingesta de proteínas y de ácidos nucleicos. En el cuerpo estas macromoléculas se descomponen en sus componentes, aminoácidos y nucleótidos, los cuales luego son repolimerizados generando nuevas proteínas y ácidos nucleicos o son utilizados para sintetizar otras moléculas. Aproximadamente la mitad de los 20 aminoácidos existentes en las proteínas son *aminoácidos esenciales* (Figura 2-27) para los vertebrados: no pueden ser sintetizados a partir de otros ingredientes de la dieta. Los otros aminoácidos sí que pueden ser sintetizados, utilizando una enorme diversidad de materiales, incluyendo intermediarios del ciclo del ácido cítrico. Los aminoácidos esenciales son producidos en otros organismos, generalmente a través de rutas largas y energéticamente costosas que en el transcurso de la evolución de los vertebrados se han ido perdiendo.

Los nucleótidos necesarios para producir RNA y DNA pueden ser sintetizados utilizando vías biosintéticas especializadas: no existen "nucleótidos esenciales"' que deban ser proporcionados por la dieta. Todos los nitrógenos de las bases púricas i pirimidínicas (y también algunos de los carbonos) derivan de los abundantes aminoácidos glutamina, ácido aspártico y glicina, mientras que los azúcares ribosa y desoxirribosa derivan de la glucosa.

Los aminoácidos que no son utilizados en procesos de biosíntesis pueden ser oxidados generando energía metabólica. Muchos de sus átomos de carbono y de hidrógeno formarán CO_2 o H_2O mientras que sus átomos de hidrógeno serán transportados a través de varias formas y aparecerán como urea, que es excretada. Cada aminoácido es procesado de forma diferente y existe una constelación entera de reacciones enzimáticas para su catabolismo.

Resumen

Las células animales obtienen la energía a partir del alimento, siguiendo tres fases. En la fase 1 las proteínas, los polisacáridos y las grasas son transformados a moléculas pequeñas mediante reacciones extracelulares. En la fase 2, estas moléculas pequeñas son degradadas dentro de las células, produciendo acetil CoA y una pequeña cantidad de ATP y de NADH. Éstas son las únicas reacciones que pueden proporcionar energía en ausencia de oxígeno. En la fase 3, las moléculas de acetil CoA son degradadas en las mitocondrias, produciendo CO_2 y átomos de hidrógeno que se unen a moléculas transportadoras, como por ejemplo el NADH. Los electrones de los átomos de hidrógeno pasan a través de una compleja cadena de transportadores, que conduce finalmente a la reducción del oxígeno molecular formando agua. Impulsados por la energía liberada en estos pasos de transferencia de electrones, los protones (H^+) son transportados al exterior de la mitocondria. El gradiente electroquímico de protones resultante a través de la membrana mitocondrial interna se utiliza para impulsar la síntesis de la mayor parte del ATP celular.

Figura 2-27 Los nueve aminoácidos esenciales. Estos aminoácidos no pueden ser sintetizados por las células humanas y por lo tanto deben ser suministrados en la dieta.

La biosíntesis y la creación de orden[17]

En un momento cualquiera en una célula se producen miles de reacciones químicas diferentes. Las reacciones están asociadas formando cadenas y redes, en las que el producto de una reacción se convierte en el substrato de la reacción siguiente. La mayoría de las reacciones químicas celulares pueden clasificarse de manera aproximada, según pertenezcan al catabolismo o a la biosíntesis (anabolismo). Ya hemos discutido las reacciones catabólicas, por lo que ahora vamos a estudiar las reacciones de biosíntesis. Estos procesos empiezan en los compuestos intermediarios de la glucolisis y del ciclo del ácido cítrico (y en otros compuestos relacionados con éstos) y generan las mayores y más complejas moléculas de la célula.

El cambio de energía libre de una reacción determina si ésta puede producirse o no[18]

A pesar de que las enzimas aceleran las reacciones energéticamente favorables, no pueden forzar que las reacciones energéticamente desfavorables tengan lugar. En una analogía con el agua, las enzimas por sí solas no pueden hacer que el agua fluya cuesta arriba. Sin embargo las células han de hacerlo para poder crecer y dividirse; han de formar moléculas altamente ordenadas y ricas en energía a partir de moléculas pequeñas y sencillas. Hemos visto que, de una manera general, esto se realiza mediante enzimas que acoplan reacciones energéticamente favorables que consumen energía (derivada fundamentalmente del sol) y que producen calor, a reacciones energéticamente desfavorables que producen orden. Vamos a examinar en detalle cómo se realiza este acoplamiento.

En primer lugar debemos considerar más cuidadosamente el término "energéticamente favorable", que hemos estado utilizando con bastante ligereza sin definirlo. Como se explica al principio, para que una reacción química tenga lugar espontáneamente únicamente ha de producir un incremento neto de desorden en el universo. El desorden se incrementa cuando la energía útil (enegía que puede ser derivada para producir trabajo) se disipa en forma de calor; el criterio de incremento de desorden puede expresarse de forma cuantitativa con la **energía libre, *G***. Ésta se define de manera que los cambios de su valor, indicados por

ΔG, miden la cantidad de desorden creado en el universo cuando tienen lugar una reacción. Las *reacciones energéticamente favorables* son, por definición, aquellas que liberan una gran cantidad de energía libre, o en otras palabras, las que tienen un valor *negativo* de ΔG elevado y por tanto crean mucho desorden. Un ejemplo familiar a escala macroscópica puede ser la "reacción" por la que un muelle comprimido se relaja hasta su estado expandido, liberando al medio en forma de calor la energía elástica que almacenaba. Las reacciones energéticamente favorables, con un $\Delta G < 0$, presentan una elevada tendencia a ocurrir espontáneamente, aunque su velocidad dependerá de otros factores, tales como la existencia de enzimas específicas (véase más adelante). En cambio, las *reacciones energéticamente desfavorables*, con un valor *positivo* de ΔG, como aquellas en las que dos aminoácidos se unen entre sí formando un enlace peptídico, generan orden en el universo y por lo tanto no se pueden producir espontáneamente. Reacciones energéticamente desfavorables como éstas sólo se producirán si están acopladas a una segunda reacción que tenga un valor de ΔG suficientemente negativo como para que el ΔG del proceso completo también resulte negativo.

El curso de la mayoría de las reacciones puede predecirse cuantitativamente. Se han recogido una gran cantidad de datos termodinámicos que hacen posible calcular los cambios de energía libre para la mayoría de las reacciones más importantes de la célula. Entonces, el cambio global de energía libre para una vía es la simple suma de los cambios de energía libre de cada una de las reacciones que la componen. Consideremos por ejemplo dos reacciones:

$$X \rightarrow Y \text{ y } C \rightarrow D$$

con valores de ΔG de +1 y –13 kcal/mol respectivamente. (Hay que recordar que un mol son 6×10^{23} moléculas de la substancia.) Si estas dos reacciones pueden ser acopladas, el ΔG de la reacción acoplada será de –12 kcal/mol. Así, la reacción desfavorable $X \rightarrow Y$, que no ocurrirá espontáneamente, puede ser impulsada por la reacción favorable $C \rightarrow D$, siempre que exista un mecanismo mediante el cual las dos reacciones puedan ser acopladas.

A menudo las reacciones de biosíntesis están acopladas directamente a la hidrólisis del ATP

Consideremos una reacción típica de biosíntesis en la que dos monómeros, A y B, han de unirse a través de una reacción de **deshidratación** (denominada también de *condensación*) en la que se libera agua:

$$\text{A-H} + \text{B-OH} \rightarrow \text{A-B} + \text{H}_2\text{O}$$

De forma casi invariable, la reacción inversa (denominada **hidrólisis**), en la que el agua rompe el compuesto formado por el enlace covalente A-B, será la reacción energéticamente favorable. Por ejemplo, éste es el caso de la hidrólisis a sus subunidades de las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos.

La estrategia general que permite a la célula producir A-B a partir de A-H y B-OH, implica una secuencia de reacciones a través de las cuales la síntesis energéticamente desfavorable del compuesto deseado se acopla a una reacción energéticamente más favorable (véase Figura 2-17). Como se explica en la Figura 2-28 la hidrólisis del ATP tiene un ΔG muy negativo y es la fuente habitual de energía libre que se utiliza para impulsar las reacciones biosintéticas de la célula. En la vía acoplada desde A-H y B-OH hasta A-B, la energía de hidrólisis del ATP transforma primero B-OH en un compuesto intermedio de mayor energía, que luego reacciona directamente con A-H dando A-B. El mecanismo más simple consiste en la transferencia de un fosfato desde el ATP hasta B-OH formando B-OPO_3 (o sea, B-O-Ⓟ), en cuyo caso la vía de reacciones únicamente estará formada por dos pasos:

1. $\text{B-OH} + \text{ATP} \rightarrow \text{B-O-Ⓟ} + \text{ADP}$
2. $\text{A-H} + \text{B-O-Ⓟ} \rightarrow \text{A-B} + \text{P}_i$

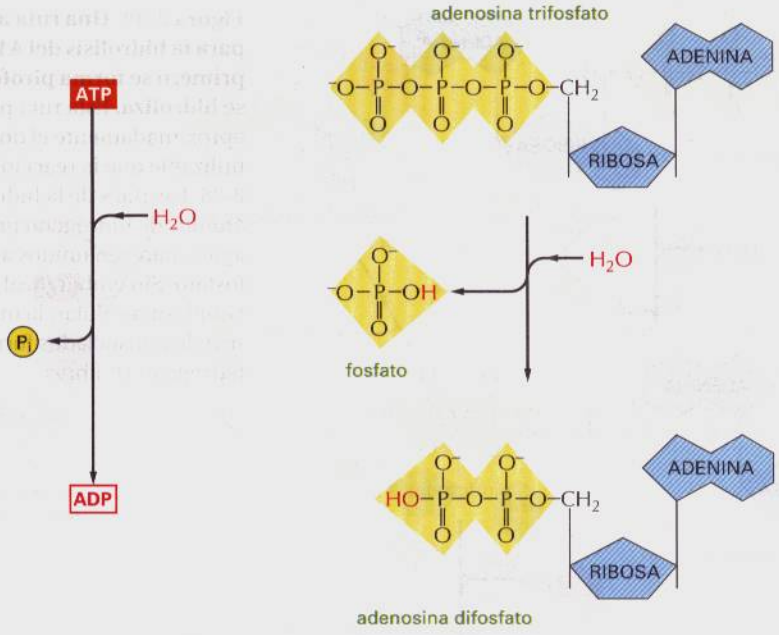


Figura 2-28 Hidrólisis del ATP. La hidrólisis del fosfato terminal del ATP libera, dependiendo de las condiciones intracelulares, entre 11 y 13 kcal/mol de energía utilizable. Esta reacción tiene un ΔG muy negativo debido a varios factores. La liberación del grupo fosfato terminal elimina una repulsión desfavorable entre cargas negativas adyacentes. Además, el ion fosfato inorgánico (P_i) liberado está estabilizado por resonancia y por la formación favorable de un enlace de hidrógeno con el agua.

Puesto que el intermediario B-O-Ⓟ se forma sólo transitoriamente, las reacciones globales que se producen son:

$$\text{A-H} + \text{B-OH} \rightarrow \text{A-B} \quad \text{y} \quad \text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + P_i$$

La primera reacción, de por sí energéticamente desfavorable, es impulsada a producirse acoplándola directamente a la segunda reacción energéticamente favorable (la hidrólisis del ATP). Un ejemplo de reacción biosintética acoplada de este tipo es la síntesis del aminoácido glutamina, mostrada en la Figura 2-29.

El ΔG de la hidrólisis del ATP a ADP y fosfato inorgánico (P_i) depende de las concentraciones de los tres reactantes, y en las condiciones habituales de una célula es entre –11 y –13 kcal/mol. En principio, esta reacción de hidrólisis puede utilizarse para impulsar una reacción desfavorable con un ΔG de, quizás, +10 kcal/mol, siempre que exista una vía de reacciones adecuada. Para algunas reacciones de biosíntesis, sin embargo, –13 kcal/mol puede ser insuficiente. En estos casos, la reacción de hidrólisis del ATP puede ser alterada de manera que inicialmente produzca AMP y pirofosfato (PP_i). El pirofosfato será hidrolizado en segundo paso (Figura 2-30). En su conjunto el proceso produce un cambio de energía libre total disponible de aproximadamente –26 kcal/mol.

¿Cómo se acopla la energía de hidrólisis del pirofosfato a una reacción biosintética? Se puede ilustrar una de las vías considerando de nuevo la síntesis del compuesto A-B a partir de A-H y B-OH. Mediante una enzima apropiada, B-OH puede ser convertido a través de su reacción con el ATP en un intermediario de alta energía B-O-Ⓟ-Ⓟ. La reacción completa consta ahora de tres pasos:

1. $\text{B-OH} + \text{ATP} \rightarrow \text{B-O-Ⓟ-Ⓟ} + \text{AMP}$
2. $\text{A-H} + \text{B-O-Ⓟ-Ⓟ} \rightarrow \text{A-B} + PP_i$
3. $PP_i + H_2O \rightarrow 2P_i$

Y las reacciones globales son

$$\text{A-H} + \text{B-OH} \rightarrow \text{A-B} \quad \text{y} \quad \text{ATP} + H_2O \rightarrow \text{AMP} + 2P_i$$

Dado que una enzima acelera por igual las direcciones hacia adelante y hacia atrás de la reacción que cataliza, el compuesto A-B puede ser destruido por recombinación con pirofosfato (el inverso del paso 2). Pero la reacción energéticamente favorable de la hidrólisis del pirofosfato (paso 3) estabiliza el compuesto

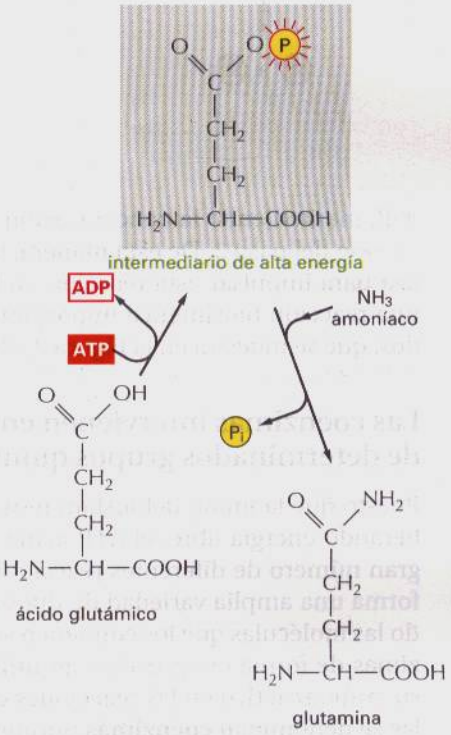


Figura 2-29 Ejemplo de reacción biosintética de deshidratación impulsada por la hidrólisis del ATP. En primer lugar, el ácido glutámico es transformado en un intermediario fosforilado de alta energía (que corresponde al compuesto B-O-Ⓟ descrito en el texto), el cual reacciona con el amonio formando glutamina. En este ejemplo, ambos pasos tienen lugar en la superficie de la misma enzima, la *glutamina sintasa*. Obsérvese que, para mayor claridad, estas moléculas se muestran en sus formas no cargadas.

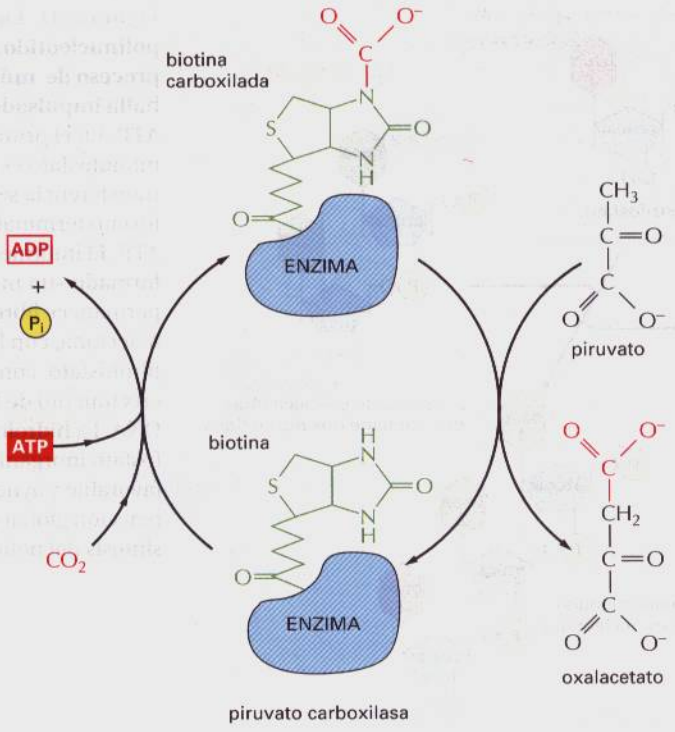


Figura 2-32 Transferencia de un grupo carboxilo mediante la coenzima biotina. La biotina (mostrada en *verde*) actúa como molécula transportadora del grupo carboxilo (en *rojo*). En la secuencia de reacciones mostradas aquí, la biotina está unida covalentemente a la enzima piruvato carboxilasa. Un grupo carboxilo activado, derivado de un ion bicarbonato (HCO_3^-) se acopla a la biotina a través de una reacción que requiere un aporte de energía procedente de la hidrólisis de una molécula de ATP. A continuación este grupo carboxilo se transfiere al grupo metilo del piruvato formando oxalacetato.

zimas actuales, como el ATP, el acetil CoA y el NADH. De acuerdo con este punto de vista, estas moléculas debieron evolucionar con un nucleótido unido covalentemente debido a la utilidad que suponía este nucleótido para la unión de la coenzima en un mundo de RNA.

La biosíntesis necesita poder reductor

Hemos visto como en las células se producen continuamente reacciones de oxidación y de reducción. La energía química de las moléculas alimenticias se libera mediante reacciones de oxidación, mientras que para producir moléculas biológicas la célula necesita –entre otras cosas– llevar a cabo una serie de reacciones de reducción que requieren un aporte de energía química. Aplicando el principio de las reacciones acopladas que hemos descrito en páginas anteriores, las células canalizan directamente la energía química derivada del catabolismo hacia la síntesis del NADH (por ejemplo, véase Figura 2-22). El enlace de alta energía que se forma entre el hidrógeno y el anillo de nicotinamida, dando lugar al NADH proporciona energía para reacciones enzimáticas desfavorables, transfiriendo el hidrógeno (como ion hidruro) a otra molécula. Por ello se dice que el NADH, y también el NADPH (estrechamente relacionado con él y en el que se puede convertir con facilidad) son transportadores de "poder reductor". Ambos se utilizan como coenzimas en numerosos tipos de reacciones de reducción.

Para saber cómo ocurre la transferencia de hidrógeno en la práctica, consideremos un solo paso de biosíntesis: la última reacción de la vía de síntesis de la molécula lipídica *colesterol*. En esta reacción, dos átomos de hidrógeno se añaden al anillo esteroide policíclico, reduciendo un doble enlace carbono-carbono. Como en la mayoría de reacciones de biosíntesis, los constituyentes de los dos átomos de hidrógeno que son necesarios en esta reacción son suministrados en forma de ion hidruro del NADPH más un protón (H^+) de la solución ($H^- + H^+ = 2H$) (Figura 2-33). Como en el NADH, el ion hidruro del NADPH que debe ser transferido forma parte de un anillo de nicotinamida y se separa fácilmente debido a que el anillo puede adoptar un estado aromático más estable si pierde el ion hidruro (véase Figura 2-24). Por consiguiente, tanto el NADH como el NADPH mantienen este ion hidruro a través de un enlace de alta energía y, a

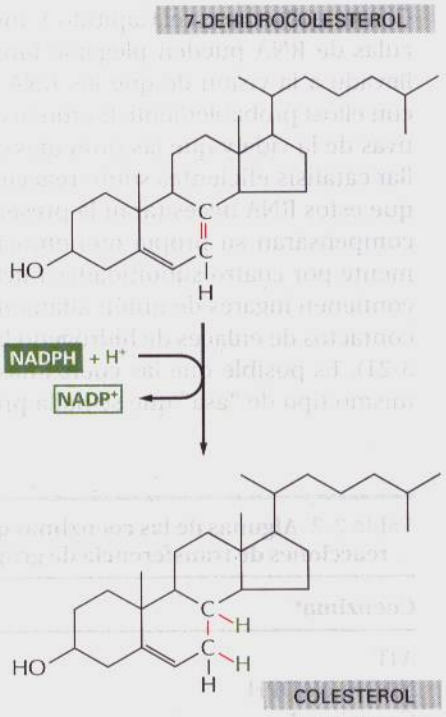
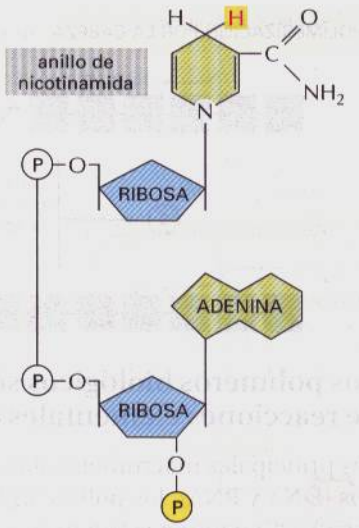


Figura 2-33 Fase final de una de las rutas de biosíntesis que conducen a la formación del colesterol. La reducción del enlace C=C se consigue mediante la transferencia de un ion hidruro procedente de la molécula transportadora NADPH, más un protón (H^+) de la solución.

Figura 2-34 La estructura del NADPH. Se diferencia de la del NADH (véase Figura 2-24) únicamente por la presencia de un grupo fosfato adicional, el cual permite que el NADPH sea reconocido selectivamente por enzimas implicadas en la biosíntesis.



partir de él, pueden transferirlo a otra molécula siempre que exista la enzima adecuada para catalizar la transferencia.

La diferencia entre el NADH y el NADPH es trivial desde el punto de vista químico: el NADPH tiene un grupo fosfato más, en una zona de la molécula alejada de la región activa (Figura 2-34). Este grupo fosfato extra carece de importancia para la reacción de transferencia del ion hidruro, pero sirve de asa para unir el NADPH como coenzima. Por regla general, el NADH se une a enzimas que catalizan reacciones catabólicas, mientras que el NADPH actúa con enzimas que catalizan reacciones de biosíntesis. Al tener las dos coenzimas que actúan en procesos diferentes, la célula puede mantener la relación NADPH:$NADP^+$ alta para aportar el poder reductor necesario para los procesos de biosíntesis mientras que, simultáneamente, puede mantener la relación NADH:NAD^+ baja para tener NAD^+ disponible para aceptar electrones durante el catabolismo.

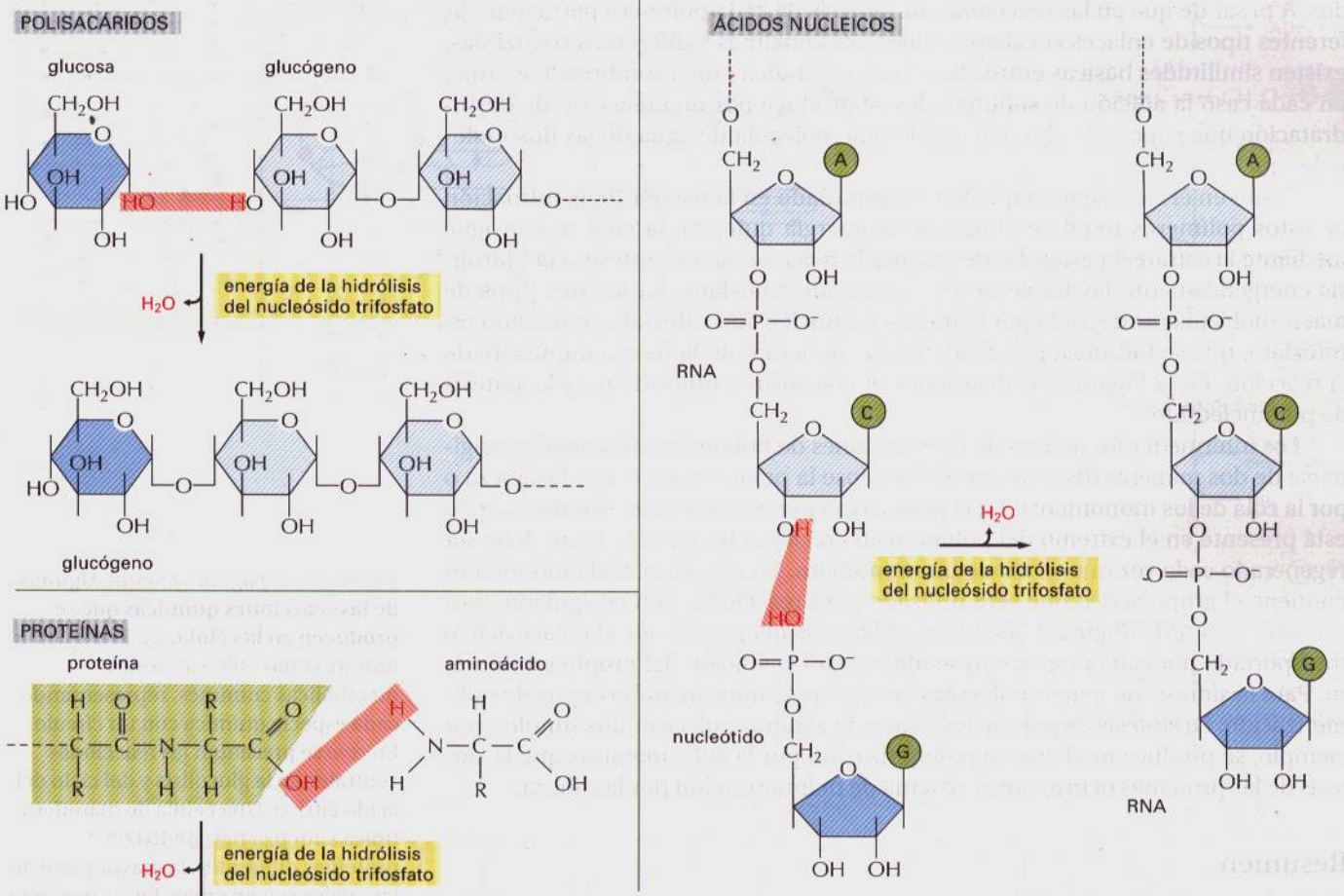


Figura 2-35 Síntesis de macromoléculas. Esbozo de las reacciones de polimerización mediante las cuales se sintetizan tres clases de polímeros biológicos, mostrando que en cada caso la síntesis implica la pérdida de agua (deshidratación). En la figura no se muestra el consumo de nucleósidos trifosfato altamente energéticos, necesaria para activar cada monómero antes de su adición. Por el contrario, la reaccion inversa –la degradación de los tres tipos de polímeros– se produce mediante la simple adición de agua (hidrólisis).

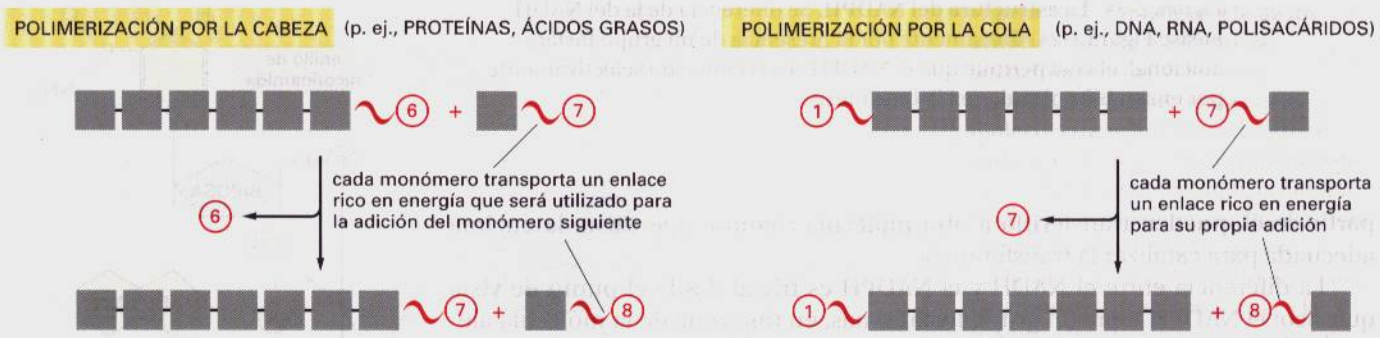


Figura 2-36 Intermediarios activados en reacciones de polimerización. Se compara el crecimiento de polímeros por la cabeza y por la cola.

Los polímeros biológicos se sintetizan mediante la repetición de reacciones elementales de deshidratación

Las principales macromoléculas sintetizadas por las células son los polinucleótidos (DNA y RNA), los polisacáridos y las proteínas. Son extraordinariamente diversos en cuanto a estructura, e incluyen las moléculas más complejas conocidas. A pesar de ello, se sintetizan a partir de un número relativamente reducido de pequeñas moléculas (denominadas *monómeros* o *subunidades*), a través de una restringida gama de reacciones químicas.

En la Figura 2-35 se muestra un esbozo sobresimplificado del mecanismo de adición de monómeros a las proteínas, a los polinucleótidos y a los polisacáridos. A pesar de que en las reacciones de síntesis de cada polímero participan diferentes tipos de enlaces covalentes, diferentes enzimas y diferentes coenzimas, existen similitudes básicas entre ellas. Como se indica por el sombreado en rojo, en cada caso la adición de subunidades se produce por una reacción de deshidratación que supone la eliminación de una molécula de agua de las dos moléculas que reaccionan.

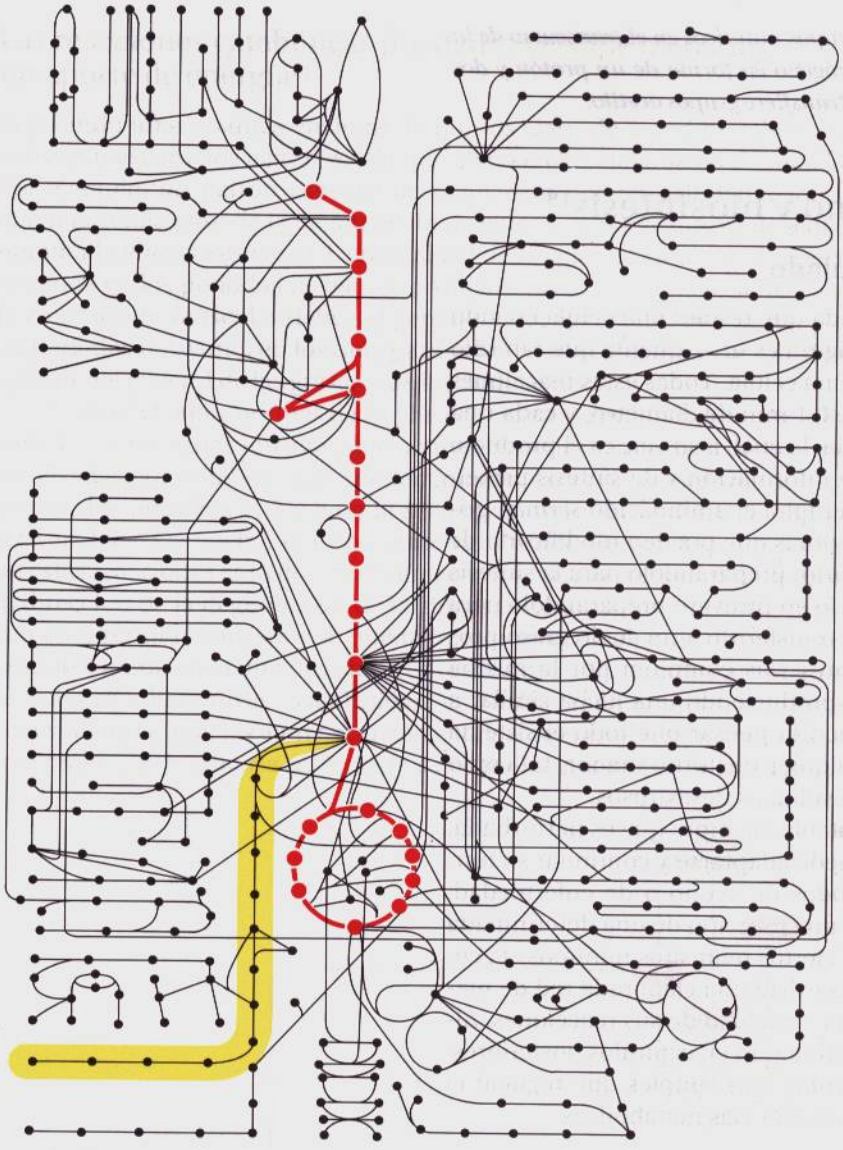
Como en el caso general que hemos estudiado en la página 79, la formación de estos polímeros requiere el aporte de energía química, la cual se consigue mediante la estrategia estándar de acoplar la reacción de biosíntesis a la hidrólisis energéticamente favorable de un nucleósido trifosfato. En los tres tipos de macromoléculas se degrada por lo menos un nucleósido trifosfato generando pirofosfato, que se hidroliza inmediatamente aumentando la fuerza impulsora de la reacción. En la Figura 2-31 ilustramos el mecanismo utilizado para la síntesis de polinucleótidos.

Los intermediarios activos de las reacciones de polimerización pueden originarse de dos maneras distintas, produciéndose la polimerización por la cabeza o por la cola de los monómeros. En la *polimerización por la cabeza*, el enlace activo está presente en el extremo del polímero en crecimiento, y por lo tanto debe ser regenerado cada vez que se añade un monómero. En este caso, cada monómero contiene el grupo activo que será utilizado para reaccionar con el siguiente monómero de la serie (Figura 2-36). En la *polimerización por la cola*, el enlace activo transportado por cada monómero se utiliza para la adición del propio monómero. Para la síntesis de macromoléculas biológicas se utilizan ambos tipos de polimerización. La síntesis de polinucleótidos y de algunos polisacáridos simples, por ejemplo, se produce mediante la polimerización por la cola, mientras que la síntesis de las proteínas ocurre por el sistema de polimerización por la cabeza.

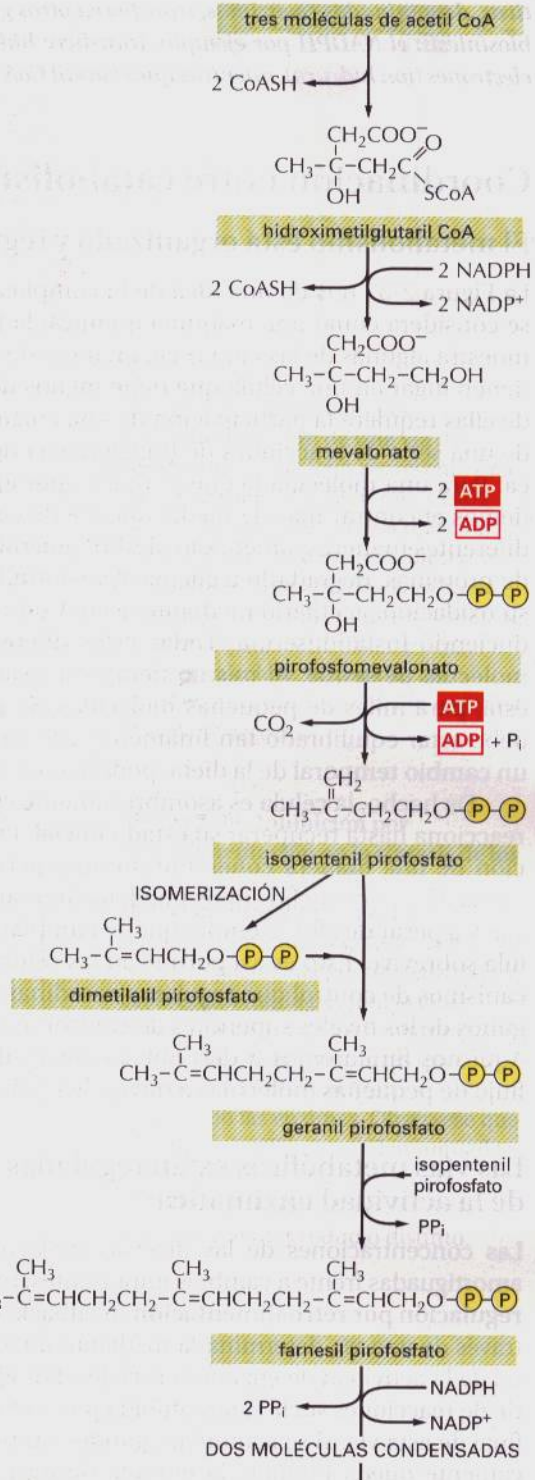
Resumen

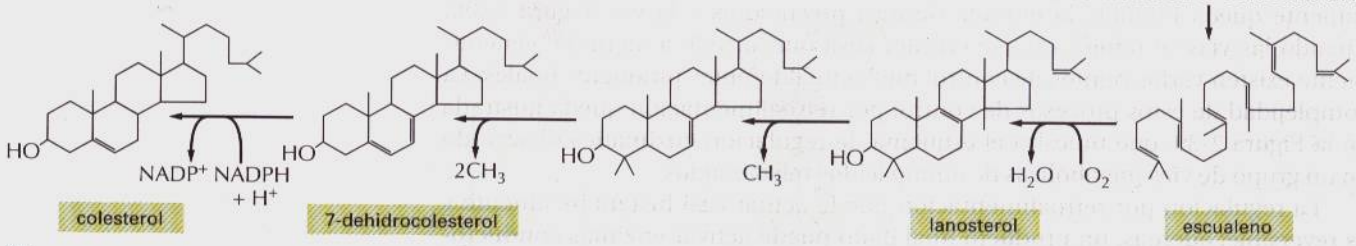
Normalmente la hidrólisis del ATP se acopla a reacciones energéticamente desfavorables, como la biosíntesis de macromoléculas, mediante la transferencia de grupos fosfato formando intermediarios fosforilados reactivos. Como ahora la reacción energéticamente desfavorable se ha vuelto energéticamente favorable, se dice que el ATP impulsa la reacción. Las moléculas poliméricas como las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos, se ensamblan a partir de pequeñas moléculas precursoras activadas mediante reacciones repetidas de deshidratación impulsadas de esta forma. Otras moléculas reac-

Figura 2-37 (*página opuesta*) **Algunas de las reacciones químicas que se producen en la célula.** (A) El esquema muestra unas 500 reacciones metabólicas comunes, representando cada especie química con un círculo. En *rojo* se presentan las reacciones centrales de la glucolisis y del ciclo del ácido cítrico. Una célula de mamífero típica sintetiza más de 10 000 proteínas diferentes, la mayor parte de las cuales son enzimas. En el segmento escogido de forma arbitraria en este laberinto metabólico (sombreado en *amarillo*), se sintetiza colesterol a partir del acetil CoA. A la derecha y por debajo del laberinto, este segmento escogido se muestra con mayor detalle (B).



(A)


tres moléculas de acetil CoA
2 CoASH
hidroximetilglutaril CoA
2 NADPH
2 NADP+
mevalonato
2 ATP
2 ADP
pirofosfomevalonato
CO2
ATP
ADP + Pi
isopentenil pirofosfato
ISOMERIZACIÓN
dimetilalil pirofosfato
geranil pirofosfato
isopentenil pirofosfato
PPi
farnesil pirofosfato
2 PPi
NADPH
NADP+
DOS MOLÉCULAS CONDENSADAS


NADP+ NADPH + H+
2CH3
CH3
H2O
O2
colesterol
7-dehidrocolesterol
lanosterol
escualeno

(B)

tivas, denominadas coenzimas, transfieren otros grupos químicos en el transcurso de la biosíntesis: el NADPH por ejemplo, transfiere hidrógeno en forma de un protón y dos electrones (ion hidruro), mientras que el acetil CoA transfiere grupos acetilo.

Coordinación entre catabolismo y biosíntesis[19]

El metabolismo está organizado y regulado

La Figura 2-37 nos da una idea de lo complicada que resulta una célula cuando se considera como una máquina química; la figura es un esquema que tan sólo muestra algunas de las etapas enzimáticas de una célula. Todas estas reacciones tienen lugar en una célula que tiene menos de 0,1 mm de diámetro, y cada una de ellas requiere la participación de una enzima, la cual, a su vez, es el producto de una serie de reacciones de transferencia de información y de síntesis proteica. Para una molécula pequeña típica –por ejemplo, el aminoácido *serina*– podemos encontrar más de media docena de enzimas que pueden modificarlo de diferentes maneras: uniéndolo al AMP (adenilarlo) preparándolo para la síntesis de proteínas, degradarlo a glicina, transformarlo en piruvato preparándolo para su oxidación, acetilarlo mediante acetil CoA o transferirlo a un ácido graso produciendo fosfatidilserina. Todas estas diferentes vías compiten por la misma molécula de serina. Al mismo tiempo se está produciendo una lucha similar a ésta, para miles de pequeñas moléculas. Se podría pensar que todo el sistema debe estar equilibrado tan finamente que cualquier trastorno menor, tal como un cambio temporal de la dieta, podría tener resultados desastrosos.

De hecho, la célula es asombrosamente estable. Siempre que es perturbada, reacciona hasta recuperar su estado inicial. Puede adaptarse y continuar su función de una manera coherente durante períodos de ayuno o de enfermedad. Mutaciones de muchos tipos pueden eliminar una reacción de una determinada vía, y a pesar de ello –siempre que se cumplan ciertos requisitos mínimos– la célula sobrevive. Esto es así porque en las células existe una elaborada red de mecanismos de control que regulan y coordinan la velocidad de sus reacciones. Algunos de los niveles superiores de control se estudiarán en capítulos posteriores. Aquí nos limitaremos a describir los mecanismos más simples que regulan el flujo de pequeñas moléculas a través de las diferentes vías metabólicas.

Las vías metabólicas están reguladas a través de cambios de la actividad enzimática[20]

Las concentraciones de las diversas moléculas pequeñas de una célula están amortiguadas frente a cambios importantes, mediante un proceso conocido como **regulación por retroalimentación** (feedback) que adapta el flujo de metabolitos a través de una vía determinada mediante un aumento o una disminución temporal de la actividad de enzimas cruciales. Por ejemplo, la enzima inicial de una serie de reacciones suele estar inhibida por *retroalimentación negativa* del producto final de esta vía: si se acumulan grandes cantidades del producto final, automáticamente queda inhibida la entrada de más precursores a la vía (Figura 2-38). Cuando las vías se ramifican o se cruzan, cosa que sucede a menudo, generalmente existen varios puntos de control mediante diferentes productos finales. La complejidad de estos procesos de control por retroalimentación queda ilustrada en la Figura 2-39, que muestra el esquema de regulación enzimática observado en un grupo de vías metabólicas de aminoácidos relacionados.

La regulación por retroalimentación puede actuar casi instantáneamente y es reversible; además, un producto final dado puede activar enzimas conductoras de otras vías e inhibir enzimas que producen su propia síntesis. Se conoce bien la base molecular de este tipo de control pero debido a que su estudio requiere unos conocimientos determinados sobre la estructura de las proteínas, no entraremos en él hasta el Capítulo 5.

Las reacciones catabólicas pueden revertirse mediante un aporte de energía[21]

Regulando unas cuantas enzimas de puntos clave de la red metabólica pueden conseguirse cambios a gran escala que afecten el metabolismo de toda la célula. Por ejemplo, un patrón especial de regulación por retroalimentación permite que una célula pase de la degradación de glucosa a la biosíntesis de glucosa (denominada *gluconeogénesis)*. La necesidad de la gluconeogénesis es especialmente aguda en los períodos de ejercicio violento, cuando la glucosa necesaria para la contracción muscular debe ser generada por las células hepáticas, y también en períodos de ayuno, en los que, para sobrevivir, la glucosa debe ser sintetizada a partir del glicerol de las grasas y de los aminoácidos.

La degradación normal de la glucosa hasta piruvato, por la glucolisis, está catalizada por varias enzimas que actúan en serie. La mayoría de las reacciones catalizadas por estas enzimas son fácilmente reversibles, pero tres de estas reacciones (los números 1, 3 y 9 en la secuencia de la Figura 2-21) son claramente irreversibles. De hecho, el importante cambio de energía libre que se produce en estas reacciones es lo que normalmente impulsa la secuencia de reacciones en la dirección de la degradación de la glucosa. Para que las reacciones se produzcan en dirección opuesta y se pueda formar glucosa a partir de piruvato, es necesario superar cada una de estas tres reacciones. Ello se consigue mediante tres reacciones alternativas, catalizadas enzimáticamente, que son impulsadas "cuesta arriba" gracias a un aporte de energía química (Figura 2-40). Así, cuando una molécula de glucosa se degrada a dos moléculas de piruvato, se generan dos

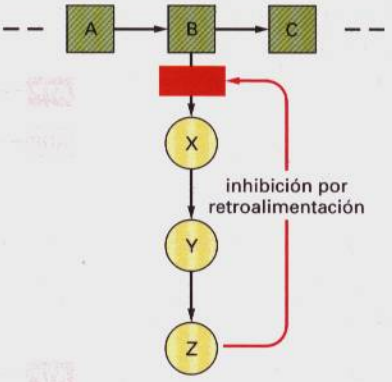


Figura 2-38 Inhibición por retroalimentación de una vía de biosíntesis. Cada letra representa una pequeña molécula diferente, y cada *flecha negra* simboliza una reacción catalizada por una enzima diferente. El producto final Z inhibe la primera enzima que es la única que lo sintetiza, de forma que Z controla su propio nivel en la célula. Se trata de un ejemplo de *retroalimentación negativa (feedback negativo).*

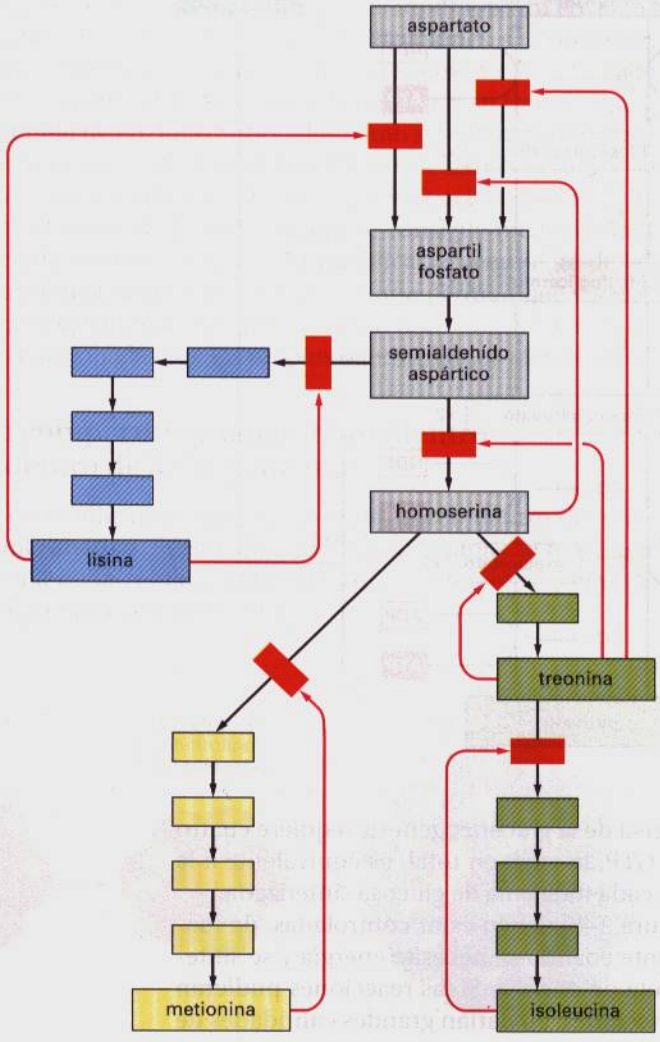


Figura 2-39 Inhibición por retroalimentación en la síntesis de los aminoácidos lisina, metionina, treonina e isoleucina, en las bacterias. En este diagrama cada reacción catalizada por una enzima está representada por una *flecha negra,* mientras que las flechas *rojas* indican las posiciones en las que los productos "retroalimentan" inhibiendo las enzimas. Obsérvese que tres enzimas diferentes (denominadas *isoenzimas*) catalizan la reacción inicial, y que cada una de ellas está inhibida por un producto distinto.

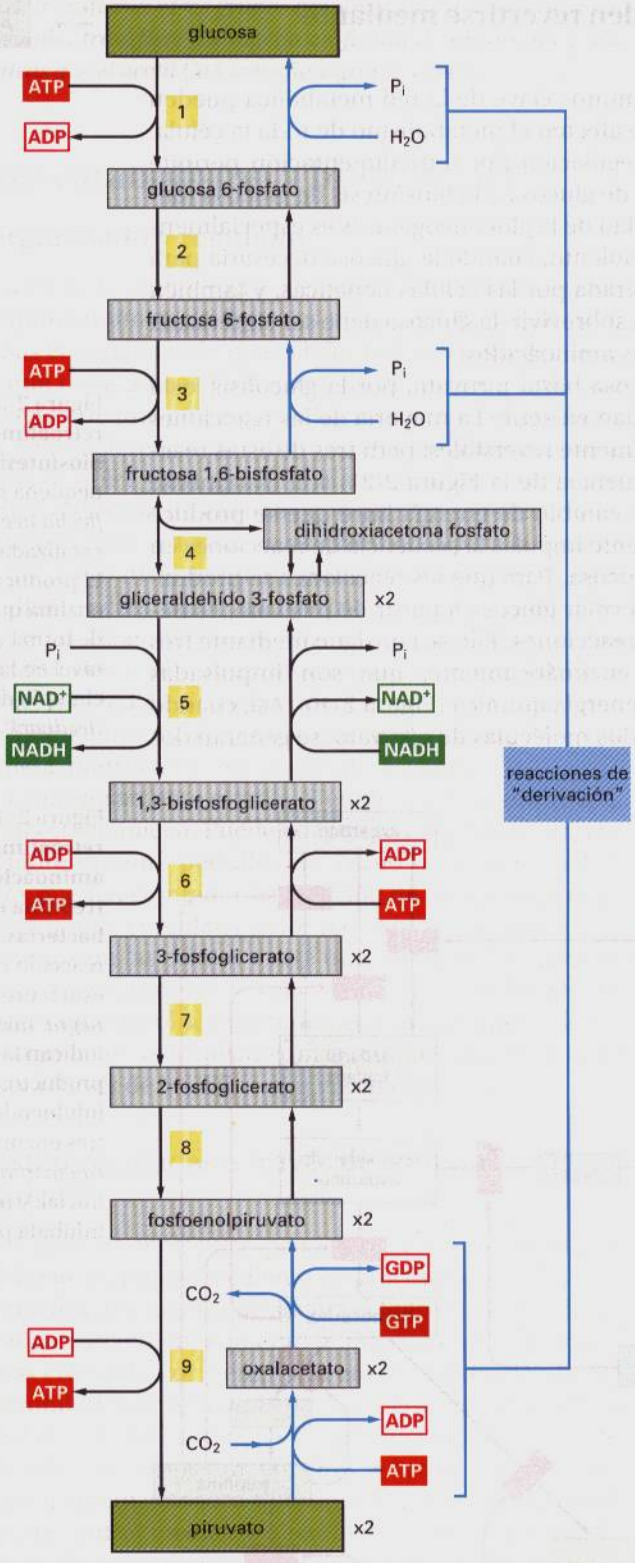


Figura 2-40 Comparación entre las reacciones que producen glucosa durante la gluconeogénesis y las reacciones que degradan la glucosa durante la glucolisis. Las reacciones de degradación (glucolíticas) son energéticamente favorables (el cambio de energía libre es inferior a cero), mientras que las reacciones de síntesis requieren un aporte de energía. Para sintetizar glucosa se necesitan diferentes "enzimas de derivación" necesarias para "saltar" las reacciones 1, 3 y 9 de la glucolisis. El flujo total de compuestos entre la glucosa y el piruvato está determinado por mecanismos de control por retroalimentación que actúan controlando el metabolismo de las moléculas que participan en estos tres pasos.

moléculas de ATP pero la reacción inversa de la gluconeogénesis requiere cuatro moléculas de ATP y dos moléculas de GTP, lo cual, en total, es equivalente a la hidrólisis de seis moléculas de ATP por cada molécula de glucosa sintetizada.

Las reacciones de desvío de la Figura 2-40 deben estar controladas, de manera que se degrade glucosa rápidamente cuando se necesite energía y se sintetice glucosa cuando la célula esté repleta de energía. Si las reacciones pudieran producirse en ambos sentidos sin restricciones, enviarían grandes cantidades de

metabolitos hacia adelante y hacia atrás, siguiendo unos ciclos fútiles que consumirían grandes cantidades de ATP sin ningún objetivo concreto.

La elegancia de estos mecanismos de control puede ilustrarse con un ejemplo clave. El paso 3 de la glucolisis es una de las reacciones que debe ser superada durante la formación de glucosa (véase Figura 2-40). Normalmente el paso implica la adición a la fructosa 6-fosfato de un grupo fosfato procedente del ATP, y está catalizado por la enzima *fosfofructoquinasa*. Esta enzima es activada por AMP, ADP y fosfato inorgánico e inhibida por ATP, citrato y ácidos grasos. Así pues, la enzima se activa por la acumulación de los productos de la hidrólisis del ATP cuando el aporte de energía es bajo y se inactiva cuando la cantidad de energía (en forma de ATP) o el aporte de alimentos, como pueden ser ácidos grasos o citrato (derivado de los aminoácidos) son abundantes. La *fructosa bisfosfatasa* es la enzima que cataliza la reacción inversa (la hidrólisis de fructosa 1,6 bisfosfato a fructosa 6-fosfato, que conduce hacia la formación de glucosa); esta enzima está regulada de manera opuesta por el mismo sistema de retroinhibición, de forma que se estimula cuando la fosfofructoquinasa se inhibe.

Las enzimas pueden activarse e inhibirse mediante modificaciones covalentes[22]

Los sistemas de control por retroalimentación que acabamos de describir permiten que las velocidades de las secuencias de reacciones estén reguladas de manera continua y automática, segundo a segundo, en respuesta a fluctuaciones del metabolismo. Las células disponen de varios dispositivos para regular las enzimas cuando los cambios de su actividad han de ser más prolongados, del orden de minutos u horas. Estos sistemas implican la modificación covalente reversible de las enzimas. Casi siempre estas modificaciones se consiguen mediante la adición de un grupo fosfato a un residuo determinado de serina, de treonina o de tirosina de la enzima. El fosfato procede del ATP y su transferencia está catalizada por una familia de enzimas conocidas como *proteína quinasas*.

En el Capítulo 5 describiremos como la fosforilación puede alterar la forma de una enzima, aumentando o inhibiendo su actividad. La eliminación posterior del grupo fosfato, que revierte el efecto de la fosforilación, se consigue mediante una segunda enzima denominada *proteína fosfatasa*. La modificación covalente de las enzimas añade otra dimensión al control metabólico, ya que permite que las vías de reacción específicas sean reguladas por señales (como las hormonas y factores de crecimiento) que no están relacionadas con los propios intermediarios metabólicos.

Las reacciones están compartimentadas, tanto dentro de las células como dentro de los organismos[23]

No todas las reacciones metabólicas de una célula se producen dentro del mismo compartimiento citoplasmático. Puesto que diferentes enzimas se hallan en diferentes compartimientos de la célula, el flujo de los componentes químicos está canalizado, tanto física como químicamente.

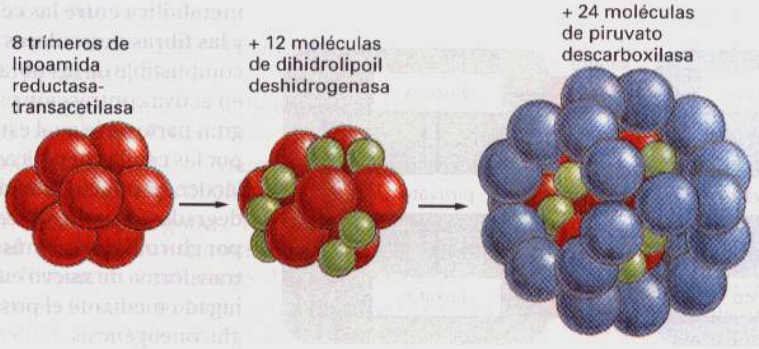


Figura 2-41 Estructura de la piruvato-deshidrogenasa. Este complejo enzimático cataliza la conversión de piruvato en acetil CoA. Se trata de un ejemplo de un gran complejo multienzimático en el que los intermediarios de la reacción pasan directamente de unas enzimas a otras.

La forma más simple de esta segregación espacial se produce cuando dos enzimas que catalizan reacciones secuenciales forman un complejo enzimático, y el producto de la primera enzima no ha de difundir a través del citosol para encontrar la segunda enzima. En cuanto ha terminado la primera reacción empieza la segunda. Algunos grandes agregados enzimáticos realizan toda una serie de reacciones sin perder el contacto con el substrato. Por ejemplo, la transformación del piruvato en acetil CoA ocurre en tres pasos químicos que se producen sobre el mismo gran complejo enzimático (Figura 2-41); en la síntesis de los ácidos grasos, una secuencia de reacciones aún más larga está catalizada por un único conjunto de enzimas. No resulta sorprendente que algunos de los mayores complejos enzimáticos estén destinados a la síntesis de macromoléculas como las proteínas y el DNA.

El siguiente nivel de segregación espacial en las células se refiere al confinamiento de enzimas relacionadas funcionalmente dentro de la misma membrana o dentro de los compartimientos acuosos de un orgánulo que está rodeado por una membrana. El metabolismo oxidativo de la glucosa constituye un buen ejemplo de ello. Después de la glucolisis, el piruvato se transporta activamente desde el citosol hasta el compartimiento interno de la mitocondria, el cual contiene todas las enzimas y metabolitos que intervienen en el ciclo del ácido cítrico (Figura 2-42). Además la propia membrana mitocondrial interna contiene todas las enzimas que catalizan las reacciones siguientes de la fosforilación oxidativa, incluidas las enzimas implicadas en la transferencia de electrones desde el NADH al O_2 y las implicadas en la síntesis del ATP. Por consiguiente, la mitocondria puede ser considerada como una pequeña fábrica productora de ATP. Análogamente, otros orgánulos celulares, como el núcleo, el complejo de Golgi y los lisosomas, pueden ser considerados como compartimientos especializados donde se encuentran confinadas enzimas relacionadas funcionalmente y que realizan tareas específicas. En cierto sentido, la célula viva es como una ciudad, con muchos servicios especializados concentrados en diferentes áreas, intensamente interconectadas por diversas vías de comunicación.

La organización espacial de los organismos pluricelulares se extiende más allá de la célula individual. Los diferentes tejidos del cuerpo tienen diferentes grupos de enzimas y realizan contribuciones distintas a la química del organismo completo. Además de las diferencias entre los diferentes tipos de células de un mismo organismo en cuanto a productos especializados como las hormonas o los anticuerpos, también existen diferencias considerables en cuanto a las vías metabólicas "habituales". Aunque prácticamente todas las células contienen las enzimas de la glucolisis, del ciclo del ácido cítrico, de la síntesis y de la degradación de los lípidos y del metabolismo de los aminoácidos, los niveles de estos procesos en los diferentes tejidos están regulados de forma diferente. Las células nerviosas, que probablemente son las células más exigentes del cuerpo, carecen casi totalmente de reservas de glucógeno y de ácidos grasos, dependiendo casi por completo del aporte de glucosa de la sangre. Las células hepáticas proporcionan glucosa a las fibras musculares que se contraen activamente, y reciclan de nuevo a glucosa el ácido láctico producido por estas células musculares (Figura 2-43). Todos los tipos de células tienen sus rasgos metabólicos característicos y cooperan intensamente, tanto en el estado normal como en la respuesta al ejercicio, al estrés y al hambre.

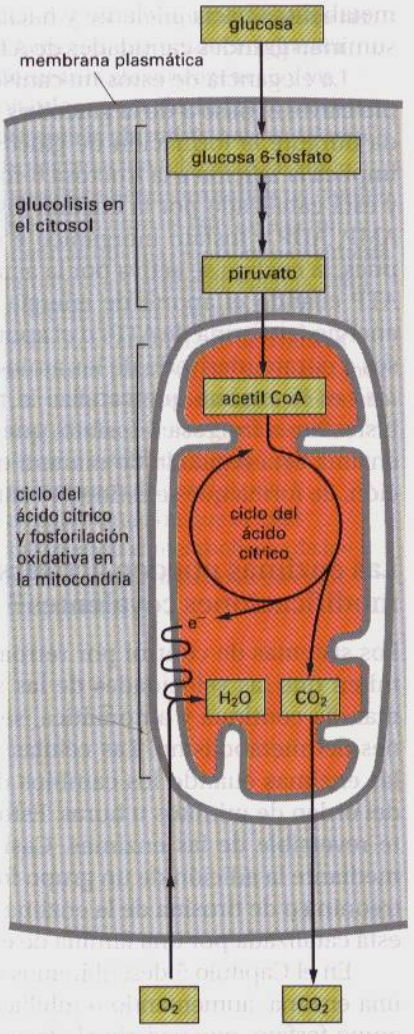


Figura 2-42 Segregación de los diversos pasos de la degradación de la glucosa en la célula eucariota. La glucolisis se produce en el citosol, mientras que las reacciones del ciclo del ácido cítrico y de la fosforilación oxidativa ocurren únicamente en las mitocondrias.

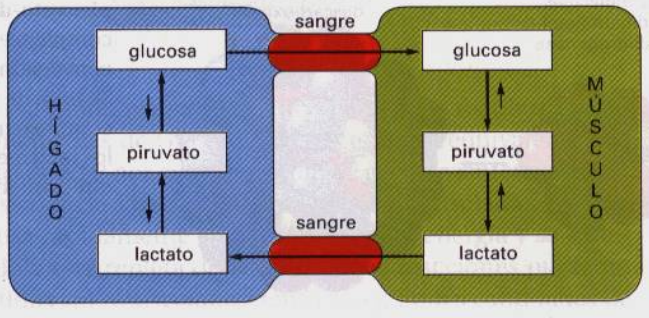


Figura 2-43 Representación esquemática de la cooperación metabólica entre las células hepáticas y las fibras musculares. El principal combustible de las fibras musculares en activa contracción es la glucosa, gran parte de la cual está suministrada por las células hepáticas. El ácido láctico, producto final de la degradación anaeróbica de la glucosa por glucolisis en el músculo, se transforma de nuevo en glucosa en el hígado mediante el proceso de gluconeogénesis.

Resumen

Los muchos miles de reacciones químicas distintas realizadas simultáneamente por una célula están estrechamente coordinadas. Diversos mecanismos de control regulan las actividades de las enzimas clave, en respuesta a las condiciones cambiantes de la célula. Una forma muy común de regulación estriba en la inhibición por retroalimentación, rápidamente reversible, ejercida por el producto final sobre la primera enzima de una vía. Una forma más prolongada de regulación implica la modificación química de una enzima por otra enzima, a menudo mediante fosforilación. Combinaciones de mecanismos reguladores pueden producir cambios importantes y prolongados en el metabolismo de la célula. No todas las reacciones celulares se producen dentro del mismo compartimiento intracelular, de forma que la segregación espacial, mediante membranas internas, permite que los orgánulos se especialicen en tareas bioquímicas.

Bibliografía

General

Becker, W.M.; Deamer, D.W. The World of the Cell, 2nd ed. Redwood City, CA: Benjamin-Cummings, 1991.

Herriott, J.; Jacobson, G.; Marmur, J.; Parsom, W. Papers in Biochemistry. Reading. MA: Addison-Wesley, 1984.

Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. Principios de Bioquímica, 2.ª ed. Barcelona: Ediciones Omega, S.A., 1993

Mathews, C.K.; van Holde, K.E. Biochemistry. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings, 1990.

Stryer, L. Biochemistry, 3rd ed. New York: W.H. Freeman, 1988.

Citas

1. Atkins, P.W. Molecules. New York: Scientific American Library, 1987.

   Henderson, L.J. The Fitness of the Environment. Boston: Beacon, 1927; reimpresión 1958. (Un análisis clásico y de fácil lectura.)

2. Ingraham, J.L.; Maaløe, O.; Neidhardt, F.C. Growth of the Bacterial Cell. Sunderland, MA: Sinauer, 1983.

3. Sharon, N. Carbohydrates. *Sci. Am.* 243(5):90-116, 1980.

4. Robertson, R.N. The Lively Membranes. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1983.

5. Branden, C.; Tooze, J. Introduction to Protein Structure. New York: Garland, 1991.

6. Saenger, W. Principles of Nucleic Acid Structure. New York: Springer, 1984.

7. Hess, B.; Markus, M. Order and chaos in biochemistry. *Trends Biochem. Sci.* 12:45-48, 1987.

   Schrödinger, E. What Is Life? Mind and Matter. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1969.

8. Atkins, P.W. The Second Law. New York: Scientific American Books, 1984.

   Dickerson, R.E. Molecular Thermodynamics. Menlo Park, CA: Benjamin, 1969.

   Klotz, I.M. Energy Changes in Biochemical Reactions. New York: Academic Press, 1967.

9. Youvan, D.C.; Marrs, B.L. Molecular mechanisms of photosynthesis. *Sci. Am.* 256(6):42-49, 1987.

10. Leehninger, A.L. Bioenergetics: The molecular Basis of Biological Energy Transformations, 2nd ed. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings, 1971.

    Racker, E. From Pasteur to Mitchell: a hundred years of bioenergetics. *Fed. Proc.* 39:210-215, 1980.

11. Fothergill-Gilmore, L.A. The evolution of the glycolytic pathway. *Trends Biochem. Sci.* 11:47-51, 1986.

12. Lipmann, F. Wanderings of a Biochemist. New York: Wiley, 1971.

13. Schlenk, F. The ancestry, birth and adolescence of ATP. *Trends Biochem. Sci.* 12:367-368, 1987.

14. Abeles, R.H.; Frey, P.A.; Jencks, W.P. Biochemistry. Boston: Jones and Bartlett, 1992.

    McGilvery, R.W. Biochemistry: A Functional Approach, 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1983.

15. Kornberg, H.L. Tricarboxylic acid cycles. *Bioessays* 7:236-238, 1987.

    Krebs, H.A. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14:154-170, 1970.

    Krebs, H.A.; Martin, A. Reminiscences and Reflections. Oxford, UK: Clarendon Press; New York: Oxford University Press, 1981.

16. Pullman, M.E., et al. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosporylation. *J. Biol. Chem.* 235:3322-3329, 1960.

17. Prigogine, I.; Stengers, I. Order out of Chaos: Man's New Dialogue with Nature. New York: Bantam Books, 1984.

18. Eisenberg, D.; Crothers, D. Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings, 1979.

    Kauzmann, W. Thermodynamics and Statistics: With Applications to Gases. New York: Benjamin, 1967.

19. Martin, B.R. Metabolic Regulation: A Molecular Approach. Oxford, UK; Blackwell Scientific, 1987.

    Newsholme, E.A.; Start, C. Regulation in Metabolism. New York: Wiley, 1973.

20. Pardee, A.B. Molecular basis of biological regulation: origins of feedback inhibition and allostery. *Bioessays* 2:37-40, 1985.

21. Hess, B. Oscillating reactions. *Trends Biochem. Sci.* 2:193-195, 1977.

22. Cohen, P. Control of Enzyme Activity, 2nd ed. London: Chapman and Hall, 1983.

    Koshland, D.E., Jr. Switches thresholds and ultrasensitivity. *Trends Biochem. Sci.* 12:225-229, 1987.

23. Banks, P.; Bartley, W.; Birt, M. The Biochemistry of the Tissues, 2nd ed. New York: Wiley, 1976.

    Sies, H. Metabolic Compartmentation. New York: Academic Press, 1982.

Cómo se estudian las células

4

- Observación de la estructura de las células con el microscopio
- Aislamiento y crecimiento de células en cultivo
- Fraccionamiento de las células y análisis de sus moléculas
- Siguiendo el rastro y cuantificando las moléculas del interior de las células

Las células son pequeñas y complejas. Resulta difícil observar su estructura y descubrir su composición molecular, pero todavía resulta más difícil dilucidar cómo funcionan sus componentes. Lo que podemos aprender sobre las células depende de las herramientas que tengamos a nuestra disposición; de hecho, los mayores avances de la ciencia son frecuentemente fruto de la introducción de nuevas técnicas de estudio. Por consiguiente, para entender la biología celular contemporánea es necesario conocer algo acerca de estos métodos de estudio.

En este capítulo vamos a revisar brevemente algunos de los principales métodos usados para estudiar las células. Empezaremos con las técnicas utilizadas para examinar las células como un todo y después continuaremos con las técnicas utilizadas para analizar sus constituyentes macromoleculares. Nuestro punto de partida será la microscopia; la biología celular empezó con la microscopia óptica, la cual todavía es una herramienta esencial, junto con los imaginativos inventos más recientes basados en haces de electrones y otras formas de radiación. Desde la observación pasiva, nos desplazaremos hasta la intervención activa: consideraremos cómo las células de diferentes tipos pueden ser separadas de los tejidos y crecer fuera del cuerpo, y cómo se pueden romper las células y aislar de forma pura sus orgánulos y constituyentes macromoleculares. Por último, discutiremos cómo podemos detectar, seguir y cuantificar los tipos individuales de moléculas e iones en el interior de la célula. La tecnología del DNA recombinante ha revolucionado nuestro conocimiento sobre la función celular, pero debido a que se trata de un apartado importante en sí mismo y depende del conocimiento de los mecanismos genéticos básicos, este conjunto de poderosos métodos se considera en detalle en el Capítulo 7.

A pesar de que los métodos tienen una importancia básica, lo que resulta realmente interesante es lo que nos permiten descubrir. Por lo tanto, proponemos que el presente capítulo se utilice como referencia y se lea en conjunción con los últimos capítulos del libro, más que como una introducción a ellos.

Observación de la estructura de las células con el microscopio[1]

Una célula animal típica mide entre 19 y 20 μm de diámetro, es decir, unas cinco veces menos que la menor partícula visible a simple vista. Por ello, hasta que no se dispuso de buenos microscopios ópticos, a principios del siglo XIX, no se descubrió que todos los tejidos vegetales y animales son agregados de células. Este descubrimiento, propuesto por Schleiden y Schwann en 1838 como la **teoría celular**, marca el nacimiento formal de la biología celular.

Las células animales no sólo son diminutas, sino que también son incoloras y traslúcidas; por ello, el descubrimiento de las principales características internas de las células dependió del hallazgo, a finales del siglo XIX, de diversos colorantes que proporcionaron el contraste suficiente para hacerlas visibles. A principios de los años 1940 se desarrolló el microscopio electrónico, mucho más poderoso que el óptico. Sin embargo, antes de que su utilización permitiera el conocimiento detallado de las complejidades de la estructura interna de la célula, se hizo necesario el desarrollo de nuevas técnicas para la preservación y coloración de las células. Hasta ahora la microscopia depende tanto de las técnicas para la preparación del espécimen como del rendimiento del propio microscopio. En las secciones que siguen, vamos a discutir tanto los instrumentos como la preparación de las muestra, y empezaremos por el microscopio óptico.

La Figura 4-1 muestra el grado de detalle que puede alcanzarse con la microscopia óptica moderna en comparación con el de la microscopia electrónica. En la Tabla 4-1 se resumen algunos de los hitos históricos en el desarrollo de la microscopia óptica.

Tabla 4-1 Algunos descubrimientos en la historia de la microscopia óptica

1611 **Kepler** sugirió una manera de construir un microscopio compuesto.

1655 **Hooke** utilizó un microscopio compuesto para descubrir unas pequeñas celdillas en cortes de corcho, a las que denominó "células".

1674 **Leeuwenhoek** informó de su descubrimiento de los protozoos. Nueve años más tarde observó bacterias por primera vez.

1833 **Brown** publicó sus observaciones microscópicas de las orquídeas y describió claramente el núcleo celular.

1838 **Schleiden** y **Schwann** propusieron la teoría celular, afirmando que la célula nucleada es la unidad estructural y funcional de las plantas y de los animales.

1857 **Kolliker** describió las mitocondrias de las células musculares.

1876 **Abbé** analizó los efectos de la difracción en la formación de la imagen en el microscopio y mostró la manera de optimizar el diseño de los microscopios.

1879 **Flemming** describió con gran claridad el comportamiento de los cromosomas durante la mitosis de las células animales.

1881 **Retzius** describió muchos tejidos animales con una precisión que todavía no ha sido superada por ningún especialista de microscopia óptica. En las dos décadas siguientes, tanto él como **Cajal** y otros histólogos diseñaron métodos de tinción y establecieron las bases de la anatomía microscópica.

1882 **Koch** utilizó colorantes de anilina para teñir microorganismos e identificó las bacterias que causan la tuberculosis y el cólera. En las dos décadas siguientes otros bacteriólogos como **Klebs** y **Pasteur** identificaron los agentes causantes de otras muchas enfermedades, examinando al microscopio preparaciones teñidas.

1886 **Zeiss** construyó una serie de lentes, siguiendo las leyes de **Abbé**, que permitieron a los especialistas en microscopia la resolución de estructuras situadas en los límites teóricos de la resolución de la luz visible.

1898 **Golgi** observó y descubrió por primera vez el complejo de Golgi, impregnando las células con nitrato de plata.

1924 **Lacassagne** y colaboradores desarrollaron la primer técnica autorradiográfica para localizar el polonio radiactivo en muestras biológicas.

1930 **Lebedeff** diseñó y construyó el primer microscopio de contraste interferencial. En 1932 **Zernicke** inventó el microscopio de contraste de fases. Estos adelantos permitieron observar por primera vez en detalle células vivas no teñidas.

1941 **Coons** utilizó anticuerpos acoplados a colorantes fluorescentes para detectar antígenos celulares.

1952 **Nomarski** ideó y patentó el sistema de contraste interferencial para el microscopio óptico, que aún lleva su nombre.

1981 **Allen** e **Inoué** perfeccionaron la microscopia óptica de contraste vídeo-amplificada.

1988 Se generaliza el uso de los microscopios de rastreo confocal.

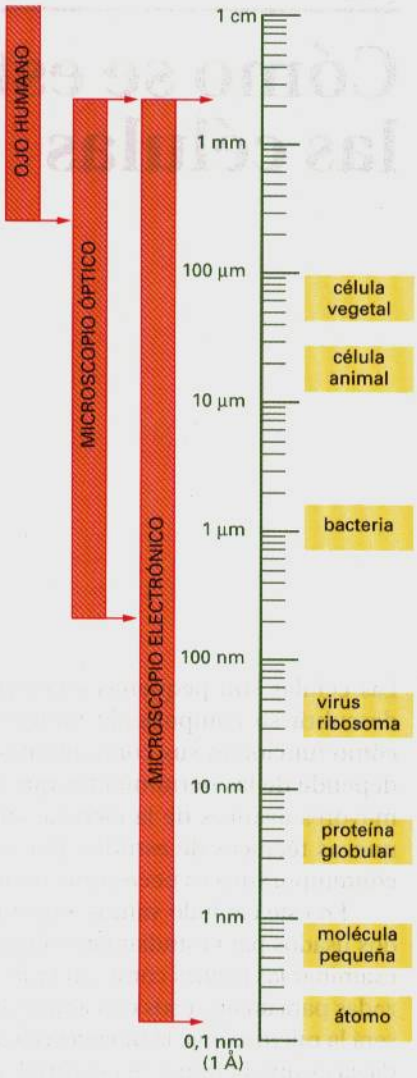


Figura 4-1 Poder de resolución. Tamaños de las células y de sus componentes, dibujados sobre una escala logarítmica, indicando el intervalo de resolución del ojo humano y de los microscopios óptico y electrónico. En microscopia se utilizan normalmente las siguientes unidades de longitud:

µm (micrómetro) = 10^{-6} m
nm (nanómetro) = 10^{-9} m
Å (unidad Ångström) = 10^{10} m

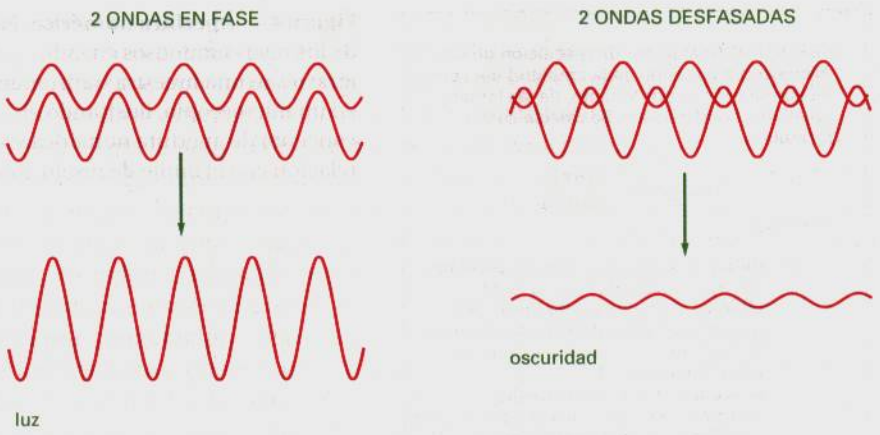


Figura 4-2 Interferencia entre ondas luminosas. Cuando dos ondas de luz se combinan *en fase*, la amplitud de la onda resultante es mayor y la luminosidad queda incrementada. Dos ondas de luz *desfasadas* se anulan parcialmente una a otra, produciendo una onda de menor amplitud, y por consiguiente, de menor intensidad luminosa.

El microscopio óptico puede resolver detalles situados a 0,2 µm de distancia[2]

En general, un haz de una radiación de una longitud de onda determinada no puede utilizarse para examinar detalles estructurales mucho más pequeños que su propia longitud de onda: esto supone una limitación fundamental de los microscopios. Así pues, el límite de resolución de un microscopio óptico está determinado por la longitud de onda de la luz visible, que abarca desde 0,4 µm (para el violeta) hasta 0,7 µm (para el rojo lejano). En la práctica, las bacterias y las mitocondrias, que tienen aproximadamente 500 nm (0,5 µm) de diámetro, son las estructuras más pequeñas que se pueden observar nítidamente al microscopio óptico; los detalles más pequeños que estas dimensiones quedan oscurecidos por los efectos de la naturaleza ondulatoria de la luz. Para comprender el porqué de este efecto, hemos de estudiar lo que le sucede a un haz de ondas luminosas cuando atraviesa las lentes de un microscopio.

Dada su naturaleza ondulatoria, la luz no sigue exactamente la línea recta idealizada de sus rayos predicha por la óptica geométrica. Por el contrario, cuando las ondas luminosas viajan a través de un sistema óptico lo hacen por una diversidad de rutas ligeramente diferentes, de manera que se interfieren entre ellas generando efectos *ópticos de difracción*. Si dos trenes de ondas que alcanzan el mismo punto por diferentes caminos están exactamente en fase, con coincidencia de las crestas y de los senos, se refuerzan el uno al otro aumentando la luminosidad. Por el contrario, si los trenes de ondas están desfasados, interfieren uno con otro y se anulan total o parcialmente (Figura 4-2). La incidencia de la luz sobre un objeto altera las relaciones de fase de las ondas luminosas, produciendo complejos efectos de interferencia. A gran aumento la sombra de un borde recto, por ejemplo, iluminado con una luz de longitud de onda uniforme, aparece como un conjunto de líneas paralelas, mientras que la de una mancha circular aparece como un conjunto de anillos concéntricos (Figura 4-3). Por la misma razón, observado a través del microscopio un punto aparece como un disco borroso, mientras que dos objetos puntuales próximos entre sí ofrecen imágenes superpuestas y pueden llegar a confundirse en una sola imagen. La perfección de las lentes, por alta que sea, no puede superar esta limitación impuesta por la naturaleza ondulatoria de la luz.

La separación límite a la que dos objetos pueden verse separados –conocida como **límite de resolución**– depende tanto de la longitud de onda de la luz como de la apertura numérica de las lentes del sistema utilizado (Figura 4-4). En las mejores condiciones posibles: con luz violeta (longitud de onda, $\lambda = 0{,}4$ µm) y una apertura numérica de 1,4, el límite de resolución teórico que se puede obtener con el microscopio óptico es tan sólo de 0,2 µm. Esta resolución ya fue alcanzada por los fabricantes de microscopios a finales del siglo XIX y con los microscopios contemporáneos producidos en serie, muy raramente se alcanza. Aunque es posible

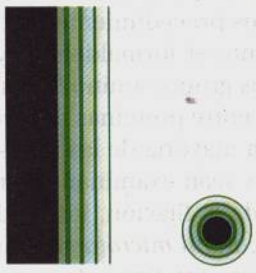
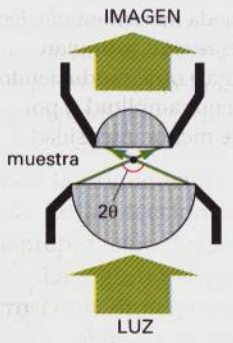


Figura 4-3 Efectos de borde. Efectos de interferencia observados a gran aumento cuando la luz pasa por el borde de un objeto sólido colocado entre la fuente de luz y el observador.

LENTES



la lente objetivo colecta un cono de luz generando una imagen

la lente condensador enfoca un cono de rayos luminosos en cada uno de los puntos de la muestra

RESOLUCIÓN: el poder de resolución de un microscopio depende de la amplitud del cono de iluminación y, por lo tanto, de las lentes objetivo y condensador. Se calcula con la fórmula

$$\text{resolución} = \frac{0{,}61\,\lambda}{n \operatorname{sen} \theta}$$

en donde:

- θ = mitad de la anchura angular del cono de rayos colectados por la lente objetivo desde un punto típico de la muestra (como la maxíma anchura es de 180°, el valor de seno θ tiene un valor máximo de 1)
- n = índice de refracción del medio (normalmente aire o aceite) que separa la muestra de las lentes objetivo y condensador
- λ = longitud de onda de la luz utilizada (para luz blanca se utiliza normalmente el valor de 0,53 µm)

APERTURA NUMÉRICA: en la ecuación anterior, el valor n sen θ se denomina apertura numérica de las lentes (AN) y es una función de su capacidad de colectar la luz. Para lentes secas este valor no puede ser mayor de 1 pero para lentes sumergidas en aceite puede llegar a ser de 1,4. Cuanto mayor sea la apertura numérica mayor es la resolución y la brillantez de la imagen (la brillantez es importante en microscopia de fluorescencia). Sin embargo, esta ventaja se obtiene a expensas de distancias de trabajo muy cortas y de profundidades de campo muy pequeñas.

Figura 4-4 Apertura numérica. Paso de los rayos luminosos cuando atraviesan una muestra transparente en un microscopio, ilustrando el concepto de apertura numérica y su relación con el límite de resolución.

agrandar una imagen tanto como se desee –p. ej., proyectándola sobre una pantalla– nunca resulta posible resolver al microscopio óptico dos objetos que estén separados menos de 0,2 µm: dichos objetos aparecerán como uno solo.

Más adelante podremos ver cómo la interferencia y la difracción pueden ser utilizadas para estudiar células vivas sin teñir. En primer lugar vamos a estudiar cómo se pueden hacer preparaciones permanentes de células para su observación al microscopio y cómo se utilizan los colorantes químicos en estas preparaciones para incrementar la visibilidad de las estructuras celulares.

Para la observación microscópica, normalmente los tejidos son fijados y seccionados

Para hacer preparaciones permanentes que después puedan ser teñidas y visualizadas al microscopio, en primer lugar las células se han de tratar con un fijador que las inmovilice, las mate y las preserve. En términos químicos, la **fijación** hace a las células permeables a los colorantes y establece puentes cruzados entre sus moléculas, de modo que éstas queden estabilizadas y bloqueadas en su posición original. Algunos de los primeros procedimientos de fijación consistían en una breve inmersión en ácidos o en disolventes orgánicos tales como el alcohol. Los procedimientos actuales suelen comprender aldehídos activos, particularmente el formaldehído y el glutaraldehído, que forman enlaces covalentes con los grupos amino libres de las proteínas y por lo tanto forman puentes cruzados entre proteínas adyacentes.

La mayoría de las muestras de tejidos son demasiado gruesas para que sus células sean examinadas directamente a alta resolución. Por consiguiente, después de la fijación, los tejidos suelen ser cortados en finas rebanadas (**secciones**), con un *micrótomo*, una máquina dotada de una cuchilla de metal muy afilada que funciona de manera parecida a un cortafiambres (Figura 4-5). Las secciones que se utilizan para ser observadas al microscopio óptico, normalmente tienen entre 1 y 10 µm de grosor y son extendidas en la superficie de un portaobjetos.

Por lo general los tejidos son muy blandos y frágiles, incluso después de la fijación, de forma que antes de la obtención de los cortes, es necesario **incluirlos**

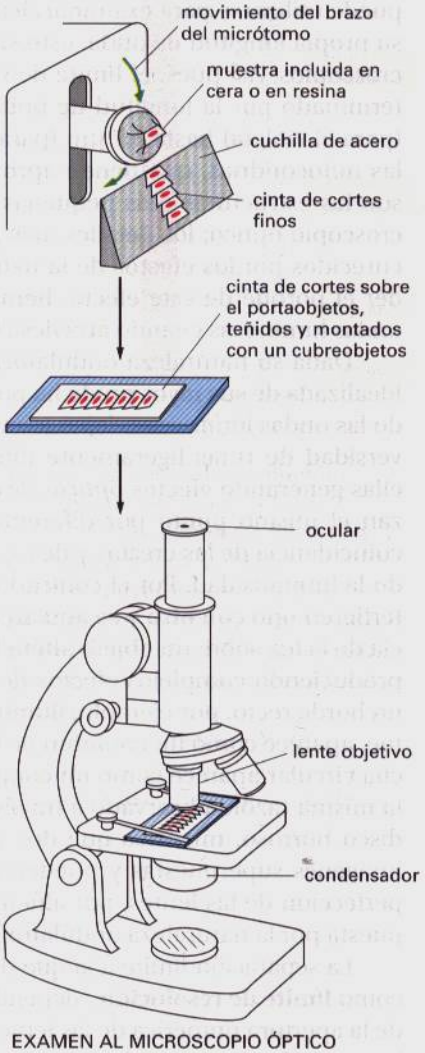


Figura 4-5 Obtención de secciones de un tejido. Un tejido incluido se corta con un micrótomo, como paso previo para su observación al microscopio óptico.

en un medio de soporte. Los medios más utilizados son ceras o resinas. En estado líquido, estos medios penetran y rodean todo el tejido; entonces, pueden ser endurecidos (por enfriamiento o por polimerización) para formar un bloque sólido que pueda ser cortado fácilmente con el micrótomo.

Existe el grave peligro de que cualquier tratamiento utilizado para la fijación pueda alterar de manera no deseada la estructura de la célula o sus constituyentes moleculares. La congelación rápida proporciona un método alternativo que, de alguna manera, evita este peligro eliminando la necesidad de fijación y de inclusión. El tejido congelado puede ser cortado directamente con un criostato –un micrótomo especial que se mantiene en una cámara fría. Aunque, las **secciones por congelación** conseguidas de esta manera tienen la ventaja de evitar algunos artefactos, pueden presentar otro tipo de complicaciones: la estructura nativa de algunas moléculas como las proteínas está bien conservada pero normalmente la estructura de las células se rompe por los cristales de hielo.

Habitualmente, el paso siguiente al de obtención de las secciones (por cualquier método) es su tinción.

Los diferentes componentes de la célula pueden ser teñidos selectivamente[3]

El contenido de la mayoría de las células (de las que el agua representa un 70% de su peso) no presenta demasiados elementos que impidan el paso de los rayos de luz. Por ello, casi todas las células en su estado natural, aunque estén fijadas y seccionadas, son casi invisibles al microscopio óptico convencional. Una manera de hacerlas visibles es teñirlas con colorantes orgánicos selectivos.

A principios del siglo XIX la demanda de colorantes para teñir los productos de la industria textil condujo a un período fértil para la química orgánica. Se observó que algunos de los colorantes teñían los tejidos biológicos y que sorprendentemente, a menudo mostraban una preferencia por determinados componentes de la célula –el núcleo o las membranas, por ejemplo– haciendo visibles estas estructuras internas. En la actualidad disponemos de una rica variedad de colorantes orgánicos, con nombres tan pintorescos como *verde de malaquita*, *negro Sudán* o *azul de Coomassie*, cada uno de los cuales presenta una afinidad específica por ciertos componentes celulares. El colorante *hematoxilina*, por ejemplo, tiene afinidad por las moléculas con carga negativa, y por ello revela la distribución del DNA, del RNA y de las proteínas ácidas de la célula (Figura 4-6). No obstante, desconocemos la base química de la especificidad de muchos colorantes.

Figura 4-6 Una sección de tejido teñida. Sección de piel humana, teñida con una combinación de colorantes, hematoxilina y eosina, que se utilizan habitualmente en histología.

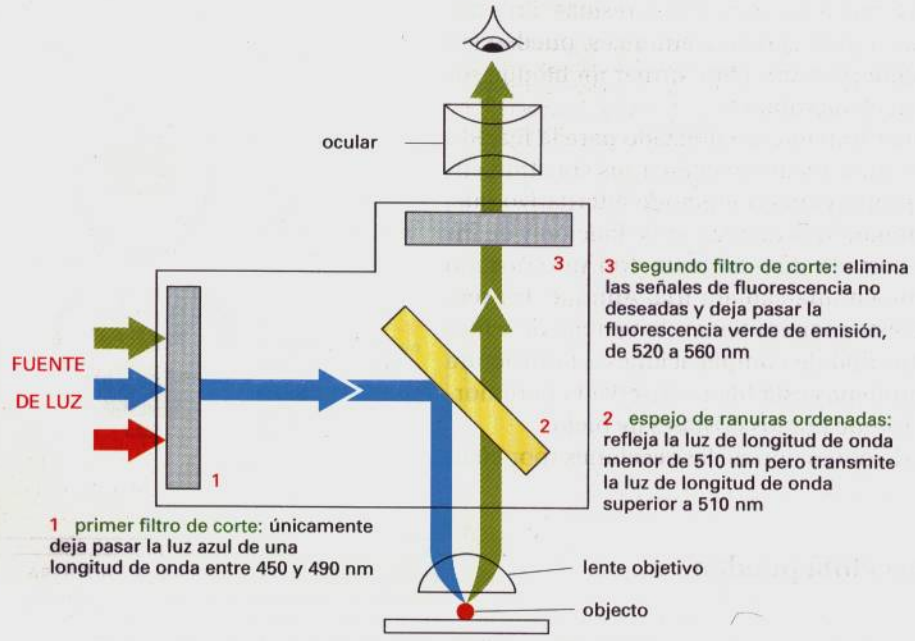


Figura 4-7 Sistema óptico de un moderno microscopio de fluorescencia. El juego de filtros consta de dos filtros de corte (1 y 3) y de un espejo dicroico (de ranuras ordenadas) (2). En este ejemplo se muestra un juego de filtros adecuado para la detección de la fluorescencia de la fluoresceína. En este tipo de microscopios es especialmente importante que la lente objetivo tenga una elevada apertura numérica, ya que para una amplificación dada la brillantez de la imagen fluorescente es proporcional a la cuarta potencia de la apertura numérica (véase también Figura 4-4).

La relativa falta de especificidad de estos colorantes a nivel molecular ha estimulado el diseño de procedimientos de tinción más racionales y selectivos y ha permitido en particular el desarrollo de métodos que revelan proteínas específicas y otras macromoléculas celulares. Existe, sin embargo, el problema de conseguir una sensibilidad adecuada para estos propósitos. Como una célula cualquiera presenta pocas copias de cada una de la mayoría de las macromoléculas, a menudo una o dos moléculas de colorante unidas a cada macromolécula resultan invisibles. Una posibilidad de resolver este problema consiste en incrementar el número de moléculas de colorante asociadas a cada macromolécula individual. Así, algunas enzimas pueden ser localizadas en las células mediante su actividad catalítica: cuando son expuestas a un substrato molecular apropiado, cada molécula de enzima genera muchas moléculas visibles de producto, las cuales pueden ser localizadas. Un método alternativo al problema de la sensibilidad consiste en la utilización de compuestos fluorescentes, como explicamos a continuación.

Mediante la microscopia de fluorescencia se pueden localizar moléculas en las células de forma específica[4]

Las moléculas fluorescentes absorben la luz de una determinada longitud de onda y emiten luz de otra longitud de onda más larga. Si un componente de este tipo es iluminado a su longitud de onda absorbente y visualizado a través de un filtro que sólo permita pasar la luz de longitud de onda igual a la de la luz emitida, el componente aparece brillante sobre un fondo oscuro. La intensidad y el color de la luz es una propiedad característica de la molécula fluorescente utilizada.

Los colorantes fluorescentes utilizados para la tinción celular son detectados con la ayuda del **microscopio de fluorescencia**. Este microscopio es similar al microscopio convencional, a excepción de que la luz incidente, procedente de una potente fuente, atraviesa dos series de filtros –uno para interceptar la luz antes de que llegue a la muestra y otro para filtrar la luz obtenida a partir de la muestra. El primer filtro se selecciona de manera que sólo permita el paso de las longitudes de onda que excitan a un determinado colorante fluorescente, mientras que el segundo filtro bloquea esta luz y permite el paso de las longitudes de onda emitidas cuando el colorante emite fluorescencia (Figura 4-7).

La microscopia de fluorescencia se utiliza habitualmente para detectar específicamente proteínas u otras moléculas en células y tejidos. Una técnica muy

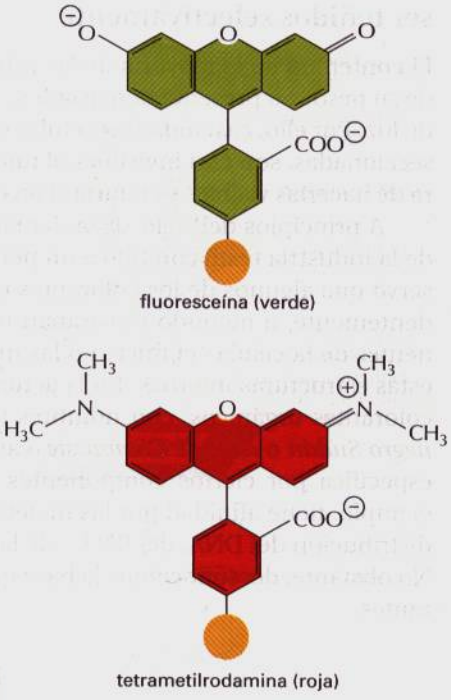


Figura 4-8 Colorantes fluorescentes. Estructura de la fluoresceína y de la tetrametilrodamina, dos colorantes utilizados habitualmente en microscopia de fluorescencia. La fluoresceína emite luz amarillo-verdosa cuando se activa con luz de una longitud de onda adecuada, mientras que la rodamina emite luz roja. Las zonas de las moléculas que se señalan en *naranja* indican la posición de un grupo químicamente reactivo; normalmente, en esta posición se forma un enlace covalente entre el colorante y una proteína (u otra molécula). Diferentes versiones comerciales de estos colorantes con diferentes tipos de grupos reactivos permite utilizarlos como diana de grupos –SH o de grupos $-NH_2$ de proteínas.

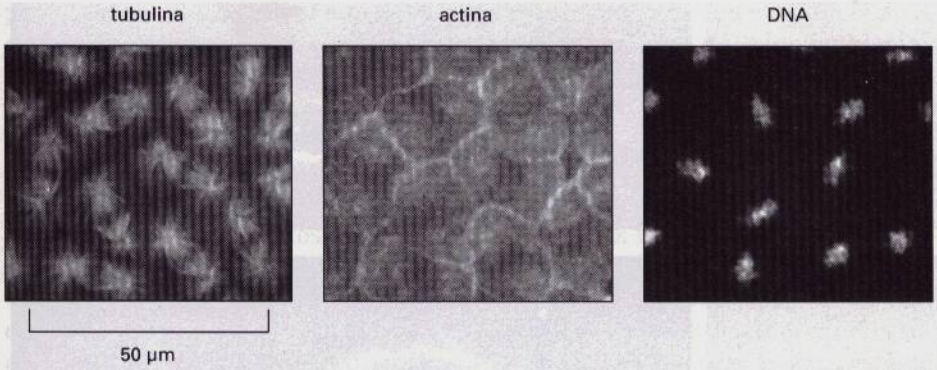


Figura 4-9 Microscopia de fluorescencia. Micrografías de una zona de la superficie de un embrión temprano de *Drosophila*, en el que se han marcado los microtúbulos con un anticuerpo acoplado a fluoresceína (*panel de la izquierda*) y los filamentos de actina con un anticuerpo acoplado a rodamina (*panel central*). Además, los cromosomas se han marcado con un tercer colorante que únicamente emite fluorescencia cuando se une a DNA (*panel de la derecha*). En este estadio, todos los núcleos del embrión comparten un mismo citoplasma, y están en el estadio de metafase de la mitosis. Las tres micrografías fueron tomadas en la misma región de un embrión fijado, utilizando tres juegos de filtros diferentes en el microscopio de fluorescencia (véase también Figura 4-7). (Por cortesía de Tim Karr.)

utilizada y potente consiste en acoplar covalentemente un colorante fluorescente a moléculas de un anticuerpo, el cual se puede utilizar entonces como un reactivo muy específico y versátil que se une selectivamente a las macromoléculas que reconoce en las células o en la matriz extracelular. Con esta finalidad, frecuentemente se utilizan dos colorantes fluorescentes: la *fluoresceína*, que cuando es excitada por luz azul emite una fluorescencia amarillo-verdosa intensa, y la *rodamina*, que cuando es excitada con una luz verde-amarilla emite una fluorescencia de color rojo intenso (Figura 4-8). Acoplando una molécula a la fluoresceína y otra a la rodamina, en la misma célula puede determinarse la distribución de dos moléculas diferentes; ambas moléculas son detectadas separadamente en el microscopio cambiando las dos series de filtros, uno específico para cada colorante. Como se muestra en la Figura 4-9, de la misma forma se pueden utilizar tres colorantes fluorescentes para distinguir tres tipos de moléculas en la misma célula.

Actualmente se han desarrollado importantes métodos, que explicaremos posteriormente, que capacitan a la microscopia de fluorescencia para seguir cambios en la concentración y en la localización de moléculas específicas en el interior de la célula *viva* (véase pág. 195).

Las células vivas se pueden observar con nitidez en un microscopio de contraste de fases o de contraste de fases interferencial[2, 5]

La posibilidad de que algunos componentes de la célula puedan perderse o distorsionase durante la preparación de las muestras no ha dejado de preocupar a los especialistas en microscopia. La única solución a este problema es examinar

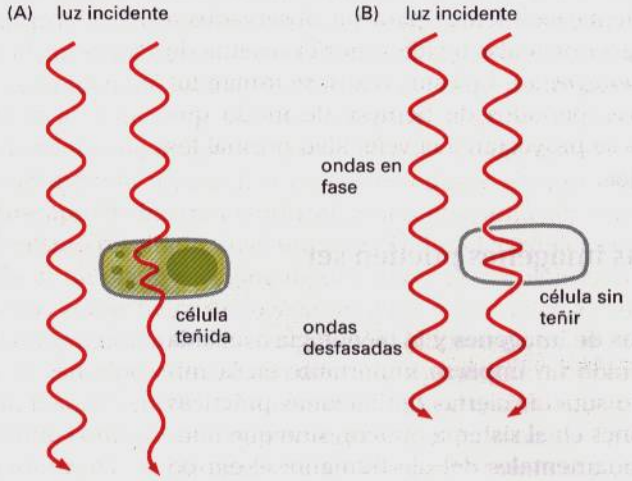


Figura 4-10 Dos sistemas para incrementar el contraste en el microscopio óptico. En (A), las zonas teñidas de la célula reducen la amplitud de las ondas luminosas de una longitud de onda determinada que pasan a través de ellas. De esta forma se obtiene una imagen en color de la célula, visible mediante la observación habitual. En (B), la luz que pasa a través de la célula viva, no teñida, no sufre ningún cambio importante de amplitud y, por consiguiente, muchos de sus detalles no se pueden observar directamente, aunque se amplifique enormemente la imagen; sin embargo, se producen cambios de *fase* en las ondas luminosas cuando éstas pasan través de la célula, y estas alteraciones pueden hacerse visibles aprovechando efectos de interferencia utilizando un microscopio de contraste de fases o de contraste de fases interferencial.

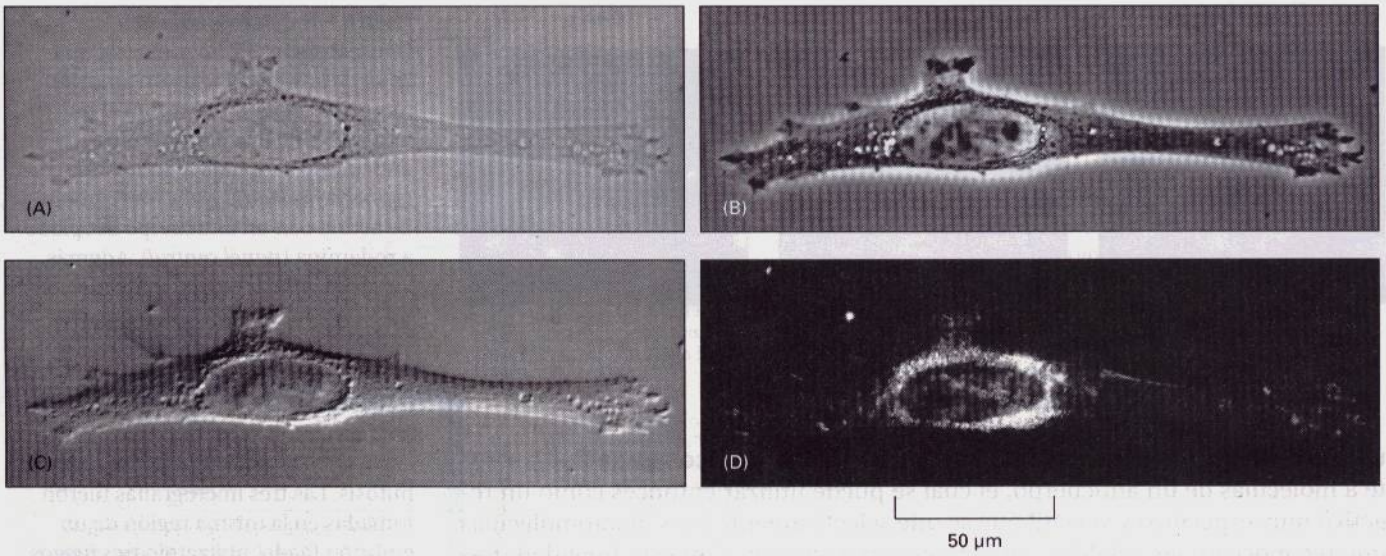


Figura 4-11 Cuatro tipos de microscopio óptico. (A) Imagen de un fibroblasto en cultivo obtenida mediante la transmisión directa de luz a través de la célula, técnica conocida como *microscopia de campo claro*. Las otras imágenes fueron obtenidas utilizando las técnicas descritas en el texto: (B) microscopia de contraste de fases; (C) microscopia de contraste de fases interferencial de Nomarski; y (D) microscopia de campo oscuro. Con los microscopios más modernos se pueden obtener los cuatro tipos de imágenes, simplemente cambiando algunos de los sistemas ópticos.

las células mientras aún están vivas, sin ningún tipo de fijación ni de congelación. Para este propósito son útiles microscopios con sistemas ópticos especiales.

Cuando la luz pasa a través de una célula viva, la fase de la onda luminosa varía en relación al índice de refracción de la célula: la luz que pasa a través de una zona relativamente gruesa o densa de la célula, como por ejemplo el núcleo, se retrasa y su fase queda desplazada de forma correspondiente respecto a la de la luz que ha pasado a través de una región adyacente de citoplasma, más fina. El **microscopio de contraste de fases** y el **microscopio de contraste de fases interferencial** aprovechan los efectos de interferencia que se producen cuando se combinan estos dos grupos de ondas, creando de esta forma una imagen de la estructura celular (Figura 4-10). Ambos tipos de microscopios ópticos se utilizan habitualmente para visualizar células vivas.

Una manera más sencilla de observar algunas de las características de una célula no teñida consiste en utilizar luz dispersada por sus diversos componentes. En el **microscopio de campo oscuro**, los rayos luminosos del sistema de iluminación son dirigidos desde la parte lateral, por lo que sólo penetra en las lentes del microscopio la luz dispersada. Por consiguiente, la célula aparece como un objeto iluminado sobre un fondo negro. La Figura 4-11 muestra imágenes de una misma célula obtenidas mediante cuatro tipos diferentes de microscopios ópticos.

Una de las grandes ventajas del microscopio de contraste de fases, del microscopio de contraste de fases interferencial y del microscopio de campo oscuro estriba en que los tres permiten observar las células en acción y estudiar los movimientos implicados en procesos como la mitosis o la migración celular. Puesto que muchos movimientos son demasiado lentos para ser observados a tiempo real, normalmente resulta útil hacer películas o vídeos por el sistema de aceleración de movimiento (*microcinematografía*). En estos casos, se toman fotografías sucesivas, separadas por breves períodos de tiempo, de modo que cuando la película o el video registrados se proyectan a la velocidad normal los acontecimientos aparecen muy acelerados.

Mediante técnicas electrónicas las imágenes pueden ser amplificadas y analizadas[6]

Recientemente, los **sistemas electrónicos de imágenes** y la tecnología asociada de **procesamiento de imágenes** han tenido un impacto importante en la microscopia óptica. No sólo han permitido superar ciertas limitaciones prácticas de los microscopios (debidas a limitaciones en el sistema óptico), sino que también han superado dos limitaciones fundamentales del ojo humano: el ojo no

puede ver luz extremadamente débil y no puede percibir pequeñas diferencias en intensidad de luz sobre un fondo brillante. El primero de estos problemas puede solucionarse adaptando a un microscopio una cámara de vídeo altamente sensible a la luz (del tipo de las que se utilizan para vigilancia nocturna). Con ello es posible observar células durante largos períodos de tiempo y con muy baja intensidad de luz, evitando de esta manera los efectos dañinos de la luz intensa (y caliente) prolongada. Estos sistemas de *intensificación de imágenes* son especialmente importantes para visualizar moléculas fluorescentes en las células vivas.

Dado que las imágenes producidas por las cámaras de vídeo son de tipo electrónico, pueden ser digitalizadas, introducidas en un ordenador y procesadas de varios modos para extraer información latente en estas imágenes. Este procesamiento de la imagen hace posible la compensación de los fallos ópticos de los microscopios, pudiendo alcanzar el límite teórico de resolución del microscopio óptico. Por otra parte, utilizando sistemas de vídeo acoplados a procesadores de imágenes puede incrementarse el contraste, superándose las limitaciones del ojo en la detección de pequeñas diferencias. A pesar de que este procesamiento también incrementa los efectos aleatorios de las irregularidades del sistema óptico, este "ruido" puede eliminarse electrónicamente restando una imagen de un área en blanco del campo de observación. De esta manera, pequeños objetos transparentes que antes eran imposibles de distinguir del fondo, pueden ser visibles.

El alto contraste alcanzable en la microscopia de interferencia asistida por ordenador hace posible la visualización de pequeños objetos tales como microtúbulos (Figura 4-12), los cuales tienen un diámetro de 0,025 µm, menor de una décima parte de la longitud de onda de la luz. Los microtúbulos individuales también pueden ser vistos en un microscopio de fluorescencia si previamente han sido marcados con fluorescencia (véase Figura 4-62). En ambos casos, sin embargo, los inevitables efectos de difracción dan una imagen altamente borrosa, de forma que estos microtúbulos aparecen con un diámetro de al menos 0,2 µm, lo cual hace imposible distinguir un microtúbulo sencillo de un haz de varios microtúbulos.

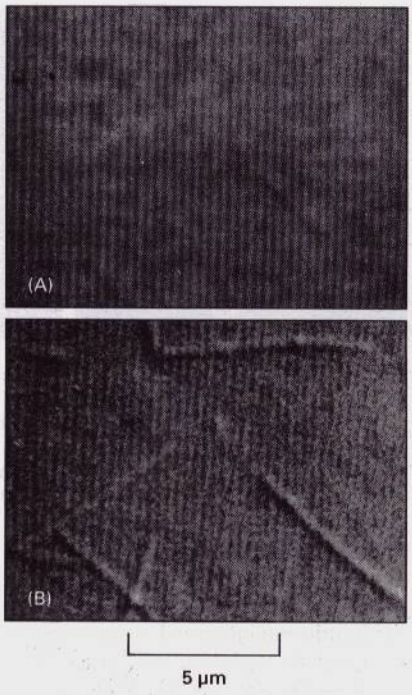


Figura 4-12 Ampliando los límites de detección. Imágenes al microscopio electrónico de microtúbulos no teñidos, visualizados por microscopia de contraste de fases interferencial seguida de un procesamiento electrónico de imágenes. (A) Imagen original no procesada. (B) Resultado final del proceso electrónico que incrementa marcadamente el contraste y reduce el "ruido". A pesar de que los microtúbulos únicamente tienen 0,025 µm de diámetro, aparecen como unos filamentos más gruesos debido a efectos de difracción. (Por cortesía de Bruce Schnapp.)

Gracias al microscopio de barrido confocal es posible obtener imágenes de complejos objetos tridimensionales[7]

Como hemos visto, para poder observar un tejido al microscopio óptico convencional, se ha de cortar en finas secciones; cuanto más finas sean las secciones más definidas serán las imágenes. En el proceso de obtención de las secciones, sin embargo, se pierde información respecto a la tercera dimensión. ¿Cómo entonces se puede obtener una imagen de la arquitectura tridimensional de una célula o de un tejido? ¿Cómo se puede ver la estructura tridimensional de una muestra que por una u otra razón no puede haber sido previamente cortada en secciones? Si se observa una muestra fina con un microscopio óptico convencional, la imagen obtenida al enfocar un nivel determinado resulta degradada y borrosa por la información que queda fuera de foco de las zonas de la muestra situadas encima y debajo del plano focal. A pesar de que este problema se puede superar mediante complejos procesadores de imágenes aplicados a las imágenes de los diferentes planos focales, el método resulta lento y costoso desde el punto de vista informático. El **microscopio de barrido confocal** aporta otra solución, más directa, para conseguir el mismo resultado final: utiliza métodos electrónicos de imagen que permiten enfocar un plano escogido de una muestra fina eliminando la luz que proviene de las zonas fuera de foco superiores e inferiores a este plano. Así se obtiene una imagen nítida de una fina *sección óptica*. A partir de series de secciones ópticas de este tipo obtenidas a diferentes profundidades, archivadas en un ordenador, resulta sencillo reconstruir una imagen tridimensional. El microscopio de barrido confocal es para los microscopistas lo que la TAC (tomografía axial computadorizada) de barrido fue (por diferentes razones) para

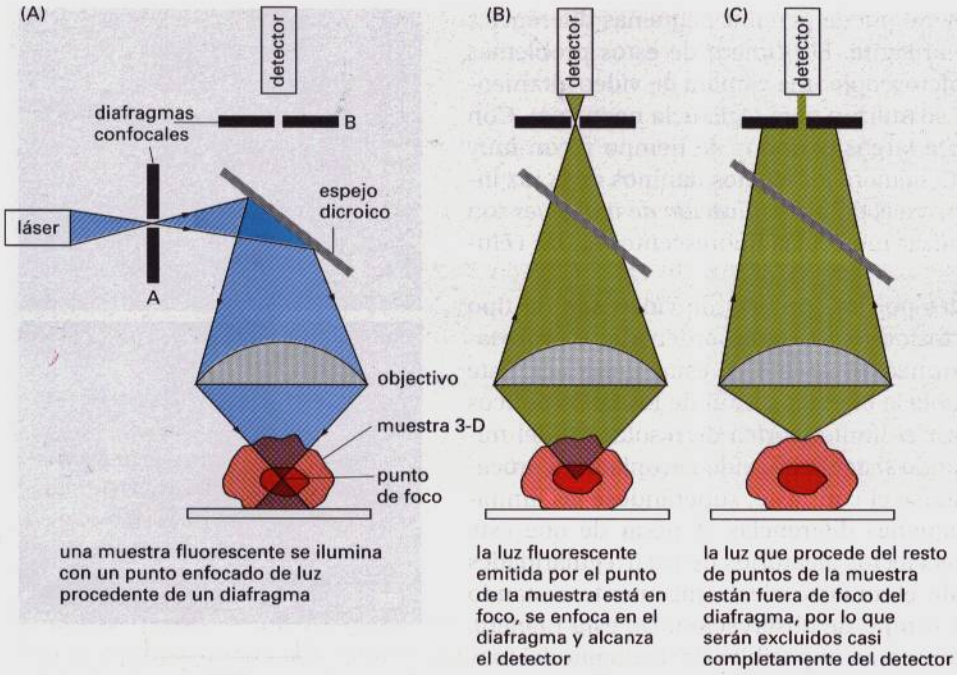


Figura 4-13 El microscopio de barrido confocal de fluorescencia. Este simple diagrama muestra que la disposición básica de los componentes ópticos es similar a la del microscopio de fluorescencia estándar mostrado en la Figura 4-7, excepto en que en éste se utiliza un láser para iluminar una pequeña mancha de luz cuya imagen se enfoca en un solo punto de la muestra (A). La fluorescencia emitida por este punto de la muestra se enfoca en un segundo (confocal) diafragma (B). La luz emitida por el resto de la muestra no se enfoca en este diafragma, por lo que no contribuirá a formar la imagen final (C). Mediante un barrido de la mancha de luz por toda la muestra se obtiene una imagen bidimensional muy fina exactamente del plano de foco, la cual no está degradada significativamente por la luz procedente de otras regiones de la muestra.

los radiólogos para estudiar el cuerpo humano: ambos sistemas proporcionan imágenes detalladas de secciones del interior de una estructura intacta.

Los detalles ópticos del microscopio de barrido confocal son complejos, pero la idea básica es sencilla, como se ilustra en la Figura 4-13. Generalmente el microscopio utiliza una óptica fluorescente (véase Figura 4-7), pero en lugar de iluminar toda la muestra a la vez, como se hace habitualmente, en cada instante el sistema óptico enfoca un pequeño punto luminoso en una profundidad determinada de la muestra. Se necesita una fuente de luz que produzca puntos luminosos muy brillantes; habitualmente se utilizan fuentes láser cuya luz haya pasado a través de un diafragma. La fluorescencia emitida por el material iluminado se recoge y produce una imagen a la entrada de un detector de luz adecuado. Se coloca un diafragma en el detector, en el lugar que es *confocal* con el punto luminoso –que es precisamente donde los rayos luminosos emitidos por el punto iluminado de la muestra están enfocados. Así, la luz de este punto de la muestra converge sobre esta apertura y entra en el detector. Contrariamente, la luz que proviene de las regiones fuera del plano focal del punto luminoso también están fuera de foco en el diafragma, por lo que resulta en gran manera excluida del detector (Figura 4-14). Para obtener una imagen bidimensional se recoge secuencialmente la información de cada punto luminoso del plano focal mediante un barrido por todo el campo a observar (como ocurre en una pantalla de televisión) y se presenta en

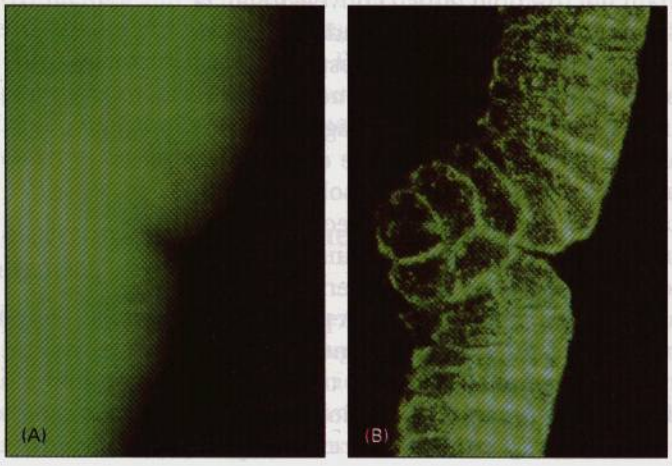


Figura 4-14 Comparación entre la microscopia convencional y la confocal. Estas dos micrografías proceden del mismo embrión intacto de *Drosophila* en estado de gástrula, teñido con una sonda fluorescente para filamentos de actina. La imagen convencional no procesada (A) resulta borrosa debido a la presencia de estructuras fluorescentes situadas por encima y por debajo del plano focal. En la imagen confocal (B) esta información fuera de foco se ha eliminado, resultando una bien definida sección óptica de la célula del embrión. (Por cortesía de Richard Warn y Peter Shaw.)

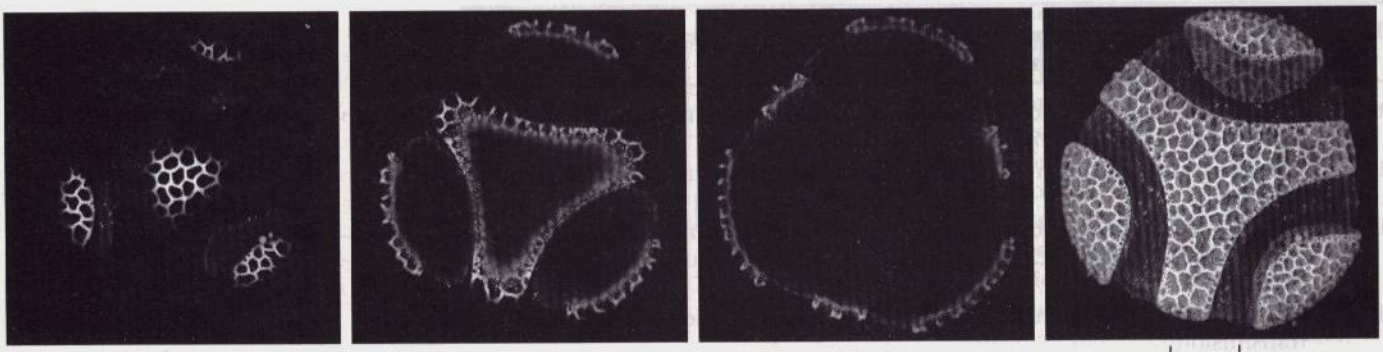


Figura 4-15 Reconstrucción tridimensional a partir de imágenes del microscopio de barrido confocal. Los granos de polen, en este caso de una pasionaria, tienen una pared celular estructurada de forma muy compleja, que contiene compuestos fluorescentes. Las imágenes obtenidas a diferentes profundidades del grano utilizando un microscopio de barrido confocal se pueden combinar obteniéndose una imagen tridimensional del grano de polen completo, como se muestra a la derecha. A la izquierda se presentan algunas secciones ópticas individuales de un total de 30, cada una de las cuales contribuye ligeramente a formar la imagen final. (Por cortesía de John White.)

una pantalla de vídeo. A pesar de que no se presenta en la Figura 4-13, el barrido se obtiene por reflexión del haz luminoso en un espejo oscilante situado entre el espejo dicroico y las lentes del objetivo de tal forma que el punto luminoso y el diafragma confocal del detector permanezcan estrictamente en registro.

El microscopio de barrido confocal se ha utilizado para resolver las estructuras de numerosos objetos tridimensionales complejos (Figura 4-15), incluyendo las redes de fibras del citoesqueleto del citoplasma y la disposición de los cromosomas y de los genes en el núcleo.

El microscopio electrónico resuelve la estructura fina de la célula[8]

La relación entre el límite de resolución y la longitud de onda de la luz que se utiliza para iluminar la muestra (véase Figura 4-4) es cierta para cualquier forma de radiación, con independencia de que sea un haz de luz o un haz de electrones. Sin embargo, en el caso de los electrones el límite de resolución puede hacerse muy pequeño. La longitud de onda de un electrón disminuye a medida que aumenta su velocidad. En un microscopio electrónico que tenga un voltaje de aceleración de 100 000 voltios, la longitud de onda de un electrón es de 0,004 nm, de forma que en teoría, la resolución de un microscopio de este tipo sería de aproximadamente 0,002 nm, lo cual es unas 10 000 veces mayor que la de un microscopio óptico. Sin embargo, debido a que las aberraciones de las lentes electrónicas son mucho más difíciles de corregir que las de las lentes de cristal, el poder de resolución real de la mayoría de los microscopios electrónicos actuales es, en el mejor de los casos, de 0,1 nm (1 Å) (Figura 4-16). Además, los problemas de preparación de la muestra, de contrastado y de lesión por la radiación, limitan claramente la resolución normal para los objetos biológicos a unos 2 nm (20 Å), unas 100 veces mayor a la resolución de un microscopio óptico. En la Tabla 4-2 se resumen algunos de los hitos históricos en el desarrollo de la microscopia electrónica.

El **microscopio electrónico de transmisión (TEM,** de Transmission Electron Microscope) es, en sus rasgos generales, parecido a un microscopio óptico, aunque es de mayor tamaño e invertido (Figura 4-17). La fuente de iluminación es un filamento o cátodo situado en la parte superior de una columna cilíndrica de unos dos metros de altura, que emite electrones. Puesto que los electrones son dispersados al colisionar con las moléculas del aire, se ha de extraer el aire de la columna, para producir el vacío en ella. A continuación, los electrones son acelerados desde el filamento mediante un ánodo, que pueden atravesar a través de un diminuto orificio, y forman un haz de electrones que se dirige hacia la parte inferior de la columna. Unas bobinas magnéticas situadas a intervalos a lo largo de la columna enfocan el haz de electrones, como las lentes enfocan la luz en un microscopio óptico. La muestra se coloca en el vacío de la columna a través de una antecámara de compresión, y se sitúa en el camino del haz de electrones. Como en el caso del microscopio óptico, normalmente la muestra se contrasta; en este caso mediante un material *electrodenso,* como veremos en la sección siguiente. Algunos de los electrones que atraviesan la muestra son dispersados por estructuras contrastadas con el material electrodenso; el resto de electrones

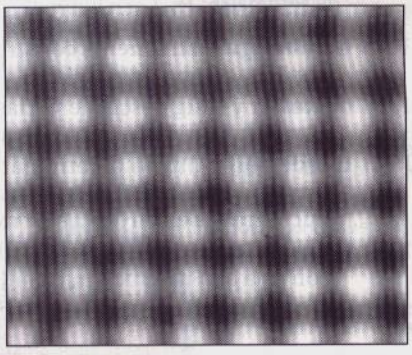


Figura 4-16 Límite de resolución del microscopio electrónico. Electronmicrografía de una fina capa de oro, en la que los átomos individuales aparecen como manchas brillantes. La distancia entre los átomos de oro adyacentes es de unos 0,2 nm (2 Å). (Por cortesía de Graham Hills.)

Tabla 4-2 Principales acontecimientos en la evolución del microscopio electrónico y de su aplicación a la biología celular

1897 **J.J. Thomson** anunció la existencia de partículas cargadas negativamente, más tarde denominadas *electrones*.

1924 **de Broglie** propuso que un electrón en movimiento tiene un comportamiento ondulante.

1926 **Busch** demostró que era posible enfocar un haz de electrones utilizando una lente magnética cilíndrica. Así estableció los fundamentos de la óptica electrónica.

1931 **Ruska** y colaboradores construyeron el primer microscopio electrónico de transmisión.

1935 **Knoll** demostró que era posible construir un microscopio electrónico de barrido. Tres años más tarde, **Von Ardenne** construyó un prototipo.

1939 **Siemens** construyó el primer microscopio electrónico de transmisión comercial.

1944 **Williams** y **Wyckoff** introdujeron la técnica de la metalización de las muestras.

1945 **Porter, Claude** y **Fullan** utilizaron el microscopio electrónico para observar células cultivadas, después de fijarlas y contrastarlas con OsO_4.

1948 **Pease** y **Baker** obtuvieron cortes finos (0,1-0,2 µm de grosor) de material biológico.

1952 **Palade, Porter** y **Sjöstrand** desarrollaron métodos de fijación y de obtención de cortes ultrafinos que permitieron observar por primera vez muchos orgánulos intracelulares. En una de las primeras aplicaciones de estas técnicas, **H.E. Huxley** demostró que el músculo esquelético contiene ordenaciones superpuestas de filamentos proteicos, apoyando así la hipótesis de los "filamentos deslizantes" de la contracción muscular.

1953 **Porter** y **Blum** diseñaron el primer ultramicrótomo que fue ampliamente aceptado, incorporando muchas de las características introducidas con anterioridad por **Claude** y **Sjöstrand**.

1956 **Glauert** y colaboradores demostraron que la resina epoxi *Araldite* era un medio de inclusión altamente eficaz para la microscopia electrónica. Cinco años más tarde, **Luft** introdujo otra resina *Epon* para la inclusión.

1957 **Robertson** describió la estructura trilaminar de la membrana celular, observada por primera vez al microscopio electrónico.

1957 Las técnicas de criofractura desarrolladas inicialmente por **Steere** fueron perfeccionadas por **Moor** y **Mühlethaler**. Más tarde (1966), **Branton** demostró que la criofractura permite visualizar el interior de la membrana.

1959 **Singer** utilizó anticuerpos acoplados a ferritina para detectar moléculas de la célula al microscopio electrónico.

1959 **Brenner** y **Horne** desarrollaron la técnica de la tinción negativa, inventada cuatro años antes por **Hall**, convirtiéndola en una técnica de aplicación rutinaria para visualizar virus, bacterias y filamentos proteicos.

1963 **Sabatini, Bensch** y **Barrnett** introdujeron el glutaraldehído (generalmente seguido de OsO_4) como fijador más utilizado en microscopia electrónica.

1965 **Cambridge Instruments** construyó el primer microscopio electrónico de barrido, de tipo comercial.

1968 **de Rosier** y **Klug** describieron las técnicas para la reconstrucción de las estructuras tridimensionales a partir de micrografías electrónicas.

1975 **Henderson** y **Unwin** determinaron por primera vez la estructura de una proteína de membrana mediante reconstrucción por ordenador de micrografías electrónicas de muestras no teñidas.

1979 **Heuser, Reese** y colaboradores desarrollaron una técnica de grabado profundo con una alta resolución, basada en una congelación muy rápida.

son enfocados formando una imagen –de una manera análoga a como se forma la imagen en el microscopio óptico– sobre una placa fotográfica o sobre una pantalla fluorescente. Puesto que los electrones que han sido dispersados han desaparecido del haz, las regiones densas de la muestra aparecen como áreas de un flujo bajo de electrones, que aparecen negras.

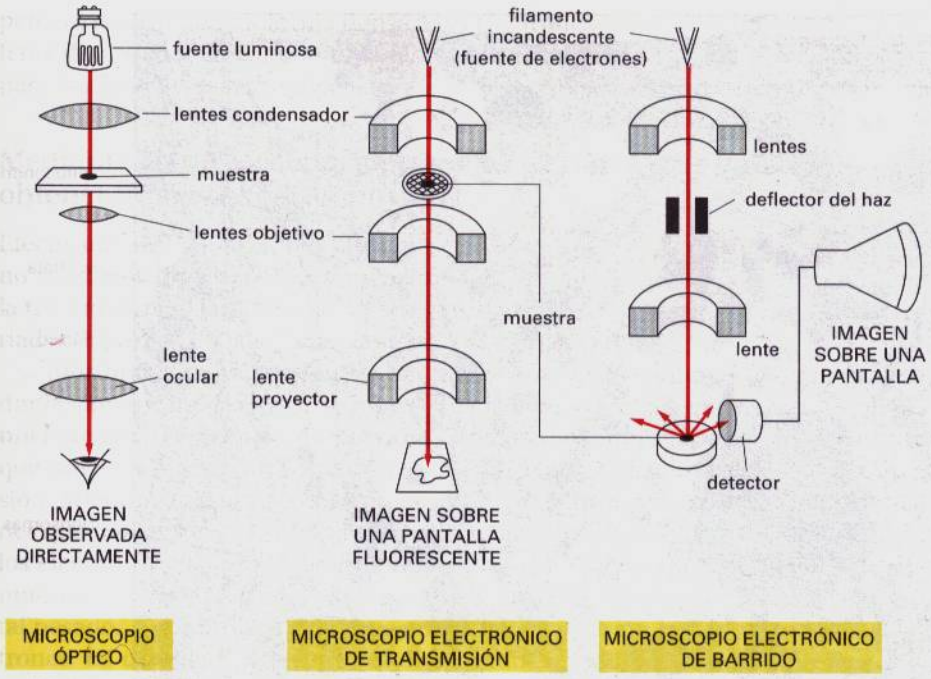
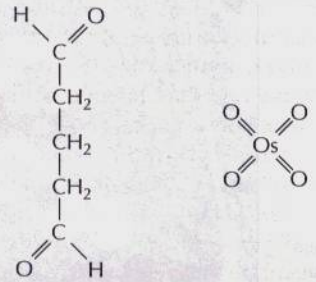


Figura 4-17 Características principales de un microscopio óptico, de un microscopio electrónico de transmisión y de un microscopio electrónico de barrido. El dibujo pone de relieve las similitudes generales del diseño de estos tipos de microscopios. Mientras que las lentes del microscopio óptico son de vidrio, las del microscopio electrónico son bobinas magnéticas. Los dos tipos de microscopios electrónicos requieren que la muestra se coloque en el vacío.



glutaraldehído tetróxido de osmio

Figura 4-18 Dos fijadores químicos que se utilizan habitualmente en microscopia electrónica. Los dos grupos reactivos aldehído del glutaraldehído le permiten establecer enlaces cruzados entre diversos tipos de moléculas, formando uniones covalentes entre ellos. El tetróxido de osmio es reducido por numerosos compuestos orgánicos con los que forma complejos mediante puentes cruzados. Resulta especialmente útil para la fijación de las membranas celulares, ya que reacciona con los dobles enlaces C=C existentes en muchos ácidos grasos.

Para poder ser estudiadas al microscopio electrónico, las muestras biológicas requieren una preparación especial[9]

En los primeros tiempos de su aplicación a materiales biológicos, el microscopio electrónico reveló la existencia en las células de una gran cantidad de estructuras inimaginables. Sin embargo, antes de que se pudieran hacer estos descubrimientos, los especialistas en microscopia electrónica tuvieron que desarrollar nuevos procedimientos de inclusión, de corte y de tinción de los tejidos.

Puesto que las muestras para microscopia electrónica han de ser expuestas a un vacío muy intenso, no es posible la observación de las muestras vivas y húmedas. Normalmente los tejidos son protegidos por fijación –primero con *glutaraldehído*, que une covalentemente las moléculas proteicas a sus vecinas, y después con *tetróxido de osmio*, que une y estabiliza las bicapas lipídicas y también las proteínas (Figura 4-18). Puesto que los electrones tienen un poder penetrante muy limitado, normalmente los tejidos fijados son cortados en secciones extremadamente finas (de 50 a 100 nm de espesor –aproximadamente 1/200 del espesor de una célula) antes de poder observarlos. Esto se logra deshidratando la muestra e infiltrándola con una resina monomérica que polimeriza formando un bloque sólido de plástico; el bloque se puede cortar mediante una cuchilla de vidrio o de diamante, en un micrótomo especial (ultramicrótomo). Estas *secciones ultrafinas*, libres de agua y de otros solventes volátiles, se recogen sobre una pequeña rejilla metálica circular para observarlas al microscopio (Figura 4-19).

En el microscopio electrónico, el contraste depende del número atómico de los átomos de la muestra: cuanto más elevado sea el número atómico mayor número de electrones serán dispersados y, por lo tanto, mayor será el contraste obtenido. Las moléculas biológicas están compuestas por átomos de número atómico muy bajo (fundamentalmente de carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno). Para hacerlas visibles, normalmente se contrastan (antes o después de seccionarlas) con sales de metales pesados tales como el osmio, el uranio y el plomo. Los diferentes componentes celulares aparecerán con diferentes grados de contraste, en función de su diferente intensidad de contrastado "de teñido" con estas sales. Los lípidos, por ejemplo, tienden a contrastarse de oscuro con el osmio, revelando así la localización de las membranas celulares (Figura 4-20).

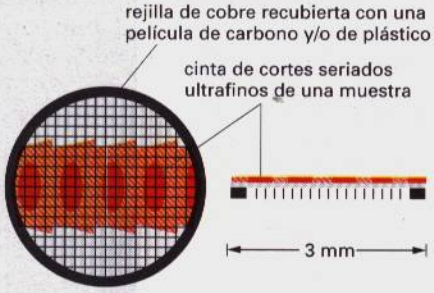


Figura 4-19 Esquema de una rejilla de cobre utilizada como soporte de los cortes ultrafinos de una muestra, en la microscopia electrónica de transmisión.

Figura 4-20 Sección ultrafina de una célula apical de la raíz de una gramínea, contrastada con osmio y otros iones de metales pesados. Se observan fácilmente la pared celular, el núcleo, las vacuolas, las mitocondrias, el retículo endoplasmático, el complejo de Golgi y los ribosomas. (Por cortesía de Brian Gunning.)

En algunos casos, en secciones ultrafinas se pueden localizar determinadas macromoléculas mediante técnicas adaptadas de la microscopia óptica. Ciertas enzimas celulares pueden ser detectadas incubando la muestra con un substrato cuya reacción conduzca al depósito local de un precipitado denso a los electrones (Figura 4-21). Alternativamente, como veremos en las págs. 197-198, diferentes anticuerpos pueden acoplarse a una enzima indicadora (normalmente

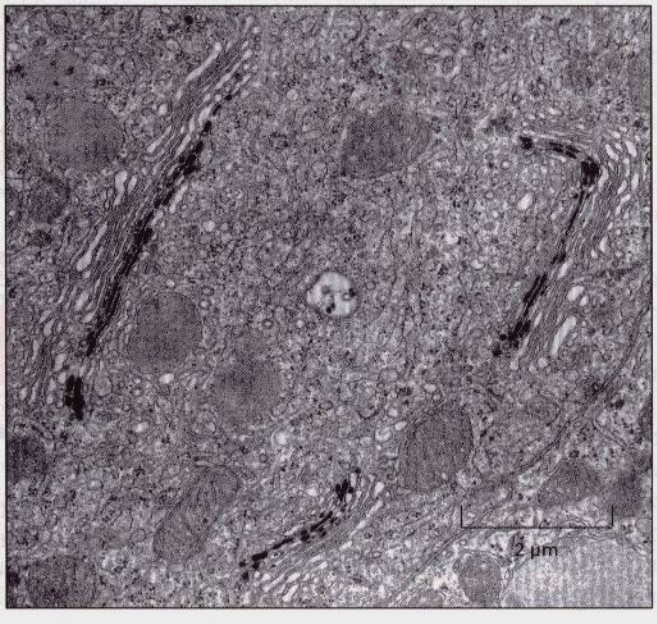


Figura 4-21 Electronmicrografía de una célula, mostrando la localización de una determinada enzima (la nucleótido difosfatasa) en el complejo de Golgi. Una sección ultrafina de la célula se incubó con un substrato que, al reaccionar con la enzima, formó un precipitado electrodenso. (Por cortesía de Daniel S. Friend.)

peroxidasa) o a una molécula densa a los electrones (normalmente pequeñas esferas de oro metálico, denominadas partículas de *oro coloidal*) y ser utilizados para localizar las macromoléculas que reconocen (véase Figura 4-63).

Mediante la microscopia electrónica de barrido se pueden obtener imágenes tridimensionales[10]

Efectivamente, las secciones ultrafinas son cortes bidimensionales de un tejido y no revelan la disposición tridimensional de los componentes celulares. Aunque la tercera dimensión puede ser reconstruida a partir de cientos de secciones seriadas (Figura 4-22), ello supone un proceso largo y tedioso.

Afortunadamente existen sistemas más directos de obtener una imagen tridimensional. Uno de estos sistemas consiste en examinar las muestras con un **microscopio electrónico de barrido (SEM**, de Scanning Electron Microscope), que suele ser más pequeño y sencillo que el microscopio electrónico de transmisión. Mientras que el microscopio electrónico de transmisión utiliza los electrones que han atravesado la muestra, el microscopio electrónico de barrido utiliza los electrones dispersados o emitidos a partir de la superficie de la muestra. La muestra a examinar se fija, se seca y se recubre con una capa delgada de un metal pesado. A continuación la muestra es barrida por un haz focalizado de electrones. La cantidad de electrones dispersados o emitidos cuando este haz primario bombardea consecutivamente cada uno de los puntos de la superficie metálica es medido y utilizado para controlar la intensidad del segundo haz, que se mueve sincrónicamente con el haz primario y forma una imagen sobre una pantalla de televisión. De esta manera se construye una imagen completa y muy ampliada de la superficie de la muestra.

La técnica de SEM proporciona una tremenda profundidad de foco; además, debido a que el grado de dispersión de los electrones depende del ángulo relativo entre el haz y la superficie, la imagen tiene puntos brillantes y sombras oscuras que le confieren un aspecto tridimensional (Figura 4-23). Sin embargo solamente se pueden examinar detalles superficiales, y en la mayoría de mode-

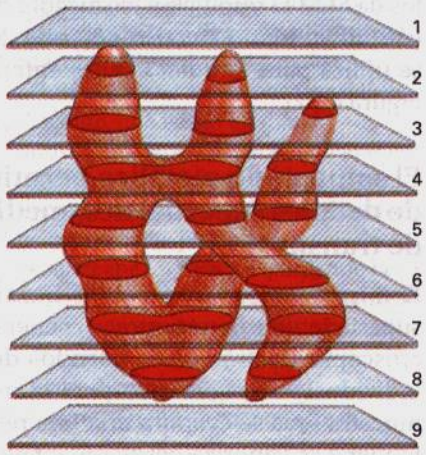


Figura 4-22 Reconstrucción tridimensional a partir de secciones seriadas. A menudo las secciones ultrafinas individuales conducen a impresiones erróneas. En este ejemplo, la mayoría de las secciones de una célula que contiene una mitocondria ramificada parecen contener dos o tres mitocondrias diferentes. Además, a partir de las secciones 4 y 7 se podría deducir que una mitocondria se halla en el proceso de división. Sin embargo, a partir de los cortes seriados se puede reconstruir la verdadera forma tridimensional.

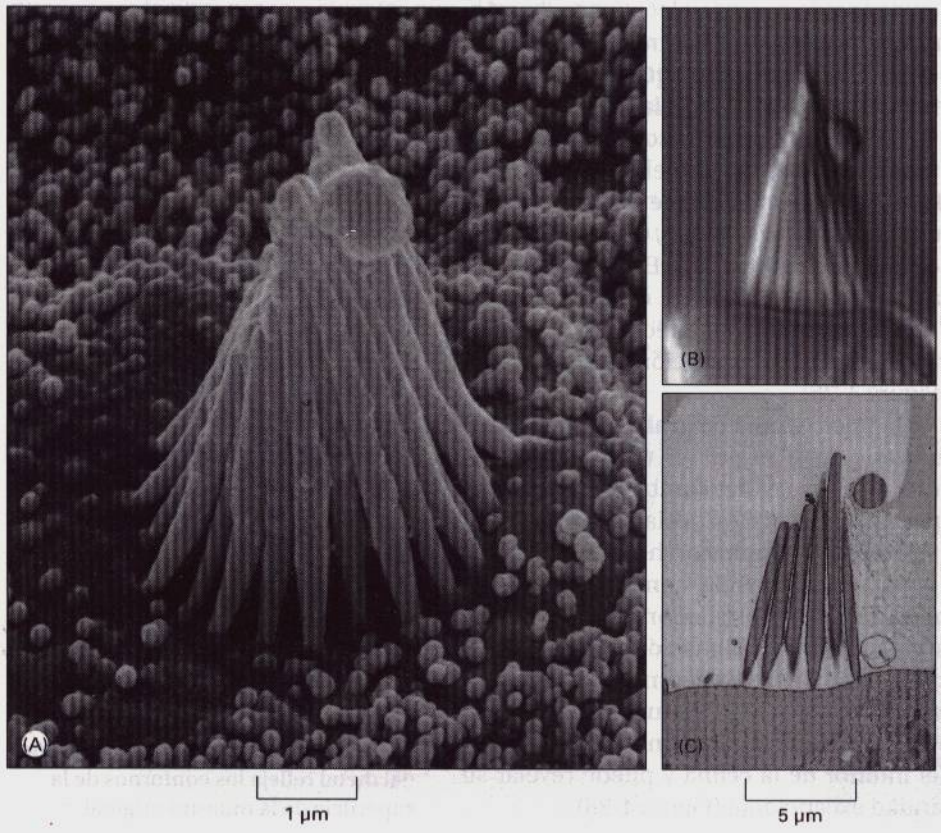


Figura 4-23 Microscopia electrónica de barrido. Electronmicrografía obtenida con un microscopio de barrido, mostrando la disposición cónica que adoptan los estereocilios que se proyectan desde la superficie de las células ciliadas del oído interno (A). Para comparar, la misma estructura se muestra observada por microscopia óptica de contraste de fases interferencial (B) y por microscopia electrónica de sección fina (C). (Por cortesía de Richard Jacobs y James Hudspeth.)

los de SEM la resolución alcanzable no es muy elevada (aproximadamente 10 nm, con un aumento efectivo de hasta 20 000 veces); por consiguiente, esta técnica se utiliza para estudiar células enteras o tejidos y no orgánulos celulares (véase Figura 4-32).

El sombreado metálico permite el examen a alta resolución de detalles superficiales, mediante el microscopio electrónico de transmisión[11]

El microscopio electrónico de transmisión puede ser utilizado para estudiar la superficie de una muestra –y generalmente a mayor resolución que en un microscopio electrónico de barrido– de forma que pueden verse macromoléculas individuales. Al igual que para la microscopia electrónica de barrido, sobre la muestra seca se evapora una fina película de un metal pesado, como el platino. El metal se vaporiza desde un ángulo oblicuo de manera que se forma una capa que en algunos lugares es más gruesa que en otros –un proceso conocido como **sombreado** porque se crea un efecto de sombras que da una imagen con apariencia tridimensional.

Algunas muestras cubiertas de esta manera son suficientemente finas o suficientemente pequeñas para que el haz de electrones penetre en ellas directamente; éste es el caso de las moléculas, los virus y las paredes celulares (Figura 4-24). Pero para el caso de las muestras más gruesas, el material orgánico ha de ser eliminado por disolución después del sombreado, de forma que tan sólo quede la fina *réplica* metálica de la superficie de la muestra. La réplica se refuerza con una película de carbono para que pueda ser colocada en una rejilla y examinada al microscopio electrónico de transmisión de la manera habitual (Figura 4-25).

La microscopia electrónica de criofractura y la de grabado por congelación proporcionan una nueva visión del interior celular[12]

Otros dos métodos que utilizan réplicas metálicas han sido particularmente útiles en la biología celular. Uno de ellos, el de la microscopia electrónica de **criofractura,** constituye un sistema de visualizar el interior de las membranas celulares. Las células se congelan a la temperatura del nitrógeno líquido (–196°C) en presencia de un *crioprotector* (un anticongelante) para impedir la distorsión provocada por la formación de cristales de hielo, y el bloque se fracciona con la hoja de una cuchilla. A menudo, el plano de fractura pasa a través del centro hidrofóbico de las bicapas lipídicas, exponiendo así el interior de las membranas celulares. Las caras de fractura resultantes se metalizan con platino, y las réplicas se observan al microscopio electrónico (como en la Figura 4-25). Estas réplicas están llenas de pequeñas protuberancias, llamadas *partículas intramembrana,* que corresponden a grandes proteínas de la membrana. Esta técnica proporciona una vía adecuada y espectacular para visualizar la distribución de este tipo de proteínas en el plano de la membrana (Figura 4-26).

Otro método importante de réplica es la microscopia de **grabado por congelación (freeze-etch),** que puede ser utilizado para examinar tanto el interior como el exterior de las células. En esta técnica las células también se congelan muy rápidamente –utilizando por ejemplo un dispositivo especial para colocar la muestra contra un bloque de cobre congelado por ejemplo con helio líquido– y el bloque congelado se fragmenta con la hoja de una cuchilla, como acabamos de describir. Pero en este caso el nivel de hielo disminuye alrededor de las células (y en menor medida dentro de las células) mediante la sublimación del agua en el vacío a medida que aumenta la temperatura (un proceso denominado *deshidratación por congelación)* (Figura 4-27). Las zonas de la célula expuestas a este proceso de *grabado* son sombreadas como antes, para conseguir una réplica de platino. Esta técnica expone estructuras del interior de la célula y puede revelar su organización tridimensional con una claridad excepcional (Figura 4-28).

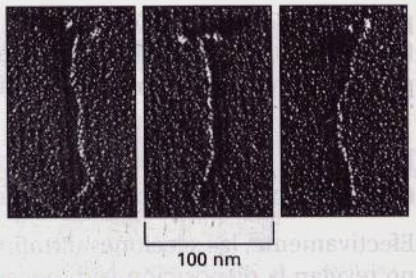


Figura 4-24 Electronmicrografías de moléculas aisladas de la proteína miosina que han sido sombreadas con platino. La miosina es uno de los componentes principales del aparato contráctil del músculo; como se muestra aquí, se compone de dos cabezas globulares unidas por un tallo común. (Por cortesía de Arthur Elliot.)

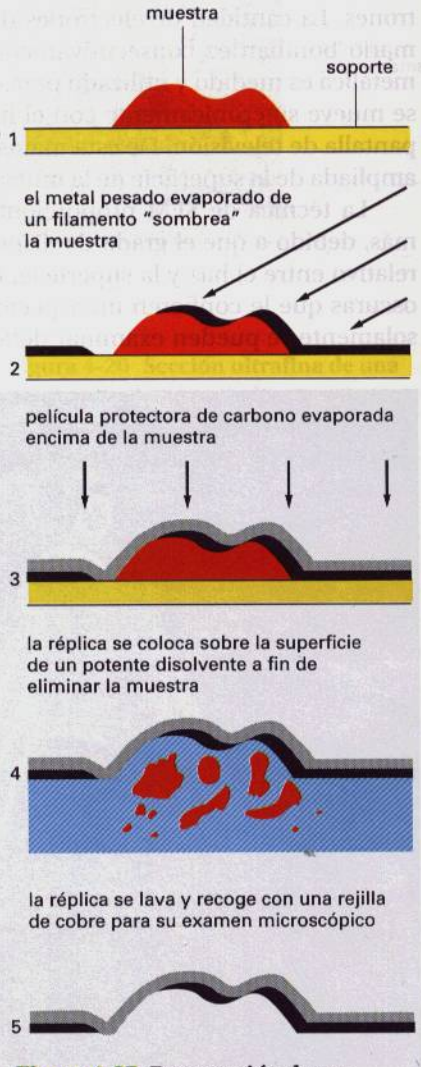


Figura 4-25 Preparación de una réplica metalizada de la superficie de una muestra. Obsérvese que el grosor del metal refleja los contornos de la superficie de la muestra original.

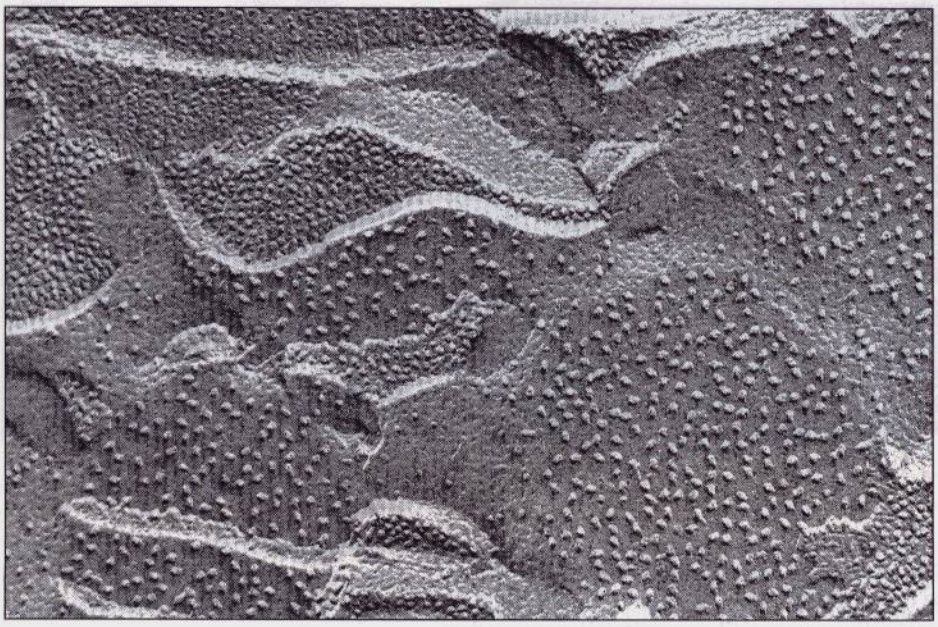


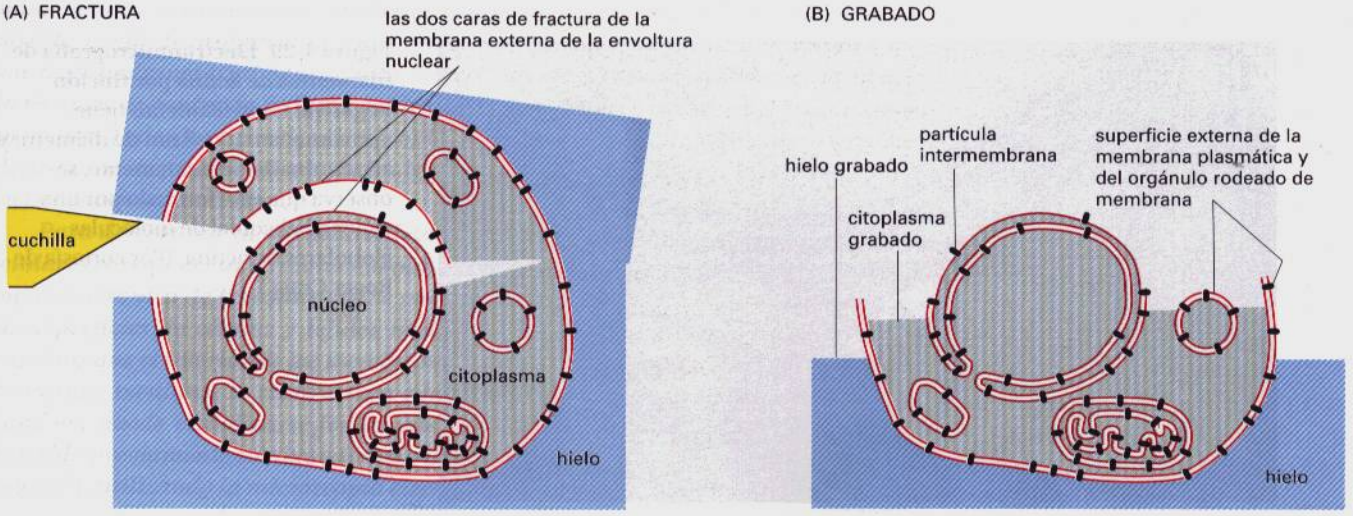
Figura 4-26 Electronmicrografía de una criofractura de la membrana del tilacoide de un cloroplasto de una célula vegetal. Las membranas del tilacoide, que llevan a cabo la fotosíntesis, se encuentran apiladas en múltiples capas (véase Figura 14-39). El plano de fractura se ha desplazado de capa a capa, pasando a través de cada bicapa lipídica y exponiendo las proteínas transmembrana que tienen un tamaño en el interior de la bicapa suficiente para hacer sombra y aparecer como partículas intramembrana en esta réplica de platino. Las partículas mayores que se aprecian en la membrana son el fotosistema II completo –un complejo de múltiples proteínas. (Por cortesía de L.A. Staehelin.)

Puesto que lo que se observa al microscopio son las réplicas metálicas sombreadas y no las propias muestras, ambos métodos, la criofractura y el sombreado por congelación, pueden utilizarse para estudiar células congeladas sin fijar, evitándose pues el riesgo de obtener artefactos producidos por el proceso de la fijación.

La tinción negativa y la microscopia crioelectrónica permiten observar macromoléculas a alta resolución[13]

Aunque las macromoléculas aisladas, tales como el DNA o las grandes proteínas, pueden ser fácilmente visualizadas con el microscopio electrónico si se vaporizan con un metal pesado para darles contraste (véase Figura 4-24), se pueden visualizar sus detalles finos utilizando **tinción negativa**. En este caso, las moléculas colocadas sobre una fina película de carbón (que resulta casi transparente a los electrones), se lavan con una solución concentrada de una sal de un metal pesado, como el acetato de uranilo. Una vez seca la muestra, una película muy fina de la sal metálica cubre la película de carbón por todas partes excepto por donde ha sido excluida debido a la presencia de una macromolécula adsorbida. Puesto que

Figura 4-27 La microscopia electrónica por criofractura. La muestra es rápidamente congelada y el bloque de hielo es fracturado con una cuchilla (A). Entonces, el nivel de hielo se reduce por sublimación del agua en el vacío, de forma que las estructuras de la célula que se encuentran cerca del plano de fractura quedan al descubierto (B). A continuación, se prepara una réplica de la superficie todavía congelada (tal como se describe en la Figura 4-25) y se examina al microscopio electrónico de transmisión.



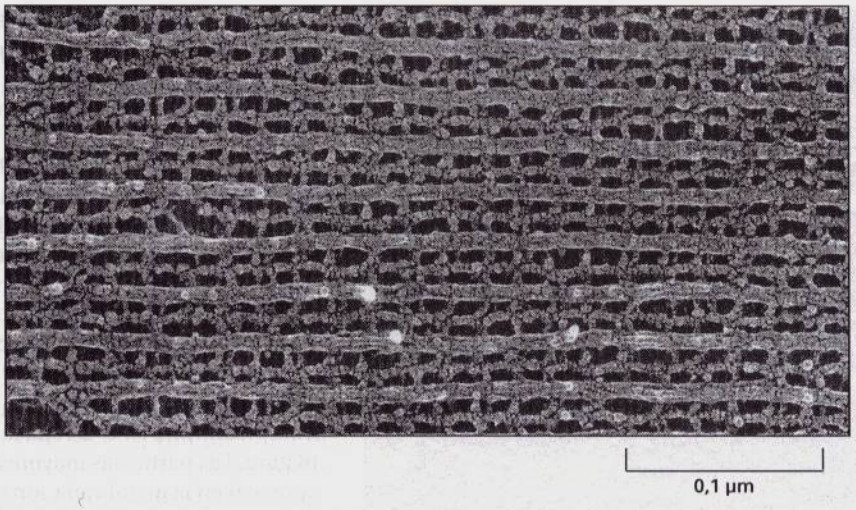


Figura 4-28 Ordenación regular de los filamentos proteicos de un músculo de insecto. Para obtener esta imagen, las células musculares fueron rápidamente congeladas en helio líquido, fracturadas a través del citoplasma y sometidas a grabado profundo. Luego, se preparó una réplica metalizada que se examinó a gran aumento. (Por cortesía de Roger Cooke y John Heuser.)

la macromolécula permite que los electrones pasen mucho más fácilmente que a través del metal pesado circundante, se crea una imagen inversa o negativa de la macromolécula. La tinción negativa es especialmente útil para visualizar grandes agregados macromoleculares, tales como virus o ribosomas, y para observar la estructura en subunidades de los filamentos proteicos (Figura 4-29).

Tanto la tinción negativa como el sombreado son capaces de proporcionar visiones de alto contraste de la superficie de pequeños conjuntos macromoleculares; ambas técnicas, sin embargo, tienen una resolución limitada por el tamaño menor de las partículas metálicas utilizadas en el sombreado o en la tinción. Métodos más recientes proporcionan una alternativa que ha permitido la visualización directa a alta resolución de incluso las características internas de estructuras tridimensionales tales como los virus. En esta técnica, llamada **microscopia crioelectrónica**, sobre una rejilla de microscopia se prepara una capa muy delgada (~100 nm) de muestra hidratada que es rápidamente congelada. Se requiere un porta-objetos especial para colocar esta muestra a –160°C en el vacío del microscopio, donde puede ser visualizada directamente sin necesidad de fijación, tinción, o secado. La homogeneidad de la capa de agua vitrificada y la utilización del contraste de fases bajo foco permite la obtención de imágenes sorprendentemente claras de estas muestras no fijadas (Figura 4-30).

Independientemente del método utilizado, al microscopio electrónico una molécula de proteína únicamente da una imagen, débil y poco definida. El intento de obtener una mejor información prolongando el tiempo de inspección o la intensidad de iluminación resulta contraproducente, ya que con ello se daña el objeto a examinar. Por consiguiente, para descubrir los detalles de la estructura

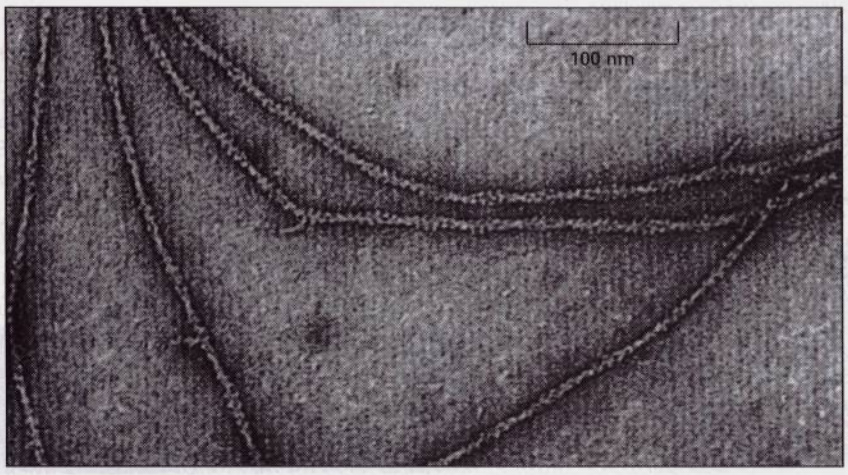
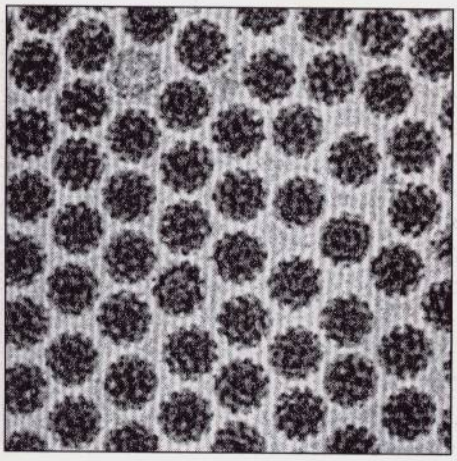
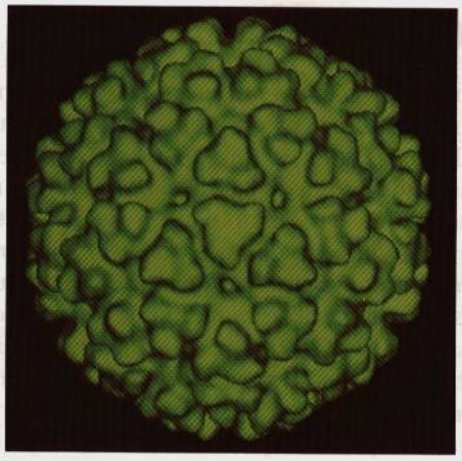


Figura 4-29 Electronmicrografía de filamentos de actina por tinción negativa. Cada filamento tiene aproximadamente 8 nm de diámetro y, al examinarlo detenidamente, se observa que está formado por una cadena helicoidal de moléculas globulares de actina. (Por cortesía de Roger Craig.)



(A)



(B)

Figura 4-30 Microscopia electrónica de un virus. (A) Virus Semliki forest no teñido en un capa fina de agua vitrificada, observado al microscopio crioelectrónico a –160ºC. Como en microscopia óptica, el contraste de fases se puede utilizar para obtener una imagen de una muestra no teñida. Mediante métodos de procesamiento de imágenes se puede combinar un gran número de estas imágenes produciendo una imagen tridimensional de alta resolución. (Por cortesía de Stephen Fuller.)

molecular es necesario combinar la información obtenida de muchas moléculas con el fin de eliminar los errores aleatorios de la imágenes individuales. Esto es posible para virus o filamentos proteicos, en los que las subunidades individuales se presentan ordenadas de forma regular y repetida; también es posible para cualquier substancia que pueda formar ordenamientos cristalinos en dos dimensiones en los que una gran cantidad de moléculas presenten una orientación idéntica y posiciones espaciales regulares. Sobre una microfotografía de un ordenamiento de cualquier tipo se pueden aplicar las técnicas de procesamiento de imágenes para obtener la imagen media de una molécula individual, revelando así detalles oscurecidos por el "ruido" aleatorio de la fotografía original.

Este sistema de reconstrucción de imágenes ha permitido obtener con una resolución de 3,5 nm la estructura interna de virus recubiertos y obtener la forma de una molécula individual de proteína a la extraordinaria resolución de 0,35 nm (véase Figura 10-31). Sin embargo, la microscopia electrónica, incluso en sus formas más sofisticadas, no consigue obtener una descripción completa de la estructura molecular, ya que los átomos en una molécula están separados por distancias de tan sólo 0,1 o 0,2 nm. Para resolver la estructura molecular a detalle atómico, se necesita otra técnica que utilice rayos X en lugar de electrones.

Resumen

Actualmente disponemos de muchas técnicas de microscopia óptica que nos permiten la observación de las células. Las células que han sido fijadas y teñidas se pueden estudiar al microscopio óptico convencional, mientras que para localizar moléculas específicas en las células se pueden utilizar anticuerpos marcados y estudiar su localización mediante el microscopio de fluorescencia. El microscopio de barrido confocal proporciona finas secciones ópticas y puede utilizarse para reconstruir imágenes tridimensionales. Las células vivas se pueden observar utilizando técnicas de contraste de fases, contraste de fases interferencial o ópticas de campo oscuro. Todos los tipos de microscopia óptica son más fáciles utilizando técnicas electrónicas de procesamiento de imágenes, las cuales amplifican la sensibilidad e incrementan la resolución.

Para determinar la estructura detallada de las membranas y de los orgánulos celulares se requiere una resolución mayor, la cual se puede alcanzar con el microscopio electrónico de transmisión. Se pueden obtener imágenes tridimensionales de las superficies de células y tejidos mediante microscopia electrónica de barrido, mientras que el interior de las membranas y de las células puede observarse, respectivamente, mediante la criofractura y la microscopia de grabado por congelación. También puede visualizarse fácilmente la forma de macromoléculas aisladas, si han sido previamente sombreadas con un metal pesado o contorneadas por tinción negativa, utilizando la microscopia electrónica.

Aislamiento y crecimiento de células en cultivo[14]

A pesar de que al microscopio pueden observarse las estructuras de los orgánulos y de las macromoléculas de la célula, la comprensión molecular de la célula requiere un análisis bioquímico detallado. Desgraciadamente los procedimientos bioquímicos requieren gran cantidad de células y siempre empiezan rompiéndolas. Si la muestra es un trozo de tejido, se mezclarán entre sí fragmentos de todas sus células y si, como ocurre en la mayoría de los casos, el tejido tenía células de varios tipos diferentes, se originará una gran confusión. Con el objeto de preservar toda la información que sea posible sobre cada uno de los tipos celulares, los biólogos celulares han desarrollado técnicas de disociación de células a partir de los tejidos y de separación de los distintos tipos celulares. Como resultado de estas técnicas, pueden analizarse poblaciones relativamente homogéneas de células –ya sea directamente o después de que su número se haya incrementado notablemente permitiendo que las células proliferen en cultivo.

Las células de un tejido pueden ser aisladas y separadas en diversos tipos celulares[15]

El primer paso del aislamiento de células a partir de un tejido que contiene una mezcla de tipos celulares consiste en romper la matriz extracelular y las uniones intercelulares que mantienen unidas entre sí las células. Normalmente las mejores recuperaciones de células disociadas viables son las obtenidas de tejidos fetales o neonatales, típicamente tratándolos con enzimas proteolitícas (como la tripsina y la colagenasa) y con agentes [como el ácido etilendiamín tetraacético o EDTA (de ethylendiamintetraacetic acid)] que une, o *quela*, el Ca^{2+} del que depende la adhesión célula-célula. Entonces, los tejidos pueden ser disociados en células individuales y viables, mediante agitación suave.

Para separar los diferentes tipos celulares a partir de una suspensión celular mixta se utilizan diversos métodos. Uno de ellos consiste en aprovechar las diferentes propiedades físicas de las células. Por ejemplo, las células grandes pueden separarse de las pequeñas y las células densas de las ligeras, mediante centrifugación. Estas técnicas se describirán al hablar de la separación de orgánulos y de macromoléculas, para lo cual fueron desarrolladas originalmente. Otra aproximación se basa en la tendencia de algunos tipos celulares a adherirse fuertemente al cristal o al plástico, lo cual permite separarlas de células que se adhieran menos fuertemente.

Una mejora importante de esta última técnica depende de las propiedades específicas de unión de los anticuerpos. Los anticuerpos que se unen específicamente a la superficie de un solo tipo celular de un tejido pueden acoplarse a varios tipos de matrices –como colágeno, esferas de polisacáridos o plástico– formando una *superficie de afinidad* a la que únicamente se unirán las células reconocidas por los anticuerpos. Las células unidas se recuperan más tarde mediante agitación suave, mediante el tratamiento con tripsina para digerir las proteínas que median la adhesión, o, en el caso de matrices digeribles (como la colágena), mediante la degradación de la propia matriz con enzimas (como la colagenasa).

La técnica más sofisticada de separación celular se basa en el marcaje específico de las células con anticuerpos acoplados a un colorante fluorescente y posterior separación de las células marcadas de las no marcadas mediante un **clasificador celular activado por fluorescencia**. En este aparato las células pasan en "fila india" a través de un haz láser determinándose la fluorescencia de cada célula. Un poco más adelante de la corriente de células, una boquilla vibratoria forma diminutas gotitas, la mayoría de las cuales contienen una o ninguna célula. Las gotitas que contienen una sola célula reciben automáticamente una carga eléctrica positiva o negativa en el momento de formarse, dependiendo de si la célula es fluorescente o no lo es; a continuación, las gotitas son desviadas por un intenso campo eléctrico hacia un contenedor apropiado. Los grupos de

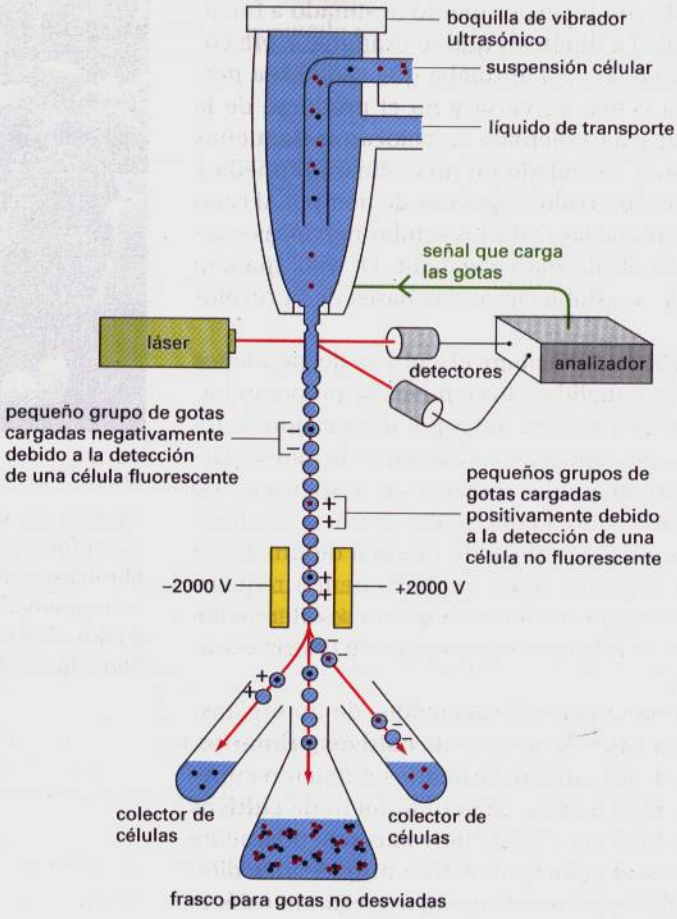


Figura 4-31 Seleccionador de células activado por fluorescencia. Cuando una célula pasa a través del rayo láser, es seleccionada de acuerdo con su fluorescencia. Las gotitas que contienen una sola célula reciben una carga negativa o positiva, según sea la célula fluorescente o no. Luego, las gotitas son desviadas mediante un campo eléctrico, en función de su carga, hacia los tubos de recogida. Téngase en cuenta que la concentración celular debe ser tal que la mayoría de las gotitas no contengan ninguna célula; la mayor parte de las gotitas, pues, fluirán al contenedor residual, junto con las gotitas que contengan más de una célula. Este mismo aparato se puede utilizar también para separar cromosomas marcados con fluorescencia de otros no marcados, proporcionando un valioso material de partida para el aislamiento y mapaje de genes.

células que se forman ocasionalmente son detectados por su mayor dispersión de luz y no reciben carga, de forma que caen en un contenedor residual. Estas máquinas pueden seleccionar 1 célula entre 1000 y clasificar unas 5000 células por segundo (Figura 4-31).

Cuando, mediante alguno de los métodos mencionados, se ha obtenido una población uniforme de células, esta población puede utilizarse directamente para análisis bioquímicos. Alternativamente, esta población celular constituye un material de partida adecuado para el cultivo celular, permitiendo estudiar el complejo comportamiento de las células bajo las condiciones estrictamente definidas de una placa de cultivo.

Las células pueden cultivarse en una placa de cultivo[16]

La mayoría de tipos celulares tanto vegetales como animales sobreviven, se multiplican e incluso expresan propiedades diferenciales en una placa de cultivo en condiciones adecuadas. Las células pueden visualizarse al microscopio o analizarse bioquímicamente, y se pueden estudiar los efectos de la adición o eliminación de moléculas determinadas tales como hormonas o factores de crecimiento. Además, en cultivos mixtos pueden estudiarse las interacciones entre un tipo celular y otro. A menudo se dice que los experimentos con células cultivadas han sido realizados *in vitro* (literalmente "en vidrio") para diferenciarlos de los experimentos realizados en organismos intactos, que se dice que han sido realizados *in vivo* (literalmente "en el organismo vivo"). Estos dos términos pueden resultar confusos porque a menudo se utilizan en un sentido diferente por los bioquímicos, para los que *in vitro* se refiere a las reacciones bioquímicas que se producen fuera de la célula mientras que *in vivo* se refiere a cualquier reacción que se produce dentro de una célula viva.

El cultivo de tejidos empezó en 1907 con un experimento destinado a finalizar una controversia de la neurobiología. La hipótesis que se examinaba era conocida bajo el nombre de *teoría neuronal*, la cual afirmaba que cada fibra nerviosa es una prolongación de una sola célula nerviosa y no el producto de la fusión de varias células. Para dilucidar esta polémica se colocaron pequeños fragmentos de médula espinal en plasma coagulado en una cámara húmeda y caliente y se observaron al microscopio a intervalos regulares de tiempo. Al cabo de un día más o menos, se pudo observar que las distintas células nerviosas emitían prolongaciones largas y finas hacia el plasma coagulado. De esta manera quedó demostrada la teoría neuronal y se establecieron las bases de la revolución del cultivo celular.

Los experimentos originales de 1907 implicaban el cultivo de pequeños fragmentos de tejido, o **explantes**. En la actualidad, los cultivos se preparan habitualmente a partir de suspensiones de células obtenidas por disociación de tejidos, como se ha descrito más arriba. A diferencia de las bacterias, la mayor parte de las células de los tejidos no están adaptadas a crecer en suspensión, de forma que necesitan una superficie sólida sobre la que poder crecer y dividirse. Actualmente este soporte lo constituye una superficie de plástico de una placa de cultivo (Figura 4-32). Sin embargo distintos tipos celulares tienen requerimientos diferentes, de forma que algunos de ellos no crecen o no se diferencian a menos que la placa de cultivo esté recubierta de componentes de matriz extracelular, como el colágeno o la laminina.

Los cultivos preparados directamente a partir de los tejidos de un organismo, con o sin fraccionamiento previo, reciben el nombre de **cultivos primarios**. En la mayoría de los casos, las células de los cultivos primarios pueden recuperarse de la placa de cultivo y utilizarse para formar un gran número de **cultivos secundarios**. De esta forma las células pueden ser subcultivadas repetidamente durante semanas o meses. A menudo estas células muestran propiedades diferenciadas típicas de sus orígenes: los fibroblastos continúan segregando colágeno; las células derivadas del músculo esquelético embrionario se fusionan formando fibras musculares gigantes que se contraen espontáneamente en la placa de cultivo; las células nerviosas emiten axones que son excitables eléctricamente y que establecen sinapsis con otras células nerviosas; las células epiteliales forman extensas láminas con muchas de las propiedades de un epitelio intacto. Puesto que estos fenómenos se producen en los cultivos, resultan accesibles al estudio a través de sistemas y técnicas que no se pueden aplicar en los tejidos intactos.

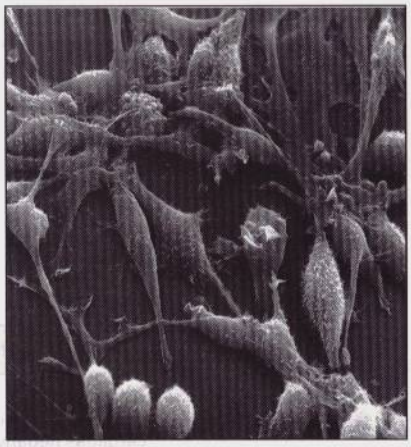


Figura 4-32 Células en cultivo. Electronmicrografía de barrido de fibroblastos de rata creciendo sobre una superficie plástica en cultivo de tejidos. (Por cortesía de Guenter Albrecht-Buehler.)

Los medios definidos químicamente, libres de suero, permiten la identificación de factores de crecimiento específicos[17]

Hasta principios de los años 1970 el cultivo de tejidos era algo así como una mezcla de ciencia y brujería. Aunque los coágulos plasmáticos fueron substituidos por placas de medios líquidos conteniendo cantidades específicas de pequeñas moléculas como sales, glucosa, aminoácidos, y vitaminas, la mayoría de los medios incluían también una proporción mal definida de una mezcla de macromoléculas en forma de suero de caballo o de suero fetal de ternera, o un extracto crudo de embrión de pollo. Estos medios todavía se utilizan actualmente para la mayoría de cultivos rutinarios (Tabla 4-3) pero resultan inadecuados para el estudio de las necesidades de macromoléculas que un tipo celular determinado tiene para prosperar y funcionar normalmente.

Esta dificultad ha conducido al desarrollo de *medios libres de suero definidos químicamente*. Además de las pequeñas moléculas habituales estos medios definidos contienen una o más proteínas específicas que la mayoría de células necesitan para sobrevivir y proliferar en cultivo. Entre ellas se encuentran los **factores de crecimiento** que estimulan la proliferación y la *transferrina* que transporta hierro al interior de las células. La mayoría de las moléculas señalizadoras proteicas extracelulares esenciales para la supervivencia, desarrollo y proliferación de

Tabla 4-3 Composición de un medio típico adecuado para el cutivo de células de mamífero

Aminoácidos	Vitaminas	Sales	Varios	Proteínas (necesarias en medios químicamente definidos, libres de suero)
Arginina	Biotina	NaCl	Glucosa	Insulina
Cisteína	Colina	KCl	Penicilina	Transferrina
Glutamina	Folato	NaH_2PO_4	Estreptomicina	Factores de crecimiento específico
Histidina	Nicotinamida	$NAHCO_3$	Rojo fenol	
Isoleucina	Pantotenato	$CaCl_2$	Suero total	
Leucina	Piridoxal	$MgCl_2$		
Lisina	Tiamina			
Metionina	Riboflavina			
Fenilalanina				
Treonina				
Triptófano				
Tirosina				
Valina				

La glucosa se utiliza a concentraciones de 5 a 10 mM. Todos los aminoácidos son de la forma L y con una o dos excepciones se utilizan a concentraciones de 0,1 a 0,2 mM; las vitaminas se utilizan a concentraciones 100 veces menores, es decir, alrededor de 1 μM. El suero, que generalmente es de caballo o de ternera, se añade hasta formar el 10% del volumen total. La penicilina y la estreptomicina son antibióticos que se utilizan para inhibir el crecimiento de las bacterias. El rojo fenol es un colorante indicador del pH, que permite seguir la variación de color para asegurar que el pH sea de 7,4 aproximadamente.

Generalmente los cultivos se mantienen en recipientes de plástico o de vidrio, con una superficie preparada adecuadamente que permita la adherencia de las células. Los recipientes se conservan en una estufa de cultivo a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de aire.

determinados tipos celulares se han descubierto a través de estudios de cultivos celulares y la búsqueda de nuevas moléculas ha sido enormemente facilitada por la asequibilidad de medios definidos químicamente y libres de suero.

Las líneas celulares eucariotas constituyen una fuente ampliamente utilizada para la obtención de células homogéneas[18]

La mayoría de las células de los vertebrados mueren tras un número finito de divisiones en cultivo: por ejemplo, las células cutáneas humanas en cultivo sobreviven durante algunos meses, dividiéndose únicamente entre 50 y 100 veces antes de morir. Se sugirió que esta vida limitada estaba relacionada con la vida limitada del animal del que derivan las células. Sin embargo, en cultivo ocasionalmente surgen algunas células que han sufrido algún cambio genético que las hace realmente inmortales. Estas células proliferan indefinidamente y pueden propagarse como una **línea celular** (Tabla 4-4).

Las líneas celulares preparadas a partir de células cancerosas difieren de las preparadas a partir de células normales, en varios aspectos; por ejemplo, a menudo las líneas de células cancerosas crecen sin fijarse a ninguna superficie y proliferan en una placa de cultivo hasta una densidad mucho mayor que la de las células normales. Experimentalmente pueden inducirse propiedades similares a éstas en células normales mediante la *transformación* con un virus o con una substancia química inductora de tumores. Las **líneas celulares transformadas** resultantes son capaces de provocar tumores si se inyectan a un animal. Las líneas celulares, tanto transformadas como no transformadas, resultan extremadamente útiles para la investigación celular como fuente de un número muy elevado de células de un tipo uniforme, especialmente porque se pueden guardar en nitrógeno líquido a –196°C durante un período indefinido de tiempo, y después de descongeladas todavía son viables. Sin embargo, es importante reconocer que las células de ambos tipos de líneas celulares casi siempre difieren de sus células progenitoras de los tejidos de las que derivan, en algunas características importantes.

Tabla 4-4 Algunas líneas celulares utilizadas habitualmente

Línea celular*	Tipo celular y origen
3T 3	fibroblasto (ratón)
BHK 21	fibroblasto (hámster sirio)
MDCK	célula epitelial (perro)
HeLa	célula epitelial (humana)
PtK 1	célula epitelial (rata canguro)
L 6	mioblasto (rata)
PC 12	célula cromafínica (rata)
SP 2	célula plasmática (ratón)

* Muchas de estas líneas celulares derivan de tumores. Todas ellas son capaces de multiplicarse indefinidamente en cultivo y expresan por lo menos algunas de las propiedades diferenciales de su origen celular. Las células BHK 21, HeLa y SP 2 son capaces de crecer en suspensión; las otras líneas celulares requieren un substrato de cultivo sólido para multiplicarse.

A pesar de que todas las células de una línea celular son muy similares entre sí, a menudo no son idénticas. La uniformidad genética de una línea celular puede mejorarse con el **clonaje celular**, mediante el cual se aísla una única célula y se le permite proliferar hasta formar una gran colonia. Un *clon* es cualquier población de células derivadas de una única célula ancestral. Una de las aplicaciones más importantes del clonaje celular ha sido el aislamiento de líneas celulares mutantes con defectos en determinados genes. A menudo el estudio de las células que son defectuosas en una proteína determinada revela muchos datos sobre la función que tiene esta proteína en las células normales.

Las células pueden fusionarse formando células híbridas[19]

Es posible fusionar una célula con otra formando una célula combinada con dos núcleos separados, denominada **heterocarionte**. La fusión se suele realizar tratando una suspensión de células con ciertos virus inactivados o con polietilén glicol, que altera las membranas plasmáticas de las células de tal forma que éstas tienden a fusionarse entre sí. Los heterocariontes ofrecen la posibilidad de mezclar los componentes de dos células diferentes para estudiar sus interacciones. Por ejemplo, el núcleo inerte de un eritrocito de pollo cuando es expuesto por fusión celular al citoplasma de una célula en cultivo en crecimiento, se reactiva produciendo RNA y con el tiempo, replicando su DNA. La primera prueba directa de que las proteínas de membrana son capaces de desplazarse en el plano de la membrana plasmática se obtuvo de un experimento en el que se fusionaron células de ratón con células humanas: aunque las proteínas de superficie de las células de ratón y de la célula humana inicialmente estaban confinadas en sus propias mitades de la membrana plasmática del heterocarionte, rápidamente difundieron y se mezclaron por toda la superficie de la célula.

Con el tiempo, el heterocarionte sufrirá una mitosis, produciéndose una **célula híbrida** en la que las dos envolturas nucleares se han disgregado permitiendo que todos los cromosomas se agrupen en un gran núcleo único (Figura 4-33). Aunque estas células híbridas puedan ser clonadas generando líneas celulares híbridas, las células híbridas iniciales tienden a ser inestables y a perder cromosomas. Por razones desconocidas estas células híbridas hombre-ratón pierden de forma predominante cromosomas humanos. Estos cromosomas se pierden de manera aleatoria, dando lugar a diversas líneas celulares híbridas hombre-ratón diferentes, cada una de las cuales contiene algunos (o uno solo) cromosomas humanos. Este fenómeno ha permitido determinar la localización de genes en el genoma humano. Por ejemplo, únicamente las células híbridas que contienen el cromosoma humano 11 sintetizan la insulina humana, lo cual indica que el gen que codifica la insulina se halla situado en el cromosoma 11. Estas mis-

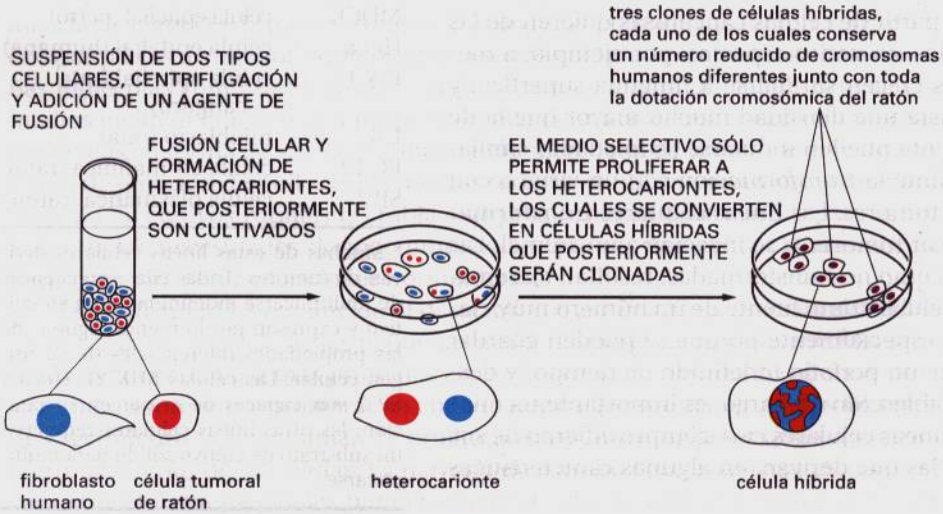


Figura 4-33 Producción de células híbridas. Células humanas se fusionan con células de ratón, produciéndose heterocariontes (cada uno de ellos conteniendo dos o más núcleos) que posteriormente darán lugar a células híbridas (cada una de ellas con un único núcleo fusionado). Estas células híbridas en particular resultan útiles para localizar genes humanos en los cromosomas, ya que la mayoría de los cromosomas humanos se pierden rápidamente de manera aleatoria, con lo que quedan clones que conservan tan sólo uno o unos cuantos genes. A menudo, las células híbridas producidas por fusión de otros tipos celulares conservan la mayoría de sus cromosomas.

Tabla 4-5 Algunos de los hitos en el desarrollo del cultivo de tejidos

1885 **Roux** demostró que las células embrionarias de pollo pueden mantenerse vivas en una solución salina, fuera del cuerpo del animal.

1907 **Harrison** cultivó médula espinal de anfibio en un coágulo linfático, demostrando así que los axones se producen como prolongaciones de células nerviosas.

1910 **Rous** indujo un tumor utilizando un extracto filtrado de células tumorales de pollo, que más tarde se demostró que contenían un virus de RNA (virus del sarcoma de Rous).

1913 **Carrel** demostró que las células podían crecer en cultivo durante mucho tiempo, siempre que fueran alimentadas regularmente y bajo condiciones asépticas.

1948 **Earle** y colaboradores aislaron células de la línea celular L y demostraron que en cultivo tisular forman clones de células.

1952 **Gey** y colaboradores establecieron una línea continua de células derivada de carcinoma cervical humano, que más tarde se convirtió en la conocida línea celular HeLa.

1954 **Levi-Montalcini** y colaboradores demostraron que el factor de crecimiento nervioso (NGF, de Nerve Growth Factor) estimula el crecimiento de los axones en cultivo.

1955 **Eagle** desarrolló la primera investigación sistemática sobre los requerimientos nutricionales esenciales de las células en cultivo y encontró que las células animales se pueden propagar en una mezcla definida de pequeñas moléculas suplementada con una reducida proporción de proteínas séricas.

1956 **Puck** y colaboradores seleccionaron mutantes con requerimientos de crecimiento alterados a partir de células HeLa en cultivo.

1958 **Temin** y **Rubin** desarrollaron un método cuantitativo para la infección de cultivos de células de pollo mediante el *virus del sarcoma de Rous* purificado. En la década siguiente **Stoker, Dulbecco, Green** y otros virólogos establecieron las características de ésta y de otras transformaciones víricas.

1961 **Hayflick** y **Moorhead** demostraron que los fibroblastos humanos en cultivo mueren tras un número finito de divisiones.

1964 **Littlefield** introdujo el medio HAT para el crecimiento selectivo de híbridos celulares somáticos. Junto con la técnica de la fusión celular, este medio hizo accesible la genética de las células somáticas.

Kato y **Takeuchi** obtuvieron una planta completa de zanahoria a partir de una sola célula de raíz de zanahoria mantenida en cultivo.

1965 **Ham** introdujo un medio definido, sin suero, capaz de permitir el crecimiento clonal de ciertas células de mamífero.

Harris y **Watkins** produjeron los primeros heterociontes de células de mamífero, mediante la fusión inducida víricamente de células humanas y de células de ratón.

1968 **Augusti-Tocco** y **Sato** adaptaron al cultivo células nerviosas tumorales de ratón (neuroblastoma) y aislaron clones que eran excitables eléctricamente y producían prolongaciones nerviosas. En esta época se aislaron otras células diferenciadas, entre ellas líneas celulares hepáticas y de músculo esquelético.

1975 **Köhler** y **Milstein** produjeron las primeras líneas celulares de hibridomas que segregaban anticuerpos monoclonales.

1976 **Sato** y colaboradores publicaron el primero de una serie de informes, demostrando que para crecer en un medio sin suero, las líneas celulares diferentes requieren mezclas diferentes de hormonas y de factores de crecimiento.

1977 **Wigler** y **Axel** y colaboradores desarrollaron un eficiente método para introducir genes humanos de copia única en el interior de células cultivadas, adaptando los métodos desarrollados inicialmente por **Graham** y **van der Eb.**

mas células híbridas también se utilizan como fuente de DNA humano para preparar librerías de DNA de cromosomas humanos. Más adelante en este capítulo aprenderemos de qué forma se han utilizado las células híbridas en la producción de anticuerpos monoclonales.

En la Tabla 4-5 se enumeran algunas de las etapas más importantes del desarrollo del cultivo en tejidos.

Resumen

Habitualmente los tejidos de organismos muy jóvenes se pueden disociar en sus componentes celulares, a partir de los cuales pueden purificarse diferentes tipos celulares individuales, los cuales pueden utilizarse para su análisis bioquímico o para establecer cultivos celulares. Muchas tipos de células animales y vegetales sobreviven y proliferan en una placa de cultivo si se les suministra el medio de cultivo adecuado conteniendo nutrientes y factores de crecimiento específicos. Aunque la mayoría de las células animales mueren después de un número finito de divisiones, en los cultivos surgen espontáneamente unas células variantes inmortales que pueden ser mantenidas indefinidamente como líneas celulares. Los clones derivados de una única célula ancestral hacen posible aislar poblaciones uniformes de células mutantes con defectos en una sola proteína. Pueden fusionarse dos tipos diferentes de células formándose heterociontes (células con dos núcleos), que pueden utilizarse para estudiar las interacciones entre los componentes de las dos células originales. Con el tiempo los heterociontes forman células híbridas (con un núcleo fusionado), las cuales proporcionan un método muy adecuado para localizar genes en los cromosomas.

Fraccionamiento de las células y análisis de sus moléculas[20]

Aunque los análisis bioquímicos requieren la disgregación de la delicada anatomía de la célula, se han desarrollado métodos suaves de separación que preservan la función de los diversos componentes celulares. De la misma forma que un tejido puede ser disgregado en sus diferentes tipos celulares vivos, también la célula puede ser fraccionada en sus orgánulos y macromoléculas funcionales. En esta sección vamos a centrarnos en los métodos que permiten la purificación de orgánulos y de macromoléculas. En el Capítulo 7 se discuten las poderosas técnicas del DNA recombinante, utilizadas para analizar genes y proteínas.

Los orgánulos y las macromoléculas pueden separarse por ultracentrifugación[21]

Las células pueden disgregarse de varias maneras: pueden someterse a shock osmótico o a vibraciones ultrasónicas, pueden hacerse pasar a través de un pequeño orificio o pueden molerse. Estos procedimientos rompen muchas de las membranas de la célula (incluidas la membrana plasmática y las membranas del retículo endoplasmático) y los fragmentos se unen inmediatamente formando pequeñas vesículas cerradas. Sin embargo, si estos procedimientos de disgregación se aplican cuidadosamente, dejan fundamentalmente intactos diversos orgánulos como el núcleo, las mitocondrias, el complejo de Golgi, los lisosomas y los peroxisomas. Así, la suspensión de células queda reducida a un espesa sopa (denominada *homogenado* o *extracto*) que contiene una gran diversidad de partículas unidas a membrana, cada una de un tamaño, una carga y una densidad características. Si se ha escogido cuidadosamente el medio de homogeneización (mediante el sistema de prueba y error para cada orgánulo), las diferentes partículas –incluyendo las vesículas derivadas del retículo endoplasmático, llamadas *microsomas*– conservan la mayor parte de sus propiedades bioquímicas originales.

A continuación, se pueden separar los diferentes componentes de este homogenado. Esto únicamente es posible gracias al desarrollo comercial, a principios de los años 1940, de un instrumento conocido con el nombre de **ultracentrífuga preparativa**, en el que los preparados de células rotas se exponen a altas

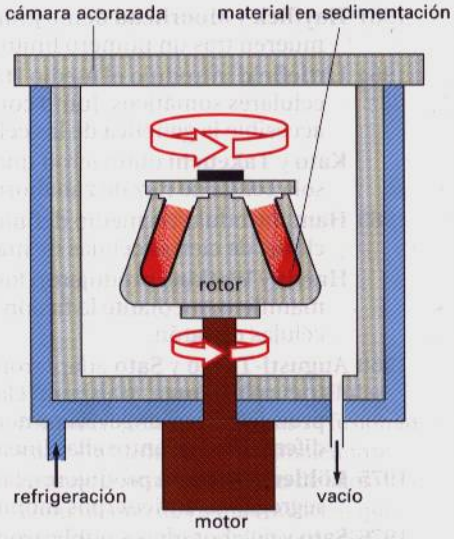


Figura 4-34 La ultracentrífuga preparativa. La muestra se coloca en unos tubos que quedan insertados en un anillo de orificios cilíndricos de un *rotor* metálico. La rápida rotación del rotor genera unas fuerzas centrífugas enormes, que provocan la sedimentación de las partículas de la muestra. El vacío disminuye el rozamiento, con lo que el rotor no se calienta tanto y el sistema de refrigeración puede mantener la muestra a 4ºC.

velocidades de giro (Figura 4-34). Este tratamiento separa los componentes celulares en función de su tamaño y su densidad: en general, las unidades mayores experimentan mayores fuerzas centrífugas y se desplazan por el tubo más rápidamente. A una velocidad relativamente reducida sedimentan los componentes de tamaño mayor, como los núcleos y las células enteras, formando un precipitado (pellet) en el fondo del tubo de la centrífuga; a una velocidad algo superior se deposita un precipitado de mitocondrias, y a velocidades aún más altas y con períodos de centrifugación más prolongados, se pueden recoger primero las pequeñas vesículas cerradas y luego los ribosomas (Figura 4-35). Todas estas fracciones son impuras pero se pueden eliminar muchos de sus contaminantes resuspendiendo de nuevo los precipitados y repitiendo varias veces el procedimiento descrito de centrifugación.

El método de centrifugación constituye el primer paso de la mayoría de fraccionamientos, pero sólo separa los componentes que son muy diferentes en tamaño. Se puede obtener un mayor grado de separación colocando el homogenado como una estrecha banda en la parte superior de una solución salina diluida que llene el tubo de centrífuga. Cuando se centrifuga, los diversos componentes de la mezcla se desplazan a través de la solución salina como series de bandas distintas, cada una a diferente velocidad, en un proceso denominado **velocidad de sedimentación** (Figura 4-36). Para que el proceso sea efectivo, las bandas deben ser protegidas del mezclado por convección, lo cual sucede habitualmente cuando una solución densa (por ejemplo, una que contenga orgánulos) se halla en la parte superior de otra de menor densidad (la solución salina). Esto se consigue rellenando el tubo de centrífuga con un gradiente de sacarosa preparado con un aparato especial de mezclado; el *gradiente de densidad* resultante, con la zona más densa en el fondo del tubo, consigue que cada una de las regiones de la solución salina sea más densa que cualquier solución superior evitando así el mezclado por convección que distorsionaría la separación.

Cuando el homogenado es sedimentado a través de estos gradientes de densidad, los diferentes componentes celulares se separan en distintas bandas que pueden ser recolectadas individualmente. La velocidad a la que sedimenta cada uno de los componentes depende fundamentalmente de su tamaño y de su forma, y suele expresarse como *coeficiente de sedimentación* o *valor s*. Las ultracentrífugas actuales pueden alcanzar velocidades superiores a 80 000 rpm y producir fuerzas de más de 500 000 veces la de la gravedad. A estas enormes fuerzas se pueden separar entre sí en función de su tamaño incluso las macromoléculas pequeñas como las moléculas de tRNA y las enzimas sencillas. Rutinariamente se utilizan los coeficientes de sedimentación de los complejos macromoleculares para determinar la masa total del complejo y, por tanto, el número de subunidades de cada tipo que presentan.

La ultracentrífuga se utiliza también para separar los componentes celulares en función de su *densidad de flotación*, independientemente de su tamaño. En este caso, la muestra normalmente se hace sedimentar a través de un gradiente discontinuo que contiene una concentración muy elevada de sacarosa o de cloruro de cesio. Cada componente celular empieza a descender por el gradiente como en la Figura 4-36, hasta que llega a una zona en la que la densidad de la solución es igual a su propia densidad. En este lugar del tubo el componente flota y ya no puede desplazarse más. Por consiguiente, en el tubo de la centrífuga se forman series de bandas distintas, siendo las bandas que contienen los componentes de mayor densidad de flotación las que se hallan más cerca del fondo del tubo de centrífuga. El método, denominado **equilibrio de sedimentación**, es suficientemente sensible para separar macromoléculas que han incorporado isótopos pesados, como el ^{13}C o el ^{15}N de las mismas macromoléculas no marcadas. De hecho, el método del cloruro de cesio fue desarrollado, en 1957, para separar el DNA marcado del no marcado producido después de la exposición de una población de bacterias en crecimiento a precursores de nucleótidos con ^{15}N; este experimento clásico proporcionó la prueba directa de la replicación semiconservativa del DNA.

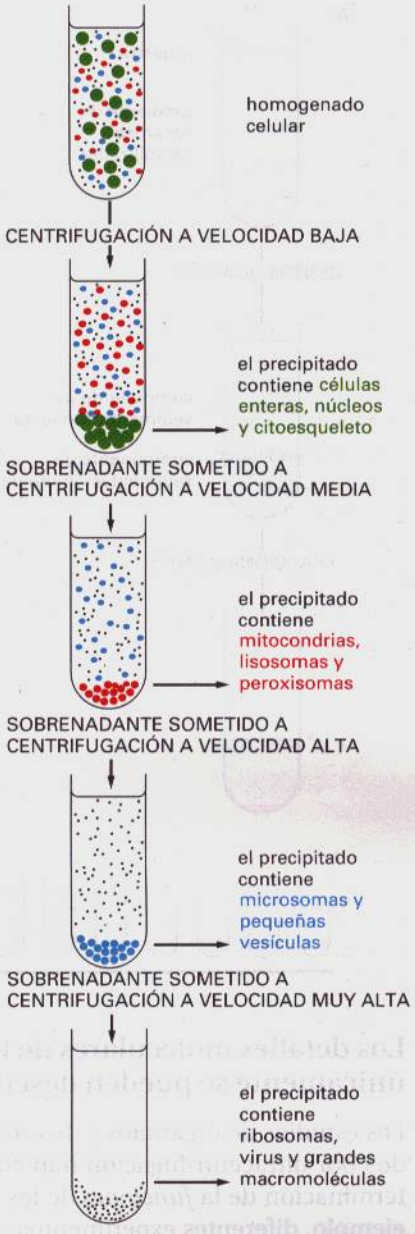


Figura 4-35 Fraccionamiento celular por centrifugación. Centrifugaciones repetidas a velocidades progresivamente mayores fraccionarán los extractos celulares en sus componentes. En general, cuanto menor sea el tamaño del componente subcelular mayor será la fuerza centrífuga necesaria para sedimentarlo. Los valores típicos de las diversas etapas de centrifugación mostradas en la figura son las siguientes:

vel. baja:	1000 veces la gravedad durante 10 minutos
vel. media:	20 000 veces la gravedad durante 20 minutos
vel. alta:	80 000 veces la gravedad durante 1 hora
vel. muy alta:	150 000 veces la gravedad durante 3 horas

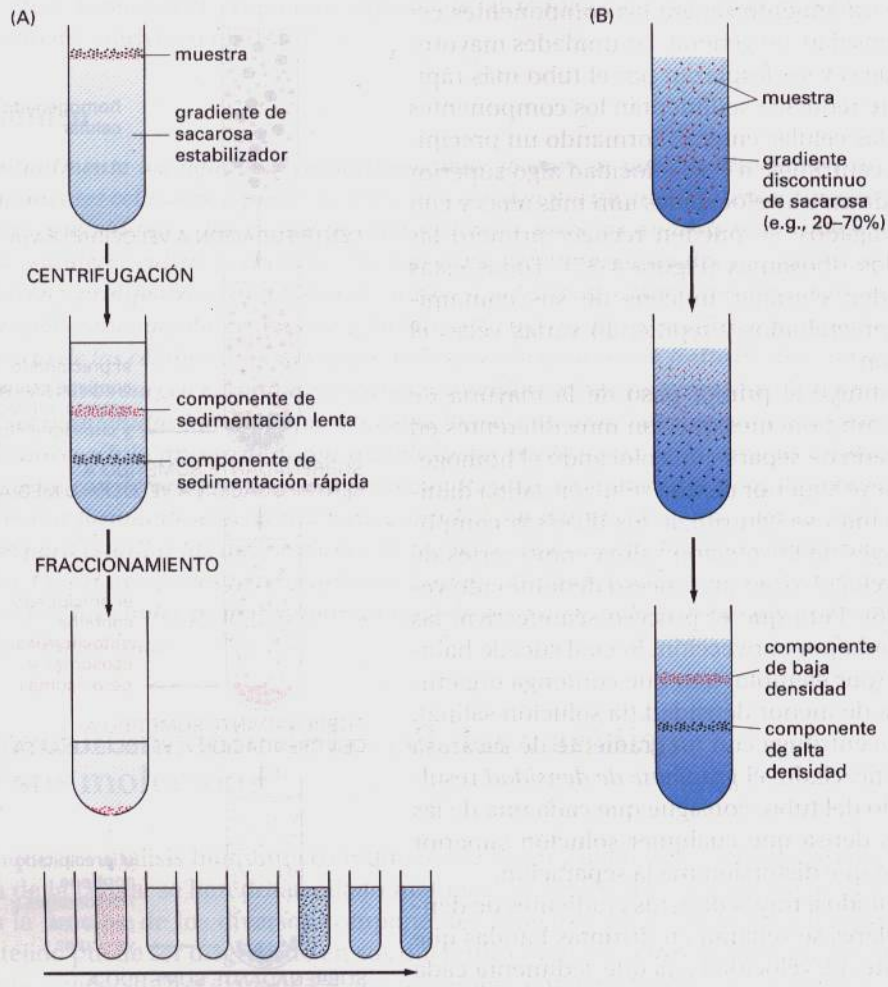


Figura 4-36 Comparación entre los métodos de velocidad de sedimentación y equilibrio de sedimentación. En velocidad de sedimentación (A), la muestra se coloca sobre una solución diluida de sacarosa y los componentes subcelulares sedimentan a diferentes velocidades de acuerdo con su tamaño. Para estabilizar las bandas que sedimentan y evitar que se mezclen por fenómenos de convección originados por pequeñas diferencias de temperatura o de concentración de los solutos, el tubo contiene un gradiente continuo de sacarosa que aumenta de concentración hacia el fondo del tubo (típicamente desde 5% a 20% de sacarosa). Después de la centrifugación, los diferentes componentes pueden recogerse por separado; el sistema más sencillo de hacerlo consiste en perforar el tubo de la centrífuga y recoger el medio gota a gota, tal como ilustra la figura. En el equilibrio de sedimentación (B) cuando los componentes subcelulares se centrifugan en un gradiente, pueden desplazarse arriba y abajo hasta que alcanzan una zona en que su densidad está comprendida entre las densidades vecinas del gradiente. Aunque aquí se presenta un gradiente de sacarosa, para separación de proteínas y de ácidos nucleicos se utilizan habitualmente gradientes de densidad preparados con cloruro de cesio. Las bandas finales, en el equilibrio, se pueden recoger como en (A).

Los detalles moleculares de los procesos celulares complejos únicamente se pueden descifrar en sistemas libres de células[22]

Los estudios de orgánulos y de otros grandes componentes subcelulares obtenidos por ultracentrifugación han constituido avances muy importante en la determinación de la *funciones* de los diferentes componentes de la célula. Así por ejemplo, diferentes experimentos sobre mitocondrias y cloroplastos purificados por centrifugación demostraron la función central de estos orgánulos en las interconversiones energéticas. Análogamente, las vesículas formadas de nuevo a partir de fragmentos del retículo endoplasmático liso y rugoso (microsomas) han sido separadas unas de otras y analizadas como modelos funcionales de estos mismos compartimentos en las células intactas. Una extensión de esta aproximación hace posible estudiar otros procesos biológicos libres de todas las complejas reacciones laterales que ocurren en la célula, y sin las constricciones de tener que mantener las células como un todo. Por ello, los extractos celulares fraccionados que mantienen su función biológica (denominados **sistemas libres de células**) son ampliamente utilizados en biología celular.

Uno de los primeros éxitos de este sistema de estudio fue la deducción del mecanismo de síntesis proteica. El punto de partida lo constituyó un extracto celular crudo que era capaz de traducir las moléculas de RNA a proteína. El fraccionamiento de este extracto dio lugar a ribosomas, tRNA y varias enzimas, que, en conjunto, constituyen la maquinaria de la síntesis proteica. Una vez se dispuso de los componentes individuales purificados, fue posible ponerlos o quitarlos uno a uno del medio de incubación, consiguiéndose así definir el papel exacto de cada uno de estos componentes. Más tarde se utilizó este mismo *sistema de traducción in vitro* para descifrar el código genético, usando polirribosomas sintéticos de se-

cuencia conocida como "RNA mensajero" (mRNA) para ser traducido. Hoy en día se utilizan diversos sistemas de traducción *in vitro* para determinar cómo las proteínas recién sintetizadas son clasificadas y dirigidas a diversos compartimentos intracelulares y también para identificar las proteínas que son codificadas por preparaciones purificadas de mRNA –un paso importante en los métodos de clonaje génico. En la Tabla 4-6 se presentan algunos de los hitos del desarrollo de los métodos utilizados en el fraccionamiento de extractos celulares.

Una gran cantidad de la información que hoy en día conocemos acerca de la biología molecular de la célula, se ha descubierto estudiando sistemas libres de células. Para citar algunos de los muchos ejemplos, estudios de este tipo se han utilizado para analizar los detalles moleculares de la replicación y la transcripción del DNA, de la maduración por corte y empalme del RNA (splicing), de la contracción muscular y del movimiento de partículas a lo largo de los microtúbulos. Los sistemas libres de células se han utilizado en estudios de procesos tan complejos y altamente organizados como el ciclo de división celular, la separación de cromosomas sobre el huso mitótico y los procesos de transporte vesicular implicados en los desplazamientos de las proteínas desde el retículo endoplásmico, a través del complejo de Golgi hasta la membrana plasmática. El análisis de un sistema libre de células supone la separación completa final de todos sus componentes macromoleculares individuales y en particular de todas sus proteínas. Ahora consideraremos cómo se puede lograr esta separación.

Tabla 4-6 Algunos de los principales acontecimientos del desarrollo de la ultracentrífuga y de la preparación de extractos libres de células

1897 **Buchner** demostró que los extractos de levadura, libres de células, pueden fermentar los azúcares produciendo dióxido de carbono y etanol, con lo que se establecieron las bases de la enzimología.

1926 **Svedberg** desarrolló la primera ultracentrífuga analítica y la utilizó para estimar el peso molecular de la hemoglobina, que cifró en 68 000 daltons.

1935 **Pickels** y **Beams** introdujeron varias características nuevas en el diseño de la ultracentrífuga, que condujeron a su utilización como instrumento preparativo.

1938 **Behrens** empleó la ultracentrifugación diferencial para separar los núcleos del citoplasma de células hepáticas, técnica que luego desarrollaron **Claude, Brachet, Hogeboon** y otros durante los años 1940 y principios de los 1950 para el fraccionamiento de orgánulos celulares.

1939 **Hill** demostró que los cloroplastos aislados, cuando se iluminaban, podían efectuar reacciones de fotosíntesis.

1949 **Szenz-Györgyi** demostró que las miofibrillas aisladas de células de músculo esquelético se contraen al añadirles ATP. En 1955 **Hofmann-Berling** desarrolló un sistema libre de células similar a éste para estudiar el movimiento ciliar.

1951 **Brakke** utilizó la centrifugación en gradiente de densidad en soluciones de sacarosa para purificar un virus vegetal.

1954 **de Duve** aisló lisosomas por centrifugación y, más tarde, peroxisomas.

1954 **Zamecnik** y colaboradores desarrollaron el primer sistema libre de células que realizaba síntesis proteica. A ello siguió una década de intensa actividad de investigación, durante la cual fue dilucidado el código genético.

1957 **Meselson, Stahl** y **Vinograd** desarrollaron la centrifugación en gradiente de densidad en soluciones de cloruro de cesio para separar ácidos nucleicos.

1975 **Dobberstein** y **Blobel** demostraron la translocación de proteínas a través de membranas, en sistemas libres de células.

1976 **Neher** y **Sakmann** desarrollaron el registro de zona para medir la actividad de canales iónicos aislados.

1983 **Lohka** y **Masui** produjeron extractos concentrados a partir de huevos que *in vitro* realizaban el ciclo celular completo.

1984 **Rothman** y colaboradores reconstituyeron *in vitro* el tráfico de vesículas de Golgi utilizando un sistema libre de células.

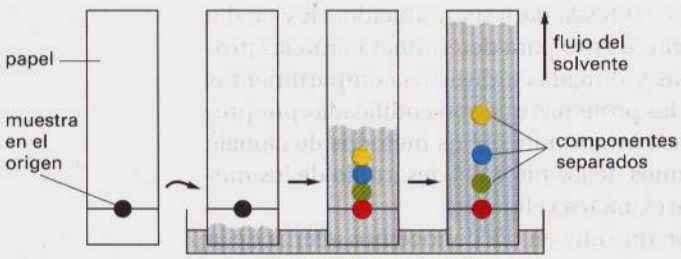


Figura 4-37 Separación de moléculas pequeñas mediante cromatografía sobre papel. Después de aplicar la muestra en un extremo del papel (el "origen") y de secarla, se permite que una solución que contiene una mezcla de dos disolventes fluya lentamente a lo largo del papel por capilaridad. Los diferentes componentes de la muestra se desplazan sobre el papel a velocidades distintas, en función de su solubilidad relativa en el solvente que es adsorbido preferentemente por el papel. El desarrollo de esta técnica revolucionó los análisis bioquímicos durante los años 1940.

Las proteínas pueden separarse mediante cromatografía[23]

Uno de los métodos de utilidad más general para el fraccionamiento de las proteínas es el de la **cromatografía**, técnica desarrollada para separar pequeñas moléculas como azúcares y aminoácidos. Un tipo muy común de cromatografía, todavía muy utilizado actualmente para separar pequeñas moléculas, es la *cromatografía de partición*. Típicamente, una gota de la muestra se aplica como una mancha en una hoja de material absorbente, que puede ser papel (*cromatografía de papel*) o una hoja de plástico o de cristal recubierta de una fina capa de un material absorbente inerte, como celulosa o gel de sílice (*cromatografía en capa fina*). A continuación, se deja que una mezcla de disolventes, como por ejemplo el agua y un alcohol, impregne la hoja desde uno de sus extremos; a medida que el líquido se va desplazando a través de la hoja, va separando las moléculas de la muestra en función de su solubilidad en cada uno de los dos disolventes. Los disolventes se escogen de forma que uno de ellos se adsorba con mayor intensidad en el material absorbente que el otro formando una capa de disolvente estacionaria en la superficie de la hoja. En cada región de la hoja las moléculas se equilibran entre el disolvente estacionario y el móvil: las que son más solubles en el disolvente fuertemente adsorbido son relativamente retardadas porque consumen más tiempo en la capa estacionaria, mientras que las que son más solubles en el otro disolvente se mueven más rápidamente. Después de un cierto número de horas, la hoja se seca y se tiñe para localizar la situación de las diferentes moléculas (Figura 4-37).

Las proteínas se suelen fraccionar mediante la *cromatografía en columna*, en la que una mezcla de proteínas en solución se hace pasar a través de una co-

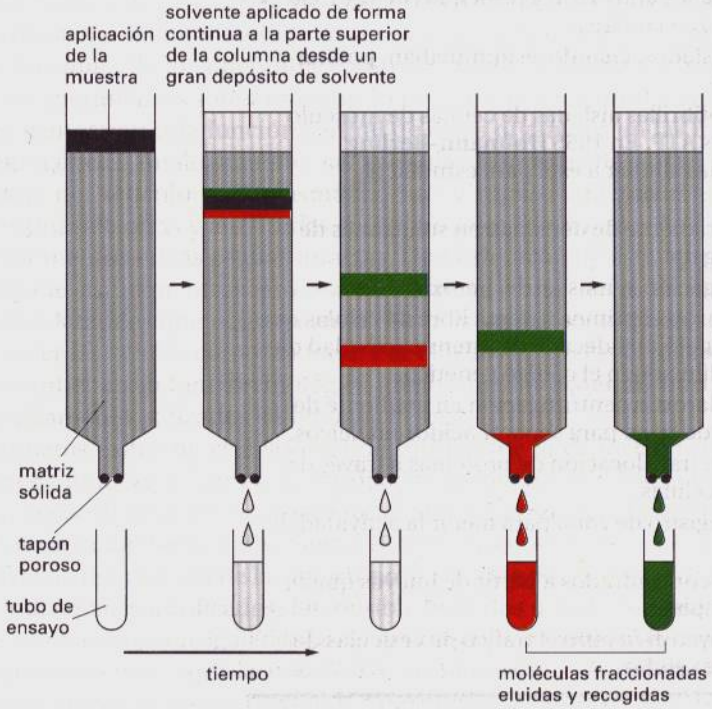


Figura 4-38 Separación de moléculas mediante cromatografía en columna. La muestra se aplica en la parte superior de una columna cilíndrica de vidrio o de plástico, que contiene una matriz sólida permeable, por ejemplo de celulosa, inmersa en un solvente. A continuación se hace pasar lentamente a través de la columna una gran cantidad de solvente, recogiéndolo en tubos separados a medida que sale de la parte inferior de la columna. Los diversos componentes de la muestra se desplazan a distintas velocidades a través de la columna quedando así fraccionados en tubos distintos.

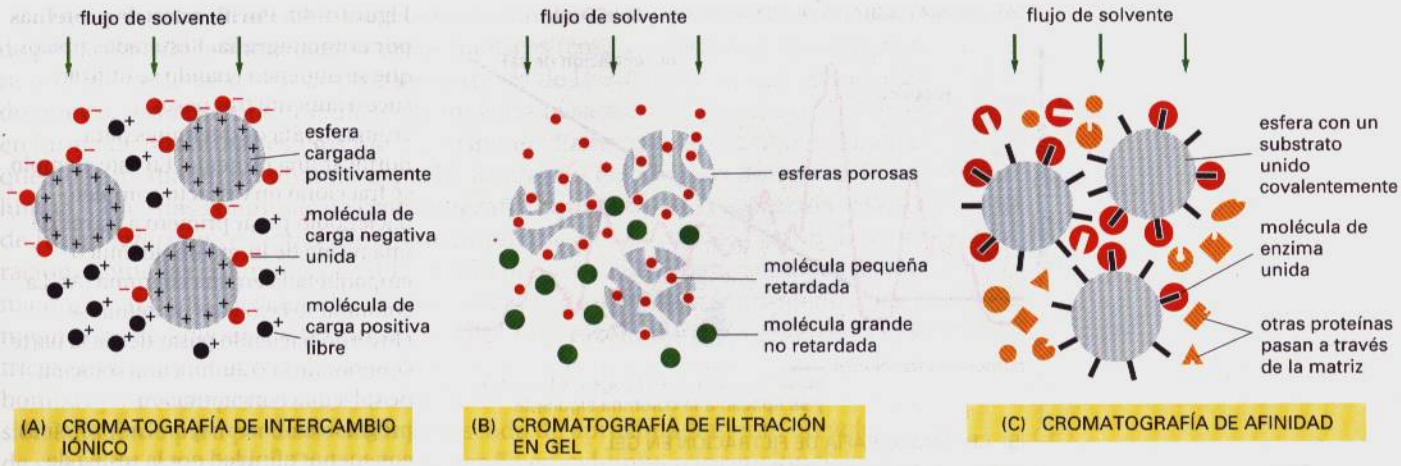


Figura 4-39 Tres tipos de matriz utilizados en cromatografía. En la cromatografía de intercambio iónico (A) la matriz insoluble presenta cargas iónicas que retardan las moléculas de carga opuesta. Las matrices utilizadas habitualmente para separar proteínas son la dietilaminoetilcelulosa (DEAE-celulosa), de carga positiva, y la carboximetilcelulosa (CM-celulosa) y la fosfocelulosa, de carga negativa. La fuerza de unión entre las moléculas disueltas y la matriz de intercambio iónico depende de la fuerza iónica y del pH de la solución eluyente que atraviesa la columna, parámetros que pueden variarse de una manera sistemática (como en la Figura 4-40) para conseguir una separación más efectiva. En la cromatografía de filtración en gel (B) la matriz es inerte pero porosa. Las moléculas suficientemente pequeñas para penetrar en el interior de la matriz se retrasan y viajan más lentamente a través de la columna. En el comercio existen bolitas de polisacáridos con puentes cruzados (dextrano o agarosa) en una amplia gama de tamaños de poro adecuadas para el fraccionamiento de moléculas de diversos pesos moleculares, desde menos de 500 hasta más de 5×10^6 daltons. La cromatografía de afinidad (C) utiliza una matriz insoluble que está unida covalentemente a un ligando específico, como por ejemplo una molécula de anticuerpo o un substrato enzimático, que se unirá a una proteína determinada de la muestra. Las moléculas de enzima que se han unido a substratos inmovilizados en columnas de este tipo se pueden eluir con una solución concentrada del substrato en forma libre, mientras que moléculas que se han unido a anticuerpos inmovilizados pueden eluirse disociando el complejo antígeno-anticuerpo con soluciones concentradas de sales o con soluciones de pH alto o bajo. A menudo se consiguen purificaciones elevadas con un solo paso a través de estas columnas.

lumna que contiene una matriz sólida porosa. Las diferentes proteínas de la mezcla se van retrasando más o menos a causa de su interacción con la matriz de la columna y pueden recogerse por separado en su estado funcional nativo a medida que fluyen por el extremo inferior de la columna (Figura 4-38). En función del tipo de matriz que se utilice, las proteínas se pueden separar según su carga (cromatografía de intercambio iónico), su hidrofobicidad (cromatografía hidrofóbica), su tamaño (cromatografía de filtración), o su capacidad para unirse a determinados grupos químicos (cromatografía de afinidad).

Actualmente se comercializan un gran número de tipos diferentes de matriz para cromatografía (Figura 4-39). Las *columnas de intercambio iónico* están llenas de pequeñas bolitas que contienen cargas positivas o negativas, de modo que las proteínas se separan en función de la disposición de cargas de su superficie. Las *columnas hidrofóbicas* están llenas de unas bolitas con cadenas laterales hidrofóbicas que sobresalen de ellas, de modo que las proteínas que tengan regiones hidrofóbicas al descubierto quedan retardadas en su tránsito por la columna. Las *columnas de filtración en gel*, que separan proteínas en función de su tamaño, contienen diminutas bolitas porosas: a medida que van descendiendo por la columna, las moléculas suficientemente pequeñas para penetrar en los poros pasan sucesivamente por el interior de estas esferas, mientras que las moléculas más grandes permanecen en la solución fluyendo entre las esferas, y por lo tanto, eluyen más rápidamente a través de la columna y salen primero. Además de permitir la separación de las moléculas, la cromatografía de filtración en gel constituye un buen sistema para determinar el tamaño de las moléculas.

Este tipo de cromatografía en columna no produce fracciones altamente purificadas si se parte de una mezcla compleja de proteínas: un único paso a través de una columna suele incrementar la proporción en la mezcla de una proteína determinada en no más de veinte veces. Puesto que la mayoría de las proteínas

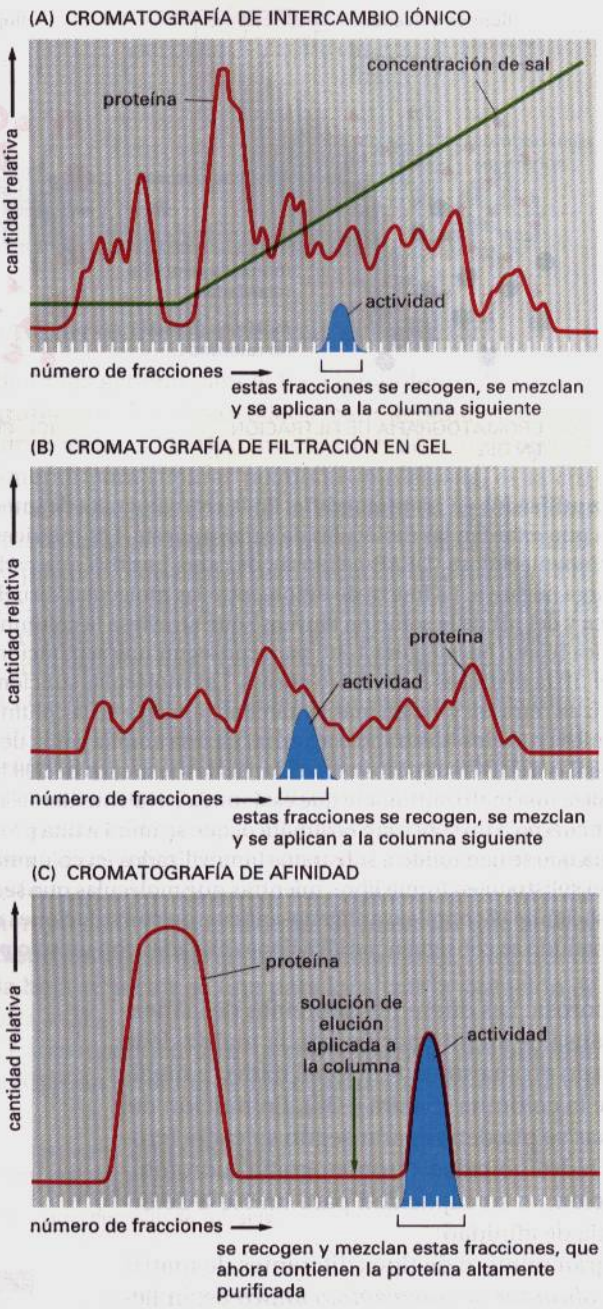


Figura 4-40 Purificación de proteínas por cromatografía. Resultados típicos que se obtienen cuando se utilizan sucesivamente tres pasos cromatográficos diferentes para purificar una proteína. En este ejemplo se fraccionó un extracto completo haciéndolo pasar primero a través de una resina de intercambio iónico empaquetada en una columna (A). La columna se lavó y las proteínas se eluyeron haciendo pasar desde la parte superior de la columna una solución de sal a una concentración progresivamente mayor. Las proteínas con menor afinidad por la resina de intercambio iónico pasaron directamente a través de la columna y fueron recogidas en las primeras fracciones eluidas que salieron por la parte inferior de la columna. Las restantes proteínas fueron eluidas de manera secuencial de acuerdo con su afinidad por la resina –las unidas más intensamente necesitaron una concentración de sal más elevada para ser eluidas. La proteína de interés salió en forma de un pequeño pico y se detectó por su actividad enzimática. Las fracciones con actividad fueron recogidas y aplicadas a una segunda columna de filtración en gel (B). La posición de elución de la proteína todavía impura fue determinada de nuevo por su actividad enzimática, y las fracciones activas fueron recogidas y purificadas hasta homogeneidad mediante una columna de afinidad (C) que contenía inmovilizado un substrato de la enzima.

representan individualmente menos del 1/1000 de la proteína celular total, para conseguir purificarlas suele ser necesario utilizar sucesivamente varios tipos diferentes de columnas para conseguir la pureza suficiente (Figura 4-40). Un procedimiento más eficiente, conocido como **cromatografía de afinidad**, utiliza interacciones de enlace, importantes desde el punto de vista biológico, que se producen en la superficie de las proteínas. Por ejemplo, si un substrato enzimático se acopla covalentemente a una matriz inerte, como pueden ser pequeñas esferas de un polisacárido, la enzima específica de este substrato fijado a la columna será retenida en la matriz y podrá ser eluida (lavada) en forma casi pura. De forma similar, puede inmovilizarse un DNA corto de secuencia diseñada específicamente y utilizarse para purificar proteínas que se unan al DNA y que reconozcan esta secuencia de nucleótidos en los cromosomas (Figura 9-23). Alternativamente, se pueden acoplar anticuerpos específicos a una matriz para purificar moléculas proteicas reconocidas por los anticuerpos. Debido a la elevada especificidad de estas *columnas de afinidad*, algunas veces se pueden conseguir, en un solo paso, purificaciones del orden de 1000 a 10 000 veces.

La resolución de las columnas convencionales de cromatografía está limitada por la falta de homogeneidad de las matrices (como la celulosa), la cual genera un flujo desigual de los disolventes a través de la columna. Se han desarrollado nuevas resinas cromatográficas (la mayoría basadas en compuestos de sílice) en forma de diminutas esferas (de 3 a 10 μm de diámetro) que pueden ser empaquetadas mediante un aparato especial formando un lecho uniforme en la columna. Con estas columnas de **cromatografía líquida de alta resolución (HPLC,** de *High Performance Liquid Chromatography*) se alcanza un alto grado de separación. Como las columnas de HPLC contienen partículas empaquetadas de forma muy compacta, la velocidad de flujo a través de ellas es prácticamente nula a menos que se apliquen altas presiones. Por esta razón, normalmente estas matrices se empaquetan en cilindros de acero y requieren un sistema sofisticado de bombas y válvulas para forzar a fluir el disolvente a través de la columna a la presión suficiente para producir un flujo deseado de aproximadamente un volumen de columna por minuto. En la cromatografía en columna convencional, la velocidad de flujo debe ser lenta (a menudo de aproximadamente un volumen de columna por hora) para dar tiempo a los solutos a que se fraccionen en equilibrio con el interior de las grandes partículas de la matriz. En la HPLC los solutos se equilibran rápidamente con el interior de las diminutas esferas, de manera que solutos con diferentes afinidades por la matriz son separados entre sí de forma muy eficiente, siempre a rápida velocidad de flujo. Esto permite que muchos fraccionamientos puedan realizarse en cuestión de minutos, mientras que para obtener una separación pobre en la cromatografía convencional se requieren horas. Por consiguiente, la HPLC se ha convertido en el método escogido para muchas separaciones de proteínas y de pequeñas moléculas.

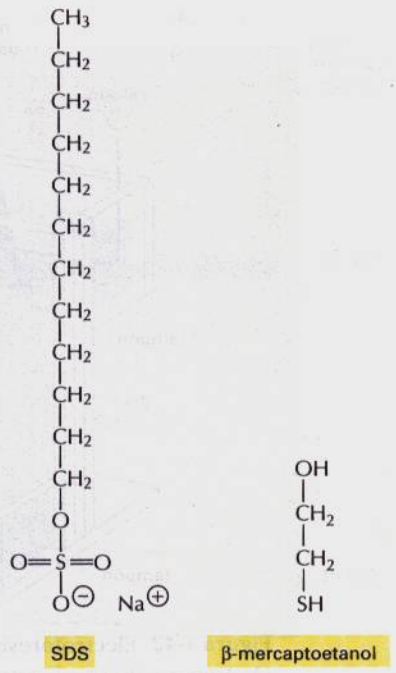


Figura 4-41 El detergente dodecil sulfato sódico (SDS) y el agente reductor β-mercaptoetanol. Estos dos reactivos químicos se utilizan para solubilizar proteínas para electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. El SDS se presenta aquí en su forma ionizada.

Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, pueden determinarse el tamaño y la composición de subunidades de una proteína[24]

Las proteínas suelen tener una carga neta positiva o negativa, que refleja la de los aminoácidos cargados que contienen. Si se aplica un campo eléctrico a una solución que contenga una molécula proteica, la proteína migrará a una velocidad que dependerá de su carga neta, de su tamaño y de su forma. Esta técnica, conocida como **electroforesis**, se utilizó inicialmente para separar mezclas de proteínas tanto libres en soluciones acuosas como incluidas en una matriz sólida porosa tal como el almidón.

A mediados de los años 1960 se desarrolló una versión modificada de este método –conocida como **electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS** (o **SDS-PAGE**, de *SDS PolyAcrilamide-Gel Electrophoresis*), que ha revolucionado los sistemas de análisis rutinarios de las proteínas. Como matriz inerte a través de la que migran las proteínas, se utiliza un gel de poliacrilamida con numerosos puentes cruzados. Normalmente el gel se prepara inmediatamente antes de utilizarse mediante la polimerización a partir de los monómeros; el tamaño del poro del gel puede ajustarse de forma que sea el adecuado para retrasar la migración de las moléculas proteicas de interés. Las proteínas no se colocan en una solución acuosa simple, sino en una solución que contiene un potente detergente de carga negativa, el **dodecil sulfato sódico**, o **SDS** (de *Sodium Dodecyl Sulfate*) (Figura 4-41). Como este detergente se une a las regiones hidrofóbicas de las moléculas proteicas, haciendo que se desplieguen las cadenas polipeptídicas, las diferentes moléculas proteicas quedan liberadas de sus asociaciones con otras moléculas proteicas o lipídicas y se disuelven libremente en la solución del detergente. Además, se suele añadir un agente reductor como el *mercaptoetanol* (Figura 4-41) con objeto de romper los enlaces S–S que pudieran existir en las proteínas, de forma que puedan analizarse separadamente todos los polipéptidos constitutivos de las moléculas que tengan varias subunidades.

¿Qué sucede cuando una mezcla de proteínas solubilizadas con SDS se somete a electroforesis a través de una lámina de gel de poliacrilamida? Cada mo-

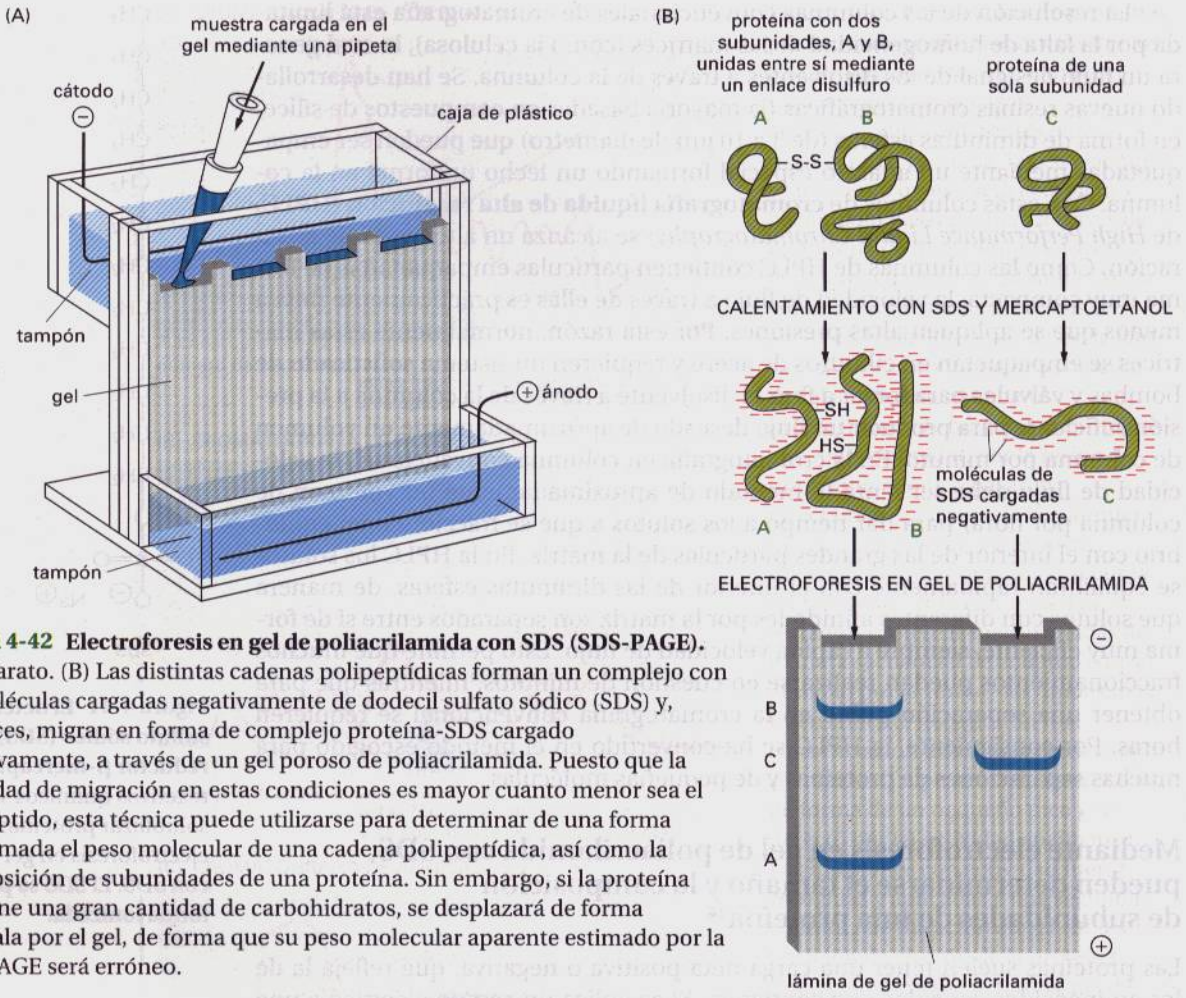


Figura 4-42 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). (A) Aparato. (B) Las distintas cadenas polipeptídicas forman un complejo con las moléculas cargadas negativamente de dodecil sulfato sódico (SDS) y, entonces, migran en forma de complejo proteína-SDS cargado negativamente, a través de un gel poroso de poliacrilamida. Puesto que la velocidad de migración en estas condiciones es mayor cuanto menor sea el polipéptido, esta técnica puede utilizarse para determinar de una forma aproximada el peso molecular de una cadena polipeptídica, así como la composición de subunidades de una proteína. Sin embargo, si la proteína contiene una gran cantidad de carbohidratos, se desplazará de forma anómala por el gel, de forma que su peso molecular aparente estimado por la SDS-PAGE será erróneo.

lécula de proteína se une a una gran cantidad de moléculas del detergente, cargadas negativamente, que anulan la carga intrínseca de la proteína y hacen que cuando se aplica un voltaje la proteína migre hacia el electrodo positivo. Las proteínas del mismo tamaño tienden a comportarse de forma idéntica ya que (1) su estructura nativa está completamente desplegada por el SDS, por lo que presentan la misma forma, y (2) unen la misma cantidad de SDS y por tanto tienen la misma cantidad de carga negativa. Las proteínas grandes, con mayor carga, están sujetas a grandes fuerzas eléctricas pero también a mayores resistencias. En solución libre, ambos efectos podrían contrarrestarse, pero en las redes del gel de poliacrilamida, que actúa como un filtro molecular, las grandes proteínas son retardadas mucho más severamente que las pequeñas. En consecuencia, una mezcla compleja de proteínas es fraccionada en series de bandas proteicas discretas, que se hallan ordenadas en función de su peso molecular (Figura 4-42). Las proteínas mayoritarias se detectan fácilmente tiñiendo el gel con un colorante como el azul de Coomassie, mientras que las proteínas minoritarias se pueden visualizar en los geles tratados con una sal de plata (pudiéndose detectar en cada banda una cantidad tan pequeña como 10 ng de proteína).

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS es un procedimiento más poderoso que cualquier otro método anterior de análisis de proteínas, principalmente debido a que puede utilizarse para separar todos los tipos de proteínas, incluyendo las que sean insolubles en agua. Pueden resolverse proteínas de membrana, proteínas componentes del citoesqueleto y proteínas que forman parte de grandes agregados macromoleculares. Debido a que el método separa los polipéptidos en función de su tamaño, también proporciona información sobre el peso molecular y la composición de subunidades de cualquier complejo

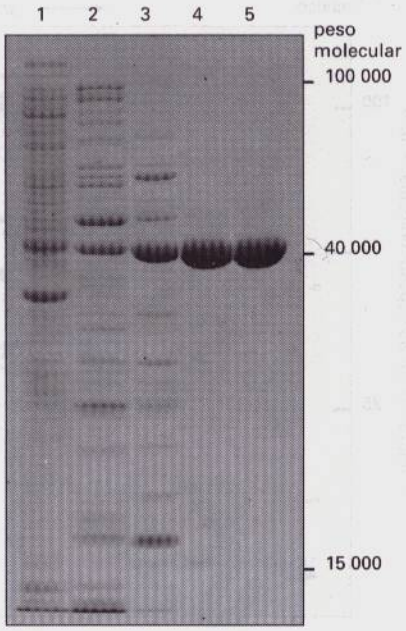


Figura 4-43 Análisis de muestras proteicas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. La fotografía muestra un gel que se ha utilizado para detectar las proteínas presentes en los sucesivos estadios de la purificación de una enzima. El carril izquierdo (carril 1) contiene la mezcla compleja de proteínas en el extracto celular de partida, y cada uno de los carriles sucesivos analizan las proteínas obtenidas después de un fraccionamiento cromatográfico de la muestra de proteínas analizada en el carril anterior (véase Figura 4-40). En cada carril se cargó la misma cantidad de proteína (10 μg). Normalmente, cada proteína aparece como una fina banda teñida; sin embargo, las bandas se ensanchan cuando contienen demasiada proteína. (Por cortesía de Tim Formosa.)

proteico. En la Figura 4-43 se presenta una fotografía de un gel utilizado para analizar cada una de las sucesivas etapas de la purificación de una proteína.

Mediante electroforesis bidimensional sobre gel de poliacrilamida, se pueden resolver más de 1000 proteínas sobre un mismo gel[25]

Dado que en un cromatograma las bandas muy próximas tienden a superponerse, cualquier método unidimensional de separación, como la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS o la cromatografía, sólo pueden resolver un número relativamente reducido de proteínas (por lo general menos de 50). Por el contrario, la **electroforesis bidimensional sobre gel**, que combina dos procedimientos diferentes de separación, puede ser utilizada para resolver más de 1000 proteínas diferentes, en forma de un mapa proteico bidimensional.

En el primer paso, las proteínas son separadas en función de su carga. La muestra se disuelve en un volumen reducido de una solución que contenga un detergente no iónico (no cargado) y un reactivo desnaturalizante como la urea o el mercaptoetanol. Esta solución disuelve, desnaturaliza y disocia todas las cadenas polipeptídicas sin alterar su carga intrínseca. Luego, las cadenas polipeptídicas son fraccionadas mediante un procedimiento denominado **enfoque isoeléctrico** o **isoelectroenfoque**, que se basa en el hecho de que la carga neta de una molécula proteica varia con el pH de la solución. Para cada proteína existe un pH característico, denominado *punto isoeléctrico*, al que la proteína no presenta carga neta y, por lo tanto, no migrará en un campo eléctrico. En el isoelectroenfoque las proteínas son sometidas a electroforesis en un tubo estrecho de gel de poliacrilamida en el que se ha establecido un gradiente de pH mediante unas mezclas de amortiguadores especiales. Cada proteína se desplaza hasta la zona de gradiente que presenta un pH igual a su punto isoeléctrico, y allí permanece inmóvil (Figura 4-44). Ésta es la primera dimensión de la electroforesis bidimensional sobre gel.

En el segundo paso, el estrecho gel que contiene las proteínas separadas se somete otra vez a electroforesis, pero en una dirección perpendicular a la utilizada en el primer paso. Esta vez se añade SDS, y las proteínas son separadas en

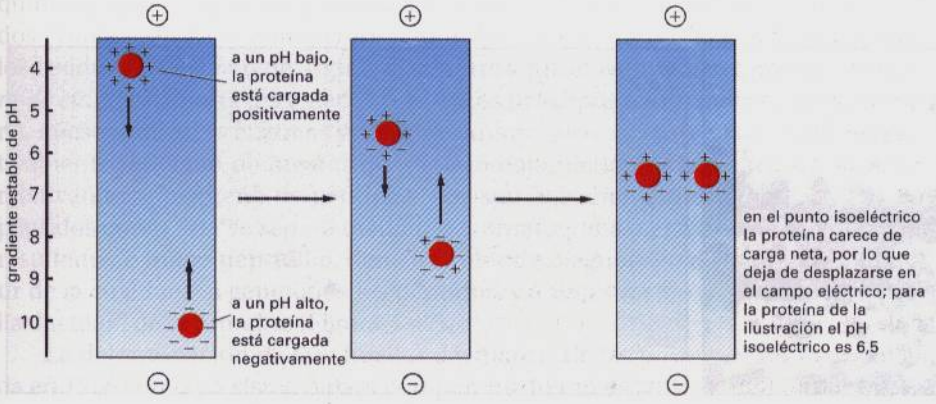


Figura 4-44 Separación de moléculas proteicas por isoelectroenfoque. A pH bajo (elevada concentración de H^+) los grupos ácido carboxilo de las proteínas tienen tendencia a quedar sin carga (–COOH) y los grupos nitrogenados básicos, a quedar cargados (por ejemplo, $-NH_3^+$) confiriendo a la mayoría de las proteínas una carga neta positiva. A un pH elevado, los grupos ácido carboxilo están cargados negativamente ($-COO^-$) y los grupos básicos tienden a estar sin carga (por ejemplo, $-NH_2$), confiriendo a la mayoría de las proteínas una carga neta negativa. A su *pH isoeléctrico* una proteína carece de carga neta debido a que las cargas positivas y negativas se anulan. Así, cuando un tubo que contiene un determinado gradiente de pH se somete a un campo eléctrico intenso, cada tipo de proteína migra hasta formar una banda bien delimitada en su pH isoeléctrico, como se muestra en la ilustración.

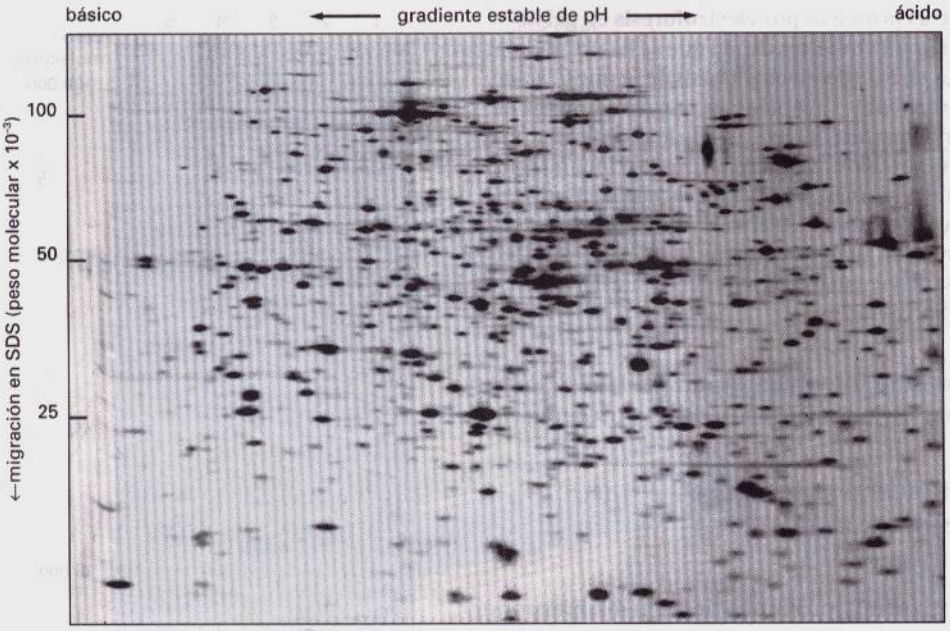
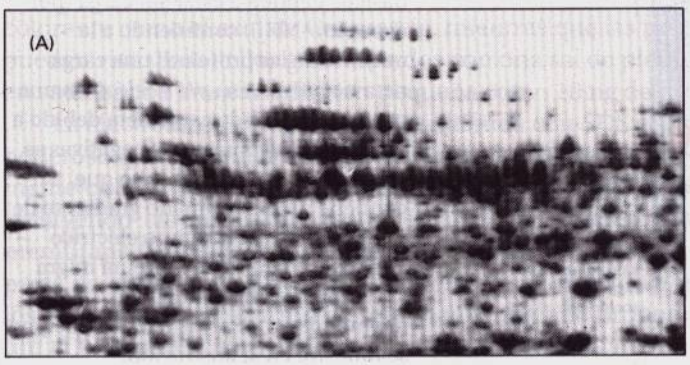


Figura 4-45 Electroforesis bidimensional sobre gel de poliacrilamida. En este gel se separan todas las proteínas de una bacteria *E. coli*; cada mancha corresponde a una cadena polipeptídica diferente. Las proteínas fueron separadas primero de acuerdo con sus puntos isoeléctricos mediante isoelectroenfoque, de izquierda a derecha. Después fueron fraccionadas de nuevo según sus pesos moleculares mediante electroforesis en presencia de SDS, de arriba a abajo. Obsérvese que las distintas proteínas se hallan presentes en cantidades muy diferentes. La bacteria fue alimentada con una mezcla de aminoácidos marcados con radioisótopos, de manera que todas sus proteínas resultaron radiactivas y pudieron fácilmente detectarse mediante autorradiografía (véase pág. 191). (Por cortesía de Patrick O´Farrell.)

función de su tamaño, como en el caso de la SDS-PAGE de una dimensión: el estrecho gel original se empapa en SDS y se sitúa en un borde de una lámina de gel de poliacrilamida-SDS, a través del cual cada cadena polipeptídica migra formando una mancha discreta. Ésta es la segunda dimensión de la electroforesis bidimensional sobre gel de poliacrilamida. Las únicas proteínas que no se resolverían serían las que tuvieran un tamaño idéntico y un punto isoeléctrico idéntico, lo cual es relativamente poco frecuente. Por este sistema pueden detectarse sobre el gel incluso cantidades traza de cada una de las cadenas polipeptídicas, mediante diversos procedimientos de tinción –o por medio de autorradiografía si la muestra estaba marcada con un radioisótopo. En un mismo gel bidimensional se pueden separar hasta 2000 cadenas polipeptídicas –lo cual constituye la mayor parte de las proteínas de una bacteria– (Figura 4-45). Este sistema tiene un poder de resolución tan elevado que permite diferenciar fácilmente dos proteínas idénticas entre sí que solamente se diferencian en un solo aminoácido cargado.

Tras su resolución tanto en geles unidimensionales como bidimensionales, una determinada proteína puede identificarse exponiendo todas las proteínas presentes a un anticuerpo específico que ha sido acoplado a un isótopo radiactivo, a una enzima fácilmente detectable o a un colorante fluorescente. Por conveniencia, normalmente esto se realiza después de que todas las proteínas presentes en el gel se han transferido (mediante "blotting") a una lámina de papel de nitrocelulosa, como describiremos más adelante para los ácidos nucleicos (véase Figura 7-13). Este método de detección de proteínas se denomina *transferencia de tipo Western* (*Western blotting*) (Figura 4-46).

Figura 4-46 Transferencia de tipo Western (Western blotting) o immunoblotting. Todas las proteínas de células del tabaco en división mantenidas en cultivo se separaron primero mediante electroforesis bidimensional sobre gel de poliacrilamida, como se muestra en la Figura 4-45, y sus posiciones se revelaron mediante una tinción sensible a las proteínas (A). Las proteínas separadas en un gel idéntico al anterior se transfirieron a un papel de nitrocelulosa, el cual se incubó con un anticuerpo que reconoce las proteínas que durante la mitosis resultan fosforiladas en residuos de treonina. Se reveló la posición de la docena de proteínas de este tipo que son reconocidas por este anticuerpo, mediante un segundo anticuerpo unido a una enzima (B). (De J.A. Traas, A.F. Bevan, J.H. Doonan, J. Cordewener y P.J. Shaw. *Plant Journal* 2:723-732, 1992, con permiso de Blackwell Scientific Publ.)



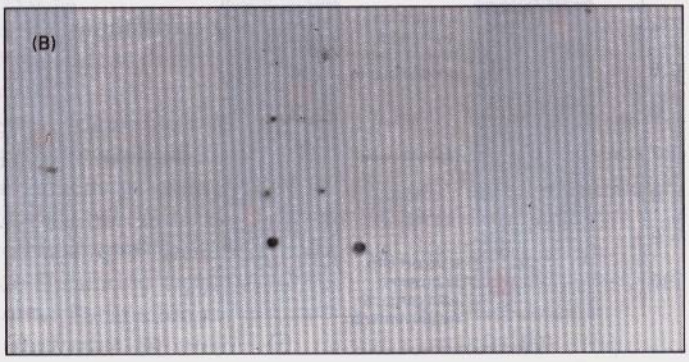


Tabla 4-7 Hitos en el desarrollo de la cromatografía y de la electroforesis y de su aplicación a las moléculas biológicas

1833 **Faraday** describió las leyes fundamentales sobre el paso de la electricidad a través de soluciones iónicas.

1850 **Runge** separó compuestos químicos inorgánicos en función de su adsorción diferencial sobre el papel, técnica precursora de las posteriores separaciones cromatográficas.

1906 **Tswett** inventó la cromatografía en columna, pasando extractos de petróleo de hojas de plantas a través de columnas de greda en polvo.

1933 **Tiselius** introdujo la electoforesis para separar proteínas en solución.

1942 **Martin** y **Synge** desarrollaron la cromatografía de partición, que dos años más tarde condujo a la cromatografía en papel.

1946 **Stein** y **Moore** determinaron por primera vez la composición de aminoácidos de una proteína utilizando inicialmente una columna cromatográfica de almidón y desarrollando posteriormente la cromatografía sobre resinas intercambiadoras de iones.

1955 **Smithies** utilizó geles preparados con almidón para separar las proteínas séricas mediante electroforesis.

Sanger completó el análisis de la secuencia de aminoácidos de la insulina bovina, que fue la primera proteína que se secuenció.

1956 **Ingram** produjo las primeras "huellas dactilares" de proteínas, demostrando que la diferencia entre la hemoglobina de la anemia falciforme y la hemoglobina normal radica en la variación de un solo aminoácido.

1959 **Raymond** introdujo los geles de poliacrilamida, mejores que los de almidón, para separar proteínas por electroforesis; en los años siguientes, **Ornstein** y **Davis** desarrollaron mejores sistemas de amortiguadores que permitieron la separación a elevada resolución.

1966 **Maizel** introdujo el uso del dodecil sulfato sódico (SDS) para mejorar la electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas.

1975 **O'Farrell** ideó el sistema bidimensional sobre gel para analizar mezclas de proteínas; la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS se combinó con la separación según el punto isoeléctrico.

En la Tabla 4-7 se presentan algunos hitos en el desarrollo de la cromatografía y la electroforesis.

La hidrólisis selectiva de una proteína genera un conjunto característico de fragmentos peptídicos[26]

Aunque el peso molecular y el punto isoeléctrico son rasgos característicos de una proteína, la identificación inequívoca de una proteína se basa, en último término, en la determinación de su secuencia de aminoácidos. La primera fase de este proceso, que consiste en la rotura de la proteína en fragmentos más pequeños, puede proporcionar por sí misma mucha información útil que ayude a caracterizar la molécula. Disponemos de enzimas proteolíticas y de reactivos químicos que rompen las proteínas entre determinados residuos de aminoácidos (Tabla 4-8). La enzima *tripsina*, por ejemplo, corta por el lado carboxilo de los residuos de lisina o de arginina, mientras que el compuesto químico *bromuro de cianógeno* corta los enlaces peptídicos próximos a los residuos de metionina. Puesto que estas enzimas y compuestos químicos actúan en un número relativamente reducido de lugares de una proteína, tienden a producir un número relativamente pequeño de péptidos, que son bastante largos. Si una mezcla de péptidos como ésta se separa mediante cromatografía o electroforesis, el patrón resultante, o **mapa peptídico**, tiene un valor de diagnóstico de la proteína a partir de la cual fueron generados los péptidos, y a veces recibe el nombre de "huella dactilar" de la proteína (Figura 4-47).

La determinación de las "huellas dactilares" de las proteínas fue desarrollada en 1956 como un sistema para comparar la hemoglobina normal con la forma

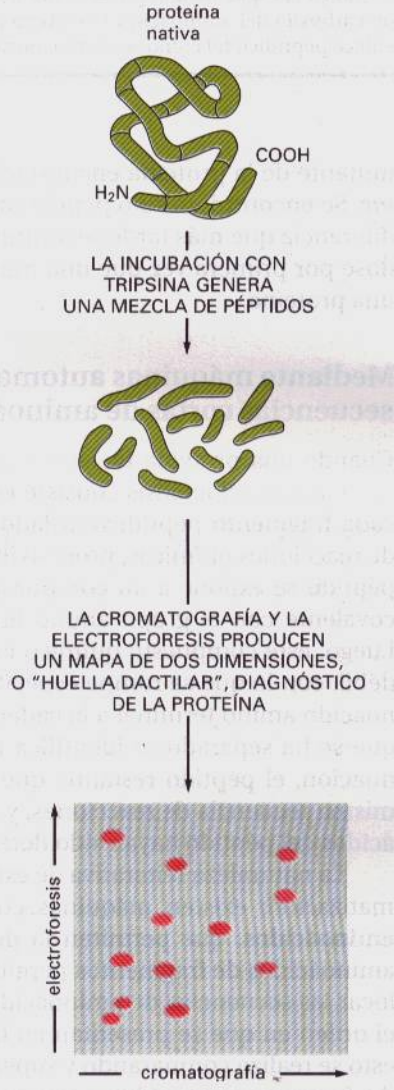


Figura 4-47 Confección de un mapa peptídico, o huella dactilar, de una proteína. En este caso, la proteína fue digerida con tripsina, generándose una mezcla de numerosos fragmentos polipeptídicos pequeños diferentes, que luego se fraccionaron en dos dimensiones mediante electroforesis y cromatografía de partición. El patrón de manchas obtenido tiene valor diagnóstico para la proteína analizada.

Tabla 4-8 Algunos de los reactivos utilizados normalmente para romper los enlaces peptídicos de las proteínas

	Aminoácido 1	Aminoácido 2
Enzima		
Tripsina	Lys o Arg	cualquiera
Quimotripsina	Phe, Trp o Tyr	cualquiera
Proteasa V8	Glu	cualquiera
Compuesto químico		
Bromuro de cianógeno	Met	cualquiera
2-Nitro-5-tiocianobenzoato	cualquiera	Cys

Se indica la especificidad por los aminoácidos de ambos lados del enlace que se rompe. El grupo carboxilo del aminoácido 1 se libera por la rotura; este aminoácido queda a la izquierda del enlace peptídico tal como se escribe normalmente (véase Panel 2-5, págs. 58-59).

mutante de la proteína encontrada en pacientes que sufren de *anemia falciforme*. Se encontró un solo péptido diferente entre ambas formas de hemoglobina, diferencia que más tarde se atribuyó a un solo aminoácido cargado, demostrándose por primera vez que una mutación puede cambiar un solo aminoácido de una proteína.

Mediante máquinas automatizadas pueden analizarse secuencias cortas de aminoácidos[27]

Cuando una proteína ha sido fragmentada en pequeños péptidos, el siguiente paso lógico del análisis consiste en determinar la secuencia de aminoácidos de cada fragmento peptídico aislado. Esto se realiza mediante una serie repetida de reacciones químicas, proceso ideado originalmente en 1967. Primeramente el péptido se expone a un compuesto químico que únicamente forma un enlace covalente con el grupo amino libre del extremo amino terminal del péptido. Luego, este compuesto químico es activado mediante su exposición a un ácido débil, con lo que se rompe específicamente el enlace peptídico que une el aminoácido amino terminal a la cadena polipeptídica; seguidamente el aminoácido que se ha separado se identifica utilizando métodos cromatográficos. A continuación, el péptido restante, que tiene un aminoácido menos, se somete a la misma secuencia de reacciones, y así sucesivamente hasta que todos los aminoácidos del péptido hayan sido determinados.

La naturaleza reiterativa de estas reacciones conduce por sí misma a la automatización; existen máquinas comerciales, denominadas **secuenciadores de aminoácidos**, que permiten la determinación automática de la secuencia de aminoácidos de fragmentos peptídicos. El paso final del proceso consiste en colocar las secuencias de aminoácidos de los diferentes fragmentos peptídicos en el orden en que se presentan en la cadena peptídica intacta. Tradicionalmente esto se realiza comparando y superponiendo las secuencias de diferentes grupos de fragmentos peptídicos obtenidos mediante fraccionamiento de la misma proteína utilizando diferentes enzimas proteolíticas.

Los adelantos tecnológicos han aumentado marcadamente la velocidad y la sensibilidad de la determinación de la secuencia de aminoácidos de proteínas, permitiendo el análisis de muestras diminutas; en una sola noche y a partir de pocos microgramos de proteína –la cantidad disponible a partir de una única banda en un gel de poliacrilamida– se puede obtener la secuencia de varias docenas de aminoácidos del extremo amino terminal de un péptido. Este procedimiento ha resultado importante para caracterizar muchas proteínas celulares minoritarias, como los receptores para las hormonas esteroideas y polipeptídicas. Frecuentemente la determinación de tan sólo 20 aminoácidos de la secuen-

cia de una proteína es suficiente para lograr diseñar una sonda de DNA que permita clonar su gen (véase Figura 7-27). Una vez se ha aislado el gen, el resto de la secuencia de aminoácidos de la proteína se puede deducir en referencia al código genético. Ésta es una gran ventaja porque, incluso con automatización, la determinación directa de la secuencia completa de una proteína resulta ser una tarea difícil. Una proteína de 100 residuos puede ser secuenciada en un mes de trabajo intenso, pero la dificultad se incrementa extraordinariamente tanto con la longitud de la cadena polipeptídica como con las particularidades químicas de los fragmentos peptídicos individuales que impiden que el proceso sea rutinario. Dado que la secuenciación del DNA puede hacerse de una forma más rápida y sencilla (véase Capitulo 7), generalmente las secuencias de la mayoría de las proteínas se determinan, en la actualidad, a partir de la secuencia de nucleótidos de su gen.

La difracción de rayos X por cristales de proteína puede revelar la estructura exacta de una proteína[28]

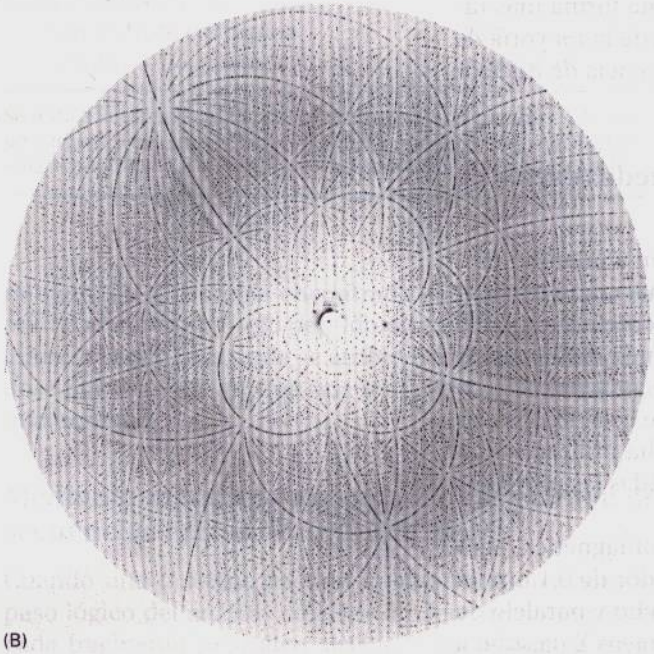
A partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína pueden a menudo predecirse los elementos de la estructura secundaria de la proteína, como las hélices α que atraviesan la membrana, así como el parecido de la proteína con otras proteínas conocidas. Sin embargo por ahora no es posible deducir de forma segura el plegamiento tridimensional de la proteína a partir de su secuencia de aminoácidos, y sin conocer la estructura detallada no es posible comprender las bases moleculares de su función. La principal técnica que se ha utilizado para determinar la estructura tridimensional de las moléculas, incluidas las proteínas a nivel atómico, es la **cristalografía de rayos X**.

Los rayos X, como la luz, son una forma de radiación electromagnética, pero de una longitud de onda mucho menor, típicamente de alrededor de 0,1 nm (el diámetro de un átomo de hidrógeno). Si se dirige un haz estrecho y paralelo de rayos X a una muestra de una proteína pura, la mayoría de los rayos X pasarán a su través. Sin embargo una pequeña fracción de ellos serán dispersados por los átomos de la muestra. Si la muestra es un cristal bien ordenado, los haces dispersados se reforzarán unos a otros en ciertos puntos (véase Figura 4-2) y aparecerán como manchas de difracción cuando los rayos X sean recogidos sobre un detector (Figura 4-48).

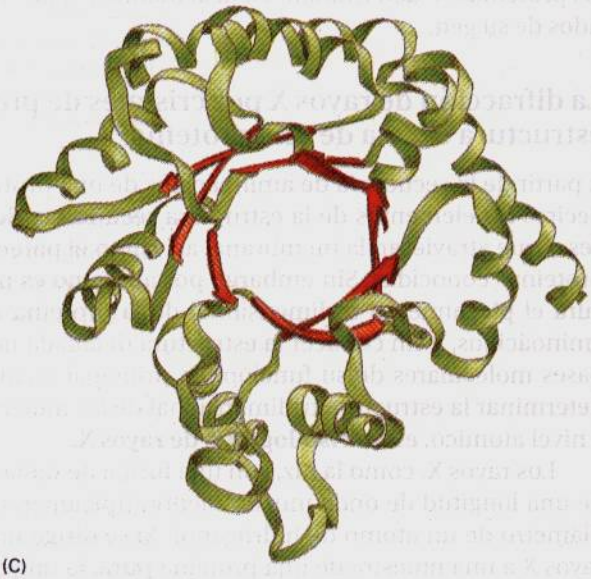
La posición e intensidad de cada mancha en el **patrón de difracción de rayos X** contiene información sobre las posiciones de los átomos en el cristal que intentamos deducir. La deducción de la estructura tridimensional de una gran molécula a partir del patrón de difracción de su cristal es una tarea compleja, y no se consiguió para una molécula de proteína hasta 1960. Recientemente los análisis de difracción de rayos X se han automatizado cada vez más, y ahora el proceso más lento es el de la producción de cristales proteicos adecuados. Ello requiere grandes cantidades de una proteína muy pura y a menudo, supone años de tanteo en la búsqueda de las condiciones de cristalización adecuadas. Todavía hay muchas proteínas, especialmente proteínas de membrana, que han resistido todos los intentos de cristalización.

El producto inmediato de un análisis de un patrón de difracción es un complejo mapa tridimensional de densidades electrónicas. Interpretar este mapa resulta una tarea complicada, y requiere la secuencia de aminoácidos de la proteína. Fundamentalmente mediante prueba y error se consigue correlacionar la secuencia y el mapa de densidades electrónicas mediante un ordenador, intentando conseguir el mejor resultado. La fiabilidad del modelo atómico final depende de la resolución de los datos cristalográficos iniciales: una resolución de 0,5 nm puede producir un mapa de baja resolución del esqueleto polipeptídico, mientras que una resolución de 0,15 nm permite situar todos los átomos (excepto los de hidrógeno) en la molécula. A menudo, un modelo atómico completo resulta demasiado complejo para ser observado directamente, pero a partir de él se pueden derivar versiones simplificadas que muestren las características es-

(A)



(B)



(C)

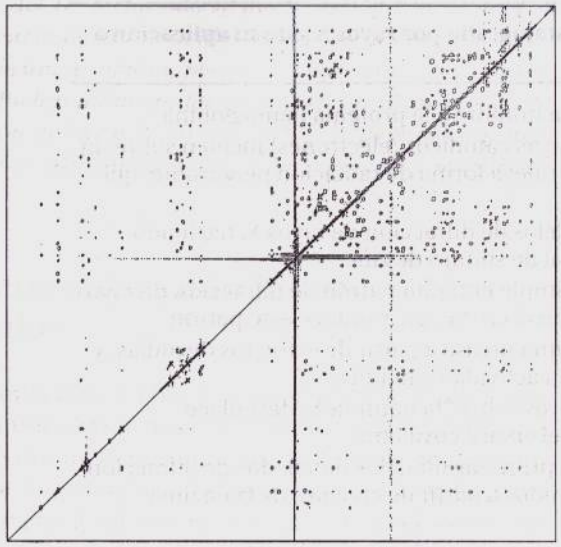
Figura 4-48 Cristalografía de rayos X. (A) Cristal proteico de ribulosa bisfosfato carboxilasa, una enzima que juega un papel crucial en la fijación de CO_2 durante la fotosíntesis. (B), Patrón de difracción de rayos X obtenido a partir del cristal. (C) Modelo simplificado de la estructura de la proteína obtenido a partir de la información de la difracción de rayos X. El modelo atómico completo es difícil de interpretar, pero esta versión muestra claramente sus características estructurales (hélices α en *verde*, láminas β en *rojo*). (A, por cortesía de C. Branden; B, por cortesía de J. Hajdu e I. Andersson; C, adaptado del original cedido por B. Furugren.)

tructurales esenciales de la estructura (véase Figura 3-34). Mediante cristalografía de rayos X se ha determinado la estructura de varios centenares de proteínas, lo cual es suficiente para empezar a entrever familias de estructuras comunes. A menudo, estas estructuras resultan más conservadas durante la evolución que las secuencias de aminoácidos que las forman.

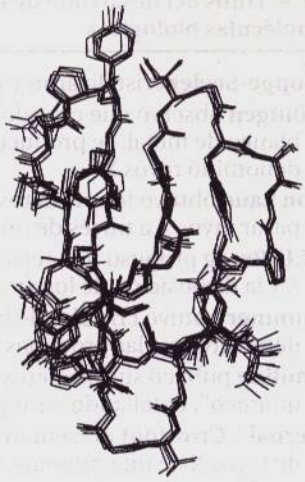
También se puede determinar la estructura molecular utilizando espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR)[29]

La espectroscopia de **resonancia magnética nuclear (NMR**, de Nuclear Magnetic Resonance) se había utilizado para analizar la estructura de pequeñas moléculas y actualmente se utiliza cada vez más para estudiar la estructura de pequeñas proteínas o de dominios proteicos. A diferencia de la cristalografía de rayos X, la NMR no requiere tener una muestra cristalizada; simplemente necesita un pequeño volumen de una solución proteica concentrada, la cual se coloca en un fuerte campo magnético.

Algunos núcleos atómicos, particularmente los de hidrógeno, tienen un momento magnético o *espín*: es decir, tienen una magnetización intrínseca, como una barra magnética. El espín se alinea en el interior de un fuerte campo magnético, pero puede variarse a un estado semialineado al ser excitado en respuesta a una aplicación de pulsos de radiofrecuencia (RF) de radiación electromagnética. Cuando los núcleos de hidrógeno excitados se relajan a su estado alineado, emiten radiación RF, la cual puede ser medida y expresada en forma de espectro. La naturaleza de la radiación emitida depende del ambiente de cada núcleo de hidrógeno, de forma que si se excita un núcleo influirá la absorción y la emisión de ra-



(A)



(B)

Figura 4-49 Espectroscopia de NMR. (A), ejemplo de los datos obtenidos a partir de un aparato de NMR. Se trata de un espectro bidimensional de NMR derivado del dominio carboxilo terminal de la enzima celulasa. Las manchas representan interacciones entre átomos de hidrógeno que en la proteína son casi vecinos. Diferentes programas de cálculo por ordenador junto con la secuencia de aminoácidos, que debe ser conocida, permiten derivar posibles estructuras compatibles. En (B) se presentan superpuestas 10 estructuras, cada una de las cuales satisface tan bien como las demás las distancias de constricción calculadas. El conjunto de estructuras constituye un buen indicador de la estructura tridimensional más probable. (Por cortesía de P. Kraulis.)

diación de otro núcleo que esté suficientemente cerca de él. Por tanto es posible, mediante una ingeniosa elaboración de la técnica básica de NMR conocida como *NMR bidimensional*, distinguir las señales procedentes de núcleos de hidrógeno de diferentes residuos de aminoácidos e identificar y medir los pequeños cambios de estas señales que ocurren cuando estos núcleos de hidrógeno se acercan suficientemente como para interactuar entre sí: la magnitud del cambio revela la distancia entre el par de átomos de hidrógeno que interactúan. De esta forma, la NMR puede aportar información sobre las distancias entre zonas de la molécula de proteína. Combinando esta información con la de la secuencia de aminoácidos, es posible, en principio, descubrir la estructura tridimensional de la proteína (Figura 4-49).

Por razones técnicas, por espectroscopia de NMR solamente se pueden determinar las estructuras de pequeñas proteínas, como máximo de entre 15 000 y 20 000 daltons, y resulta muy improbable que el método pueda abordar el estudio de moléculas mayores de 30 000-40 000 daltons. Sin embargo, muchos dominios funcionales de proteínas son mucho más pequeños que estos tamaños, y a menudo pueden obtenerse en forma de estructuras estables, analizables por NMR. Ello resulta especialmente útil cuando la proteína se ha resistido a ser cristalizada. Por ejemplo, de esta forma se han determinado las estructuras de los dominios de unión a DNA de varias proteínas reguladoras de genes. La NMR también se utiliza con éxito para investigar moléculas no proteicas, y por ejemplo resulta valiosa como método para descubrir las estructuras de las complejas cadenas hidrocarbonadas laterales de las glucoproteínas.

En la Tabla 4-9 se recogen algunos hitos del desarrollo de la cristalografía de rayos X y de la NMR.

Resumen

Las poblaciones celulares pueden ser analizadas bioquímicamente, disgregándolas y fraccionando su contenido por ultracentrifugación. Posteriores fraccionamientos permiten el desarrollo de sistemas libres de células; estos sistemas son necesarios para determinar los detalles moleculares de procesos celulares complejos. De esta manera, actualmente se estudian, por ejemplo, la síntesis proteica, la replicación del DNA, la maduración del RNA y varios tipos de transporte intracelular. El peso molecular y la composición de subunidades de incluso muy pequeñas cantidades de una proteína se pueden determinar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. En electroforesis bidimensional en gel las proteínas se resuelven como manchas separadas mediante isoelectroenfoque en una dimensión seguido de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS en la segunda dimensión. Estas separa-

Tabla 4-9 Hitos del desarrollo de la cristalografía por rayos X y de su aplicación a las moléculas biológicas

1864 **Hoppe-Seyler** cristalizaron y dieron nombre a la proteína hemoglobina.

1895 **Röntgen** observó que cuando los rayos catódicos (electrones) inciden sobre un blanco de metal, se produce una nueva forma de radiación penetrante, que denominó rayos X.

1912 **von Laue** obtuvo los primeros modelos de difracción de rayos X, haciendo pasar rayos X a través de un cristal de sulfuro de zinc.

W.L. Bragg propuso una relación simple entre un patrón de difracción de rayos X y la disposición de los átomos en el cristal que produce este patrón.

1926 **Summer** obtuvo cristales de la enzima ureasa a partir de extractos de judías, y demostró que las proteínas tienen actividad catalítica.

1931 **Pauling** publicó sus primeros ensayos sobre "la naturaleza del enlace químico", detallando las reglas del enlace covalente.

1934 **Bernal** y **Crowfoot** presentaron los primeros modelos detallados de difracción de rayos X de una proteína, obtenidos a partir de cristales de la enzima pepsina.

1935 **Patterson** desarrolló un método analítico para determinar las distancias interatómicas a partir de los datos de difracción de rayos X.

1941 **Astbury** obtuvo el primer patrón de difracción de rayos X del DNA.

1951 **Paulin** y **Corey** propusieron la estructura de una conformación helicoidal de una cadena de aminoácidos L, –la hélice α– y la estructura de la lámina β, la presencia de las cuales más tarde fue descrita en numerosas proteínas.

1953 **Watson** y **Crick** propusieron el modelo de doble hélice del DNA, basándose en los patrones de difracción de rayos X obtenidos por **Franklin** y **Wilkins.**

1954 **Perutz** y colaboradores desarrollaron métodos de átomos pesados para solucionar el problema de fases en la cristalografía de las proteínas.

1960 **Kendrew** describió la primera estructura detallada de una proteína (la mioglobina de cachalote) hasta una resolución de 0,2 nm, y **Perutz** propuso una estructura de resolución menor de la hemoglobina, una proteína mayor que la anterior.

1966 **Phillips** describió la estructura de la lisozima, la primera enzima que fue analizada en detalle.

1971 **Jeener** propuso la utilización de NMR bidimensional, y **Wuthrich** y colaboradores durante los primeros años de la década de 1980 utilizaron por primera vez este método para resolver la estructura de una proteína.

1976 **Kim** y **Rich**, y **Klug** y colaboradores describieron la estructura tridimensional del tRNA, determinada mediante difracción de rayos X.

1977-1978 **Holmes** y **Klug** determinaron la estructura del virus del mosaico del tabaco (TMV), y **Harrison** y **Rossman** determinaron la estructura de dos pequeños virus esféricos.

1985 **Michel** y colaboradores determinaron la primera estructura de una proteína transmembrana (un lugar de reacción fotosintético) mediante cristalografía de rayos X. **Henderson** y colaboradores obtuvieron la estructura de la bacteriorrodopsina, una proteína transmembrana, mediante métodos de microscopia electrónica entre 1975 y 1990.

ciones electroforéticas pueden aplicarse incluso a proteínas que normalmente son insolubles en agua.

Las proteínas mayoritarias de extractos celulares solubles pueden ser purificadas por cromatografía en columna; dependiendo del tipo de matriz de la columna, se pueden separa proteínas biológicamente activas, en función de su peso molecular, de su hidrofobicidad, de sus características de carga, o de su afinidad por otras moléculas. En una purificación típica, la muestra se pasa sucesivamente a través de varias columnas diferentes –las fracciones enriquecidas obtenidas en una columna se aplican a la columna siguiente. Una vez que la proteína ha sido purificada hasta homogeneidad, se pueden estudiar con detalle sus actividades biológicas. Además, se puede determinar una pequeña porción de su secuencia de aminoácidos y, sobre ella, se puede clonar la secuencia de DNA que codifica la proteína completa; a par-

tir de la secuencia de nucleótidos del DNA clonado se puede deducir la secuencia de aminoácidos restante. La secuencia de aminoácidos es necesaria para determinar le estructura tridimensional de una proteína, pero no es suficiente. Para determinar esta estructura a una resolución atómica, las proteínas mayores se han de cristalizar y estudiar por difracción de rayos X. La estructura de pequeñas proteínas en solución se puede determinar utilizando análisis de resonancia magnética nuclear.

Siguiendo el rastro y cuantificando las moléculas del interior de las células

Los métodos clásicos de microscopia ofrecen buenas visiones de la arquitectura de la célula, pero no demasiada información sobre la química celular. En biología celular a menudo resulta importante determinar las cantidades de determinadas moléculas y conocer dónde se hallan localizadas en el interior de la célula y de qué manera cambia su cantidad o localización en respuesta a señales extracelulares. Las moléculas de interés varían desde pequeños iones inorgánicos como el Ca^{2+} o el H^+ hasta grandes moléculas como determinadas proteínas, moléculas de RNA o de DNA.

Se han desarrollado métodos sensibles para cuantificar cada uno de estos tipos de moléculas y para seguir el comportamiento dinámico de la mayoría de ellas en las células vivas. En esta sección describimos de qué manera se pueden introducir sondas específicas en el interior de la célula viva para monitorizar las condiciones químicas del citosol. Además se presentan otros dos métodos de detección ampliamente utilizados en biología celular: los que utilizan *radioisótopos* y los que utilizan *anticuerpos*. Ambos métodos son capaces de detectar con una gran sensibilidad una molécula determinada en una mezcla compleja: en condiciones óptimas pueden detectar menos de 1000 copias de una molécula en una muestra.

Los átomos radiactivos pueden ser detectados con una gran sensibilidad[30]

La mayoría de los elementos que se presentan en la naturaleza son una mezcla de *isótopos* ligeramente diferentes. Estos isótopos se diferencian entre sí por la masa de sus núcleos atómicos, pero como tienen el mismo número de electrones, tienen las mismas propiedades químicas. Los núcleos de los isótopos radiactivos, o radioisótopos, son inestables y sufren desintegraciones de forma aleatoria en el tiempo, produciendo diferentes átomos. En el transcurso de estas desintegraciones emiten partículas energéticas subatómicas como electrones, o radiaciones como los rayos γ. Utilizando sistemas de síntesis química para incorporar uno o más átomos radiactivos a pequeñas moléculas de interés, como un azúcar o un aminoácido, se puede seguir el destino de esta molécula durante cualquier reacción biológica.

Aunque los radioisótopos naturales son poco frecuentes (a causa de su inestabilidad), se pueden producir en grandes cantidades en reactores nucleares en los que diferentes átomos se bombardean con partículas de alta energía. Como resultado de ello, hoy disponemos de las formas marcadas radioisotópicamente de muchos compuestos importantes desde el punto de vista biológico (Tabla 4-10). La radiación que emiten se detecta de diversas maneras. Los electrones (partículas β) pueden ser detectados en un *contador Geiger* por la ionización que producen en un gas, o pueden ser cuantificados con un *contador de centelleo* gracias a las pequeñas chispas de luz que generan en un líquido de centelleo. Estos métodos hacen posible la medida de la cantidad de un radioisótopo determinado que existe en una muestra biológica. También es posible determinar la localización de un radioisótopo en una muestra utilizando una *autorradiografía*, como describiremos posteriormente. Todos estos métodos de detección son ex-

Tabla 4-10 Algunos radioisótopos utilizados habitualmente en la investigación biológica

Isótopo	Período de semi-desintegración
^{32}P	14 días
^{131}I	8,1 días
^{35}S	87 días
^{14}C	5570 años
^{45}Ca	164 días
^{3}H	12,3 años

Los isótopos están enumerados en orden decreciente de la energía de la radiación β (electrones) que emiten. El ^{131}I también emite radiación γ. El *período de semidesintegración* es el tiempo necesario para que se desintegre un 50% de los átomos de un isótopo.

traordinariamente sensibles: en condiciones favorables pueden detectar casi todas las desintegraciones que se producen –y por lo tanto casi todos los átomos radiactivos que se desintegran.

Los radioisótopos se utilizan para marcar las moléculas en las células y en los organismos y seguirles la pista[31]

Una de las primeras aplicaciones de la radiactividad a la biología consistió en seguir la ruta química del carbono durante la fotosíntesis. Se mantuvieron algas verdes unicelulares en una atmósfera que contenía CO_2 marcado radiactivamente ($^{14}CO_2$) y, tras períodos variables de tiempo después de haber sido expuestos a la luz solar, se separaron sus contenidos solubles mediante cromatografía en papel. Colocando una hoja de película fotográfica sobre el cromatograma seco se detectaron las pequeñas moléculas que contenían ^{14}C derivado del CO_2. De esta manera se identificaron los principales componentes de la vía fotosintética, desde el CO_2 hasta el azúcar.

Las moléculas radiactivas pueden ser utilizadas para seguir el curso de casi todos los procesos celulares. Un experimento típico puede consistir en añadir a las células un precursor en su forma radiactiva. Las moléculas radiactivas se mezclarán con las moléculas preexistentes no marcadas; ambos tipos de moléculas serán tratados de forma idéntica por la célula ya que sólo se diferencian en el peso de su núcleo atómico. Se podrán seguir los cambios de la localización o de la forma química de las moléculas radiactivas en función del tiempo. A menudo, se puede aumentar la resolución de estos experimentos utilizando un protocolo de marcaje denominado de **pulso y caza,** en el que el material radiactivo (el *pulso*) se añade únicamente durante un período de tiempo muy corto y después es eliminado mediante lavado y substituido por moléculas no radiactivas. A intervalos regulares de tiempo se toman muestras y en cada una de ellas se identifica la forma química o se localiza la radiactividad (la *caza*) (Figura 4-50). Los experimentos de pulso y caza combinados con la autorradiografía (véase más adelante) han sido importantes por ejemplo para dilucidar el camino seguido por las proteínas de secreción desde el retículo endoplásmico hasta el exterior celular (Figura 4-51).

El marcaje radioisotópico solamente es valioso como sistema para diferenciar moléculas que son químicamente idénticas pero que tienen historias diferentes –por ejemplo, moléculas que se diferencian en su momento de síntesis. De esta manera, por ejemplo, se demostró que casi todas las moléculas de una célula viva son degradadas y reemplazadas por otras continuamente, incluso cuando la célula no está creciendo y aparentemente se encuentra en estado estacionario. Estos procesos de "recambio" que algunas veces tiene lugar muy lentamente, serían imposibles de detectar sin el uso de radioisótopos.

Actualmente casi todas las pequeñas moléculas comunes están disponibles comercialmente en forma radiactiva y prácticamente cualquier molécula biológica, por muy complicada que sea, puede marcarse con radiactividad. Los compuestos se pueden marcar con radiactividad incorporando átomos radiactivos en posiciones determinadas de su estructura, lo cual permite seguir los diferen-

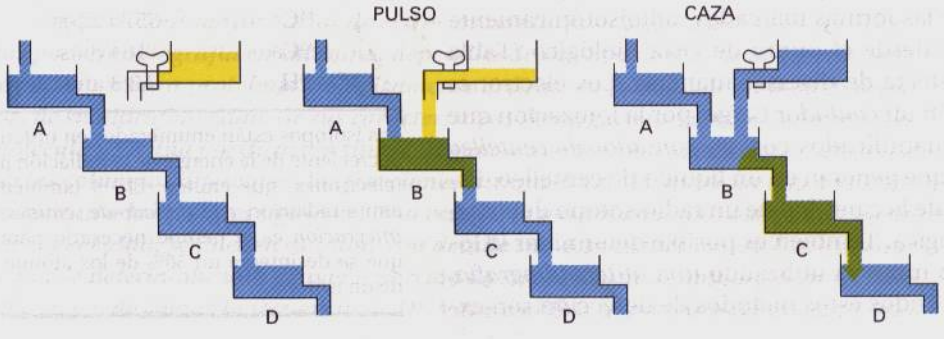
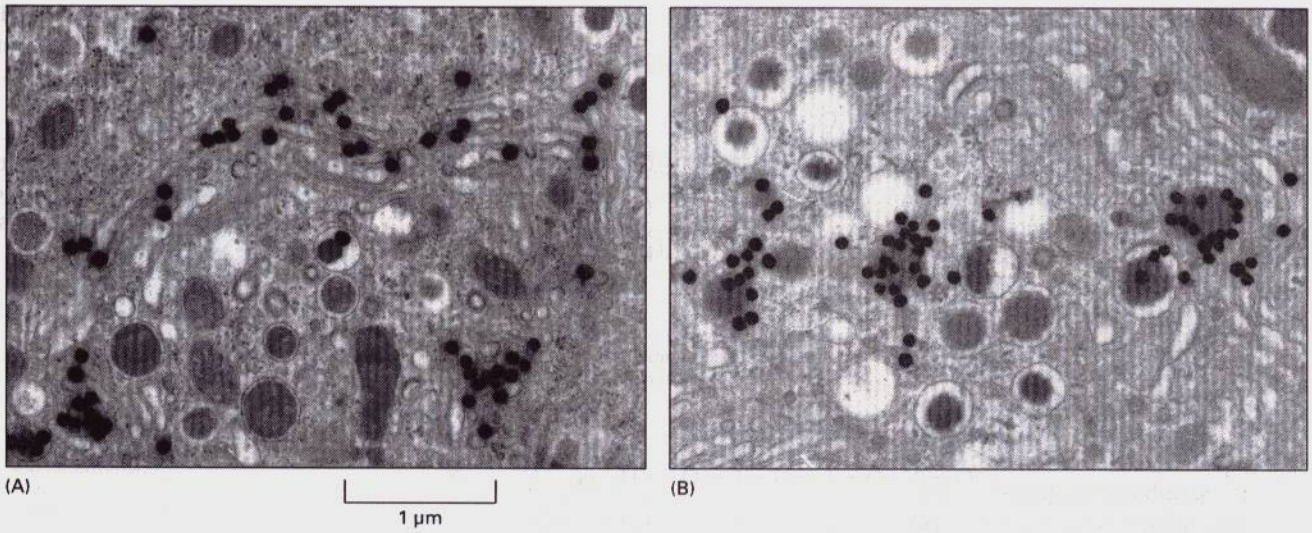


Figura 4-50 Lógica de un experimento típico de pulso y caza utilizando radioisótopos. Los recipientes marcados con A, B, C y D representan compartimentos diferentes de la célula (detectados mediante técnicas de autorradiografía o de fraccionamiento celular) o bien compuestos químicos distintos (detectados mediante cromatografía u otros métodos químicos). En la Figura 4-51 se presentan resultados reales de un experimento de pulso y caza.



tes destinos de distintas zonas de una misma molécula durante las reacciones biológicas (Figura 4-52).

Una de las aplicaciones importantes de la radiactividad a la biología celular consiste en la localización por **autorradiografía** de compuestos radiactivos en secciones de células enteras o de tejidos. En este procedimiento las células vivas son expuestas brevemente a un pulso de un compuesto radiactivo determinado y se incuban durante un período variable de tiempo –para permitir que el compuesto se incorpore– antes de fijarlas y tratarlas para microscopia óptica o electrónica. Cada preparación es recubierta posteriormente con una fina película de una emulsión fotográfica y se coloca en la obscuridad varios días durante los cuales parte del radioisótopo se desintegra. Entonces la emulsión se revela y se determina la posición de la radiactividad en cada célula mediante la posición de los granos oscuros de plata generados (véase Figura 4-51). Así por ejemplo, la incubación de células con un precursor radiactivo del DNA (*timidina* ^{3}H), muestra que el DNA se sintetiza en el núcleo y permanece allí. En cambio el marcaje de la células con un precursor radiactivo de RNA (*uridina* ^{3}H) revela que el RNA se sintetiza inicialmente en el núcleo de la célula pero que luego se desplaza rápidamente hacia el citoplasma. Las moléculas marcadas con radiactividad también pueden ser detectadas por autorradiografía después de haber sido separadas de otras moléculas mediante electroforesis en gel: de esta manera se detecta habitualmente la posición tanto de las proteínas (véase Figura 4-45) como de los ácidos nucleicos (véase Figura 7-5). Además cuando se utilizan moléculas de ácidos nucleicos marcadas radiactivamente como sondas para buscar moléculas de ácidos nucleicos complementarias a ellas, se utiliza la autorradiografía para detectar la posición y la cantidad de estas moléculas que se hibridan con la sonda, tanto sobre un gel como sobre la sección de un tejido (véase Figura 7-20).

Figura 4-51 Autorradiografía al microscopio electrónico. Resultados de un experimento de pulso y caza en el que células B pancreáticas se mantuvieron durante 5 minutos con leucina ^{3}H (el pulso) y a continuación se colocaron en un medio con un gran exceso de leucina no marcada (la caza). Una gran cantidad del aminoácido se incorpora a la insulina, la cual es una proteína de secreción. Tras 10 minutos de caza, la proteína marcada se ha desplazado desde el retículo endoplasmático rugoso hasta las cisternas del Golgi (A), donde se puede localizar mediante los granos negros de plata de la emulsión fotográfica. Tras los 45 minutos de caza siguientes la proteína marcada se encuentra en los gránulos de secreción electrodensos (B). Los pequeños granos de plata redondeados que se aprecian aquí se han producido utilizando un revelador fotográfico especial y no deben confundirse con los puntos negros similares que aparecen en los métodos de marcaje inmunológico (por ejemplo, en la Figura 4-63). Experimentos similares a los de la figura resultaron importantes para establecer las rutas intracelulares de las proteínas de secreción recién sintetizadas. (Cortesía de L.Orci, en *Diabetes* 31:538-565, 1982. © 1982 American Diabetes Association Inc.)

Las concentraciones de los iones se pueden medir mediante electrodos intracelulares[32]

Una posibilidad de estudiar la química de una célula viva individual consiste en insertar la punta de una fina pipeta de vidrio directamente en el interior de la célula, una técnica desarrollada por los electrofisiólogos para estudiar voltajes y flujos de corriente a través de la membrana plasmática. Para ello se confeccionan *microelectrodos* intracelulares a partir de finos tubos de vidrio estirados al fuego hasta que la punta tenga un diámetro de una fracción de micrómetro. Estos tubos se llenan con una solución conductora (normalmente una sal simple como el KCl en agua). La punta del microelectrodo puede ser introducida en el citoplasma a través de la membrana plasmática, la cual se cierra alrededor del

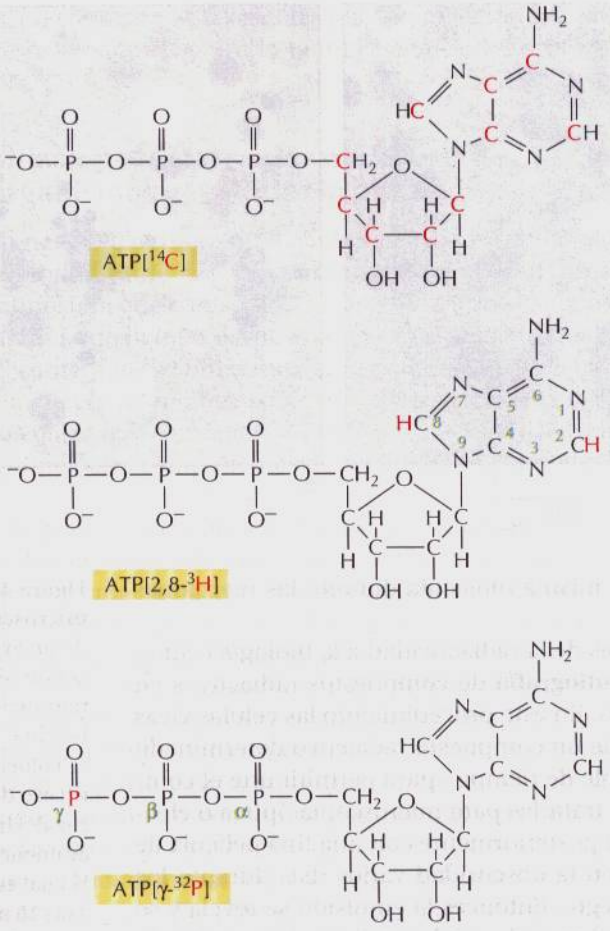


Figura 4-52 Moléculas marcadas radioisotópicamente. Tres formas radiactivas del ATP, disponibles comercialmente. Los átomos radiactivos se muestran en *rojo*. También se indica la nomenclatura utilizada para identificar la posición y el tipo de los átomos radiactivos.

tubo adhiriéndose íntimamente al vidrio de forma que la célula se altera relativamente poco.

Los microelectrodos son útiles para estudiar el interior celular de dos maneras: pueden ser transformados en sondas para medir las concentraciones intracelulares de iones inorgánicos comunes como el H^+, el Na^+, el K^+, el Cl^-, el Ca^{2+} y el Mg^{2+}, y pueden utilizarse como micropipetas para inyectar moléculas en las células. El principio que permite medir las concentraciones iónicas con un microelectrodo es el mismo que el del pHmetro corriente. La tendencia de los iones a difundir a favor de su gradiente de concentración puede ser equilibrada por un campo eléctrico de sentido opuesto; cuanto mayor sea el gradiente de concentración mayor tendrá que ser el campo eléctrico. Así, la magnitud del campo eléctrico necesario para mantener el gradiente de concentración en un equilibrio estable nos proporciona una medida de la magnitud del gradiente de concentración. Para determinar la concentración de un ion determinado se ha de utilizar un material que solamente sea permeable a este ion, formar con este material una lámina o barrera y situarla entre la solución del ion cuya concentración queremos determinar y una solución patrón de concentración del ion conocida. La diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana selectiva cuando no exista flujo de iones será directamente proporcional a la relación de concentraciones del ion determinado a ambos lados de dicha membrana. (La teoría relacionada con el transporte iónico a través de la membrana plasmática se explica en el Panel 11-2.) En la práctica, la punta del microelectrodo se llena con un compuesto orgánico apropiado que hace de barrera permeable selectiva al ion escogido cuya concentración se desea medir. Entonces, se inserta el microelectrodo junto con un microelectrodo de referencia en el interior de una célula, como se muestra en la Figura 4-53.

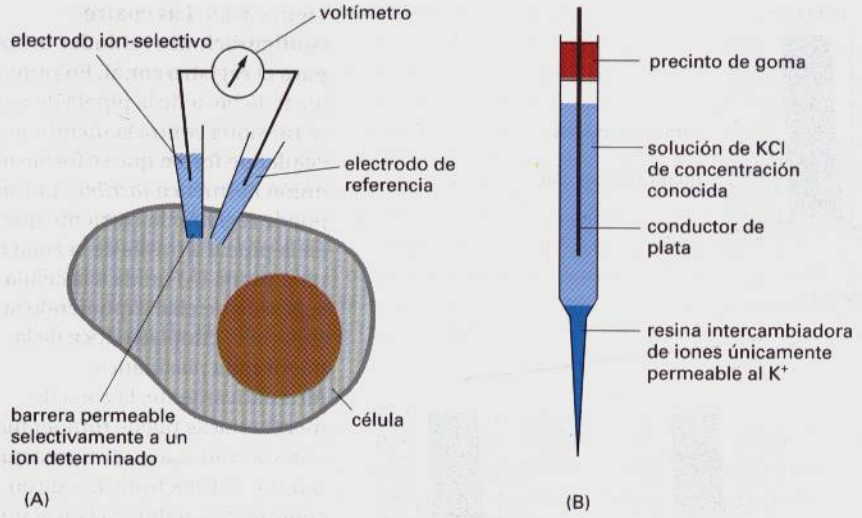


Figura 4-53 Microelectrodo ion-selectivo utilizado para medir la concentración intracelular de un determinado ion. En (A) se muestra el dispositivo experimental. (B) ilustra la construcción de un microelectrodo permeable selectivamente al K^+. En general, la punta del microelectrodo ion-selectivo intracelular está construida de un cristal especial o está llena de un compuesto orgánico especial que la hace permeable exclusivamente al ion escogido. El resto del tubo está lleno de una solución acuosa del ion a una concentración conocida, en la que se halla sumergido un conductor metálico que está conectado a un terminal de un voltímetro. El otro terminal del voltímetro está conectado de forma similar a un microelectrodo de vidrio, que actúa de referencia, el cual tiene la punta abierta y contiene una solución conductora sencilla. Ambos microelectrodos, empaquetados conjuntamente, atraviesan la membrana plasmática de la célula que se quiere estudiar. El voltaje que mide el voltímetro, que es igual a la diferencia de potencial a través de la barrera permeable selectivamente, revela la concentración del ion en la célula.

Más recientemente la técnica de microelectrodos se ha adaptado al estudio del transporte iónico a través de canales proteicos especializados (denominados canales iónicos) situados en una pequeña cantidad de membrana plasmática. En este caso, un microelectrodo de vidrio de larga punta se presiona suavemente sobre la membrana plasmática de una célula, en lugar de introducirlo en la célula atravesando dicha membrana (Figura 4-54). Entonces resulta posible estudiar el comportamiento eléctrico de la pequeña zona de membrana que queda recubriendo la punta del electrodo, se halle todavía unida a la célula o separada de ella (Figura 4-55). Esta técnica, conocida como **registro zonal** ("patch-clamp recording") ha revolucionado el estudio de los canales iónicos. Como se explica en el Capítulo 11, constituye una de las pocas técnicas de biología celular que permite estudiar a tiempo real la función de una sola molécula proteica.

Los cambios rápidos en las concentraciones iónicas intracelulares se pueden medir mediante indicadores emisores de luz[33]

Los electrodos sensibles a iones únicamente revelan la concentración iónica de un punto de la célula. Además, su respuesta es lenta y en ocasiones irregular para iones que se hallen presentes a concentraciones muy bajas, como es el caso del Ca^{2+}. Por ello, estos electrodos no son adecuados para medir los rápidos y transitorios cambios intracelulares de la concentración de Ca^{2+}, que tan importantes son en la respuesta celular a señales extracelulares. Estos cambios pueden ser analizados mediante la utilización de indicadores iónicos sensibles, cuya emisión de luz refleja la concentración local del ion. Algunos de estos indicadores son luminiscentes (emiten luz espontáneamente) mientras que otros son fluorescentes (emiten luz cuando son expuestos a la luz). La *aecuorina* es una proteína luminiscente, aislada a partir de ciertas medusas marinas, que emite luz en presencia de Ca^{2+} y responde a los cambios de concentración de Ca^{2+} en el

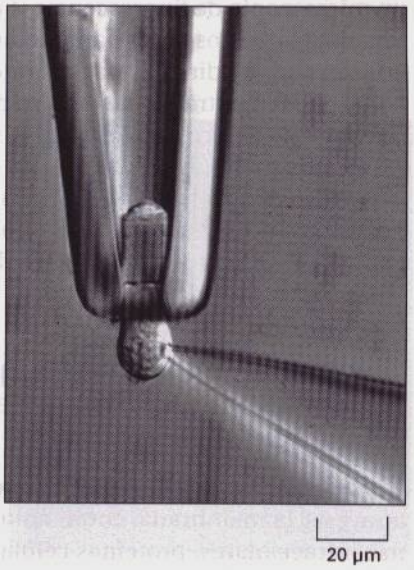


Figura 4-54 Micropipetas utilizadas para el registro zonal ("patch-clamp recording"). Se muestra una célula en bastón del ojo de una salamandra, mantenida por una pipeta de succión mientras que una pipeta de vidrio de punta fina, presionada contra la célula de forma que el vidrio se halla en íntimo contacto con la membrana plasmática, actúa de microelectrodo. Generalmente se utiliza un artilugio electrónico para mantener el voltaje constante y a un valor determinado. (De T.D. Lamb, H.R. Matthews y V.Torre, *J. Physiol.* 37:315-349, 1986.)

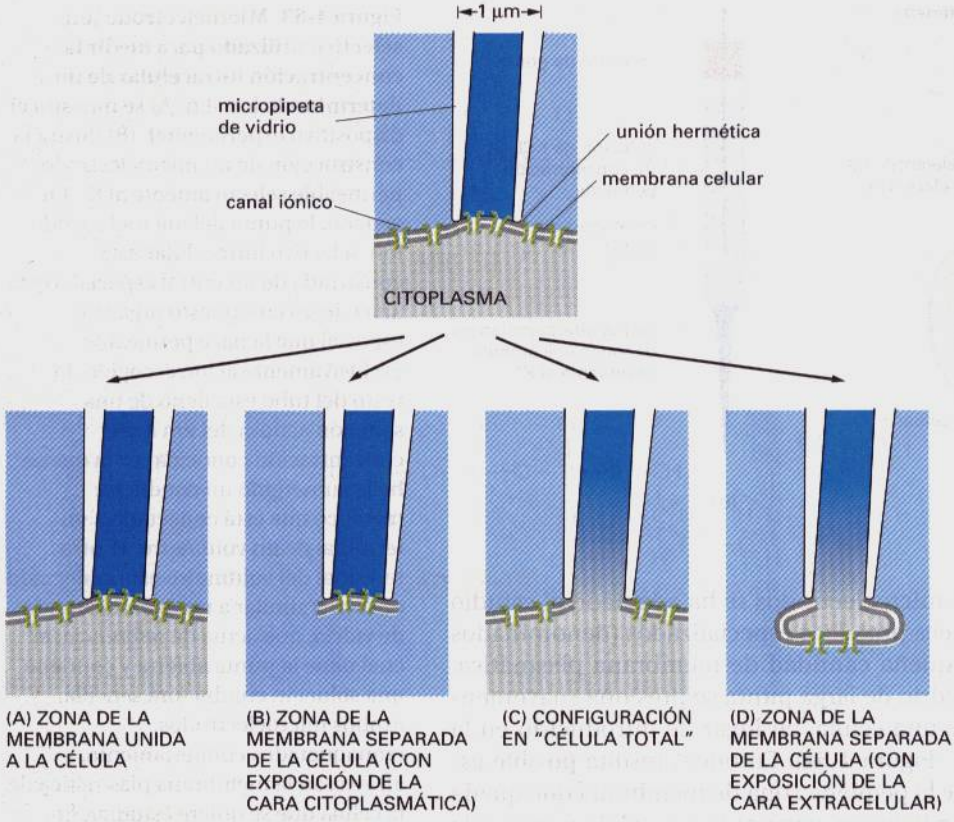


Figura 4-55 Las cuatro configuraciones estándar utilizadas para el registro zonal. En primer lugar, la boca de la pipeta de registro se presiona contra la membrana celular de forma que se forme una unión hermética (*arriba*). Entonces se puede registrar la corriente que entra en la pipeta a través de la zona de membrana (A) unida a la célula o (B) separada de ella, exponiendo la superficie citoplasmática de la membrana plasmática. Alternativamente, la zona de membrana se puede romper mediante una succión suave, de forma que el interior del electrodo quede en comunicación directa con el interior de la célula (C); en esta última configuración en "célula total" se puede registrar el comportamiento eléctrico de la célula de forma similar a como se haría con un microelectrodo, pero con la opción adicional de poder alterar la composición química de la célula permitiendo que diferentes compuestos difundan desde la pipeta, de punta relativamente ancha, al citoplasma. La configuración (D) se obtiene a través de la configuración (C) separando la pipeta de la célula de forma que un fragmento de la membrana plasmática adyacente se repliegue sobre la punta de la pipeta, sellándose a ella. En (D) se halla expuesta no la superficie citoplasmática de la membrana [como ocurre en (B)] sino la superficie exterior de la membrana.

intervalo de 0,5 a 10 mM. Si por ejemplo se microinyecta en un huevo, la aecuorina emite un destello de luz en respuesta a la súbita y localizada liberación de Ca^{2+} que se produce en el interior del citoplasma cuando el huevo es fertilizado (Figura 4-56).

Recientemente se han sintetizado indicadores fluorescentes de Ca^{2+} que se unen fuertemente al Ca^{2+} y que cuando están libres son excitados a longitudes de onda ligeramente más largas que cuando están unidos a él. Midiendo la proporción de intensidad fluorescente a las dos longitudes de onda de excitación, puede determinarse la proporción de concentraciones entre el indicador unido a Ca^{2+} y el indicador libre. Esta diferencia proporciona una medida precisa de la concentración de Ca^{2+} libre. Dos populares indicadores de este tipo, denominados *quin-2* y *fura-2*, son útiles para estudiar los cambios de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} en diferentes zonas de la célula, visualizándolas mediante un microscopio de fluorescencia (Figura 4-57). Existen indicadores fluorescentes semejantes a éstos útiles para medir otros iones; por ejemplo, algunos de ellos se utilizan para medir H^+, y por lo tanto, el pH intracelular. Algunos de estos indicadores pueden entrar en las células por difusión, por lo que no se han de microinyectar, lo cual permite controlar al microscopio de fluorescencia un gran número de células simultáneamente. La construcción de nuevos tipos de indicadores y su utilización con los modernos métodos de análisis de imágenes pueden hacer posible el desarrollo de métodos rápidos y precisos similares a éstos que nos permitan analizar las variaciones de las concentraciones intracelulares de diferentes pequeñas moléculas.

Existen diferentes sistemas que permiten introducir moléculas en una célula para las que la membrana celular sea impermeable[34]

A menudo resulta útil poder introducir en la célula moléculas que no puedan atravesar la membrana, como anticuerpos que reconocen determinadas proteínas intracelulares, proteínas celulares normales que han sido marcadas con un

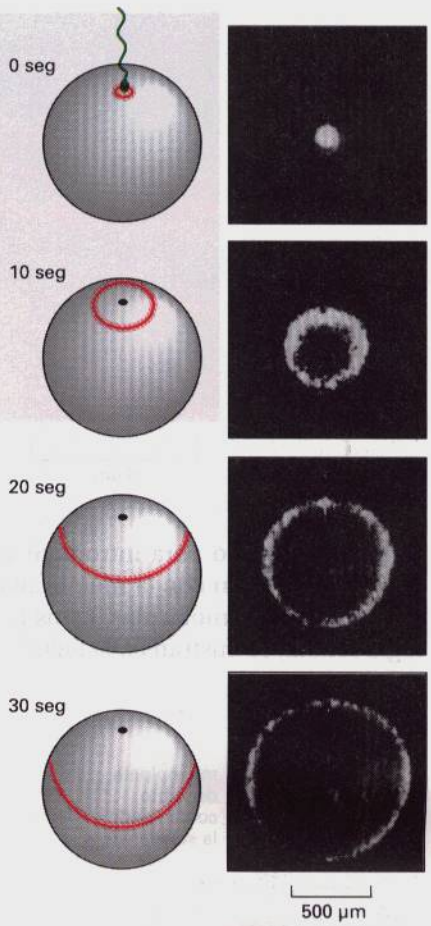


Figura 4-56 La proteína luminiscente aecuorina emite luz en presencia de Ca^{2+} libre. En esta figura se ha inyectado aecuorina a un huevo de pez medaka, la cual ha difundido por el citosol. A continuación, el huevo se ha fecundado con un espermatozoide, y se ha examinado con la ayuda de un intensificador de imágenes. Las cuatro fotografías que se presentan aquí fueron tomadas a intervalos de 10 segundos mirando hacia abajo el punto donde entró el espermatozoide. Las imágenes revelan una onda de liberación de calcio libre en el citosol a partir de reservorios intracelulares justo por debajo del lugar donde entró el espermatozoide, tal como se indica en el diagrama de la izquierda. (Fotografías reproducidas de J.C. Gilkey, L.F. Jaffe, E.B. Ridgway y G.T. Reynolds. *J. Cell Biol.* 76:448-466, 1978. Con permiso de copyright de The Rockefeller University Press.)

compuesto fluorescente o moléculas que afectan la conducta de la célula. Una aproximación consiste en microinyectar estos compuestos a la célula a través de una micropipeta de vidrio. Una técnica especialmente útil es la denominada **citoquímica análoga fluorescente**, mediante la cual una proteína determinada se acopla a un colorante fluorescente y se microinyecta en una célula; de esta forma, se puede seguir el destino de la proteína inyectada con un microscopio de fluorescencia, a medida que la célula crece y se divide. Si se marca tubulina (la subunidad de los microtúbulos) por ejemplo con un colorante que emita fluorescencia en el rojo, se puede seguir la dinámica de los microtúbulos segundo a segundo en la célula viva (Figura 4-58).

También se pueden microinyectar anticuerpos en una célula, para bloquear la función de la molécula que reconocen. Por ejemplo, la inyección de anticuerpos anti-miosina-II en un huevo fecundado de erizo de mar impide que el huevo se divida en dos, a pesar de que la división nuclear se produce normalmente. Esta observación demostró que la miosina desempeña un papel esencial en el proceso contráctil que divide el citoplasma durante la división celular, pero que no es necesaria para la división nuclear (véase Figura 18-34).

A pesar de que la microinyección es una técnica ampliamente utilizada, supone la inyección de cada célula una por una; por esta razón solamente resulta posible estudiar varios cientos de células simultáneamente. Otras aproximaciones permiten permeabilizar simultáneamente grandes poblaciones de células. Por ejemplo, utilizando potentes choques eléctricos o agentes químicos, como bajas concentraciones de detergentes, se puede romper parcialmente la estructura de la membrana plasmática de la célula, haciéndola más permeable. La técnica eléctrica tiene la ventaja de generar grandes poros en la membrana plasmática, sin dañar las membranas intracelulares. Los poros se mantienen abiertos durante intervalos de tiempo que pueden oscilar entre minutos y horas, dependiendo del tipo celular utilizado y de la clase de choque eléctrico que se aplique; así, a través de los poros las macromoléculas pueden entrar (y salir) del citosol rápidamente. Si el tratamiento ha sido limitado, un elevado porcentaje de las células tratadas consigue reparar sus membranas plasmáticas y sobrevive.

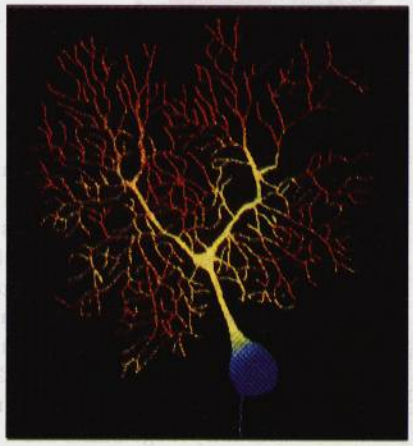


Figura 4-57 Visualización intracelular de la concentración de Ca^{2+} utilizando un indicador fluorescente. El ramificado árbol de dendritas de una célula de Purkinje del cerebro recibe más de 100 000 sinapsis de otras neuronas. La señal de salida de la célula se transporta por un único axón, que aquí se ve saliendo del cuerpo celular en la parte inferior de la figura. Esta imagen de la concentración intracelular de calcio de una célula de Purkinje (del cerebro de un cobaya) se obtuvo utilizando una cámara de gran sensibilidad y el indicador fluorescente sensible al Ca^{2+}, fura-2. La concentración de Ca^{2+} libre está representada por diferentes colores, siendo la mayor concentración el color *rojo* y la menor el *azul*. Las mayores concentraciones de Ca^{2+} se presentan en los centenares de ramas de denditras. (Por cortesía de D.W. Tank, J.A. Connor, M. Sugimori y R.R. Llinas.)

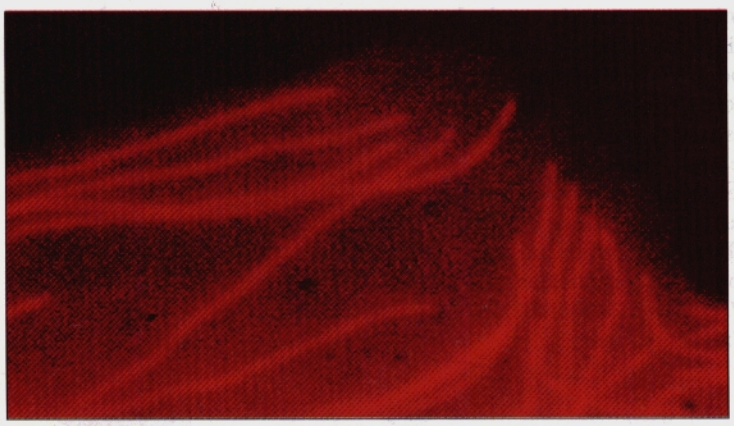


Figura 4-58 Citoquímica fluorescente análoga. Micrografía fluorescente del borde conductor de un fibroblasto que ha sido inyectado con tubulina marcada con rodamina. Los microtúbulos de toda la célula han incorporado las moléculas de tubulina marcadas. Así, se puede detectar los microtúbulos individualmente y se puede seguir su comportamiento dinámico mediante un sistema de ordenador que incremente la imagen, como se muestra aquí. A pesar de que parece que los microtúbulos tienen unos 0,25 µm de grosor, se trata de un efecto óptico; en realidad su diámetro es de tan sólo una décima parte de este valor. (Por cortesía de P. Sammeh y G. Borisy.)

Un tercer método para introducir grandes moléculas en la células consiste en provocar la fusión con la membrana plasmática de vesículas de membrana que contengan estas moléculas. Estos tres métodos, ampliamente utilizados en biología celular, se ilustran en la Figura 4-59.

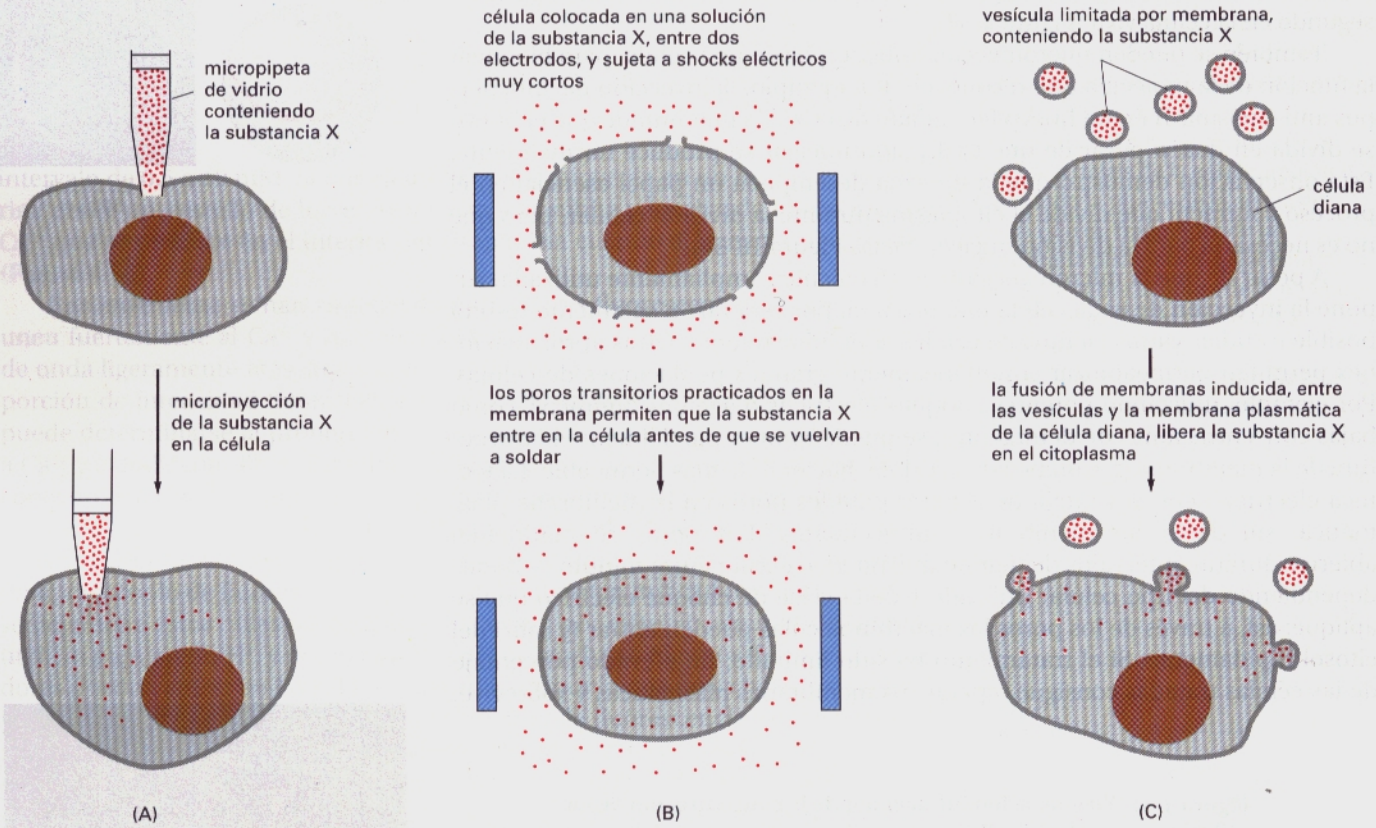


Figura 4-59 Métodos utilizados para introducir en una célula una substancia para la cual la membrana es impermeable. En (A) la substancia es inyectada a través de una micropipeta, aplicando una presión o, si la substancia está cargada eléctricamente, aplicando un voltaje que obligue a la substancia a pasar al interior de la célula como una corriente iónica (técnica denominada *iontoforesis*). En (B) la membrana celular se hace transitoriamente permeable a la substancia que queremos introducir, rompiendo la estructura de la membrana mediante un breve pero intenso shock eléctrico (por ejemplo de 2000 voltios por centímetro durante 200 microsegundos). En (C) se usa un sistema de fusión de membranas. Se pueden cargar vesículas rodeadas de membrana con la substancia deseada y luego inducirlas a fusionarse con la célula diana.

La activación inducida por la luz de moléculas precursoras "empaquetadas" facilita el estudio de la dinámica intracelular[35]

La complejidad y rapidez de muchos procesos intracelulares, como la acción de las moléculas señal o el movimiento de las proteínas del citoesqueleto, los hace difíciles de estudiar a nivel unicelular. Idealmente, cualquier molécula de interés se puede introducir en una célula viva en un momento preciso y en un lugar de la célula determinado, y posteriormente seguir su comportamiento, así como la respuesta de la célula. Sin embargo, la microinyección es limitada debido a la dificultad de controlar el lugar y el momento de la descarga del compuesto que se microinyecta. Una aproximación mucho más poderosa supone sintetizar una forma inactiva de la molécula de interés, introducirla en la célula y activarla súbitamente y en un lugar escogido de la célula enfocando sobre ella un fino haz de luz. Se han sintetizado precursores inactivos fotosensibles de este tipo, denominados **moléculas empaquetadas**, de una gran variedad de pequeñas moléculas, incluyendo el Ca^{2+}, el AMP cíclico, el GTP y el inositol trifosfato. Las moléculas empaquetadas se pueden introducir en las células vivas mediante cualquiera de los métodos descritos en la Figura 4-59, y posteriormente se pueden activar mediante un fuerte pulso de luz procedente de un láser (Figura 4-60). Se puede utilizar un microscopio para enfocar el haz de luz sobre cualquier región de la célula, de forma que el experimentador puede controlar exactamente dónde y cuándo se liberará la molécula. De esta forma, por ejemplo, se pueden estudiar los efectos instantáneos de la liberación en el citosol de una molécula señal intracelular.

Las moléculas empaquetadas fluorescentes son herramientas con un gran futuro. Se construyen uniendo un colorante fluorescente fotoactivable a una proteína purificada. Es importante que la proteína modificada siga siendo biológicamente activa: a diferencia de lo que ocurre con el marcaje con radioisótopos (cuya diferencia únicamente consiste en el número de neutrones del núcleo del átomo marcado), el marcaje con colorantes empaquetados fluorescentes añade a la superficie de la proteína un gran grupo extra, el cual fácilmente puede alterar las propiedades de la proteína. Mediante prueba y error suele encontrarse fácilmente un protocolo de marcaje satisfactorio. Cuando se dispone de una proteína marcada biológicamente activa, resulta posible seguir su comportamiento en el interior de las células vivas. Por ejemplo, se puede introducir tubulina marcada con fluoresceína empaquetada en los microtúbulos del huso mitótico: cuando se ilumina una pequeña región del huso mitótico con un láser, la tubulina marcada se vuelve fluorescente, de forma que ahora se puede seguir su movimiento a lo largo de los microtúbulos del huso (Figura 4-61). En principio, esta misma técnica se puede aplicar a cualquier proteína.

Se pueden utilizar anticuerpos para detectar y aislar moléculas determinadas[36]

Los anticuerpos son proteínas producidas por los vertebrados como defensa contra las infecciones (véase Capítulo 23). Se diferencian del resto de las proteínas en que son producidos en millones de formas diferentes, cada una de las

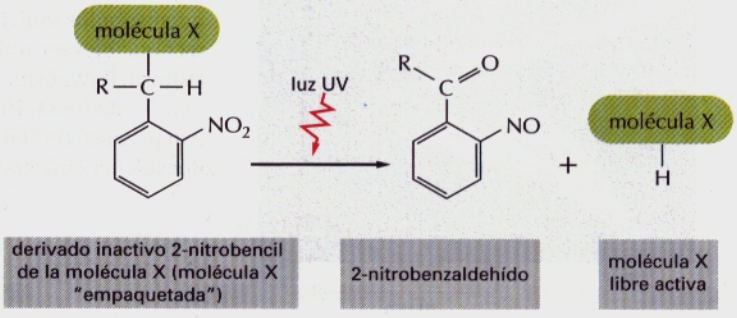


Figura 4-60 Moléculas empaquetadas. Esquema general que muestra de qué forma un derivado de una molécula empaquetada sensible a la luz (aquí designada X) se puede convertir, mediante un flash de luz UV, en su forma libre activa. Incluso los iones Ca^{2+} se pueden empaquetar indirectamente; en este caso se utiliza un quelante de Ca^{2+}, el cual se inactiva por fotólisis, liberando así el Ca^{2+} que lleva unido.

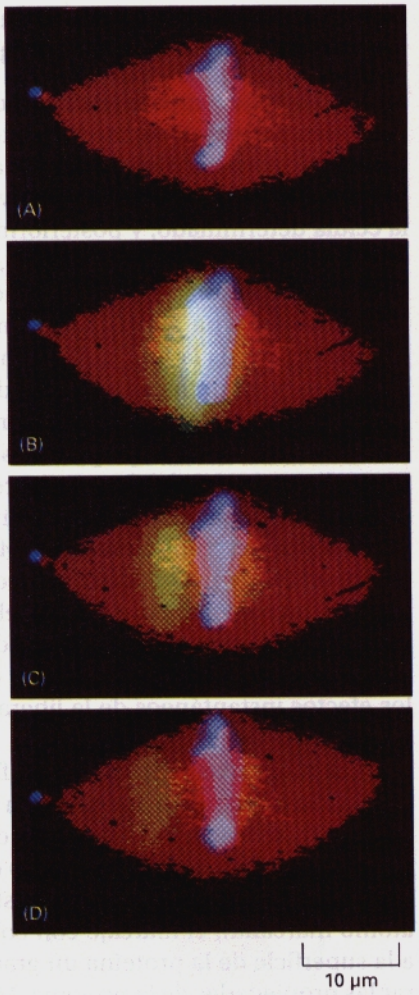


Figura 4-61 Determinación del flujo de microtúbulos en el huso mitótico utilizando fluoresceína empaquetada unida a tubulina. (A) Un huso en metafase formado *in vitro* a partir de un extracto de huevos de *Xenopus* ha incorporado tres marcadores fluorescentes: tubulina unida a rodamina (*rojo*) para marcar todos los microtúbulos, un colorante *azul* unido al DNA que marca los cromosomas y fluoresceína empaquetada unida a tubulina, que también se incorpora en todos los microtúbulos pero que resulta invisible debido a que no es fluorescente hasta que no haya sido activada por luz ultravioleta. En (B) se utiliza un haz de luz ultravioleta para desempaquetar localmente la fluoresceína empaquetada unida a tubulina principalmente en el lado izquierdo de la placa metafásica. Durante los siguientes minutos (después de un minuto y medio en C y de dos minutos y medio en D) se observa que la señal de tubulina unida a fluoresceína desempaquetada se desplaza hacia el polo izquierdo del huso, lo cual indica que la tubulina se desplaza continuamente hacia los polos a pesar de que el huso (visualizado a través de la fluorescencia de la tubulina marcada con rodamina *roja)* permanece casi inalterada. (De K.E. Sawin y T.J. Mitchison, *J. Cell. Biol.* 112:941-954, 1991, con permiso de copyright de The Rockefeller University Press.)

cuales tiene un lugar de unión diferente que reconoce específicamente a una molécula diana (denominada *antígeno*). La exacta especificidad de los anticuerpos frente a los antígenos los convierte en poderosas herramientas para la biología celular. Marcados con colorantes fluorescentes (fluorocromos) resultan muy valiosos para localizar en las células determinadas moléculas mediante microscopia de fluorescencia (Figura 4-62); marcados con partículas densas a los electrones, como pueden ser esferas de oro coloidal, se utilizan para localizar con una alta resolución moléculas determinadas al microscopio electrónico (Figura 4-63). Como herramientas biológicas se utilizan para detectar y cuantificar moléculas en extractos celulares y para identificar proteínas determinadas, después de que éstas hayan sido aisladas por electroforesis en gel de poliacrilamida (véase Figura 4-46). Los anticuerpos se pueden acoplar a una matriz inerte con el fin de formar una columna de afinidad, la cual se utiliza para purificar macromoléculas específicas a partir de un extracto celular, o en el caso de que la molécula se halle en la superficie de la célula, para seleccionar tipos determinados de células vivas a partir de una población heterogénea.

Frecuentemente, la sensibilidad de los anticuerpos como sondas para la detección de moléculas determinadas en las células y en los tejidos se incrementa

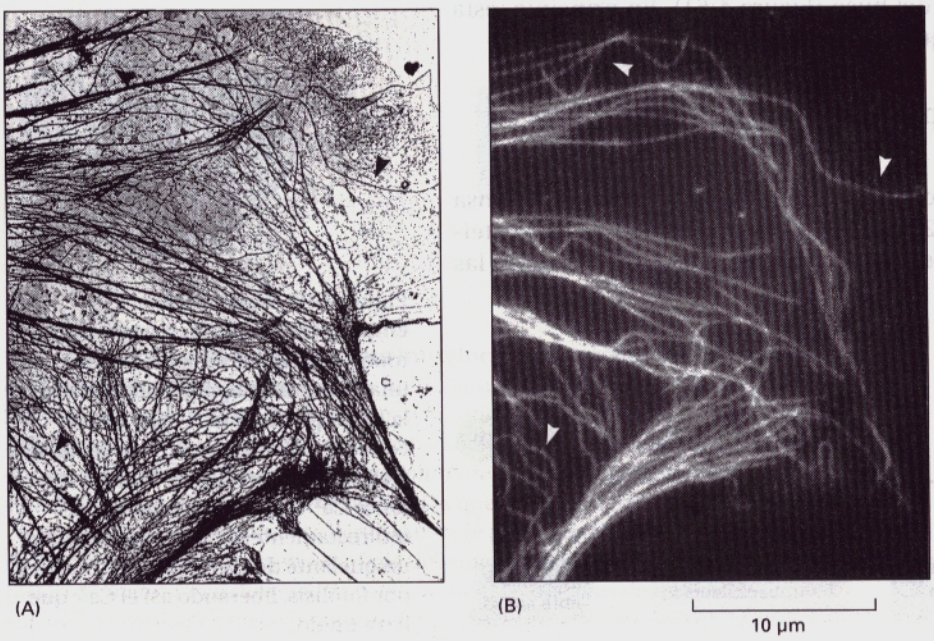


Figura 4-62 Inmunofluorescencia. (A) Electronmicrografía de la zona cortical de una célula epitelial en cultivo, mostrando la distribución de los microtúbulos y de otros filamentos. (B) La misma área pero teñida con un anticuerpo fluorescente anti-tubulina, la subunidad proteica de los microtúbulos, utilizando la técnica de la inmunocitoquímica indirecta (véase Figura 4-64). Las flechas indican microtúbulos individuales fácilmente reconocibles en ambas figuras. (De M. Osborn, R. Webster y K. Weber, *J. Cell. Biol.* 77:R27-R34, 1978. Reproducido con permiso de copyright de The Rockefeller University Press.)

mediante métodos de amplificación de señal. Por ejemplo, a pesar de que se puede unir directamente una molécula marcadora, como un colorante fluorescente, a un anticuerpo que será utilizado para el reconocimiento específico (el *anticuerpo primario*), se consigue una señal mayor utilizando el anticuerpo primario y luego detectándolo con un grupo de *anticuerpos secundarios* que se unan a él (Figura 4-64).

Los métodos de amplificación más sensibles utilizan una enzima como molécula marcadora, unida al anticuerpo secundario. Así por ejemplo, se puede utilizar la fosfatasa alcalina, una enzima que en presencia de los reactivos adecuados produce fosfato inorgánico que genera un precipitado coloreado. Este precipitado revela la presencia del anticuerpo secundario que está acoplado a la enzima, y por lo tanto, la localización del complejo antígeno-anticuerpo al que se ha unido el anticuerpo secundario. Como cada molécula de enzima actúa catalíticamente generando varios cientos de moléculas de producto, este sistema permite la detección de diminutas cantidades de antígeno. Sobre este principio se han desarrollado *inmunoensayos unido a una enzima (ELISA, de Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)*, que se utilizan habitualmente en medicina como test sensibles –por ejemplo como prueba de gestación o de varios tipos de infecciones.

La manera más sencilla de preparar anticuerpos es inyectando varias veces una muestra de un antígeno a un animal, como un conejo o una cabra, y luego recogiendo suero rico en anticuerpo. Este *antisuero* contiene una mezcla heterogénea de anticuerpos, cada uno de los cuales ha sido producido por una célula secretora de anticuerpos diferente (un linfocito B). Los diferentes anticuerpos reconocen diversas zonas de la molécula de antígeno y también impurezas de la preparación de antígeno que se inyectó. A veces, la especificidad de un antisuero por un antígeno determinado puede aumentarse eliminando las moléculas de anticuerpo que se unen a otras moléculas; por ejemplo, un antisuero producido contra una proteína X puede hacerse pasar a través de una columna de afinidad de antígenos Y y Z, para eliminar así todos los anticuerpos anti-Y y anti-Z del antisuero. Sin embargo, la heterogeneidad de los antisueros a menudo ha limitado sus aplicaciones.

Las líneas celulares de hibridomas constituyen una fuente permanente de anticuerpos monoclonales[37]

En 1976 quedó solucionado el problema de la heterogeneidad de los anticuerpos gracias al desarrollo de una nueva técnica que revolucionó el uso de los anticuerpos como herramientas para la biología celular. La técnica se basa en propagar un clon de células a partir de una único linfocito B secretor de anticuerpos, con lo que se pueden obtener grandes cantidades de anticuerpos. El problema práctico, sin embargo, es que los linfocitos B tienen una vida limitada en cultivo. Para solucionar esta limitación, se fusionan linfocitos B individuales productores de anticuerpos, procedentes de un ratón o una rata inmunizados, con células derivadas de un tumor "inmortal" de linfocitos B. De la mezcla heterogénea resultante de células híbridas se seleccionan aquellos híbridos que presentan tanto la capacidad de producir un determinado anticuerpo como la capacidad de multiplicarse indefinidamente en cultivo. Estos **hibridomas** se

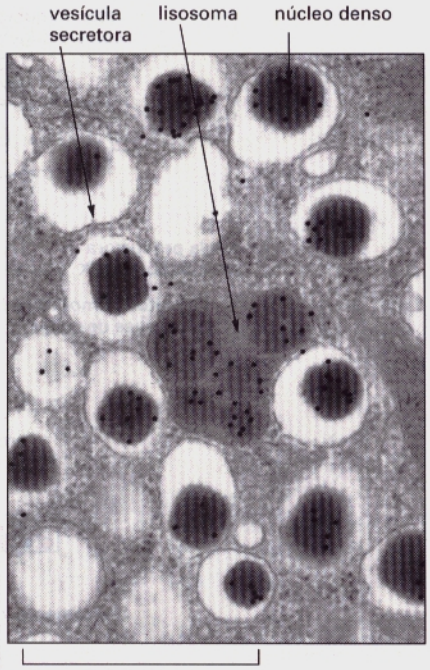


Figura 4-63 Inmunolocalización en microscopia electrónica. Micrografía electrónica de una célula secretora de insulina, en la que las moléculas de insulina se han marcado con anticuerpos anti-insulina unidos a pequeñas esferas de oro coloidal (cada una de las cuales aparecen como puntos negros). La mayor parte de la insulina se halla almacenada en las zonas densas de las vesículas secretoras; además, algunas de estas zonas densas se degradan vía lisosomas. (De L. Orci, *Diabetologia* 28:528-546, 1985.)

Figura 4-64 Inmunocitoquímica indirecta. El método es muy sensible debido a que el anticuerpo primario es a su vez reconocido por muchas moléculas del anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario está unido covalentemente a una molécula marcadora que lo hace fácilmente detectable. Entre las moléculas marcadoras más utilizadas se encuentran los colorantes fluoresceína y rodamina (para microscopia de fluorescencia), la enzima peroxidasa de rábano (tanto para microscopia óptica convencional como para microscopia electrónica), la ferritina (proteína que contiene hierro) o esferas de oro coloidal (para microscopia electrónica) y las enzimas fosfatasa alcalina o peroxidasa (para su detección bioquímica).

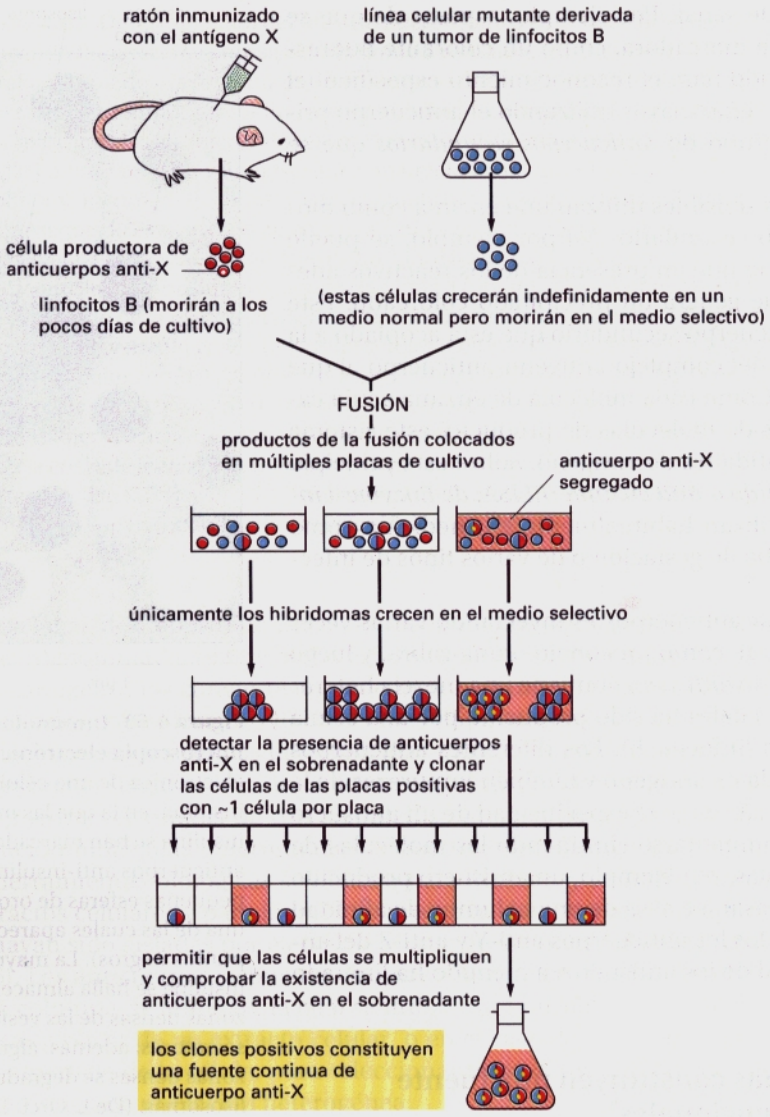


Figura 4-65 Preparación de hibridomas que segreguen anticuerpos monoclonales homogéneos contra un antígeno determinado (X). El medio de crecimiento selectivo utilizado contiene un inhibidor (la aminopterina) que bloquea las rutas normales de biosíntesis a través de las que se sintetizan los nucleótidos. Por consiguiente, las células han de utilizar una ruta paralela para sintetizar sus ácidos nucleicos, y la línea celular mutante a la que se fusionan los linfocitos B normales es defectuosa para esta vía. Puesto que ninguno de los dos tipos celulares utilizados para la fusión inicial puede vivir separado del otro, tan sólo sobreviven las células híbridas.

propagan como clones individuales, cada uno de los cuales constituye una fuente permanente y estable de un **anticuerpo monoclonal** (Figura 4-65). Este anticuerpo reconocerá un único tipo de lugar antigénico –por ejemplo, un grupo determinado de seis cadenas laterales de aminoácidos de la superficie de una proteína. El hecho de que la especificidad sea uniforme hace de estos anticuerpos monoclonales una herramienta mucho más útil que los antisueros convencionales, los cuales normalmente contienen una mezcla de anticuerpos que reconocen una gran variedad de diferentes determinantes antigénicos, incluso en macromoléculas pequeñas.

Sin embargo, la mayor ventaja de la técnica de los hibridomas consiste en que se pueden producir anticuerpos monoclonales contra moléculas no purificadas, que únicamente constituyen un componente minoritario de una mezcla compleja. En un antisuero ordinario obtenido contra una mezcla, el número de moléculas de anticuerpo que reconocen los componentes minoritarios de la mezcla puede ser demasiado pequeño para llegar a ser utilizable. Pero si los linfocitos B que producen todos estos anticuerpos se hallan en hibridomas y se selecciona un clon hibridómico a partir de esta gran mezcla de clones, este clon determinado se puede propagar indefinidamente con lo que se producirá el anticuerpo deseado en grandes cantidades. Por lo tanto, en principio se puede generar un anticuerpo monoclonal contra cualquier proteína de una mezcla biológica; una vez se ha conseguido el anticuerpo, se puede utilizar como sonda

específica tanto para averiguar y localizar la proteína que induce su formación como para purificar esta proteína y estudiar su estructura y su función. Dado que únicamente se han aislado el 5% de las 10 000 proteínas que tiene aproximadamente una célula de mamífero, muchos de los anticuerpos monoclonales generados contra mezclas impuras de proteínas identifican nuevas proteínas en extractos celulares fraccionados. Con la utilización de los anticuerpos monoclonales y la tecnología del clonaje génico (véase más adelante) no va a ser difícil la identificación y caracterización de nuevas proteínas y de nuevos genes; el problema será determinar su función, y a menudo el sistema más potente de hacerlo es utilizando la tecnología del DNA recombinante, como se discute en el Capítulo 7.

Resumen

Actualmente se dispone de una gran número de técnicas que permiten detectar, medir y seguir casi cualquier molécula de interés en el interior de una célula. Cualquier molécula puede ser "marcada" mediante la incorporación de uno o más átomos radiactivos. Los núcleos de estos átomos se desintegran, emitiendo una radiación que permite detectar la molécula marcada y trazar sus movimientos y su metabolismo en la célula. Entre el elevado número de aplicaciones de los radioisótopos a la biología celular, se puede destacar el análisis de las vías metabólicas mediante métodos de pulso y caza y la determinación de un elevado número de moléculas individualmente mediante la autorradiografía.

Los colorantes fluorescentes también se pueden utilizar para medir las concentraciones de determinados iones en células individuales, incluso en zonas concretas de una célula. Los microelectrodos de vidrio, que empezaron a ser imprescindibles en el estudio de potenciales de membrana y de corrientes iónicas a través de la membrana plasmática, actualmente proporcionan una alternativa para medir las concentraciones intracelulares de iones determinados. También pueden utilizarse como micropipetas para inyectar a las células moléculas para las que las membranas son impermeables, como proteínas marcadas con fluoresceína y anticuerpos. Se puede seguir el comportamiento dinámico y los movimientos de muchos tipos de moléculas en una célula viva construyendo un precursor inactivo "empaquetado", el cual puede ser introducido en una célula y activado en una región determinada de la célula mediante una reacción estimulada por la luz.

Los anticuerpos también son herramientas versátiles y sensibles para detectar y localizar moléculas biológicas determinadas. Los vertebrados producen millones de moléculas de anticuerpo distintas, cada una de las cuales tiene un lugar de unión que reconoce una región determinada de una macromolécula. La técnica del hibridoma permite la obtención, en cantidades casi ilimitadas, de anticuerpos monoclonales, con una especificidad única. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales contra, en principio, cualquier macromolécula celular; estos anticuerpos monoclonales pueden ser utilizados para localizar y purificar la molécula que el anticuerpo reconoce y, por lo menos en algunos casos, analizar su función.

Bibliografía

General

Cantor, C.R.; Schimmel, P.R. Biophysical Chemistry, 3 vols. New York: W.H. Freeman, 1980. (Una extensa exposición de los principios físicos en que se basan muchas técnicas bioquímicas y biofísicas.)

Freifelder, D.M. Physical Biochemistry, 2nd ed. New York: W.H. Freeman, 1982.

Van Holde, K.E. Physical Biochemistry. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1985.

Citas

1. Bradbury, S. An Introduction to the Optical Microscope, 2nd ed. Oxford, UK: Oxford University Press, 1989.

   Fawcett, D.W. A Textbook of Histology, 11th ed. Philadelphia: Saunders, 1986.

   Lacey, A.J., ed. Light Microscopy in Biology. A Practical Approach. Oxford, UK: IRL Press, 1989.

2. Hecht, E. Optics, 2nd ed. Reading, MA: Addison-Wesley, 1987.

   Slayter, E.M.; Slayter, H.S. Light and Electron Microscopy. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1992.

Spencer, M. Fundamentals of Light Microscopy. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1982.

3. Boon, M.E.; Drijver, J.S. Routine Cytological Staining Methods. London: Macmillan, 1986.

Hayat, M.A. Cytochemical Methods. New York: Wiley-Liss, 1989.

4. Haugland, R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 5th ed. Eugene, OR: Molecular Probes, Inc., 1992.

Ploem, J.S.; Tanke, H.J. Introduction to Fluorescence Microscopy. Royal Microscopical Society Handbook No. 10. Oxford, UK: Oxford Scientific Publications, 1987.

Wang, Y.-L., Taylor, D.L., eds. Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, Parts A & B (Methods in Cell Biology, Vols. 29 and 30). San Diego, CA: Academic Press, 1989. (Una completa guía que abarca mucho más que la microscopia de fluorescencia básica.)

Willingham, M.C.; Pastan, I.H. An Atlas of Immunofluorescence in Cultured Cells. Orlando, FL: Academic Press, 1985.

5. Zernike, F. How I discovered phase contrast. *Science* 121:345-349, 1955.

6. Allen, R.D. New observations on cell architecture and dynamics by video-enhanced contrast optical microscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 14:265-290, 1985.

Herman, B.; Jacobson, K., eds. Optical Microscopy for Biology. New York: Wiley-Liss, 1990.

Inoue, S. Video Microscopy. New York: Plenum Press, 1986.

Shotton, D., ed. Electronic Light Microscopy: Techniques in Modern Biomedical Microscopy. New York: Wiley-Liss, 1993.

7. Minsky, M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scaning* 10:128-138, 1988.

Pawley, J.B., ed. Handbook of Confocal Microscopy, 2nd ed. New York: Plenum Press, 1990.

White, J.G.; Amos, W.B.; Fordham, M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J. Cell Biol.* 105:41-48, 1987.

8. Pease, D.c.; Porter, K.R. Electron microscopy and ultramicrotomy. *J. Cell Biol.* 91:287s-292s, 1981.

9. Hayat, M.A. Principles and Techniques of Electron Microscopy, 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1989.

Wischnitzer, S. Introduction to Electron Microscopy. Oxford: Pergamon, 1981.

10. Everhart, T.W.; Hayes, T.L. The scanning electron microscope. *Sci. Am.* 226(1):54-69, 1972.

Hayat, M.A. Introduction to Biological Scanning Electron Microscopy. Baltimore: University Park Press, 1978.

Kessel, R.G.; Kardon, R.H. Tissues and Organs. New York: W.H. Freeman, 1979. (Un atlas de tejidos de vertebrados vistos mediante microscopia electrónica de barrido.)

Pawley, J.B.; Walther, P.; Shih, S.-J.; Malecki, M. Early results using high-resolution, low-voltage, low-temperature SEM. *J. Microsc.* 161:327-335, 1991.

11. Sommerville, J.; Scheer, U., eds. Electron Microscopy in Molecular Biology: A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1987.

12. Heuser, J. Quick-freeze, deep-etch preparation of samples for 3-D electron microscopy. *Trends Biochem. Sci.* 6:64-68, 1981.

Pinto da Silva, P.; Branton, D. Membrane spliting in freeze-etching. *J. Cell Biol.* 45:598-605, 1970.

13. Chiu, W. Electron microscopy of frozen, hydrated biological specimens. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15:237-257, 1986.

Darst, S.A.; Edwards, A.M.; Kubalek, E.W.; Kornberg, R.D. Three-dimensional structure of yeast RNA polymerase II at 16 A resolution. *Cell* 66:121-128, 1991.

Unwin, N. Nicotinic acetylcholine receptor at 9 A resolution. *J. Mol. Biol.* 229:1101-1124, 1993.

Unwin, P.N.T.; Henderson, R. Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystal specimens. *J. Mol. Biol.* 94:425-440, 1975.

14. Freshney, R.I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques. New York: Liss, 1987.

15. Herzenberg, L.A.; Sweet, R.G.; Herzenberg, L.A. Fluorescence-activated cell sorting. *Sci. Am.* 234(3):108-116, 1976.

Kamarck, M.E. Fluorescence-activated cell sorting of hybrid and transfected cells. *Methods Enzymol.* 151:150-165, 1987.

Nolan, G.P.; Fiering, S.; Nicolas, J.-F.; Herzenberg, L.A. Fluorescence-activated cell analysis and sorting of viable mammalian cells based on beta-D-galactosidase activity after transduction of *E. coli lac Z. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2603-2607, 1988.

16. Harrison, R.G. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J. Exp. Zool.* 9:787-848, 1910.

17. Ham, R.G. Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53:288-293, 1965.

Levi-Montalcini, R. The nerve growth factor thirty-five years later. *Science* 237:1154-1162, 1987.

Loo, D.T.; Fuquay, J.I.; Rawson, C.L.; Barnes, D.W. Extended culture of mouse embryo cells without senescence: inhibition by serum. *Science* 236:200-202, 1987.

Sato, G.H.; Pardee, A.B.; Sirbasku, D.A., eds. Growth of Cells in Hormonally Defined Media. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

18. Hay, R., et al., eds. American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 6th ed. Rockville, MD: American Type Culture Collection, 1988.

19. Ruddle, F.H.; Creagan, R.P. Parasexual approaches to the genetics of man. *Annu. Rev. Genet.* 9:407-486, 1975.

20. Colowick, S.P.; Kaplan, N.O., eds. Methods in Enzymology, Vols. 1-. . . . San Diego, CA: Academic Press, 1955-1994. (Una serie de varios volúmenes que contiene artículos básicos y específicos sobre muchos procedimientos.)

Cooper, T.G. The Tools of Biochemistry. New York: Wiley, 1977.

Deutscher, M.P., ed. Guide to Protein Purification (Methods in Enzymology, Vol. 182). San Diego, CA: Academic Press, 1990.

Scopes, R.K. Protein Purification, Principles and Practice, 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1987.

21. Claude, A. The coming of age of the cell. *Science* 189: 433-435, 1975.

de Duve, C.; Beaufay, H. A short history of tissue fractionation. *J. Cell Biol.* 91:293s-299s, 1981.

Meselson, M.; Stahl, F.W. The replication of DNA in *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47:671-682, 1958. (La centrifugación en gradiente de densidad se utiliza para demostrar que la replicación del DNA es semiconservativa.)

Palade, G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189:347-358, 1975.

Sheeler, P. Centrifugation in Biology and Medical Science. New York: Wiley, 1981.

22. Morre, D.J.; Howell, K.E.; Cook, G.M.W.; Evans, W.H., eds. Cell Free Analysis of Membrane Traffic. New York: Liss, 1986.

Nierenberg, M.W.; Matthaei, J.H. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* on naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47:1588-1602, 1961.

Racker, E. A New Look at Mechanisms in Bioenergetics. New York: Academic Press, 1976. (Sistemas libres de células en la comprensión del metabolismo energético.)

Zamecnik, P.C. An historical account of protein synthesis, with current overtones–a personalized view. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34:1-16, 1969.

23. Dean, P.D.G.; Johnson, W.S.; Middle, F.A. Affinity Chromatography: A Practical Approach. Arlington, VA: IRL Press, 1985.

Gilbert, M.T. High Performance Liquid Chromatography. Littleton, MA: John Wright-PSG, 1987.

24. Andrews, A.T. Electrophoresis, 2nd ed. Oxford, UK: Clarendon Press, 1986.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.

Hames, B.D.; Rickwood, D., eds. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach, 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1990.

25. Celis, J.E.; Bravo, R., eds. Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins. New York: Academic Press, 1984.

O'Farrell, P.H. High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021, 1975.

26. Cleveland, D.W.; Fischer, S.G.; Kirschner, M.W.; Laemmli, U.K. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252:1102-1106, 1977.

Ingram, V.M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anemia hemoglobin. *Nature* 178:792-794, 1956.

27. Edman, P.; Begg, G. A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* 1:80-91, 1967.

Hewick, R.M.; Hunkapiller, M.W.; Hood, L.E.; Dreyer, W.J. A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J. Biol. Chem.* 256:7990-7997, 1981.

McCloskey, J.A., ed. Mass Spectrometry (Methods in Enzymology, Vol. 193). San Diego, CA: Academic Press, 1990.

Sanger, F. The arrangement of amino acids in proteins. *Adv. Protein Chem.* 7:1-67, 1952.

Walsh, K.A.; Ericsson, L.H.; Parmelee, D.C.; Titani, K. Advances in protein sequencing. *Annu. Rev. Biochem.* 50:261-284, 1981.

28. Brandem, C.; Toozze, J. Introduction to Protein Structure. New York: Garland, 1991.

Glusker, J.P.; Trueblood, K.N. Crystal Structure Analysis: A Primer. Oxford, UK: Oxford University Press, 1985.

Kendrew, J.C. The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci. Am.* 205(6):96-111, 1961.

Perutz, M.F. The hemoglobin molecule. *Sci. Am.* 211(5):64-76, 1964.

29. Cooke, R.M., Cambell, I.D. Protein structure determination by nuclear magnetic resonance. *Bioessays* 8:52-56, 1988.

Shulman, R.G. NMR spectroscopy of living cells. *Sci. Am.* 248(1):86-93, 1983.

Wuthrich, K. Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science* 243:45-50, 1989.

30. Chase, G.D.; Rabinowitz, J.L. Principles of Radioisotope Methodology, 2nd ed. Minneapolis: Burgess, 1962.

Dyson, N.A. An Introduction to Nuclear Physics with Applications in Medicine and Biology. Chichester, UK: Horwood, 1981.

Yalow, R.S. Radioimmunoassay: a probe for the fine structure of biologic systems. *Science* 200:1236-1245, 1978.

31. Calvin, M. The path of carbon in photosynthesis. *Science* 135:879-889, 1962. (Descripción de una de las primeras aplicaciones de los radioisótopos en biología.)

Hershey, A.D.; Chase, M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36:39-56, 1952.

Rogers, A.W. Techniques of Autoradiography, 3rd ed. New York: Elsevier/North Holland, 1979.

Slater, R.J., ed. Radioisotopes in Biology: A Practical Approach. New York: Oxford University Press, 1990.

32. Ammann, D. Ion-Selective Microelectrodes: Principles, Design and Application. Berlin: Springer-Verlag, 1986.

Auerbach, A.; Sachs, F. Patch clamp studies of single ionic channels. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 13:269-302, 1984.

Neher, E. Ion channels for communication betweeen and within cells. *Science* 256:498-502, 1992.

Sakmann, B. Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *Science* 256:503-512, 1992.

33. Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260:3440-3450, 1985.

Tsien, R.Y. Fluorescent probes of cell signaling. *Annu. Rev. Neurosci.* 12:227-253, 1989.

34. Celis, J.E.; Graessman, A.; Loyter, A., eds. Microinjection and Organelle Transplantation Techniques. London: Academic Press, 1986.

Chang, D.C.; Chassy, B.M.; Saunders, J.A.; Sowers, A.E. Guide to Electroporation and Electrofusion. New York: Academic Press, 1991.

Gomperts, B.D.; Fernández, J.M. Techniques for membrane permeabilization. *Trends Biochem. Sci.* 10:414-417, 1985.

Ostro, M.J. Liposomes. *Sci. Am.* 256(1):102-111, 1987.

Ureta, T.; Radojkovic, J. Microinjected frog oocytes: a first-rate test tube for studies on metabolism and its control. *Bioessays* 2:221-226, 1985.

35. Adams, S.R.; Tsien, R.Y. Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annu. Rev. Physiol.* 55:755-784, 1993.

Gurney, A.M. Photolabile caged compounds. In Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity (W.T. Mason, ed.). London: Academic Press, 1993.

Sawin, K.E.; Theriot, J.A.; Mitchison, T.J. Photoactivation of fluorescence as a probe for cytoskeletal dynamics in mitosis and cell motility. In Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity (W.T. Mason, ed.). London: Academic Press, 1993.

Walker, J.W.; Somlyo, A.V.; Goldman, Y.E.; Somlyo, A.P.; Trentham, D.R. Kinetics of smooth and skeletal muscle activation by laser pulse photolysis of caged inositol 1,4,5-triphosphate. *Nature* 327:249-252, 1987.

36. Anderton, B.H.; Thorpe, R.C. New methods of analysing for antigens and glycoproteins in complex mixtures. *Immunol. Today.* 1:122-127, 1980.

Coons, A.H. Histochemistry with labeled antibody. *Int. Rev. Cytol.* 5:1-23, 1956.

Harlow, E.; Lane, D. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

Wilson, L.; Matsudaira, P., eds. Antibodies in Cell Biology (Methods in Cell Biology, Vol. 37). New York: Academic Press, 1993.

37. Clackson, T. et al. Makin antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352:624-628, 1991.

Kang, A.S.; Barbas, C.F.; Janda, K.D.; Benkovic, S.J.; Lerner, R.A. Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4363-4366, 1991.

Milstein, C. Monoclonal antibodies. *Sci. Am.* 243(4):66-74, 1980.

Yelton, D.E.; Scharff, M.D. Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 50:657-680, 1981.

Macromoléculas: estructura, forma e información

3

- Procesos de reconocimiento molecular
- Ácidos nucleicos
- Estructura de las proteínas
- Las proteínas como catalizadores

Al considerar la transición desde las pequeñas moléculas de la célula hasta las macromoléculas gigantes, asistimos a mucho más que a un simple aumento de tamaño. Aunque las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos están construidos a partir de una colección restringida de aminoácidos, nucleótidos y azúcares respectivamente, pueden presentar propiedades únicas y realmente sorprendentes, que les confieren unas características muy lejanas a sus precursores químicos. Las macromoléculas biológicas están compuestas de varios cientos –a veces de millones– de átomos unidos entre ellos formando disposiciones espaciales definidas de forma muy precisa. Cada una de estas macromoléculas contiene una información muy específica. Incorporadas a su estructura, existen series de mensajes biológicos que pueden ser leídos cuando estas macromoléculas interaccionan con otras moléculas, permitiéndoles desarrollar una función determinada.

En este capítulo examinaremos las estructuras de las macromoléculas, dedicando un interés especial a las proteínas y a los ácidos nucleicos y explicando cómo, a lo largo de la evolución, se han adaptado para desarrollar funciones determinadas. Consideraremos los principios por los cuales estas macromoléculas catalizan transformaciones químicas, construyen complejas estructuras multimoleculares, generan movimiento y –mucho más fundamental que todo esto– almacenan y transmiten información hereditaria.

Procesos de reconocimiento molecular[1]

Las macromoléculas tienen un peso molecular que normalmente oscila entre 10 000 y 1 millón, y un tamaño intermedio entre las moléculas orgánicas de la célula, tratadas en el Capítulo 2, y los grandes agregados macromoleculares y orgánulos, que serán objeto de estudio de capítulos posteriores (Figura 3-1). Una pequeña molécula, la del agua, constituye el 70% de la masa total de la célula; casi todo el resto de la masa son macromoléculas (Tabla 3-1).

Tal como se ha descrito en el Capítulo 2, una macromolécula se ensambla a partir de subunidades de peso molecular menor, que se añaden una tras otra formando un largo polímero a modo de cadena (véase Figura 2-35). Generalmente, en la construcción de cada cadena participa únicamente una familia de subunidades: los aminoácidos se unen a otros aminoácidos formando las proteínas, los nucleótidos se unen a otros nucleótidos formando los ácidos nucleicos; y los azúcares se unen a otros azúcares formando los polisacáridos. Puesto que la secuencia exacta de las subunidades es crucial para la función de una molécu-

Figura 3-1 Comparación entre el tamaño de las moléculas proteicas y el de otros componentes celulares. Los ribosomas son importantes agregados macromoleculares compuestos por unas 60 proteínas y moléculas de RNA.

Tabla 3-1 Composición química aproximada de una bacteria típica y de una celúla de mamífero típica

Componente	Porcentaje del peso total de la célula	
	E. coli *Bacteria*	*Célula de mamífero*
H_2O	70	70
Iones inorgánicos (Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cl^-, etc.)	1	1
Algunos metabolitos pequeños	3	3
Proteínas	15	18
RNA	6	1,1
DNA	1	0,25
Fosfolípidos	2	3
Otros lípidos	–	2
Polisacáridos	2	2
Volumen celular total:	2×10^{-12} cm^3	4×10^{-9} cm^3
Volumen celular relativo:	1	2000

Las proteínas, los polisacáridos, el DNA y el RNA son macromoléculas. Los lípidos generalmente no se clasifican como macromoléculas, a pesar de que tienen algunas de sus características; por ejemplo, la mayoría de ellos se sintetizan como polímeros lineales de una molécula menor (el grupo acetil de acetil CoA) y se autoensamblan formando grandes estructuras (membranas). Nótese que el agua y las proteínas comprenden la mayor parte de la masa tanto de las células de mamífero como de las bacterias.

la, su biosíntesis requiere mecanismos que aseguren que cada subunidad adecuada se coloque en el polímero en la posición exacta de la cadena.

Las interacciones específicas de una macromolécula dependen de enlaces débiles no covalentes[2]

Una cadena macromolecular se mantiene unida por medio de *enlaces covalentes*, que son suficientemente fuertes como para preservar la secuencia de subunidades durante largos períodos de tiempo. A pesar de que la secuencia de subunidades determina la información contenida en una macromolécula, la utilización de esta información depende en gran medida de otros enlaces mucho más débiles, los enlaces *no covalentes*. Estos enlaces débiles se forman entre diferentes regiones de la misma macromolécula, y también entre diferentes macromoléculas. Por ello, estos enlaces determinan en gran medida tanto la estructura tridimensional de las cadenas macromoleculares como la manera en que estas estructuras interaccionan entre sí.

Los enlaces no covalentes que se presentan en las moléculas biológicas, suelen clasificarse en tres tipos: **enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno** y **atracciones de van der Waals**. Otra importante fuerza débil se genera por la estructura tridimensional del agua, la cual tiende a unir los grupos hidrofóbicos con el fin de minimizar su efecto destructor de la red de moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno (véase Panel 2-1, págs. 50-51). Esta expulsión de la solución acuosa genera lo que algunas veces se considera como un cuarto tipo de enlace

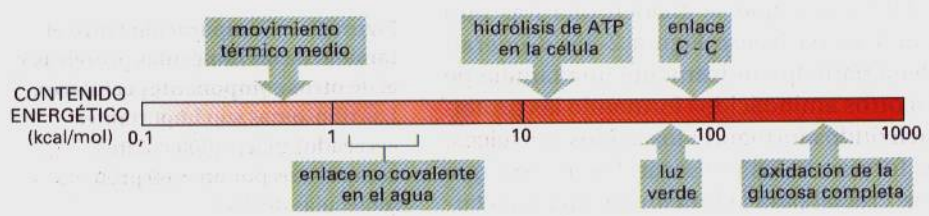


Figura 3-2 Energías comparativas de algunos acontecimientos moleculares importantes de la célula. Nótese que los valores de energía se muestran en una escala logarítmica.

Tabla 3-2 Enlaces químicos covalentes y no covalentes

Tipo de enlace	Longitud (nm)	Fuerza (kcal/mol)*	
		En el vacío	*En el agua*
Covalente	0,15	90	90
Iónico	0,25	80	3
Hidrógeno	0,30	4	1
Atracciones de van der Waals (por átomo)	0,35	0,1	0,1

*La fuerza de un enlace se puede medir como la energía necesaria para romperlo, que aquí se presenta en kalorías por mol (kcal/mol). (*Una kilocaloría* es la cantidad de energía necesaria para incrementar en 1° C la temperatura de 1000 g de agua. Una unidad alternativa de uso común es el kilojoule, kJ, igual a 0,24 kcal.) La fuerza de cada enlace son los átomos que están implicados en su formación, y del ambiente preciso en el que se halla el enlace; los valores de la tabla solamente son, por lo tanto, una guía aproximada. Nótese que el ambiente acuoso de una célula disminuye enormemente la fuerza de los enlaces iónicos y de hidrógeno entre moléculas diferentes a las de agua (Panel 3-1, págs. 96-97). La longitud de enlace es la distancia entre los centros de los átomos diferentes al hidrógeno que participan en el enlace.

débil no covalente. En el Panel 3-1, páginas 96-97, se exponen las características principales de estos cuatro tipos de enlaces débiles.

En un medio acuoso, los enlaces no covalentes son de 30 a 300 veces más débiles que los enlaces covalentes (Tabla 3-2) y sólo ligeramente más fuertes que la energía media de las colisiones térmicas a 37°C (Figura 3-2). Por consiguiente, un único enlace no covalente –a diferencia de lo que ocurre con un enlace covalente– resulta demasiado débil para resistir los movimientos térmicos que tienden a separar las moléculas, por lo que son necesarios numerosos enlaces no covalentes para mantener unidas dos superficies moleculares. Entre dos superficies sólo se pueden formar un elevado número de enlaces no covalentes si existen un elevado número de átomos de estas superficies que estén adaptados unos a los otros (Figura 3-3), lo cual determina la especificidad de reconocimiento biológico, como ocurre entre una enzima y su substrato.

Como se explica en la parte superior del Panel 3-1, los átomos se comportan casi como si fueran pesadas esferas de un radio determinado (su "radio de van der Waals"). El requerimiento de que dos átomos no pueden solaparse limita los ángulos de enlace posibles de una cadena polipeptídica (Figura 3-4). Estas y otras interacciones estéricas reducen substancialmente el número de disposiciones tridimensionales (o **conformaciones**) que son posibles. A pesar de ello, una larga cadena flexible como por ejemplo la de una proteína, puede plegarse en un número enorme de diferentes posibilidades, teniendo cada conformación

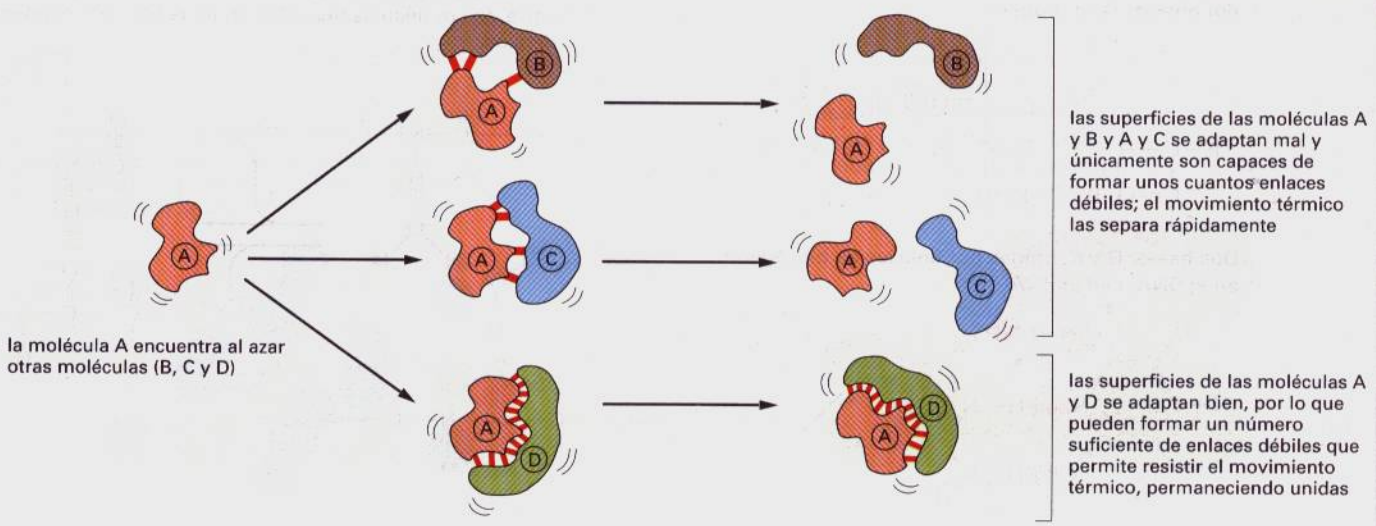
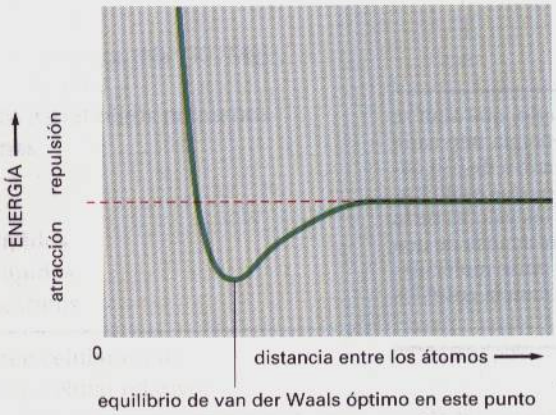


Figura 3-3 Enlaces no covalentes. Manera en que los enlaces débiles median los procesos de reconocimiento entre las macromoléculas.

FUERZAS DE VAN DER WAALS

A una distancia corta, 2 átomos cualesquiera muestran una débil interacción de enlace debido a sus cargas eléctricas fluctuantes. Esta fuerza recibe el nombre de atracción de van der Waals. Sin embargo dos átomos se repelen muy energéticamente si se los acerca demasiado. Esta repulsión de van der Waals desempeña un papel importante limitando las posibles conformaciones de una molécula.

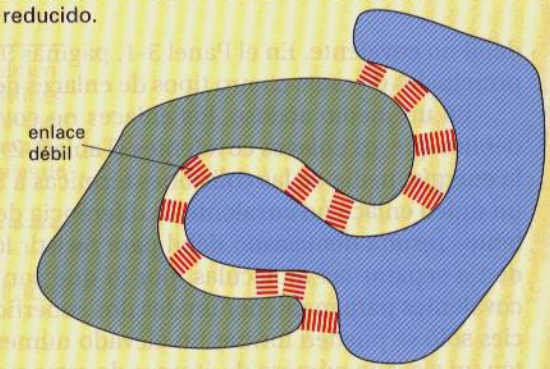


Cada tipo de átomo tiene un radio, conocido como radio de van der Waals, en el que las fuerzas de van der Waals están equilibradas.

Dos átomos se atraen entre sí por fuerzas de van der Waals hasta que la distancia entre ellos iguale la suma de sus radios de van der Waals. A pesar de que estas atracciones de van der Waals son individualmente muy débiles, pueden ser importantes cuando dos superfícies macromoleculares se adaptan muy bien una a otra.

ENLACES QUÍMICOS DÉBILES

Las moléculas orgánicas pueden interaccionar con otras moléculas a través de fuerzas no covalentes de alcance reducido.

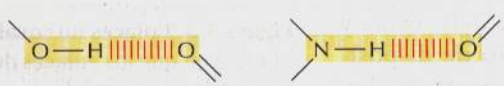


Típicamente, los enlaces químicos débiles tienen una fuerza 20 veces inferior a la de un enlace covalente. Sólo son suficientemente fuertes para fijar dos moléculas cuando se forma simultáneamente un número elevado de ellos.

ENLACES DE HIDRÓGENO

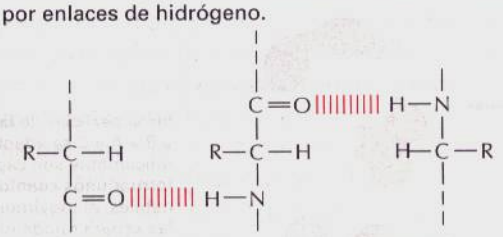
Un átomo de hidrógeno es compartido por dos átomos (ambos electronegativos, como el O y el N) formándose un enlace de hidrógeno.

Los enlaces de hidrógeno son más fuertes cuando los tres átomos se hallan en línea recta:

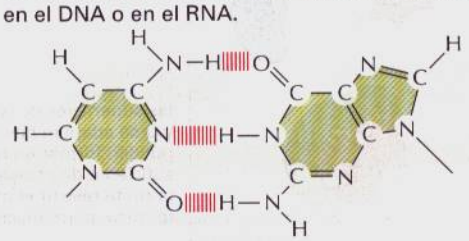


Ejemplos en macromoléculas:

Dos cadenas polipeptídicas de aminoácidos unidas por enlaces de hidrógeno.

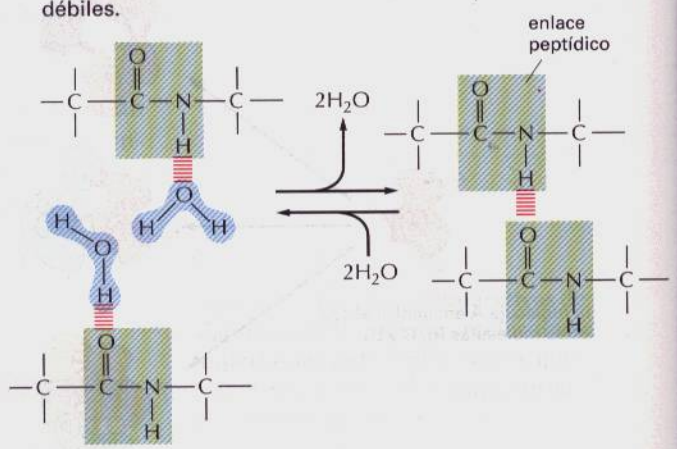


Dos bases, G y C, unidas por enlaces de hidrógeno en el DNA o en el RNA.



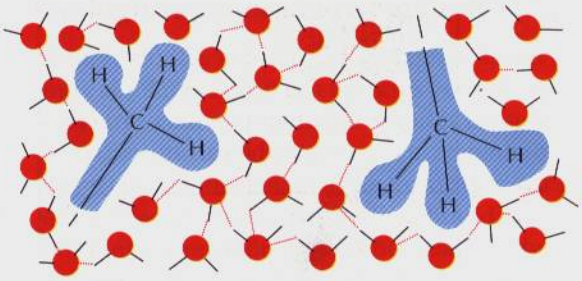
ENLACES DE HIDRÓGENO EN EL AGUA

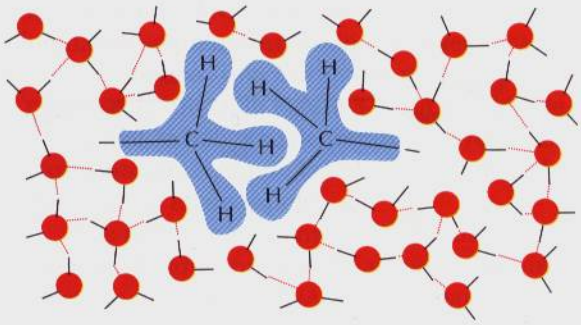
Las moléculas que pueden formar enlaces de hidrógeno con otras también pueden, alternativamente, formar enlaces de hidrógeno con moléculas de agua. Debido a esta competencia con las moléculas de agua los enlaces de hidrógeno formados entre dos moléculas disueltas en agua son relativamente débiles.



96 **Panel 3-1** **Principales tipos de fuerzas no covalentes débiles que unen las moléculas entre sí.**

INTERACCIONES HIDROFÓBICAS

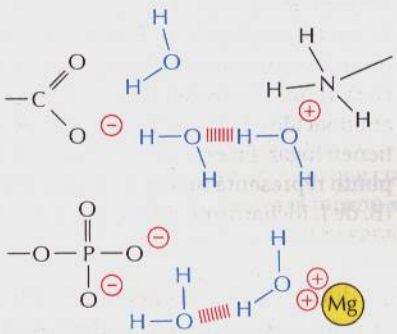




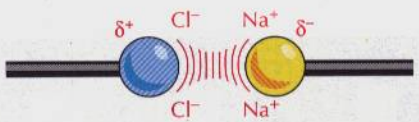
El agua une los grupos hidrofóbicos con objeto de minimizar los efectos destructores de estos grupos sobre la red de enlaces de hidrógeno del agua. A menudo se dice que los grupos hidrofóbicos que se mantienen unidos de esta manera están unidos por "puentes hidrofóbicos", a pesar de que la atracción está generada en realidad por una repulsión de las moléculas de agua.

ENLACES IÓNICOS EN SOLUCIONES ACUOSAS

Los grupos cargados están protegidos por sus interacciones con las moléculas de agua. Por ello, los enlaces iónicos en solución acuosa son bastante débiles.

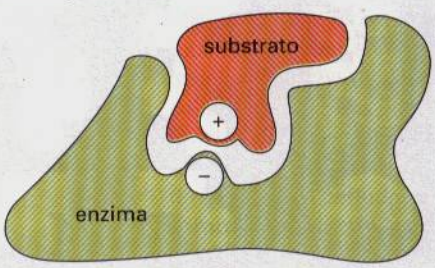


Además, los enlaces iónicos se debilitan por la presencia de sales, cuyos átomos forman los contraiones que se distribuyen alrededor de los iones de carga opuesta.



La medida de la intensidad de la desestabilización de la interacción por sales supone una estima cuantitativa del número total de enlaces iónicos implicados.

De todos modos, los enlaces iónicos son muy importantes en los sistemas biológicos. Una enzima que se una a un substrato cargado positivamente a menudo presentará en el lugar apropiado un resto de aminoácido cargado negativamente.



ENLACES IÓNICOS

Las interacciones iónicas se producen entre grupos totalmente cargados (enlace iónico) o entre grupos parcialmente cargados.

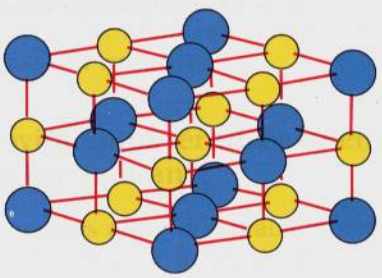
La fuerza de atracción entre las dos cargas δ^+ y δ^- es

$$\text{fuerza} = \frac{\delta^+ \delta^-}{r^2 D} \quad \text{(Ley de Coulomb)}$$

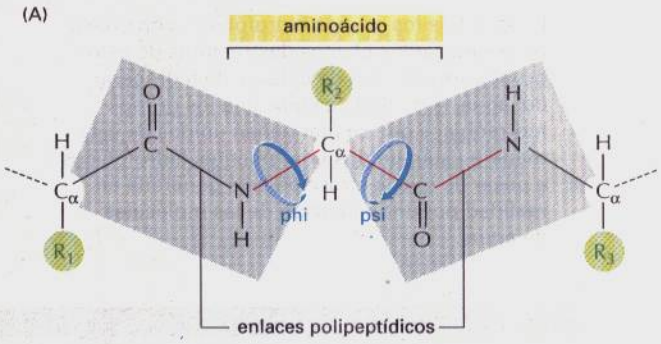
donde D = constante dieléctrica
(1 para el vacío, 80 para el agua)

r = distancia de separación

En ausencia de agua, las fuerzas iónicas son muy intensas. Son responsables de la dureza de minerales tales como el mármol y el ágata.



cristal de NaCl



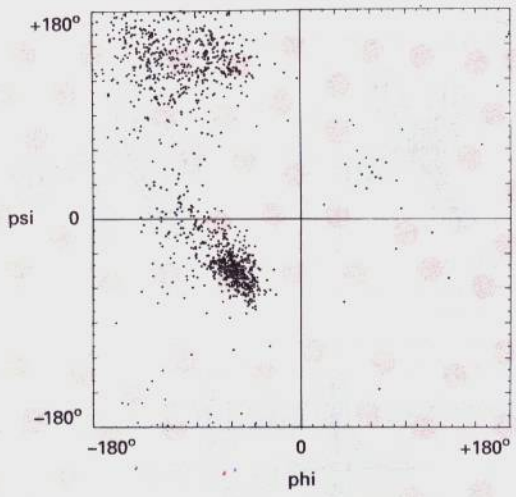


Figura 3-4 Limitaciones estéricas de los ángulos de enlace en una cadena polipeptídica. (A) Cada aminoácido contribuye con tres enlaces (en *rojo*) a su cadena polipeptídica. El enlace peptídico es plano (sombreado en *gris*) y no permite rotación. Por el contrario, se puede producir rotación sobre del enlace C_α– C –a este ángulo de rotación se le denomina psi (ψ)– y sobre el enlace N– C_α –a este ángulo de rotación se le denomina phi (φ). El grupo R representa una cadena lateral de un aminoácido. (B) La conformación de los átomos principales de una cadena proteica viene determinada por un par de ángulos psi y phi para cada aminoácido; debido a las colisiones estéricas entre los aminoácidos, la mayoría de los pares de ángulos phi y psi no tienen lugar. En este gráfico, llamado de Ramachandran, cada punto representa un par de ángulos observados en proteínas. (B, de J. Richardson, *Adv. Prot. Chem.* 34:, 174-175, 1981.)

una colección diferente de interacciones débiles dentro de la cadena, y es la fuerza total de estas interacciones lo que determina qué conformaciones se formarán.

La mayoría de proteínas de una célula se pliegan de forma estable de una sola manera: durante el curso de la evolución la secuencia de subunidades de aminoácidos ha sido seleccionada de forma que una determinada conformación puede formar muchas más interacciones favorables en la propia cadena que cualquier otra.

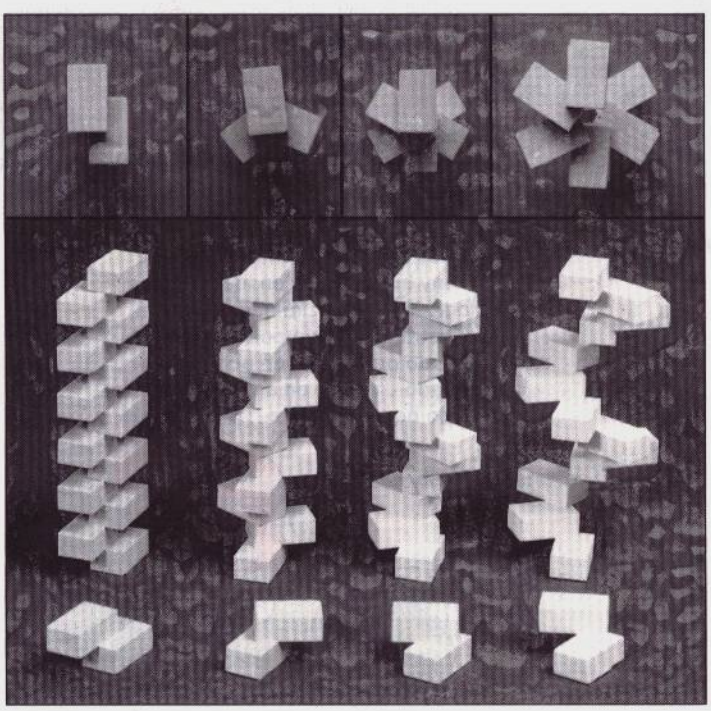


Figura 3-5 Cuando varias subunidades se unen entre sí de una forma regular, se genera una hélice. En primer término se presenta la interacción entre dos subunidades y detrás aparecen las hélices que resultan de esta interacción. Las hélices que se presentan aquí son de (A) dos, (B) tres o (C) y (D) seis unidades por vuelta. En la parte superior de la figura se puede observar la disposición de las subunidades desde la parte superior de cada hélice. Nótese que la hélice (D) tiene un paso de vuelta más ancho que la hélice (C).

Una hélice es un motivo estructural común en las estructuras biológicas generadas a partir de subunidades repetidas[3]

A menudo, las estructuras biológicas están formadas por subunidades que son muy similares las unas a las otras –como aminoácidos o nucleótidos–, formando una larga cadena repetitiva. Si todas las subunidades son idénticas, normalmente ocurre que las adyacentes en la cadena se unen de una única manera, ajustando sus posiciones relativas de forma que se minimice la energía libre de contacto entre ellas. En este caso, cada subunidad se colocará exactamente en la misma posición en relación a sus subunidades adyacentes, de modo que la subunidad 3 se unirá a la subunidad 2 de la misma forma en la que la subunidad 2 se ha unido a la subunidad 1, y así sucesivamente. Debido a que es muy raro que las subunidades se unan formando una línea recta, generalmente estas uniones originan una **hélice** –una estructura regular que se parece a una escalera de caracol, como se ilustra en la Figura 3-5. En función de la dirección de giro de la escalera de caracol, la hélice se denomina dextrógira o levógira (Figura 3-6). Esta característica no varía cuando la hélice se coloca cabeza abajo, pero es la inversa cuando se refleja en un espejo.

Las hélices son elementos habituales de las estructuras biológicas, tanto si las subunidades son moléculas pequeñas que están unidas entre sí de forma covalente (como en el DNA), como si son grandes moléculas proteicas unidas entre sí por fuerzas no covalentes (como en los filamentos de actina). Esto no es sorprendente. Una hélice es una estructura que en absoluto es excepcional, generada simplemente por la unión, una contra otra, de muchas subunidades similares, de forma que cada una adopta exactamente la misma relación espacial con la subunidad anterior.

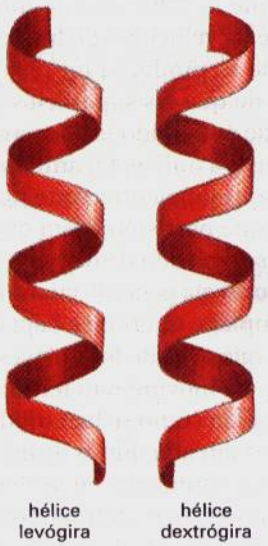


Figura 3-6 Comparación entre una hélice levógira y otra dextrógira. Como referencia, es útil recordar que los tornillos habituales, que avanzan cuando se les hace girar en el sentido de las agujas de un reloj, son dextrógiros. Nótese que cualquier hélice conserva el mismo sentido de giro (y por lo tanto su característica de ser dextrógira o levógira) aunque se la coloque boca abajo.

La difusión es el primer paso hacia el reconocimiento molecular[4]

Para que dos moléculas se unan entre sí deben entrar en estrecho contacto. Esto se consigue gracias a los movimientos térmicos que hacen que las moléculas se desplacen, o *difundan*, desde sus posiciones de partida. Puesto que las moléculas de un líquido colisionan y se separan rápidamente unas de otras, una determinada molécula se mueve primero en una dirección y luego en otra, en un "movimiento al azar" (Figura 3-7). La distancia media que recorre cada tipo de molécula desde su punto de partida es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo utilizado, es decir, si una molécula determinada necesita por término medio 1 segundo para desplazarse 1 μm, necesitará 4 segundos para desplazarse 2 μm, 100 segundos para desplazarse 10 μm, etc. Por lo tanto, la difusión es eficaz para que las moléculas se desplacen a distancias limitadas, pero no es eficaz para distancias largas.

Experimentos realizados inyectando a células colorantes fluorescentes y otras moléculas marcadas demuestran que la difusión en el citoplasma de moléculas pequeñas es casi tan rápida como en el agua. Una molécula del tamaño del ATP necesitará sólo 0,2 segundos aproximadamente para difundir hasta una distancia media de 10 μm –el diámetro de una célula animal pequeña. Sin embargo, las grandes macromoléculas se desplazan mucho más lentamente. No sólo presentan velocidades de difusión intrínsecamente más lentas sino que además su movimiento se ve retardado por frecuentes colisiones con otras muchas macromoléculas que se mantienen en su lugar mediante asociaciones moleculares en el citoplasma (Figura 3-8).

Figura 3-7 Un recorrido al azar. Las moléculas de una solución se desplazan al azar debido a continuas colisiones con otras moléculas. Este movimiento permite a las pequeñas moléculas difundir de una zona a otra de la célula en períodos de tiempo sorprendentemente cortos: pueden difundir a través de toda una célula típica de mamífero en menos de un segundo.

Los movimientos térmicos unen a las moléculas y luego las separan[4]

Los encuentros entre dos macromoléculas o entre una macromolécula y una molécula pequeña, se producen al azar, por difusión simple. Un encuentro puede conducir inmediatamente a la formación de un complejo (en cuyo caso se

dice que la velocidad de formación está *limitada por la difusión*). Alternativamente, la velocidad de formación del complejo puede ser más lenta, por necesitar que se produzca un reajuste de la estructura de una o de ambas moléculas, antes de que las superficies interactivas puedan adaptarse una a la otra, de forma que a menudo las dos moléculas que colisionan se separarán una de la otra, sin llegar a unirse. En ambos casos, cuando las dos moléculas interactivas se han acercado suficientemente una a la otra, forman entre ellas múltiples enlaces débiles, que persisten hasta que el movimiento térmico al azar hace que las moléculas se disocien de nuevo (Figura 3-3).

Por regla general, cuanto más fuerte es la unión de las moléculas que forman el complejo, tanto más baja es su velocidad de disociación. En un caso extremo, la energía total de los enlaces formados puede ser insignificante en comparación con la del movimiento térmico, por lo que las dos moléculas se disociarán tan rápidamente como se han unido. En el otro caso extremo, la energía total de los enlaces es tan alta que la disociación se produce muy raramente. Las interacciones fuertes se producen en la célula cuando la función biológica requiere que las dos macromoléculas permanezcan estrechamente asociadas durante largo tiempo –por ejemplo, en el caso de una proteína reguladora que debe permanecer unida al DNA para inhibir la expresión de un gen. Las interacciones débiles se producen cuando la función requiere un cambio rápido de la estructura del complejo –por ejemplo, cuando las dos proteínas que interaccionan han de cambiar de pareja, durante los movimientos de una máquina proteica.

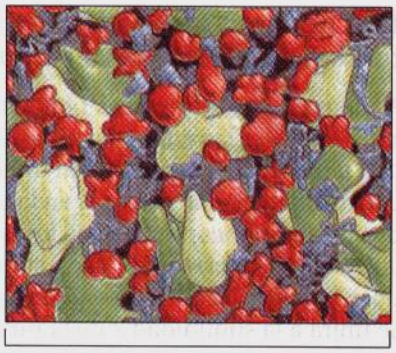


Figura 3-8 Macromoléculas en el citoplasma celular. El dibujo está hecho aproximadamente a escala, e ilustra el abarrotamiento que existe en el citoplasma. Únicamente se representan las macromoléculas: los RNA se han dibujado en *azul*, los ribosomas en *verde* y las proteínas en *rojo*. En el citoplasma las macromoléculas difunden de una forma relativamente lenta debido a que interaccionan con muchas otras macromoléculas; por el contrario, las moléculas pequeñas difunden casi tan rápidamente como lo hacen en el agua. (Adaptado a partir de D.S. Goodsell, *Trends in Biochem. Sci.* 16:203-206, 1991.)

La constante de equilibrio constituye una medida de la fuerza de interacción entre dos moléculas[5]

La fuerza exacta del enlace entre dos moléculas es un índice útil de la especificidad de su interación. Para ilustrar cómo se mide la fuerza de enlace, considere-

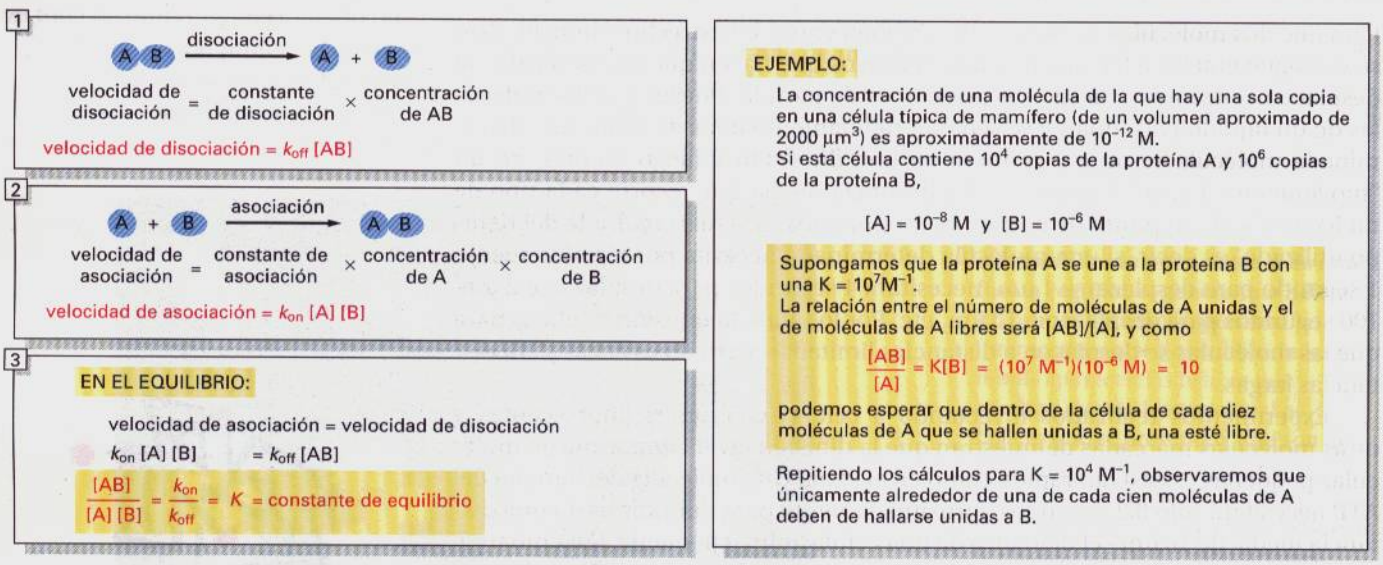


Figura 3-9 Principio del equilibrio. El equilibrio entre las moléculas A y B y el complejo AB se mantiene gracias al balance entre las dos reacciones opuestas indicadas en (1) y (2). Como se expresa en (3), la relación entre la constante de asociación y la de disociación es igual a la *constante de equilibrio (K)* para la reacción. Las moléculas A y B han de chocar para poder reaccionar por lo que la velocidad de síntesis del complejo AB es proporcional al producto de las concentraciones individuales de los reactantes A y B. Por eso en la expresión final de *K* aparece el producto [A] × [B], donde [ ] indica "concentración de".

Como se ha definido tradicionalmente, en la ecuación de un equilibrio químico las concentraciones de los productos aparecen en el numerador y las de los compuestos que reaccionan, en el denominador. Así, la constante de equilibrio en (3) es para la reacción de *asociación* A + B → AB, mientras que la inversa de esta fracción sería la constante de equilibrio para la reacción de *disociación* AB → A + B. Sin embargo, al referirse a interacciones de unión sencilla, es menos confuso hablar de *constante de afinidad* o *constante de asociación* (en litros por mol); cuanto mayor es el valor de la constante de asociación (K_a), mayor es la fuerza de unión entre A y B. El recíproco de K_a es la *constante de disociación* (en moles por litro); cuanto menor es el valor de la constante de disociación (K_d) mayor es la fuerza de unión entre A y B.

mos una reacción en la que la molécula A se une a la molécula B. Esta reacción continuará hasta alcanzar un *punto de equilibrio*, en el cual la velocidad de formación y la de disociación son iguales (Figura 3-9). Las concentraciones de A, de B y del complejo AB en este punto de equilibrio se pueden utilizar para determinar una **constante de equilibrio (*K*)** para la reacción, tal como se explica en la Figura 3-9. Esta constante recibe a veces el nombre de **constante de afinidad**, y habitualmente se utiliza como medida de la fuerza de enlace entre dos moléculas; cuanto *más fuerte* sea el enlace, tanto *más elevado* será el valor de la constante de afinidad.

La constante de equilibrio de una reacción en la que se enlazan dos moléculas está directamente relacionada con el cambio de energía libre estándar del enlace (ΔG°), mediante la ecuación descrita en la Tabla 3-3. En esta tabla también se indican los valores de ΔG° correspondientes a varios valores de *K*. En sistemas biológicos, las constantes de afinidad para interacciones de enlace sencillo normalmente oscilan entre 10^3 y 10^{12} litros/mol; esto corresponde a energías de enlace en el intervalo de 4 a 17 kcal/mol, que puede provenir de unos 4 a 17 enlaces de hidrógeno.

Los átomos y las moléculas se mueven rápidamente[6]

Las reacciones químicas de una célula tienen lugar a velocidades asombrosamente elevadas. Una molécula de una enzima típica, por ejemplo, cataliza unas 1000 reacciones por segundo y algunas enzimas como la catalasa pueden conseguir velocidades de más de 10^6 reacciones por segundo. Cada reacción requiere que una molécula de enzima se encuentre con otra de substrato, por lo que velocidades como éstas sólo son posibles gracias a que las moléculas se mueven a velocidades suficientemente rápidas. Los movimientos de las moléculas pueden clasificarse de forma general en tres categorías: (1) el movimiento de una molécula de un lugar a otro (movimiento de translación), (2) el rápido movimiento atrás y adelante de los átomos unidos de forma covalente respecto a otro (vibración), y (3) las rotaciones. Todos estos movimientos son importantes para unir entre sí las superficies de moléculas que interaccionan.

Las velocidades de los movimientos moleculares pueden medirse por diversas técnicas espectroscópicas, que indican que una gran proteína globular está girando constantemente, rotando sobre su eje, alrededor de un millón de veces por segundo. Las velocidades de encuentros por difusión originados por movimientos de traslación son proporcionales a la concentración de la molécula que difunde. Si el ATP, por ejemplo, se halla presente a su concentración intracelular habitual de 1 mM, cada lugar de una molécula proteica será bombardeado con moléculas de ATP por unas 10^6 colisiones al azar cada segundo. Para una concentración de ATP 10 veces menor, el número de colisiones descendería a 10^5, y así sucesivamente.

De forma extremadamente rápida, en cuanto dos moléculas han colisionado y se hallan en una orientación relativa adecuada, puede producirse entre ellas una reacción química. Teniendo en cuenta lo rápidamente que se mueven y reaccionan las moléculas, las velocidades de catálisis enzimática observadas no parecen tan extraordinarias.

Los procesos de reconocimiento molecular nunca pueden ser perfectos[7]

Todas las moléculas tienen energía –la energía cinética de sus movimientos de traslación, de vibración y de rotación y la energía potencial almacenada en sus distribuciones electrónicas. A través de las colisiones moleculares, esta energía se distribuye aleatoriamente a todos los átomos presentes, de forma que la mayoría de átomos tendrán niveles de energía cercanos al valor medio, y tan sólo una pequeña proporción de ellos presentarán niveles energéticos muy altos. A pesar de que las conformaciones o estados favorables que adopte una molécula

Tabla 3-3 La relación entre las diferencias de energía libre y las constantes de equilibrio

Constante de equilibrio $\frac{[AB]}{[A][B]} = K$ (litros/mol)	Energía libre de AB menos energía libre de A + B (kcal/mol)
10^5	–7,1
10^4	–5,7
10^3	–4,3
10^2	–2,8
10	–1,4
1	0
10^{-1}	1,4
10^{-2}	2,8
10^{-3}	4,3
10^{-4}	5,7
10^{-5}	7,1

Si se permite que la reacción A + B $\rightleftharpoons$ llegue al equilibrio, las cantidades relativas de A, B y AB dependerán de las diferencias de energía libre, ΔG°, entre ellos. Los valores de la tabla corresponden a 37°C (310°K), y están calculados a partir de la ecuación

$$\Delta G^\circ = -RT \ln \frac{[AB]}{[A][B]}$$

o

$$\frac{[AB]}{[A][B]} = e^{-\Delta G^\circ / RT} = e^{-\Delta G^\circ / 0{,}6138}$$

Aquí, ΔG° viene dado en kilocalorías por mol y representa la diferencia de energía libre en condiciones estándar (en las que todos los componentes se hallan a concentraciones de 1,0 moles/litro); T es la temperatura en grados Kelvin (°K). Principios similares a éstos se aplican incluso al caso más sencillo de una reacción A $\rightleftharpoons$ A*, según el cual una molécula puede interconvertirse entre dos estados A y A* que se diferencian en un cierto valor de ΔG°. En el equilibrio, la relación entre el número de moléculas de ambos tipos es igual a la relación

$$\frac{[A^*]}{[A]} = e^{-\Delta G^\circ / RT}$$

Así, a partir de esta tabla podemos ver que, si la transición A → A* tiene un cambio de energía libre favorable de 4,3 kcal/mol, en el equilibrio habrá más de 1000 moléculas en el estado A* que en el estado A.

serán las que supongan menor energía libre (véanse págs. 78-79), como consecuencia de colisiones extraordinariamente violentas se producen estados de alta energía. Es posible calcular la probabilidad de que, a una temperatura dada un átomo o una molécula esté en un estado de una determinada energía (véase Tabla 3-3). La probabilidad de un estado de alta energía disminuye respecto a la de uno de baja energía a medida que la diferencia entre los valores de la energía libre de ambos aumenta. Sin embrago, esta probabilidad únicamente es igual a cero cuando la diferencia de energía es infinita.

Debido a que las colisiones moleculares son fortuitas, de vez en cuando ocurren pequeñas "reacciones secundarias". A consecuencia de ello, una célula comete errores continuamente. Se producirán ocasionalmente incluso las reacciones que son energéticamente muy desfavorables. Por ejemplo, dos átomos unidos uno al otro por un enlace covalente, pueden ocasionalmente estar sometidos a una energía especial de colisión, y separarse. Análogamente, la especificidad de una enzima por su substrato no puede ser absoluta ya que el reconocimiento de una molécula como diferente de otra nunca puede ser perfecto. Únicamente se podrían evitar por completo los errores si la célula desarrollara mecanismos que tuvieran diferencias de energía infinitas entre las alternativas. Puesto que esto no es posible, las células se ven forzadas a tolerar un cierto nivel de error, y han desarrollado una gran variedad de reacciones especiales de reparación para corregir los errores más perjudiciales.

Por otro lado, los errores son esenciales para la vida. Si no fuera por las equivocaciones ocasionales en el proceso de mantenimiento de las secuencias de DNA, probablemente la evolución no habría tenido lugar.

Resumen

La secuencia de subunidades de una macromolécula contiene una información que determina el perfil tridimensional de su superficie. Este perfil, a su vez, controla el reconocimiento entre una molécula y otra o entre distintas zonas de una misma molécula, mediante enlaces débiles, no covalentes. Las fuerzas de atracción son de cuatro tipos: enlaces iónicos, atracciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno e interacciones entre grupos no polares causadas por su expulsión hidrofóbica del agua. Dos moléculas se reconocerán una a otra mediante un proceso en el que primero se encuentran por difusión al azar, se unen de forma transitoria y luego se disocian. Generalmente, la fuerza de esta interacción se expresar en forma de una constante de equilibrio. Puesto que la única manera de conseguir que el reconocimiento sea infalible consiste en hacer que la energía de enlace sea infinitamente grande, las células vivas constantemente cometen errores; los que son intolerables son corregidos mediante procesos especiales de reparación.

Ácidos nucleicos[8]

Los genes están formados por DNA[9]

Desde que el hombre ha sembrado cosechas o criado animales, resulta obvio que cada semilla o cada óvulo fecundado debe de contener escondido un plan o diseño para el desarrollo del organismo. En la época moderna, la ciencia de la genética se desarrolló alrededor de la premisa de que existían unos elementos invisibles portadores de información, denominados **genes**, que son distribuidos a cada una de las células hijas cuando la célula madre se divide. Por consiguiente, antes de dividirse una célula ha de hacer una copia de sus genes para poder ceder a sus células hijas una colección completa de ellos. Los genes de los espermatozoides y de los óvulos transmiten la información genética de una generación a la siguiente.

La herencia de los caracteres biológicos debe implicar la existencia de esquemas de átomos que sigan las leyes de la física y de la química: en otras palabras, los genes deben estar formados por moléculas. Al principio, la naturaleza

de estas moléculas resultaba difícil de imaginar. ¿Qué tipo de molécula podría ser almacenada en una célula, dirigir las actividades de un organismo en desarrollo y además ser capaz de una replicación exacta y casi ilimitada?

Hacia finales del siglo XIX, los biólogos habían reconocido ya que los transportadores de la información hereditaria eran los *cromosomas* que resultan visibles en el núcleo cuando una célula empieza a dividirse. Pero la evidencia de que es el ácido desoxirribonucleico (DNA) de estos cromosomas la substancia de la que están formados los genes se obtuvo mucho más tarde a partir de unos estudios sobre bacterias. En 1944 se demostró que la adición de DNA purificado de una cepa de bacteria a otra cepa ligeramente diferente, confería a esta segunda cepa propiedades hereditarias características de la primera. Como hasta entonces se había creído que tan sólo las proteínas presentaban una complejidad conformacional suficiente como para ser portadoras de la información genética, este descubrimiento constituyó una sorpresa y no fue aceptado de forma general hasta principio de los años 1950. Actualmente, la idea de que el DNA contiene la información genética –almacenada en su larga cadena de nucleótidos– es tan fundamental para el pensamiento biológico que a veces resulta difícil darse cuenta del enorme abismo intelectual que llenó este concepto.

Las moléculas de DNA consisten en dos largas cadenas unidas por pares de bases complementarias[10]

Al considerar la simplicidad de la química del DNA resulta comprensible que los genetistas tuvieran dificultades en aceptar que el DNA es la esencia de los genes. Una cadena de DNA es un largo polímero no ramificado, compuesto únicamente por cuatro tipos de subunidades. Estas subunidades son los desoxirribonucleótidos que contienen las bases adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). Los nucleótidos están unidos por enlaces covalentes fosfodiéster entre el carbono 5' de un grupo desoxirribosa y el carbono 3' del siguiente (Panel 2-6, págs. 60-61). Los cuatro tipos de bases están fijados a esta cadena de azúcar fosfato repetitiva, casi como cuatro tipos diferentes de cuentas ensartadas en un collar.

¿Cómo una larga cadena de nucleótidos puede codificar las instrucciones para todo un organismo, o incluso únicamente para una sola célula? Y, ¿cómo pueden copiarse estos mensajes de una generación de células a la siguiente? Las respuestas se hallan en la estructura tridimensional de la molécula de DNA.

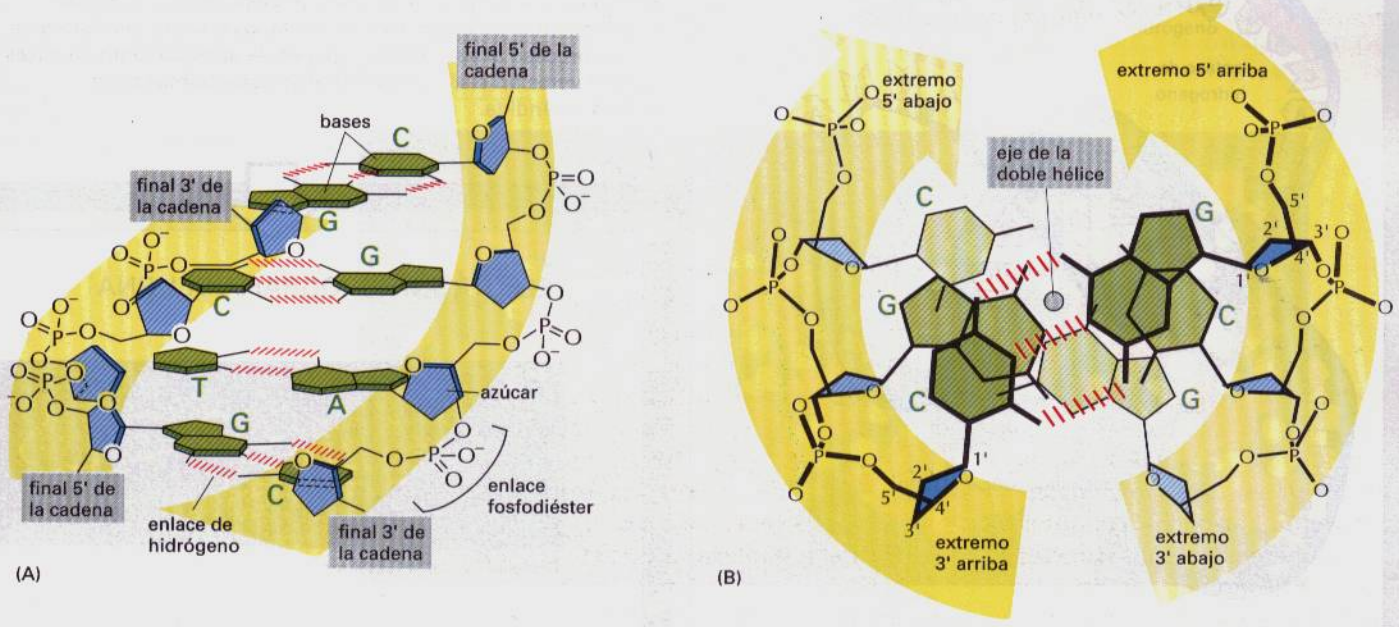


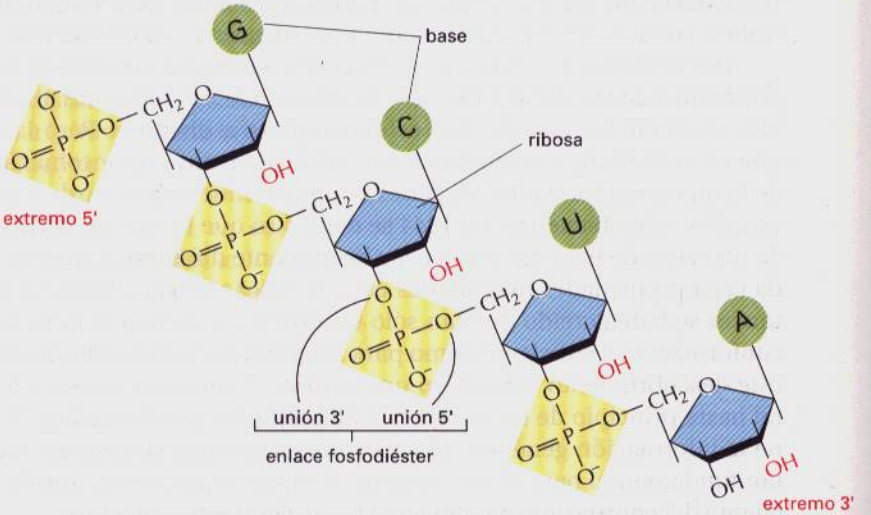
Figura 3-10 La doble hélice de DNA. (A) Una corta sección de la doble hélice del DNA. Se presentan cuatro pares de bases complementarias. Las bases se representan en *gris* y los azúcares desoxiribosa en *azul*. (B) La hélice vista desde uno de sus extremos. Nótese que las dos hebras del DNA avanzan en direcciones opuestas y que cada par de bases se mantiene unido por dos o tres enlaces de hidrógeno (véase también Panel 3-2, págs. 104-105).

DNA Y RNA

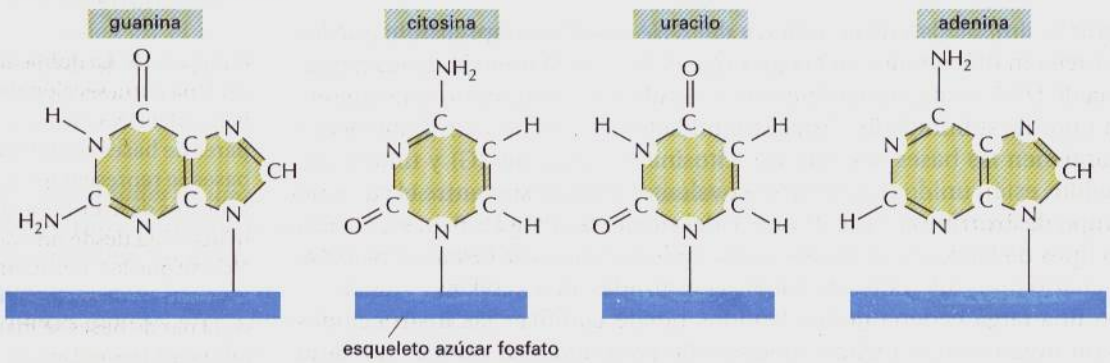
En esta mitad del panel se presenta la estructura del RNA y en la otra mitad la del DNA. Tanto el DNA como el RNA son polímeros lineales de nucleótidos (véase Panel 2-6, págs. 60-61). El RNA se diferencia del DNA en tres aspectos:

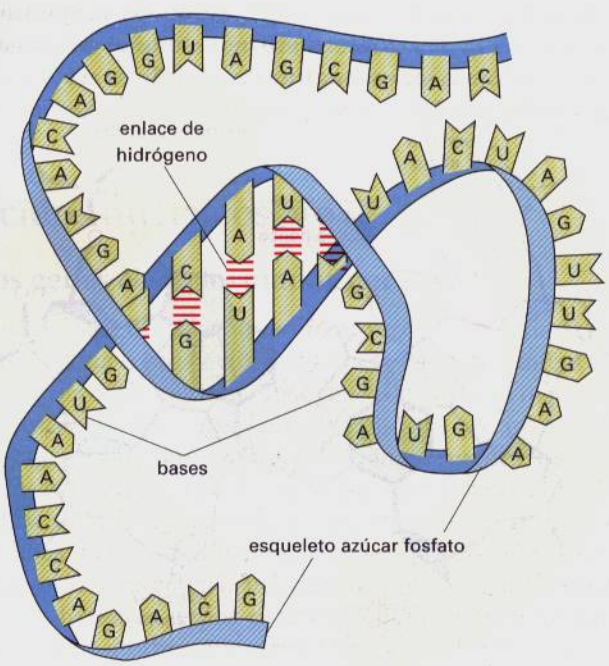
1. la columna vertebral de azúcar fosfato presenta ribosa en lugar de desoxirribosa
2. presenta la base de uracilo (U) en lugar de timina (T)
3. existe en forma de hebra sencilla en lugar de una hélice de doble hebra.

ESQUELETO DE AZÚCAR FOSFATO DEL RNA



LAS CUATRO BASES DEL RNA

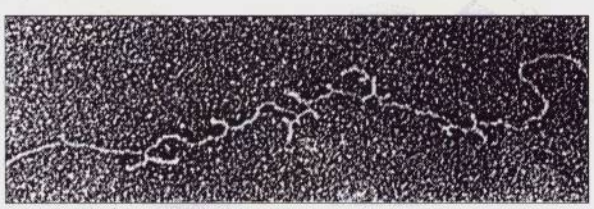




HEBRA SENCILLA DE RNA

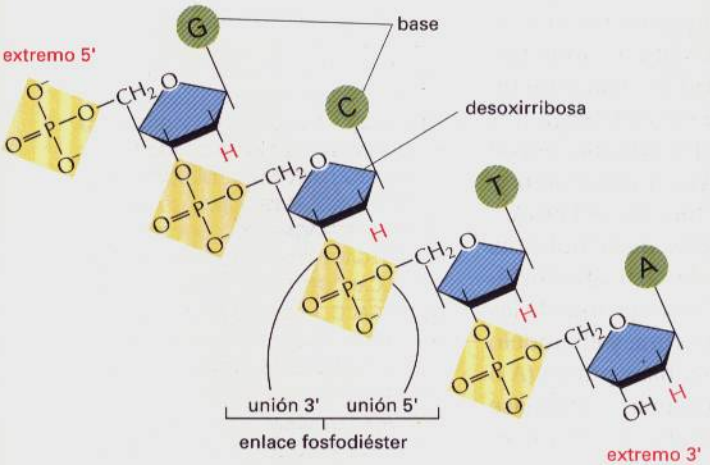
El RNA es una hebra sencilla, pero presenta cortas zonas de apareamientos de bases complementarias que pueden formarse por un proceso al azar. Estas regiones de apareamiento de bases pueden verse en electronmicrografías como ramas de la cadena extendida.

ELECTRONMICROGRAFÍA DEL RNA

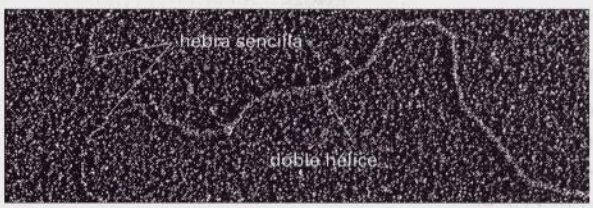


(Cortesía de Peter Wellauer.)

ESQUELETO DE AZÚCAR FOSFATO DEL DNA

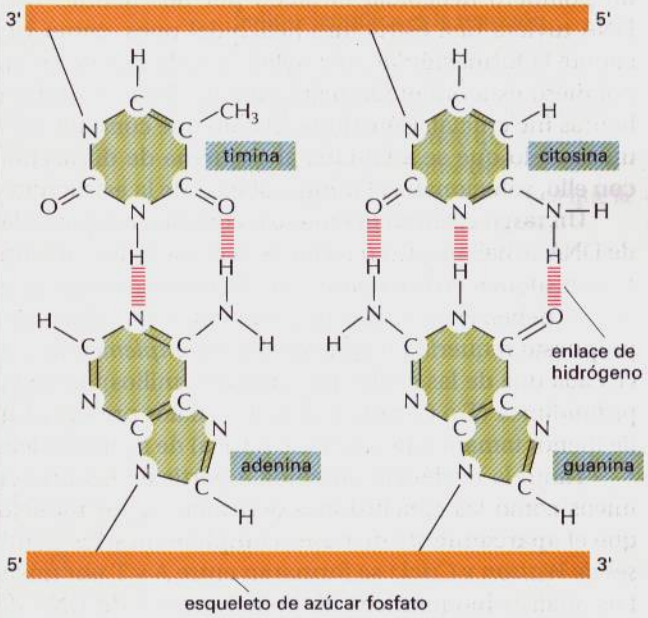


ELECTRONMICROGRAFÍA DEL DNA



(Cortesía de Mei Lie Wong.)

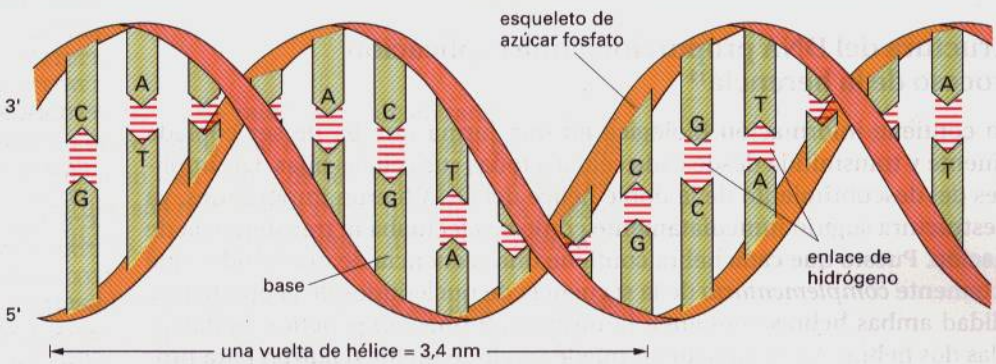
LAS CUATRO BASES DEL DNA FORMANDO DOS PARES DE BASES

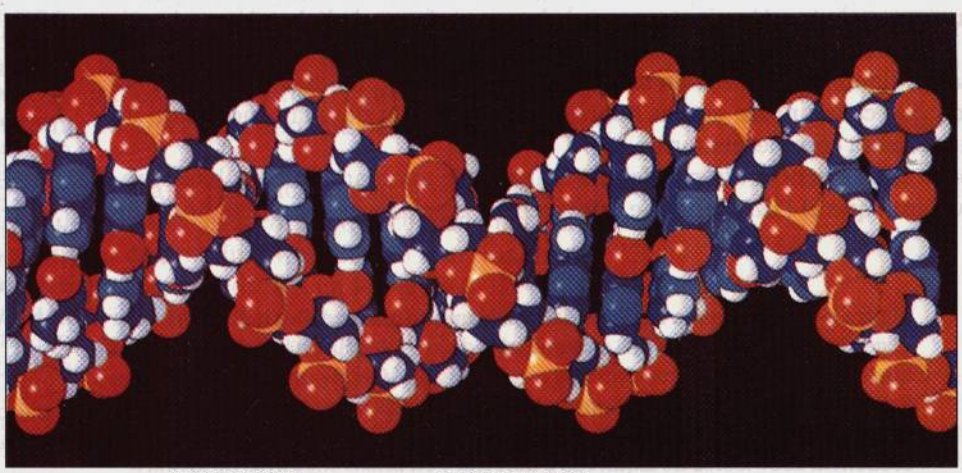


La formación específica de enlaces de hidrógeno entre G y C y entre A y T (A y U en el RNA) genera los pares de bases complementarias.

DOBLE HÉLICE DEL DNA

En una molécula de DNA, se encuentran apareadas dos cadenas antiparalelas cuyas secuencias de nucleótidos son complementarias, generando una doble hélice dextrógira de aproximadamente 10 pares de nucleótidos por vuelta de la hélice. En la parte superior de esta figura se presenta una ilustración esquemática y en la inferior un modelo lleno de la doble hélice del DNA.





estría principal estría secundaria

A principios de los años 1950, análisis por difracción de rayos X de muestras de DNA estiradas hasta conseguir fibras, sugirieron que la molécula de DNA es un polímero helicoidal formado por dos hebras. No era sorprendente que el DNA tuviera una estructura helicoidal pues, como ya hemos visto, es muy frecuente la formación de una hélice si cada una de las subunidades vecinas de un polímero está orientada regularmente. Pero el hecho de que el DNA tenga dos hebras fue crucial. Constituyó el dato que condujo, en 1953, a la construcción de un modelo que se adaptaba al esquema de difracción de rayos X observado y, con ello, solucionaba el rompecabezas de la estructura y de la función del DNA.

Un rasgo esencial del modelo consistía en que todas las bases de la molécula de DNA se hallan en el *interior* de la doble hélice, mientras que los azúcares fosfato se disponen en el exterior. Esta distribución supone que las bases de una de las hebras deben estar extraordinariamente cerca de las de la otra hebra, y el modelo propuesto requería un *apareamiento complementario* entre una base púrica (A o G, cada una de las cuales presenta dos anillos) de una de las cadenas y una base pirimidínica (T o C, cada una de las cuales presenta un solo anillo, por lo que es de menor tamaño que una base púrica) de la otra cadena (Figura 3-10).

Tanto la evidencia obtenida a partir de los primeros experimentos bioquímicos como las conclusiones derivadas de los modelos moleculares sugirieron que el **apareamiento de bases complementarias** (también llamado *pares de bases de Watson y Crick*) se formaran entre A y T por un lado y entre G y C por otro. Los análisis bioquímicos de preparaciones de DNA de diferentes especies han demostrado que, a pesar de que la composición de nucleótidos del DNA varía notablemente (por ejemplo, desde un 13% a un 36% de residuos de A en el DNA de diferentes tipos de bacterias), se cumple una regla general que dice que, cuantitativamente, [G] = [C] y [A] = [T]. La construcción de modelos moleculares reveló que el número de enlaces de hidrógeno efectivos que pueden formarse entre G y C o entre A y T era mayor que para otra combinación cualquiera de estas bases. Así pues, el modelo de doble hélice para el DNA explicaba de forma elegante la bioquímica cuantitativa.

La estructura del DNA proporciona una explicación del proceso de la herencia[11]

Un gen contiene información biológica en una forma que ha de ser copiada exactamente y transmitida desde cada célula a todas sus células hijas. Las implicaciones del descubrimiento de la doble hélice del DNA fueron importantes, ya que la estructura sugirió inmediatamente cómo se efectuaba la transferencia de información. Puesto que cada hebra contiene una secuencia de nucleótidos que es exactamente *complementaria* de la secuencia de nucleótidos de la otra hebra, en realidad ambas hebras contienen la misma información genética. Si llamamos a las dos hebras A y A', la hebra A puede servir de molde o *patrón* para producir una nueva hebra A', mientras que de la misma forma la hebra A' puede utilizarse para producir una nueva hebra A. Así, la información genética puede ser copiada mediante un proceso en el cual la hebra A se separa de la hebra A' permitiendo que cada una de ambas hebras sirva de patrón para la producción de una nueva hebra complementaria.

Como consecuencia directa del mecanismo de apareamiento de bases, resulta evidente que el DNA contiene información gracias a la secuencia lineal de

CCCTGTGGAGCCACACCCTAGGGTTGGCCA
ATCTACTCCCAGGAGCAGGGAGGGCAGGAG
CCAGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAG
CCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACAC
AACTGTGTTCACTAGCAACTCAAACAGACA
CCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGT
CTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGA
ACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGG
GCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGT
TTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTG
GAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATA
GGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTAT
TTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTAC
CCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTT
GGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATG
GGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAG
AAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCTG
GCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTT
GCCACACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAG
CTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGGTG
AGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTCTTTCC
CCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCAT
AGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACAGTTT
AGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCATCA
GTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTC
TTTTATTTGCTGTTCATAACAATTGTTTTC
TTTTGTTTAATTCTTGCTTTCTTTTTTTTT
CTTCTCCGCAATTTTTACTATTATACTTAA
TGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAA
TATCTCTGAGATACATTAAGTAACTTAAAA
AAAAACTTTACACAGTCTGCCTAGTACATT
ACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGC
ATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTTCTT
TTATTTTTAATTGATACATAATCATTATAC
ATATTTATGGGTTAAAGTGTAATGTTTTAA
TATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGT
AATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCT
TTCTTCTTTTAATATACTTTTTTGTTTATC
TTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTC
TTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCAT
GCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAG
TGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAAT
ATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAA
ATTGTAACTGATGTAAGAGGTTTCATATTG
CTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTC
TGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTG
GATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTT
GCTAATCATGTTCATACCTCTTATCTTCCT
CCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTG
TGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATT
CACCCCACCAGTGCAGGCTGCCTATCAGAA
AGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGC
CCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCTTGC
TGTCCAATTTCTATTAAAGGTTCCTTTGTT
CCCTAAGTCCAACTACTAAACTGGGGGATA
TTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTG
CCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAA
TGATGTATTTAAATTATTTCTGAATATTTT
ACTAAAAAGGGAATGTGGGAGGTCAGTGCA
TTTAAAACATAAAGAAATGATGAGCTGTTC
AAACCTTGGGAAAATACACTATATCTTAAA
CTCCATGAAAGAAGGTGAGGCTGCAACCAG
CTAATGCACATTGGCAACAGCCCCTGATGC
CTATGCCTTATTCATCCCTCAGAAAAGGAT
TCTTGTAGAGGCTTGATTTGCAGGTTAAAG
TTTTGCTATGCTGTATTTTACATTACTTAT
TGTTTTAGCTGTCCTCATGAATGTCTTTTC

Figura 3-11 Secuencia del DNA del gen humano que codifica la β-globina. El gen codifica una de las dos subunidades de la molécula de la hemoglobina, que en todos los individuos adultos transporta el oxígeno por la sangre. Solamente se presenta la secuencia de una de las dos hebras del DNA (la "cadena codificante"), ya que la otra tiene la secuencia complementaria. La secuencia debe leerse de izquierda a derecha y en líneas sucesivas de arriba a abajo de la página, como si se tratara de un texto normal en español.

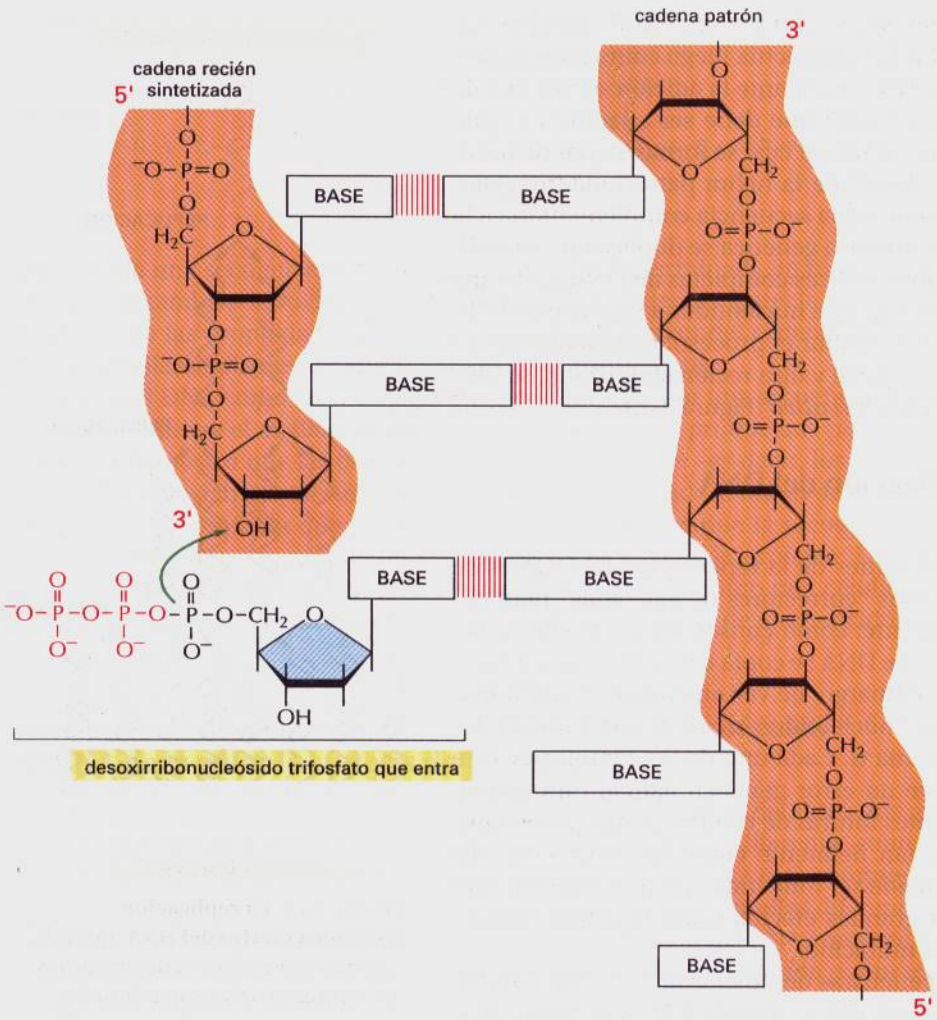


Figura 3-12 Síntesis de DNA. La adición de un desoxirribonucleótido al extremo 3' de una cadena polinucleotídica es la reacción fundamental a través de la cual se sintetiza el DNA. Como se muestra en la figura, es el apareamiento de bases entre el ribonucleótido que se añade y una hebra ya existente de DNA (la hebra *patrón*) lo que condiciona que la nueva hebra de DNA tenga una secuencia de nucleótidos complementaria.

sus nucleótidos. Cada nucleótido –A, C, T o G– puede ser considerado como una letra de un alfabeto sencillo de cuatro letras que es utilizado para escribir los mensajes biológicos en forma lineal en una "cinta de teleimpresora". Los organismos se diferencias entre sí porque sus respectivas moléculas de DNA poseen diferentes secuencias de nucleótidos, y por consiguiente, diferentes mensajes biológicos.

Puesto que el número de posibles secuencias diferentes en una cadena de DNA de n nucleótidos de largo es de 4^n, la variedad biológica que se puede generar utilizando una modesta longitud de DNA es, en principio, enorme. Una célula animal típica contiene un metro de DNA (3×10^9 nucleótidos). Utilizando un abecedario lineal de cuatro letras, un gen humano extraordinariamente pequeño puede llenar una cuarta parte de una página de texto (Figura 3-11), mientras que la información genética existente en una célula humana permitiría llenar un libro de más de 500 000 páginas.

Aunque el principio en el que se basa la replicación génica es elegante y simple, la maquinaria real con la que se realiza esta copia en la célula es complicada y está compuesta por un complejo de proteínas que forman una "máquina de replicación". La reacción fundamental es la indicada en la Figura 3-12, en la que la enzima *DNA polimerasa* cataliza la adición de un desoxirribonucleótido al extremo 3' de una cadena de DNA. Cada nucleótido añadido a la cadena es, en realidad, un *desoxirribonucleósido trifosfato*; la liberción del pirofosfato de este nucleótido activado y su hidrólisis posterior proporcionan la energía para la reacción de **replicación del DNA**, convirtiéndola de forma efectiva en una reacción irreversible.

La replicación de una hélice de DNA empieza por la separación local de sus dos hebras de DNA complementarias. Cada hebra actúa luego como patrón para la formación de una nueva molécula de DNA, mediante la adición secuencial de desoxirribonucleósidos trifosfato. El nucleótido que debe ser añadido en cada caso se selecciona mediante un proceso durante el cual se forma un par de bases complementarias con el nucleótido siguiente de la hebra patrón madre, generándose así una hebra hija de DNA que tiene una secuencia complementaria a la de la hebra patrón (Figura 3-12). La información genética se duplica en su totalidad –es decir, se llegan a formar dos dobles hélices completas de DNA, cada una de las cuales es idéntica en cuanto a secuencia de nucleótidos a la hélice de DNA madre que sirvió de patrón. Puesto que al acabar el proceso, cada molécula de DNA hija está formada por una cadena original y otra recién sintetizada, se dice que el mecanismo de replicación es *semiconservativo* (Figura 3-13).

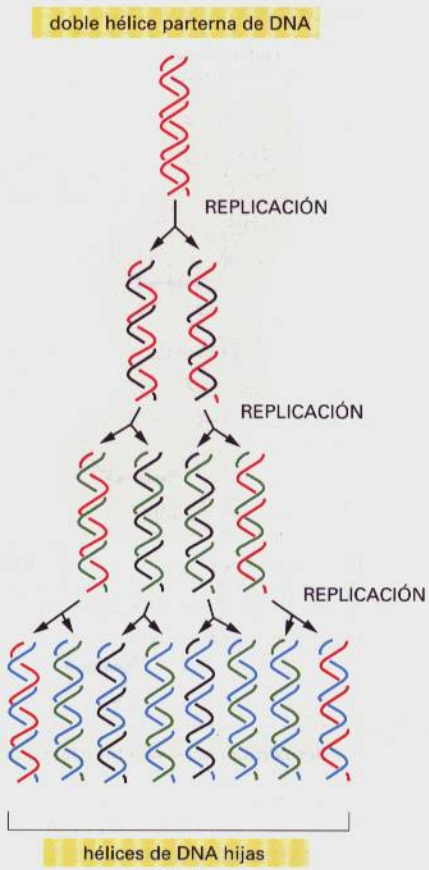


Figura 3-13 La replicación semiconservativa del DNA. En cada ciclo de replicación, cada una de las dos hebras de DNA son utilizadas como patrón para la formación de una hebra complementaria de DNA. Por consiguiente, las hebras originales permanecen inalteradas a lo largo de muchas generaciones celulares.

Los errores en el proceso de replicación del DNA generan mutaciones[12]

Una de las características más impresionantes de la replicación del DNA es su exactitud. Se utilizan diversos mecanismos "correctores de galeradas" para eliminar nucleótidos situados incorrectamente; como consecuencia de ello, la secuencia de nucleótidos de una molécula de DNA se copia con menos de un error por cada 10^9 nucleótidos añadidos. Sin embargo, de vez en cuando la maquinaria de la replicación salta o añade algunos nucleótidos, o coloca una T donde debería existir una C, o una A en lugar de una G. Cada uno de los cambios de este tipo en la secuencia de DNA constituye un error genético llamado **mutación**, que será copiado en todas las generaciones futuras de células, ya que las secuencias de DNA "equivocadas" se copian tan fielmente como las "correctas". La consecuencia de un error de este tipo puede ser muy importante, ya que un solo cambio de un nucleótido puede tener grandes efectos sobre la célula, dependiendo del lugar donde haya ocurrido la mutación.

A principios de los años 1940, los genetistas demostraron de forma concluyente que los genes especifican la estructura de las proteínas. Por eso, una mutación en un gen causada por una alteración en la secuencia de su DNA puede acarrear la inactivación de una proteína y no producir ningún efecto, por lo que se le llama *mutación silenciosa*. Muy raramente, una mutación origina un gen con una función útil, mejorada o nueva. En este caso los organismos portadores de la mutación tendrán una ventaja, y a través de la selección natural el gen mutado puede llegar a substituir con el tiempo al gen original de la población.

La secuencia de nucleótidos de un gen determina la secuencia de aminoácidos de una proteína[13]

El DNA es relativamente inerte químicamente. La información que contiene se expresa indirectamente a través de otras moléculas: el DNA dirige la síntesis de RNA específicos y de moléculas de proteína que, a su vez, determinan las propiedades físicas y químicas de la célula.

Aproximadamente al mismo tiempo en que los biofísicos analizaban la estructura tridimensional del DNA por difracción de rayos X, los bioquímicos estudiaban intensamente la estructura química de las proteínas. Se sabía ya que las proteínas son cadenas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos secuenciales, pero todavía no se conocía con certeza que cada tipo de proteínas consiste en una secuencia característica de aminoácidos; pero a principios de los años 1950, cuando se llegó a conocer la secuencia de la pequeña proteína *insulina* (Figura 3-14), se descubrió que cada tipo de proteína consiste en una secuencia de aminoácidos típica. Al igual que el conocimiento de la estructura del DNA ejerció una influencia crucial sobre la composición de la base molecular de la genética y de la herencia, la determinación de la secuencia de la insulina constituyó la clave para comprender la estructura y la función de las proteínas. Si la in-

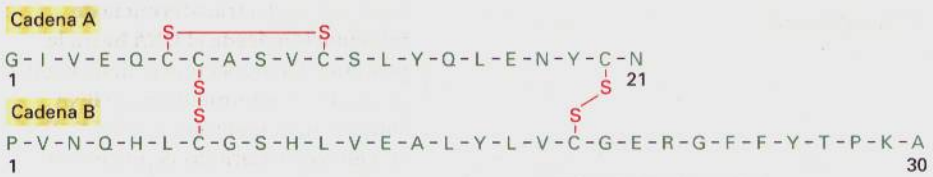


Figura 3-14 Secuencia de aminoácidos de la insulina bovina. La insulina es una proteína muy pequeña formada por dos cadenas polipeptídicas, una de 21 y la otra de 30 residuos de aminoácidos. Cada cadena presenta una secuencia de aminoácidos característica determinada genéticamente. Los símbolos de una letra utilizados para nombrar los aminoácidos son los que se indican en el Panel 2-5, págs. 58-59; los enlaces S–S indicados en *rojo* son enlaces disulfuro entre residuos de cisteína. Inicialmente la proteína se sintetiza como una única larga cadena polipeptídica (codificada por un único gen), la cual se divide posteriormente formando las dos cadenas.

sulina tenía una secuencia definida, genéticamente determinada, lo más probable era que también la tuvieran las demás proteínas. Además, parecía razonable suponer que las propiedades de una proteína dependerían del orden exacto en el que se hallaran dispuestos sus aminoácidos constituyentes.

Tanto el DNA como las proteínas están compuestos por una secuencia lineal de subunidades, y el análisis bioquímico de las proteínas producidas por genes mutantes demostró que las dos secuencias son *co-lineales* –es decir, los nucleótidos del DNA están dispuestos en un orden que coresponde al orden de los aminoácidos en la proteína que especifican. Resultó evidente que la secuencia del DNA contiene una especificación codificada de la secuencia proteica. La pregunta central de la biología molecular pasó a ser entonces cómo una célula traduce una secuencia de nucleótidos del DNA a una secuencia de aminoácidos de una proteína.

Porciones de la secuencia de DNA se copian en moléculas de RNA para guiar la síntesis de proteínas[14]

La síntesis de una proteína implica copiar regiones específicas del DNA (los *genes*) en otro tipo de polinucleótido química y funcionalmente diferente, conocido como **ácido ribonucleico** o **RNA**. Al igual que el DNA, el RNA está compuesto por una secuencia lineal de nucleótidos, pero presenta dos pequeñas diferencias químicas respecto al DNA: (1) el esqueleto de azúcar fosfato del RNA contiene ribosa en lugar de desoxirribosa, y (2) la base timina (T) está substituida por uracilo (U), una base muy estrechamente relacionada que también se aparea con A (véase Panel 3-2, págs. 104-105).

El RNA contiene toda la información de la secuencia de DNA de la que ha sido copiado y mantiene las propiedades del DNA de apareamiento de bases. Las moléculas de RNA se sintetizan a través de un proceso conocido como **transcripción del DNA**, que en muchos aspectos se parece al de la replicación del DNA, ya que una de las dos hebras del DNA actúa como patrón sobre el que se examinan las posibilidades de apareamiento de bases de los ribonucleótidos. Cuando se consigue un buen ajuste con el DNA patrón, el ribonucleótido es incorporado como una unidad ligada covalentemente. De esta forma, la cadena de RNA que está creciendo lo hace nucleótido a nucleótido.

La transcripción del DNA se diferencia de la replicación el DNA en varios puntos importantes. Por ejemplo, el RNA producido no permanece asociado al DNA. Inmediatamente detrás de la región en la que se añaden los ribonucleótidos, la hélice original del DNA se forma de nuevo y la molécula de RNA se separa. Por consiguiente, las moléculas de RNA tienen una sola hebra. Además, las moléculas de RNA son relativamente cortas en comparación con las de DNA, ya que son copiadas a partir de una región limitada del DNA –suficiente para producir una o varias proteínas (Figura 3-15). A los transcritos de RNA que dirigen la síntesis de moléculas de proteína, se les llama moléculas de **RNA mensajero** (**mRNA**). Otros transcritos de RNA actúan como *RNA de transferencia* (*tRNA*) o bien forman los componentes del RNA ribosómico (rRNA) o partículas ribonucleoproteicas más pequeñas.

La cantidad de RNA sintetizado a partir de una región determinada de DNA está controlada por *proteínas reguladoras de la actividad génica*, que se unen a lugares específicos del DNA cerca de las secuencias codificantes de un gen. En cualquier célula y en cualquier momento dado, algunos genes se están utilizan-

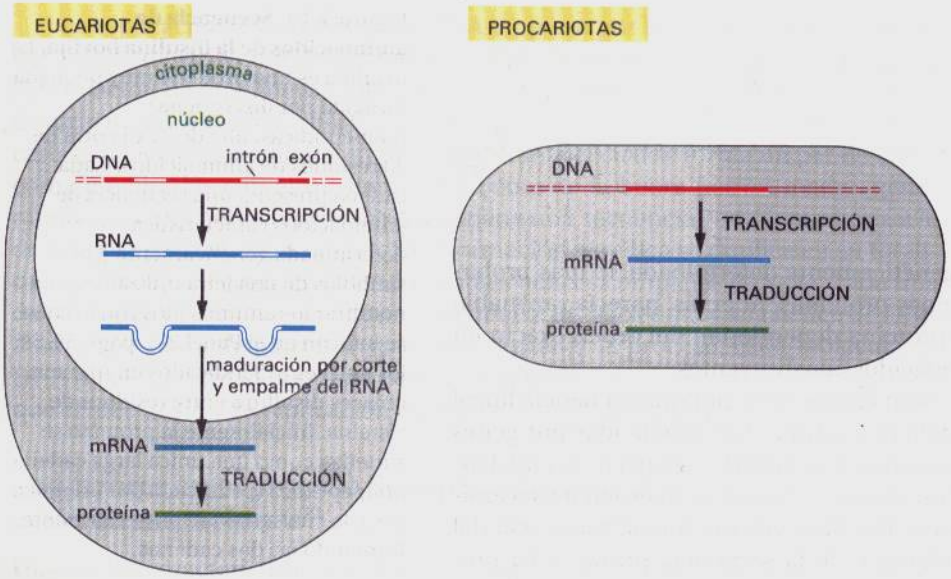


Figura 3-15 La transferencia de información desde el DNA hasta la proteína. La transferencia tiene lugar a través de un intermediario de RNA llamado RNA mensajero (mRNA). En las células procariotas el proceso es más simple que en las células eucariotas. En eucariotas, las regiones codificantes del DNA (situadas en los *exones*, dibujados en color) están separadas por regiones no codificantes (llamadas *intrones*). Tal como se indica en la figura, estos intrones pueden eliminarse a través de una reacción, catalizada por enzimas, de maduración por corte y empalme (splicing) del RNA, formando así una molécula de mRNA.

do para sintetizar RNA en grandes cantidades mientras que otros genes no se transcriben en absoluto. En cada generación celular, a partir de un gen activo pueden sintetizarse centenares de transcritos de RNA a partir del mismo segmento de DNA. Cada molécula de mRNA puede ser traducida dando lugar a muchos centenares de copias de una cadena polipeptídica, por lo que la información contenida en una pequeña región del DNA puede dirigir la síntesis de millones de copias de una proteína determinada. La proteína *fibroína*, por ejemplo, es el componente mayoritario de la seda. En cada célula de la glándula de la seda, un solo gen de fibroína genera 10^4 copias de mRNA, cada una de las cuales dirige la síntesis de 10^5 moléculas de fibroína –produciéndose un total de 10^9 moléculas de fibroína en sólo 4 días.

Las moléculas de RNA de eucariotas son cortadas y recombinadas, eliminándose secuencias intrón[15]

En las células bacterianas la mayoría de las proteínas están codificadas por una única secuencia de DNA, larga e ininterrumpida, que se copia sin ninguna alteración o modificación previa, produciendo una molécula de mRNA. En 1977, los biólogos moleculares quedaron asombrados ante el descubrimiento de que la mayoría de los genes eucariotas presentan sus secuencias codificantes (llamadas *exones*) interrumpidas por secuencias no codificantes (llamadas *intrones*). Para producir una proteína, primero se transcribe todo el gen, incluyendo tanto sus intrones como sus exones y generando una molécula de mRNA muy larga –el *transcrito primario*. Antes de que esta molécula de RNA abandone el núcleo, un complejo de enzimas procesadoras de RNA elimina todas las secuencias de intrones produciendo así una molécula de RNA mucho más corta. Después de que esta maduración del RNA, llamada **maduración por corte y empalme del RNA** (**RNA splicing**) haya concluido, la molécula de RNA se desplaza hasta el citoplasma constituyendo ahora una molécula de mRNA que dirige la síntesis de una molécula de una proteína determinada (Figura 3-15).

Este sistema de transferencia de información en eucariotas, aparentemente ruinoso, se ha desarrollado probablemente debido a que supone que la síntesis de proteína es mucho más versátil. El transcrito primario de RNA de algunos genes, por ejemplo, puede madurar por corte y empalme de diferentes formas, produciendo diferentes mRNA dependiendo del tipo de célula y del estadio de desarrollo. Esto permite sintetizar diferentes proteínas a partir del mismo gen. Además, como la presencia de numerosos intrones facilita los procesos de re-

1.ª posición (extremo 5') ↓	2.ª posición U	2.ª posición C	2.ª posición A	2.ª posición G	3.ª posición (extremo 3') ↓
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Figura 3-16 El código genético. En el transcurso de la síntesis proteica, los grupos de tres nucleótidos (*codones*) de una molécula de mRNA son traducidos a aminoácidos de acuerdo con las reglas indicadas aquí. Los codones GUG y GAG, por ejemplo, se traducen a valina y a ácido glutámico respectivamente. Obsérvese que los codones que presentan U o C como segundo nucleótido tienden a codificar los aminoácidos más hidrofóbicos (compárese con el Panel 2-5, págs. 58-59).

combinación genética entre exones, probablemente este tipo de disposición génica ha sido extraordinariamente importante en los albores de la historia de la evolución de los genes –acelerando los procesos por medio de los cuales los organismos desarrollaron nuevas proteínas a partir de partes de otras ya existentes, en lugar de tener que desarrollar completamente nuevas secuencias.

Las secuencias de nucleótidos del mRNA son "leídas" en grupos de tres y traducidas a aminoácidos[16]

Las reglas a través de las que se traduce la secuencia nucleotídica a secuencia de aminoácidos de una proteína, el denominado **código genético**, fueron descifradas a principios de los años 1960. Se demostró que la secuencia de nucleótidos de la molécula de mRNA que actúa como intermediario, era leída en orden consecutivo, en grupos de tres. Cada triplete de nucleótidos, denominado un **codón**, determina un aminoácido. Puesto que el RNA es un polímero lineal de cuatro nucleótidos diferentes, existen $4^3 = 64$ tripletes de codón posibles (recuérdese que lo importante es la *secuencia* de nucleótidos de un triplete). Habitualmente en las proteínas tan sólo se encuentran 20 aminoácidos diferentes de modo que la mayoría de aminoácidos deben ser especificados por varios codones; es decir, el código genético es *degenerado*. El código (ilustrado en la Figura 3-16) ha sido altamente conservado a través de la evolución: con pocas excepciones, es igual en organismos tan diversos como las bacterias, las plantas y el hombre.

En principio, cada secuencia de RNA puede ser leída siguiendo una de las tres posibles *pautas de lectura* diferentes que pueden darse según el lugar en que empiece el proceso de decodificación (Figura 3-17). En casi todos los casos únicamente una de estas pautas de lectura producirá una proteína funcional. Puesto que no existen signos de puntuación salvo al principio y al final del mensaje de RNA, la pauta de lectura se establece en el inicio del proceso de traducción y se mantiene a partir de entonces.

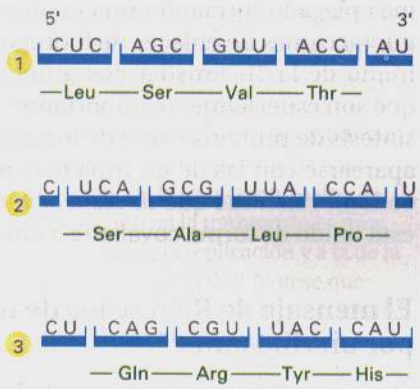
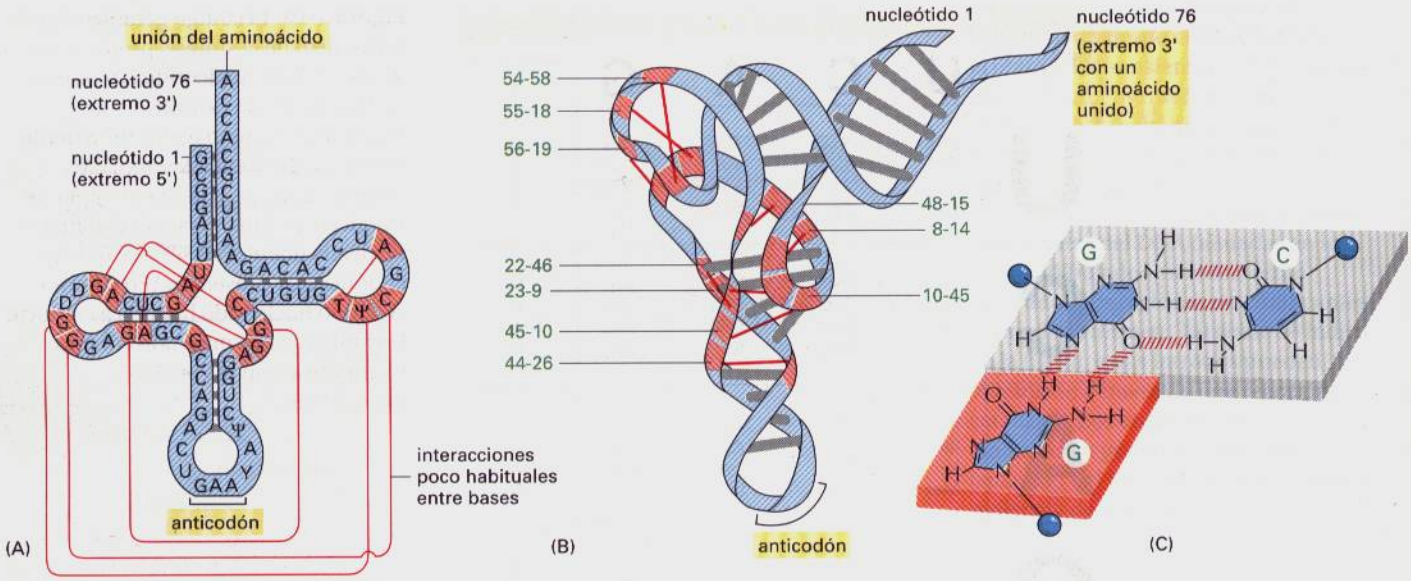


Figura 3-17 Las tres pautas de lectura posibles en la síntesis proteica. En el proceso de traducción de una secuencia de nucleótidos (*azul*) en una secuencia de aminoácidos (*verde*), la secuencia de nucleótidos de un mRNA es leída desde el extremo 5' hacia el extremo 3', en grupos consecutivos de 3 nucleótidos. Por consiguiente, según cual sea la "pauta de lectura" utilizada, cada secuencia de RNA puede codificar, en principio, tres secuencias de aminoácidos completamente diferentes entre sí.

Las moléculas de tRNA emparejan los aminoácidos con los grupos de nucleótidos[17]

Los codones de una molécula de mRNA no reconocen directamente los aminoácidos que especifican, como hacen las enzimas con su substrato. La **traducción** de un mRNA a proteína depende de una molécula "adaptadora" que reconoce



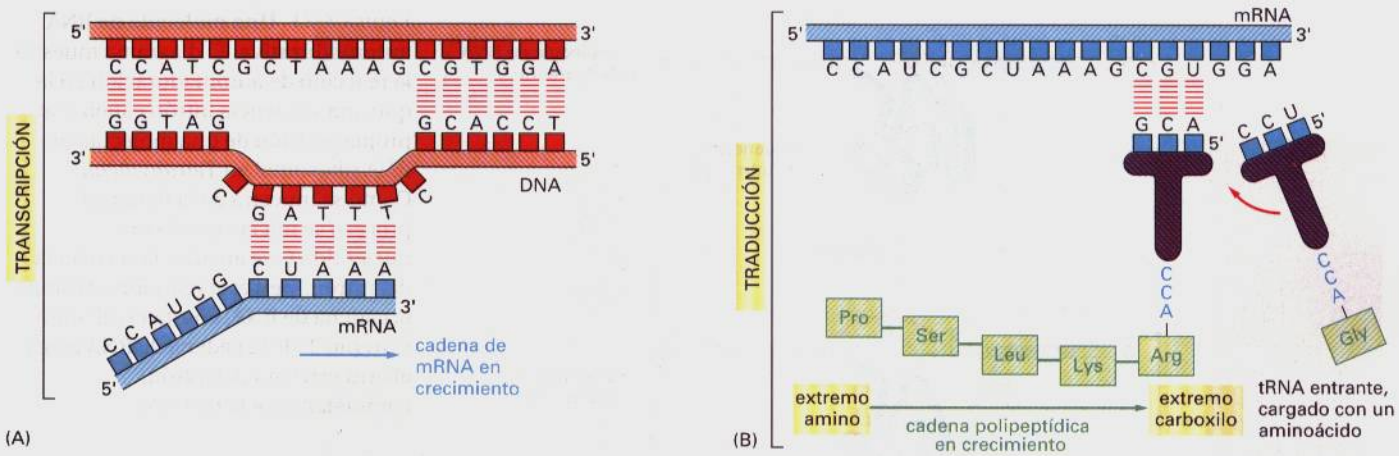
un aminoácido y un grupo de tres nucleótidos. Estos adaptadores son un grupo de pequeñas moléculas de RNA conocidas como **RNA de transferencia** (**tRNA**), cada una de las cuales tiene una longitud de unos 80 nucleótidos.

Una molécula de tRNA presenta una conformación tridimensional plegada, que se mantiene en parte por interacciones no covalentes de apareamientos de bases como las que mantienen unidas las dos hebras de la hélice de DNA. Sin embargo, en la molécula de tRNA, que es de una sola hebra, los pares de bases complementarios se forman entre residuos de nucleótidos de la *misma* cadena, la cual hace que la molécula de tRNA se pliegue de una forma característica, que es importante para su función de adaptador. Cuatro cortos segmentos de la molécula presentan una estructura en doble hélice, dando lugar a una molécula que parece un "cruce en trébol" en dos dimensiones. Este cruce en trébol está más plegado formando una conformación en forma de L que se mantiene por interacciones de enlaces de hidrógeno más complejas (Figura 3-18). En cada extremo de la "L" existen dos grupos de residuos de nucleótidos desapareados, que son especialmente importantes para la función de la molécula de tRNA en la síntesis de proteínas: uno de los grupos forma el *anticodón*, cuyas bases pueden aparearse con las de un triplete complementario de una molécula de mRNA (el codón), mientras que *la secuencia CCA* del extremo 3' de la molécula de tRNA está unido de forma covalente a una secuencia de aminoácidos (Figura 3-18A).

Figura 3-18 tRNA para la fenilalanina en levadura. (A) La molécula está dibujada adoptando una conformación de "cruce en trébol" para destacar los pares de bases complementarios (*barras grises cortas*) que se forman en regiones helicoidales internas de la molécula. (B) Se muestra en forma de esquema la conformación real de la molécula, basada en análisis por difracción de rayos X. Los pares de bases complementarios se indican como *barras grises largas*. Además, en *rojo* se presentan los nucleótidos que participan en interacciones no habituales de apareamiento de bases y que mantienen unidas diferentes zonas de la molécula. Estas parejas están numeradas y conectadas por *líneas de color rojo* tanto en (A) como en (B). En (B) los pares de bases están numerados. (C) Una de las interacciones de apareamiento de bases poco habituales. Aquí, una base interacciona a través de enlaces de hidrógeno con otras dos; algunas de estas "triples bases" colaboran para mantener plegada esta molécula de tRNA.

El mensaje de RNA se lee de un extremo al otro por un ribosoma[18]

El proceso de reconocimiento de los codones, que transfiere la información genética del mRNA vía tRNA a la proteína, depende de interacciones entre pares de bases del mismo tipo de las que median la transferencia de información genética del DNA al DNA y del DNA al RNA (Figura 3-19). Sin embargo, la mecánica de ordenación de las moléculas de tRNA sobre el mRNA es complicada y requiere de la presencia de un **ribosoma**, que es un complejo de más de 50 proteínas diferentes asociadas a varias moléculas de RNA estructural (rRNA). Cada ribosoma es una gran máquina sintetizadora de proteínas en la que las moléculas de tRNA se colocan por sí mismas para leer el mensaje genético codificado en la secuencia de las moléculas de mRNA. El ribosoma encuentra primero un punto específico de inicio en la molécula de mRNA, que establece la pauta de lectura y determina el extremo amino terminal de la proteína. Luego, a medida que el ribosoma se desplaza a lo largo de la molécula de mRNA, va traduciendo, codón a codón, la secuencia de nucleótidos a secuencia de aminoácidos, utilizando



moléculas de tRNA para añadir aminoácidos al extremo por el que la cadena polipeptídica está creciendo (Figura 3-20). Cuando un ribosoma llega al final del mensaje, tanto él como el extremo carboxilo terminal de la proteína recién sintetizada se liberan del extremo 3' de la molécula de mRNA y quedan libres en el citoplasma.

Los ribosomas actúan con una eficiencia notable: en 1 segundo, un solo ribosoma bacteriano añade aproximadamente unos 20 aminoácidos a una cadena polipeptídica en formación. En el Capítulo 6 se ofrecen más detalles sobre la estructura de los ribosomas y sobre el mecanismo de la síntesis proteica.

Algunas moléculas de RNA actúan como catalizadores[19]

Tradicionalmente se ha considerado que las moléculas de RNA son simples cadenas de nucleótidos, con una química relativamente poco interesante. En 1981, esta concepción quedó destrozada por el descubrimiento de una molécula de RNA con actividad catalítica, con un tipo de reactividad química tan sofisticada como la que los bioquímicos habían asociado exclusivamente a las proteínas. Las moléculas de RNA ribosómico de los protozoos ciliados *Tetrahymena* se sintetizan inicialmente como un largo precursor, a partir del cual se sintetiza uno de los rRNA por una reacción de corte y empalme (splicing) del RNA. La sorpresa surgió ante el descubrimiento de que esta reacción de corte y empalme podía desarrollarse *in vitro* en ausencia de proteínas. Por consiguiente, se demostró que la secuencia intrón presenta una actividad catalítica, semejante a la de una enzima que lleva a cabo la reacción de dos etapas que se ilustra en la Figura 3-21. A continuación, se sintetizó en un tubo de ensayo la secuencia de 400 nucleótidos de

Figura 3-19 Flujo de información en la síntesis proteica. (A) Los nucleótidos de la molécula de mRNA se unen formando una copia complementaria de un segmento de una hebra de DNA. (B) Luego, estos nucleótidos, en grupos de tres, se unen a conjuntos complementarios de tres nucleótidos de la región anticodón de determinadas moléculas de tRNA. En el otro extremo de cada tipo de las moléculas de tRNA, un aminoácido determinado se mantiene unido a través de un enlace de alta energía, y cuando se produce el apareamiento, este aminoácido es añadido al extremo en crecimiento de la cadena proteica. Así, la traducción de la secuencia de nucleótidos del mRNA a una secuencia de aminoácidos depende del aparamiento de bases complementarias entre un codón del mRNA y el anticodón correspondiente del tRNA. Por consiguiente, la base molecular de la transferencia de información en la traducción es muy similar a la de la replicación y a la de la transcripción del DNA. Nótese que tanto la síntesis como la traducción del mRNA se inician en el extremo 5'.

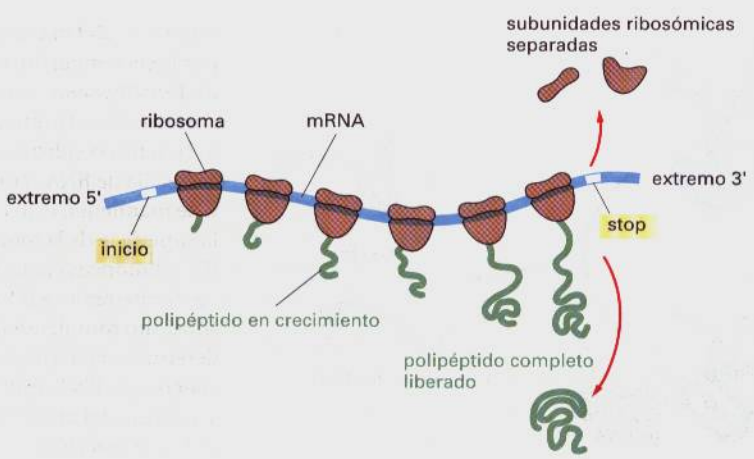


Figura 3-20 Síntesis de una proteína por ribosomas unidos a una molécula de mRNA. Los ribosomas se unen a una señal de iniciación que se halla cercana al extremo 5' de la molécula de mRNA y luego se desplazan hacia el extremo 3', sintetizando la proteína a medida que avanzan. A menudo varios ribosomas se desplazan simultáneamente sobre un mismo mRNA, de forma que cada uno de ellos fabrica una cadena polipeptídica independiente pero idéntica a las otras; toda esta estructura recibe el nombre de *polirribosoma*.

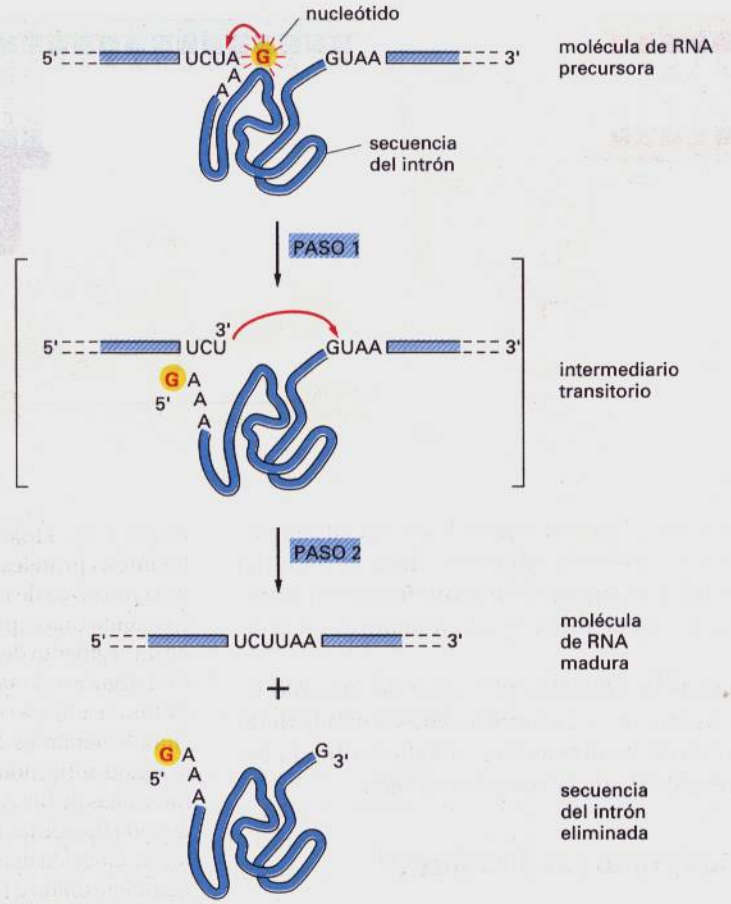


Figura 3-21 Una molécula de RNA automadurativa. El diagrama muestra la reacción de automaduración en la que una secuencia intrón cataliza su propia escisión de una molécula de RNA ribosomal en *Tetrahymena*. Como se muestra en la figura, el proceso se inicia cuando un nucleótido G se añade a la secuencia del intrón, y en esta reacción se rompe la cadena de RNA; entonces, el nuevo extremo 3' de la cadena de RNA ataca al otro extremo del intrón, completándose la reacción.

longitud del intrón y se comprobó que era capaz de plegarse formando una compleja superficie y podía actuar como una enzima en reacciones con otras moléculas de RNA. Puede, por ejemplo, juntar dos substratos determinados –un nucleótido de guanina y una cadena de RNA– y catalizar su unión covalente cortando la cadena de RNA en un lugar específico (Figura 3-22).

En esta reacción tipo, de la cual el primer paso se presenta simulado en la Figura 3-21, la propia secuencia intrón actúa de forma repetitiva cortando numerosas cadenas de RNA. A pesar de que la maduración del RNA por corte y empalme se realiza habitualmente por sistemas que no son autocatalíticos (véase Capítulo 8), en diferentes tipos de células, incluyendo hongos y bacterias, se han descrito RNA automadurativos con secuencias intrón relacionadas con la de *Te-*

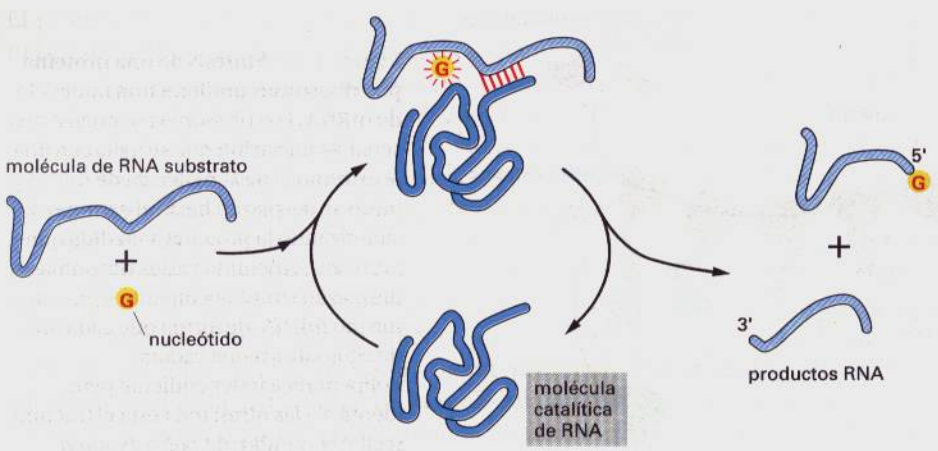


Figura 3-22 Una reacción catalizada por la secuencia intrónica purificada de *Tetrahymena*. En esta reacción, que corresponde al primer paso de la Figura 3-21, tanto el substrato específico –una molécula de RNA– como un nucleótido G se mantienen estrechamente unidos a la superficie de la molécula catalítica de RNA. Entonces el nucleótido se une covalentemente a la molécula de RNA substrato rompiéndola en un lugar determinado. La liberación de las dos cadenas de RNA resultantes deja libre la secuencia del intrón para posteriores ciclos de reacción.

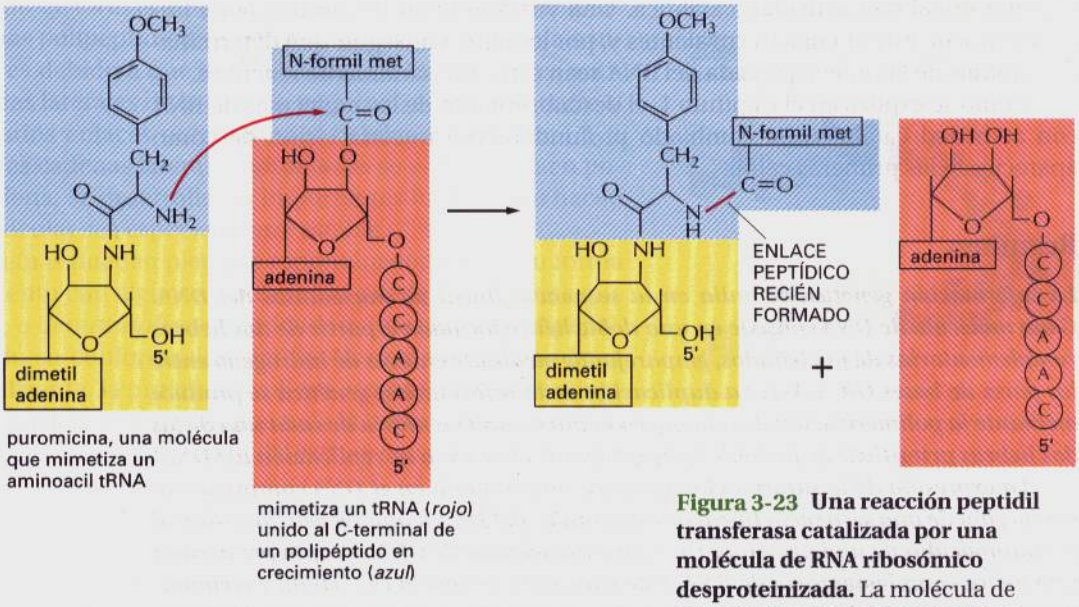


Figura 3-23 Una reacción peptidil transferasa catalizada por una molécula de RNA ribosómico desproteinizada. La molécula de puromicina mimetiza un tRNA cargado con el aminoácido tirosina y en las células actúa como un potente inhibidor de la síntesis de proteínas añadiéndose al extremo en crecimiento de una cadena polipeptídica. En este modelo de reacción el extremo de la cadena polipeptídica en crecimiento está mimetizado por un hexanucleótido (*en rojo*, representando un tRNA) que está unido covalentemente a la N-formil metionina (que representa el polipéptido). Una gran molécula de rRNA altamente purificada cataliza la adición de puromizina a la N-formil metionina, formando un nuevo enlace peptídico y liberando el hexanucleótido.

trahymena. Este hecho sugiere que estas secuencias de RNA podrían haber aparecido antes de que las líneas evolutivas de las células procariotas divergieran, hace 1,5 mil millones de años.

Recientemente se han descubierto algunas otras familias de RNA catalíticos. Por ejemplo, la mayoría de los tRNA se sintetizan inicialmente como un RNA precursor más largo, y se ha descrito una molécula de RNA que juega el papel catalítico principal en un complejo RNA-proteína que reconoce estos precursores y los corta en lugares específicos. Se conoce también una secuencia catalítica de RNA que desempeña una función importante en el ciclo vital de numerosos viroides de plantas. Todavía es más destacable que ahora se sospecha que los ribosomas ejercen su función principalmente por catálisis basada en moléculas de RNA, de forma que las proteínas del ribosoma jugarían un papel de apoyo de los RNA ribosómicos (rRNA), que constituyen más de la mitad de la masa del ribosoma. El rRNA largo, por ejemplo, tiene una actividad peptidil transferasa que puede catalizar la formación de nuevos enlaces peptídicos (Figura 3-23).

¿Cómo le es posible a una molécula de RNA actuar como una enzima? El ejemplo del tRNA indica que las moléculas de RNA pueden plegarse de formas altamente específicas. En la Figura 3-24 se presenta una estructura tridimensional propuesta para el núcleo de la secuencia intrón automadurativa de *Tetrahymena*. Interacciones entre diferentes zonas de esta molécula de tRNA (análogas a los poco habituales enlaces de hidrógeno en moléculas de tRNA –véase Figura 3-18) son responsables de plegados posteriores que generan una compleja superficie

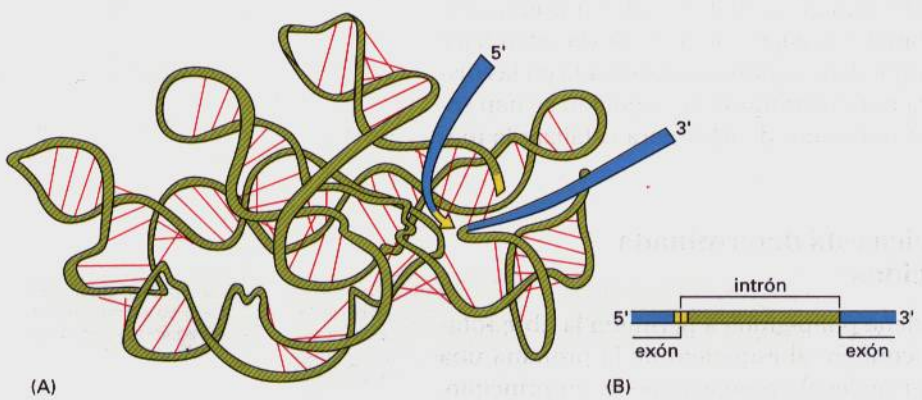


Figura 3-24 Visión tridimensional del núcleo catalítico de la secuencia intrónica de RNA ilustrada en las Figuras 3-21 y 3-22. (A) La molécula plegada, con las interacciones de enlaces de hidrógeno en *rojo*. Esta molécula, de unos 240 nucleótidos, se presenta inmediatamente después del corte inical del extremo 5' del intrón (*amarillo*). (B) Dibujo esquemático de la molécula presentada en (A), en su forma desplegada. (Adaptado de L. Jaeger, E. Westhoff y F. Michel, *J. Mol. Biol.* 221: 1153-1164, 1991.)

tridimensional con actividad catalítica. Una yuxtaposición de átomos poco frecuente puede estirar enlaces covalentes y, por lo tanto, conseguir que determinados átomos de la cadena plegada del RNA sean extraordinariamente reactivos.

Como se explica en el Capítulo 1, el descubrimiento de las moléculas de RNA con actividad catalítica ha cambiado profundamente nuestra visión de cómo aparecieron las primeras células.

Resumen

La información genética se halla en la secuencia lineal de nucleótidos del DNA. Cada molécula de DNA consiste en una doble hélice formada a partir de dos hebras complementarias de nucleótidos, emparejadas mediante enlaces de hidrógeno entre los pares de bases G-C y A-T. La duplicación de la información genética se produce mediante la polimerización de una nueva hebra complementaria de cada una de las dos hebras primitivas de la doble hélice, durante el proceso de replicación del DNA.

La expresión de la información genética almacenada en el DNA comprende la traducción de una secuencia lineal de nucleótidos del DNA a una secuencia co-lineal de aminoácidos de una proteína. Un segmento acotado de DNA se copia primero en una hebra complementaria de RNA. Este transcrito primario es cortado y reempalmado (spliced) eliminándose las secuencias de intrones y generando una molécula de mRNA. Finalmente, el mRNA es traducido a proteína a través de un complejo conjunto de reacciones que tienen lugar en un ribosoma. Los aminoácidos utilizados para la síntesis proteica son unidos primero a una familia de moléculas de tRNA, cada una de las cuales reconoce, mediante interacciones de apareamiento de bases complementarias, grupos determinados de tres nucleótidos del mRNA. A continuación, la secuencia de nucleótidos del mRNA es leída de un extremo al otro en grupos de tres, de acuerdo con un código genético universal.

Otras moléculas de RNA actúan en las células como agentes catalíticos semejantes a las enzimas. Estas moléculas de RNA se pliegan generando una superficie que contiene nucleótidos que han adquirido una reactividad extraordinaria. Uno de estos catalizadores es el rRNA grande del ribosoma, que cataliza la formación de enlaces peptídicos durante la síntesis proteica.

Estructura de las proteínas[20]

Las células están formadas en gran parte por proteínas, que constituyen más de la mitad del peso seco de la célula (Tabla 3-1). Las proteínas determinan la forma y la estructura de la célula y también actúan como los principales instrumentos de reconocimiento molecular y como catalizadores. A pesar de que es cierto que el DNA almacena la información para generar una célula entera, tiene poca influencia directa sobre los procesos celulares. El gen de la hemoglobina, por ejemplo, no puede transportar oxígeno: ésta es una propiedad de la proteína especificada por el gen.

Las moléculas de DNA y de RNA son cadenas de nucleótidos, químicamente muy semejantes entre sí. En cambio, las proteínas están formadas por un conjunto de 20 aminoácidos muy diferentes, cada uno de los cuales presenta una personalidad química distinta (véase Panel 2-5, págs. 58-59). Esta variedad hace posible la enorme versatilidad de las propiedades químicas observada en las distintas proteínas, y posiblemente explica por qué durante la evolución se han seleccionado las proteínas en lugar de las moléculas de RNA para catalizar la mayoría de las reacciones celulares.

La forma de una molécula proteica está determinada por la secuencia de sus aminoácidos[21]

Muchos de los enlaces de una larga cadena polipeptídica permiten la libre rotación de los átomos que unen, lo cual confiere al esqueleto de la proteína una gran flexibilidad. Por lo tanto, cualquier molécula proteica puede, en principio,

adoptar un número ilimitado de formas diferentes (*conformaciones*). Sin embargo, la mayoría de las cadenas polipeptídicas se pliegan adoptando una sola conformación particular. Esto es debido a que los esqueletos de los diferentes aminoácidos, a modo de cadenas laterales de la cadena principal, se asocian entre sí y con el agua formando varios enlaces no covalentes débiles (véase Panel 3-1, págs. 96-97). Siempre que las cadenas laterales apropiadas se encuentren en posiciones cruciales en la cadena, se desarrollarán importantes fuerzas que hacen que una conformación particular sea especialmente estable.

La mayoría de las proteínas pueden plegarse espontáneamente en su forma correcta. Debido al tratamiento con algunos disolventes, puede conseguirse que una proteína se despliegue, o *desnaturalice*, obteniéndose una cadena polipeptídica flexible que ha perdido su conformación nativa. Normalmente cuando se retira el solvente desnaturalizante, la proteína se pliega espontáneamente adoptando su conformación original, lo cual indica que toda la información necesaria para determinar el plegamiento se halla contenida exclusivamente la secuencia de aminoácidos.

Uno de los factores más importantes que condicionan el plegamiento de una proteína es la distribución de sus cadenas laterales polares y no polares. Las cadenas laterales hidrofóbicas, muy abundantes, tienden a agruparse en el interior de la molécula, lo cual les permite evitar el contacto con el entorno acuoso (como las gotas de aceite se vuelven a unir después de haber sido dispersadas mecánicamente en el agua). Por el contrario, las cadenas laterales polares tienden a disponerse cerca de la parte externa de la molécula proteica, donde pueden interactuar con el agua y con otras moléculas polares (Figura 3-25). Puesto que los enlaces peptídicos también son polares, tienden a interactuar entre sí y con las cadenas laterales polares, para formar enlaces de hidrógeno (Figura 3-26); casi todos los residuos polares enterrados dentro de la proteína están apareados de esta forma (Figura 3-27). Así pues, los enlaces de hidrógeno desempeñan un papel importante en mantener unidas diferentes regiones de la cadena polipeptídica de una molécula proteica plegada, y son de una importancia crucial para muchas de las interacciones de enlace observadas en las superficies de las proteínas.

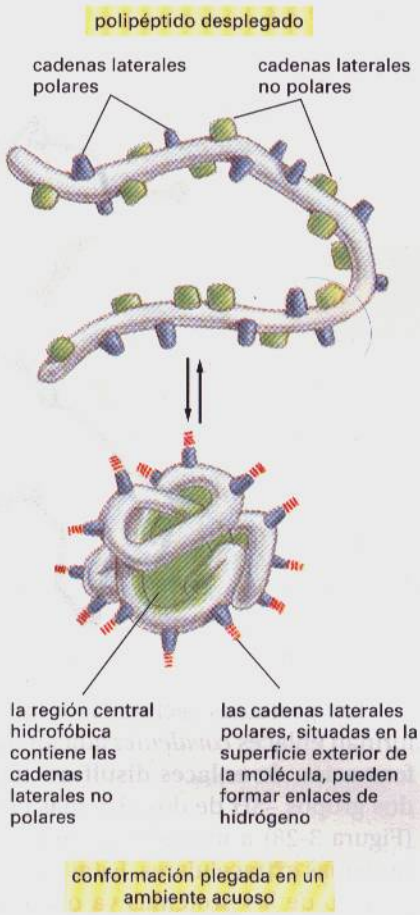


Figura 3-25 Plegado de una proteína adoptando una conformación globular. Las cadenas laterales de los aminoácidos polares tienden a situarse en el exterior de la proteína, donde pueden interaccionar con el agua; las cadenas laterales de los aminoácidos no polares quedan enterradas en el interior, formando un núcleo hidrofóbico "escondido" del agua.

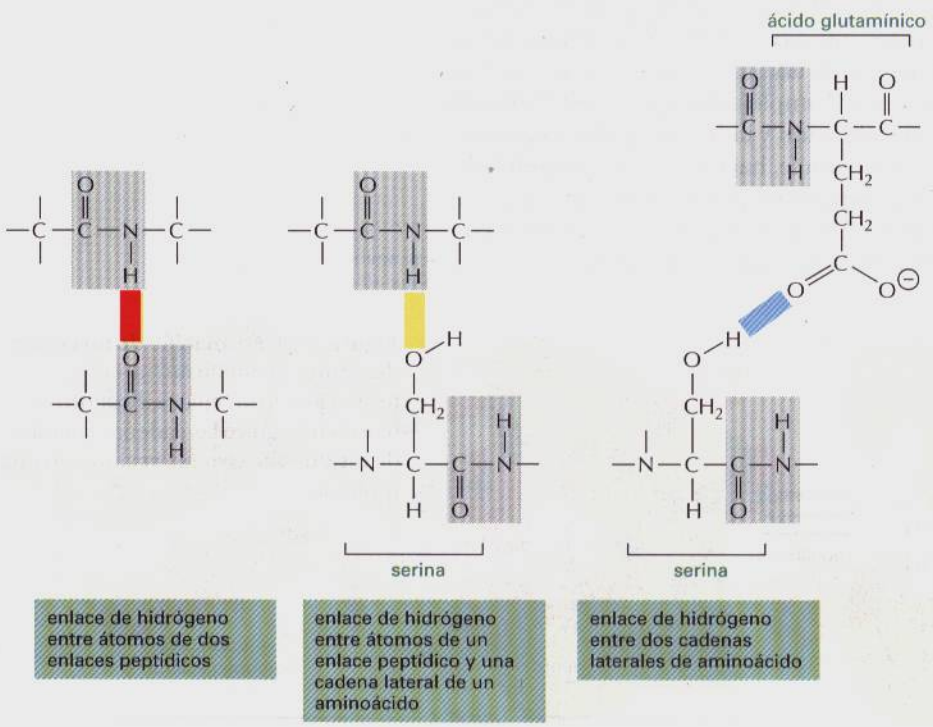


Figura 3-26 Enlaces de hidrógeno. Algunos de los enlaces de hidrógeno (indicados en color) que se pueden formar entre los aminoácidos de una proteína. Los enlaces peptídicos se presentan sombreados en *gris*.

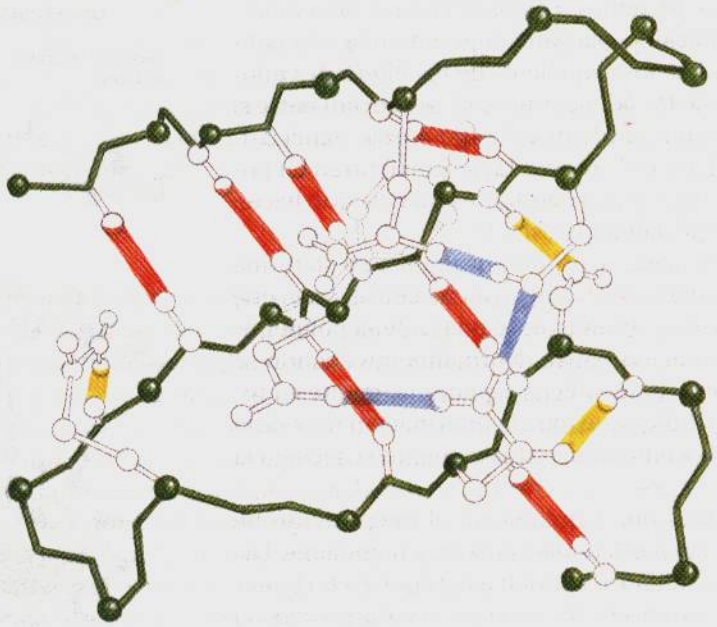


Figura 3-27 Detalles de enlaces de hidrógeno en una proteína. En esta región de la enzima lisozima, se forman enlaces de hidrógeno entre dos cadenas laterales (*azul*), entre una cadena lateral y un átomo de un enlace peptídico (*amarillo*) o entre átomos de dos enlaces peptídicos (*rojo*). Para referencia, véase Figura 3-26. (Según C.K. Mathews y K.E. van Holde, Biochemistry. Redwood City, CA: Benjamin/Cummings, 1990.)

Las proteínas secretadas o las proteínas de la superficie celular a menudo forman enlaces *covalentes* adicionales intracatenarios. De forma más notable, la formación de **enlaces disulfuro** (también denominados enlaces S–S) entre los dos grupos –SH de dos cisteínas cercanas de una cadena polipeptídica plegada (Figura 3-28) a menudo sirven para estabilizar la estructura tridimensional de proteínas extracelulares. Estos enlaces no son necesarios para el plegamiento específico de las proteínas ya que el plegamiento de las proteínas normalmente tiene lugar en presencia de agentes reductores que impiden la formación de enlaces S–S. De hecho, muy raramente se forman enlaces S–S (si es que se forman alguna vez) en moléculas proteicas que se hallen en el citosol, ya que la elevada concentración de agentes reductores –SH en el citosol rompe estos enlaces.

El resultado neto de todas las interacciones individuales entre aminoácidos consiste en que la mayoría de las moléculas proteicas se pliegan espontáneamente adoptando conformaciones características y definidas de forma precisa. Las que son compactas y globulares tienen un núcleo interno compuesto de grupos de cadenas laterales hidrofóbicas –dispuestas siguiendo una ordenación densa, casi cristalina– mientras que la superficie exterior, muy compleja e irregular, está formada por las cadenas laterales más polares. La localización y las características químicas de los diferentes átomos de esta intrincada superficie, hacen que cada proteína sea única y permiten a la molécula fijarse a otras superficies macromoleculares y a ciertas moléculas pequeñas (véase más adelante). Desde los puntos de vista químico y estructural, las proteínas son las moléculas conocidas más sofisticadas.

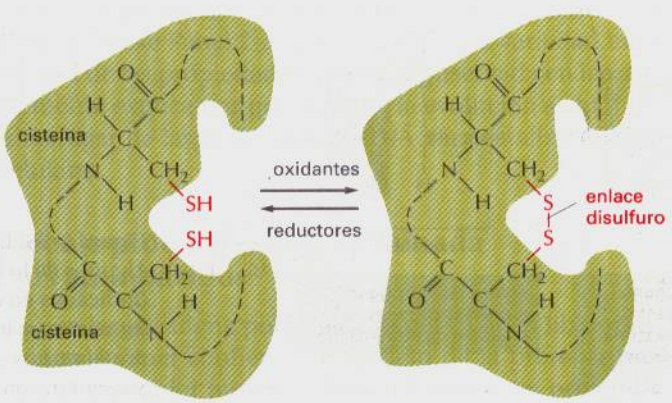


Figura 3-28 Formación de un enlace disulfuro. El dibujo ilustra la formación de un enlace disulfuro (covalente) entre las cadenas laterales de residuos de cisteína vecinos, en una proteína.

Diferentes cadenas proteicas presentan esquemas de plegamiento iguales[22]

Aunque toda la información necesaria para el plegamiento de una cadena proteica se halla contenida en su secuencia de aminoácidos, aún no hemos aprendido a "leer" esta información y así poder predecir la estructura tridimensional detallada de una proteína a partir de su secuencia. Por consiguiente, la conformación plegada sólo puede ser determinada mediante un elaborado *análisis por difracción de rayos X* de cristales de la proteína, o si la proteína es muy pequeña por técnicas de resonancia magnética nuclear (véase Capítulo 4). Hasta ahora con estas técnicas se han analizado completamente más de 100 tipos de proteínas. Cada una de estas proteínas tiene una conformación específica tan irregular y complicada que necesitaríamos un capítulo entero de este libro para describir todos los detalles tridimensionales de cada una de ellas.

Al comparar las estructuras tridimensionales de diferentes moléculas proteicas, se pone de manifiesto que, aunque la conformación completa de cada proteína es única, en diferentes regiones de estas macromoléculas aparecen repetidos varios esquemas de plegamiento. Dos de estos esquemas son particularmente frecuentes, porque resultan de las interacciones regulares por enlaces de hidrógeno entre los propios enlaces peptídicos más que entre las cadenas laterales de algunos aminoácidos. Ambos patrones de plegamiento fueron predichos correctamente en 1951 al estudiar los modelos basados en los diferentes esquemas de difracción de rayos X de la seda y del cabello. Los dos patrones regulares de plegamiento descubiertos entonces reciben hoy el nombre de *lámina* β, que se presenta en la fibroína de la seda, y de *hélice* α, que se presenta en la proteína α-queratina de la piel y de sus formaciones tales como el cabello, las uñas y las plumas.

El núcleo de la mayoría (aunque no de todas) de las proteínas globulares presenta extensas regiones de **lámina β**. En el ejemplo de la Figura 3-29, que muestra parte de una molécula de anticuerpo, se forma una *lámina* β *antiparalela*

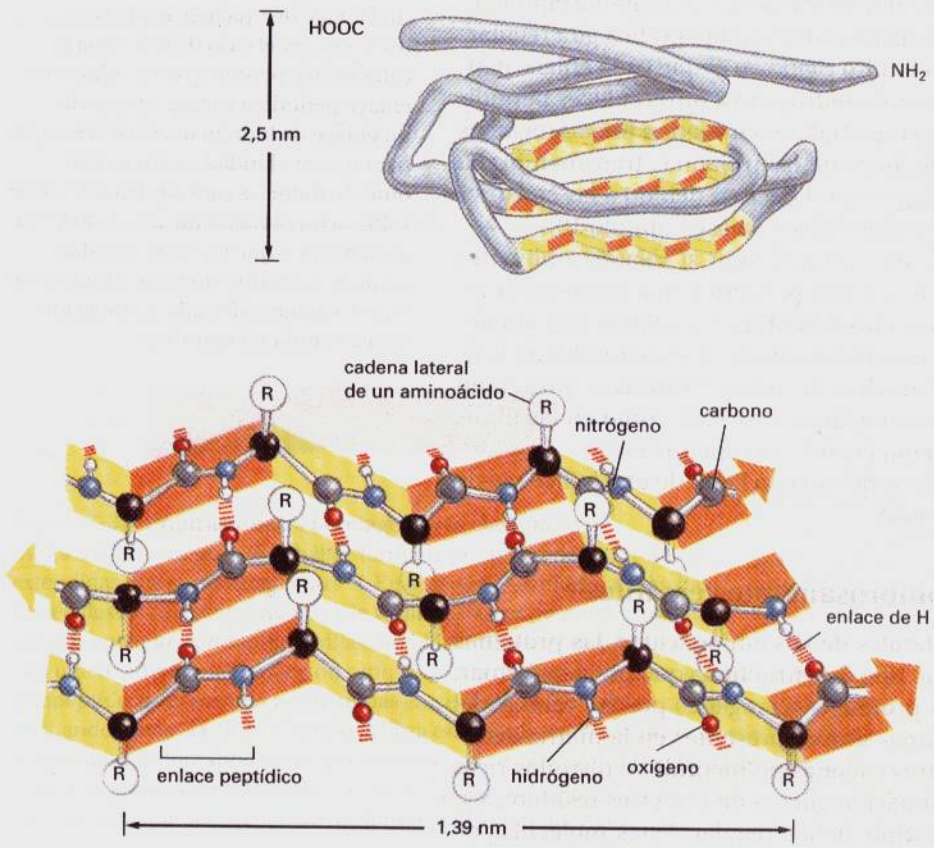
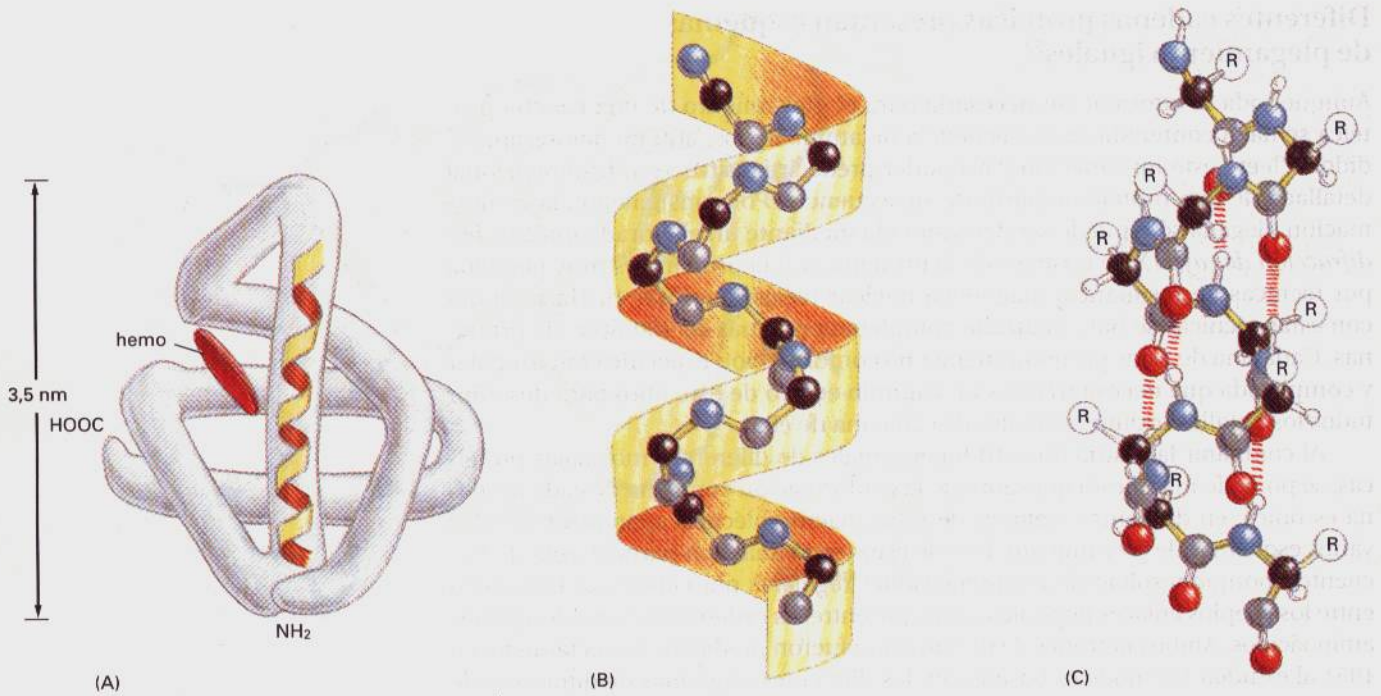


Figura 3-29 La lámina ß es una estructura frecuente formada por zonas de cadenas polipeptídicas en las proteínas globulares. En la parte superior se muestra un dominio de 115 aminoácidos de una molécula de inmunoglobulina; consiste en una estructura en forma de sandwich de dos láminas β, una de las cuales se presenta en color. En la parte inferior se muestra en detalle una lámina β antiparalela perfecta, siendo R las cadenas laterales de los aminoácidos. Obsérvese que cada enlace peptídico está unido a través de un enlace de hidrógeno a un enlace peptídico vecino. Las estructuras laminares reales de las proteínas globulares suelen ser algo menos regulares que la lámina β dibujada aquí, y además la mayoría de láminas se hallan ligeramente deformadas (véase Figura 3-31).



cuando una cadena polipeptídica extendida se pliega sobre sí misma hacia adelante y hacia atrás, de forma que cada sección de la cadena queda orientada en dirección opuesta a la de las secciones inmediatas. Esto da lugar a una estructura muy rígida que se mantiene por enlaces de hidrógeno entre los enlaces peptídicos de las cadenas vecinas. A menudo tanto las láminas β antiparalelas como las *láminas β paralelas*, estrechamente relacionadas con las anteriores (formadas por regiones de cadenas polipeptídicas que están orientadas en la misma dirección), actúan como una trama sobre la que se estructura la proteína globular.

Se genera una **hélice α** cuando una misma cadena polipeptídica gira regularmente sobre sí misma dando lugar a un cilindro rígido en el que cada enlace peptídico está unido regularmente por enlaces de hidrógeno a otros enlaces peptídicos vecinos de la cadena. Muchas proteínas globulares contienen breves regiones de estas hélices α (Figura 3-30). Las porciones de las proteínas transmembrana que atraviesan la bicapa lipídica casi siempre son hélices α debido a las constricciones impuestas por el ambiente lipídico hidrofóbico (véase Capítulo 10).

Normalmente, una hélice α aislada no es estable por sí sola en ambientes acuosos. Sin embargo, dos hélices α idénticas que presenten una disposición repetitiva de cadenas laterales no polares se enrollan progresivamente una alrededor de la otra formando una estructura especialmente estable denominada *hélice superenrollada* (véase pág. 132). En muchas proteínas fibrosas se presentan largas zonas de hélices superenrolladas semejantes a varillas, como en las fibras intracelulares de α-queratina que refuerzan la piel y sus apéndices.

En la Figura 3-31 se presentan modelos de espacio lleno de una hélice α y de una lámina β, con y sin sus cadenas laterales.

Figura 3-30 Una hélice α es otra estructura frecuente formada por zonas de la cadena polipeptídica de una proteína. (A) La molécula de mioglobina, cuya función es transportar oxígeno, tiene 153 aminoácidos de longitud y presenta una hélice α (dibujada en color). (B) Detalle de una hélice α perfecta. (C) Como en el caso de la lámina β, cada enlace peptídico está unido a un enlace peptídico vecino a través de un enlace de hidrógeno. Obsérvese que para mayor claridad en (B) se han omitido tanto las cadenas laterales [que sobresalen radialmente a todo lo largo de la hélice y que en (C) se señalan como R] como los átomos de hidrógeno en el carbono α de cada aminoácido (véase también Figura 3-31).

Las proteínas son moléculas asombrosamente versátiles[23]

Debido a la variedad de las cadenas laterales de sus aminoácidos, las proteínas son notablemente versátiles en cuanto al tipo de estructuras que pueden formar. Veamos, por ejemplo, dos abundantes proteínas segregadas por las células del tejido conjuntivo –la colágena y la elastina– ambas presentes en la matriz extracelular. En las moléculas de **colágena**, tres cadenas polipeptídicas distintas ricas en el aminoácido prolina y con un aminoácido glicina de cada tres residuos, están enrolladas entre sí generando una triple hélice regular. Estas moléculas de

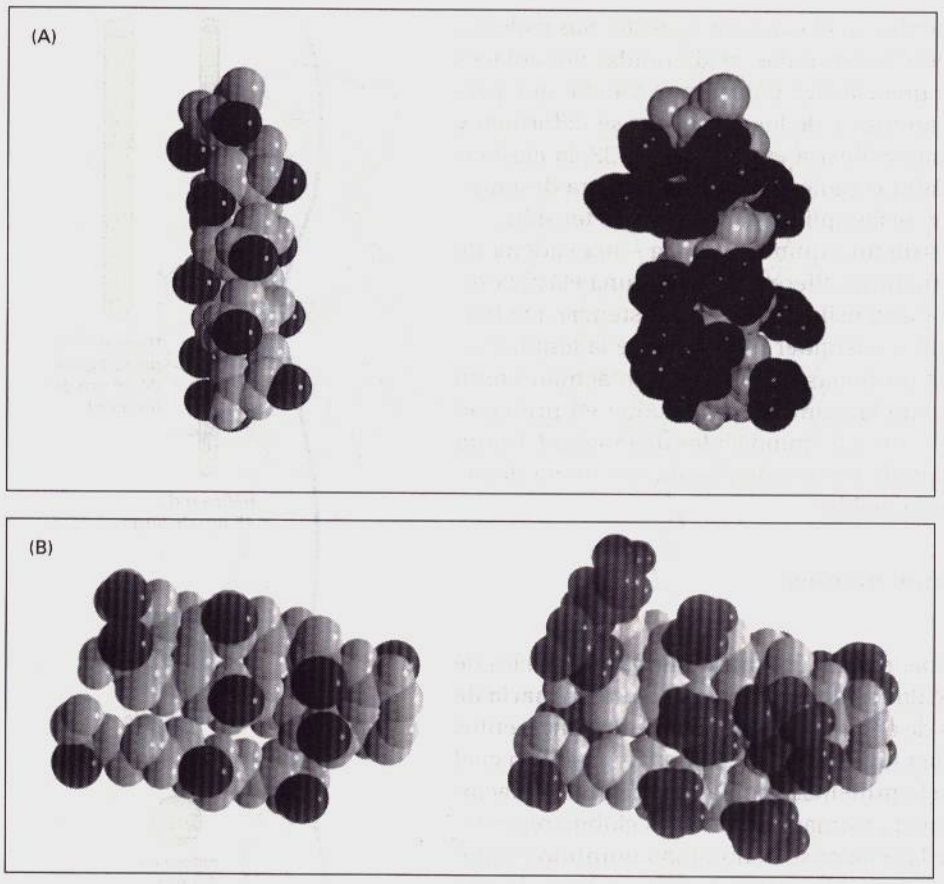


Figura 3-31 Modelos espaciales compactos de una hélice α y de una lámina β con (*derecha*) y sin (*izquierda*) las cadenas laterales de sus aminoácidos. (A) Una hélice α (parte de la estructura de la mioglobina). (B) Una región de lámina β (parte de la estructura de un dominio de una inmunoglobulina). En las fotografías de la izquierda, cada cadena lateral está representada por un único átomo sombreado en negro (los grupos R de las Figuras 3-29 y 3-30), mientras que a la derecha se muestra la cadena lateral entera. (Por cortesía de Richard J. Feldmann.)

colágena están, a su vez, empaquetadas formando fibrillas en las que las moléculas de colágena adyacentes están unidas por enlaces covalentes cruzados entre los residuos vecinos de lisina, dando a las fibrillas una enorme resistencia a la tensión (Figura 3-32).

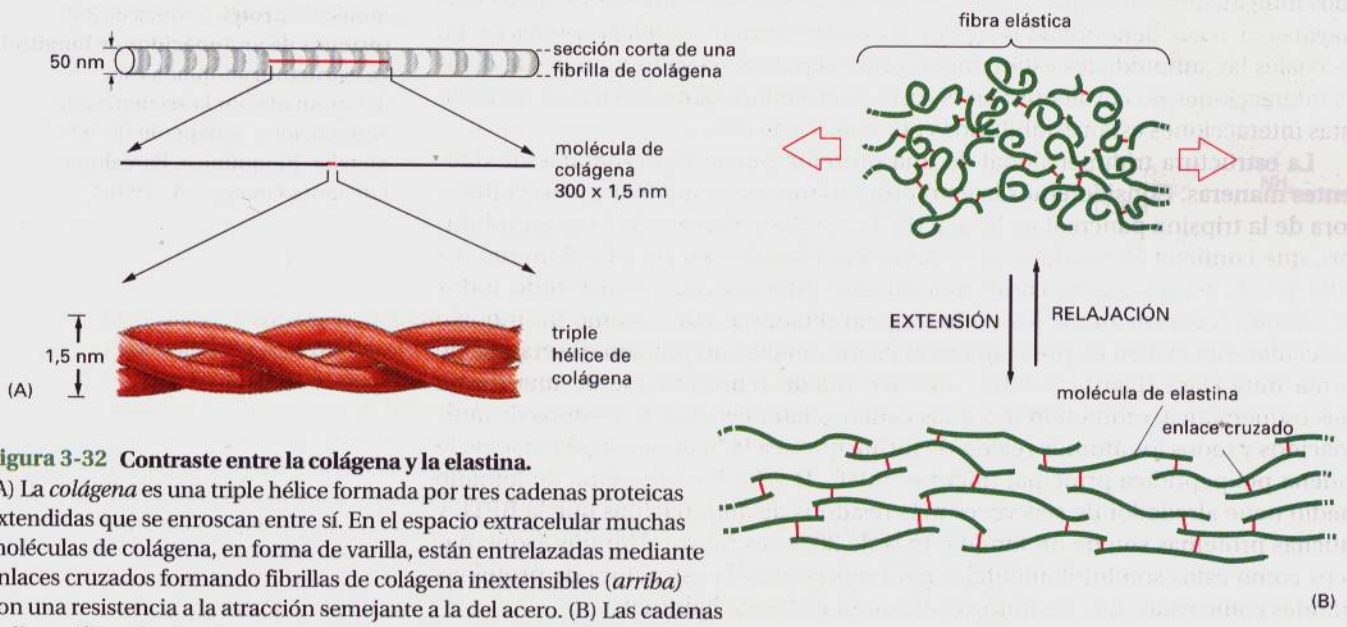


Figura 3-32 Contraste entre la colágena y la elastina. (A) La *colágena* es una triple hélice formada por tres cadenas proteicas extendidas que se enroscan entre sí. En el espacio extracelular muchas moléculas de colágena, en forma de varilla, están entrelazadas mediante enlaces cruzados formando fibrillas de colágena inextensibles (*arriba*) con una resistencia a la atracción semejante a la del acero. (B) Las cadenas polipeptídicas de *elastina* están unidas entre sí mediante enlaces cruzados, formando fibras elásticas. Cuando la fibra es estirada, cada molécula de elastina se desenrolla adoptando una conformación más extendida. El notable contraste entre las propiedades físicas de la elastina y las de la colágena radica por completo en que sus secuencias de aminoácidos son diferentes.

La **elastina** es un caso que se encuentra en el extremo opuesto. Sus cadenas polipeptídicas, relativamente libres y desestructuradas, están unidas por enlaces covalentes cruzados, generando una trama elástica parecida al caucho que permite que tejidos tales como los de las arterias y de los pulmones se deformen y dilaten sin sufrir ningún daño. Tal como se ilustra en la Figura 3-32, la elasticidad es debida a la capacidad de las distintas moléculas proteicas para desenrollarse de manera reversible cada vez que se les aplique una fuerza de tensión.

Hay que destacar que la misma estructura química básica –una cadena de aminoácidos– pueda formar tantas estructuras diferentes: una trama elástica semejante al caucho (elastina), un cable inextensible con una resistencia a la tensión semejante a la del acero (colágena) o cualquier otra de entre la amplia variedad de superficies catalíticas de las proteínas globulares que actúan como enzimas. La Figura 3-33 ilustra y compara la gama de formas que en principio podría adoptar una cadena polipeptídica de 300 aminoácidos de longitud. Como ya hemos dicho, la conformación adoptada realmente por una proteína determinada depende de su secuencia de aminoácidos.

Las proteínas presentan diferentes niveles de organización estructural[24]

Al describir la estructura de una proteína, resulta útil distinguir varios niveles de organización. La secuencia de aminoácidos se denomina **estructura primaria** de la proteína. Las interacciones regulares de enlaces de hidrógeno entre fragmentos contiguos de la cadena polipeptídica dan lugar a hélices α y a láminas β, lo cual constituye la **estructura secundaria** de la proteína. Además, ciertas combinaciones de hélices α y láminas β se empaquetan formando unidades globulares enlazadas de forma compacta, cada una de las cuales se denominan **dominio** proteico. Normalmente los dominios están construidos a partir de una zona de una cadena polipeptídica de entre 50 y 350 aminoácidos, y parece que son las unidades básicas a partir de las cuales se construyen las proteínas (véase más adelante). Mientras que las proteínas más pequeñas pueden presentar un solo dominio, las proteínas mayores presentan varios de ellos, normalmente conectados por cadenas polipeptídicas de longitud relativamente variable. Finalmente, los polipéptidos individuales a menudo se asocian constituyendo subunidades de moléculas mayores, a veces denominadas *agregados moleculares* o *complejos proteicos*, en los cuales las subunidades están unidas entre sí por un elevado número de débiles interacciones no covalentes; en el caso de proteínas extracelulares, a menudo estas interacciones están estabilizadas por enlaces disulfuro.

La estructura tridimensional de una proteína puede representarse de diferentes maneras. Consideremos la extraordinariamente pequeña proteína inhibidora de la tripsina pancreática básica (BPTI, de Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor), que contiene 58 residuos de aminoácido plegados en un solo dominio. La BPTI puede representarse como una imagen estereoscópica mostrando todos sus átomos a excepción de los de hidrógeno (Figura 3-34A) o como un modelo molecular espacial en el que la mayoría de los detalles no puedan observarse de forma muy clara (Figura 3-34B). También puede representarse de una forma más esquemática, omitiendo todas las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos y todos los átomos reales, de forma que sea fácil de seguir el curso de la cadena polipeptídica principal (Figuras 3-34C, D y E). Una proteína de tamaño medio tiene alrededor de seis veces más residuos de aminoácidos que la BPTI, y muchas proteínas son de un tamaño más de 20 veces mayor. Dibujos esquemáticos como éstos son fundamentales para representar la estructura de proteínas grandes como éstas. En este libro se utilizarán de forma habitual.

La Figura 3-35 muestra cómo se puede resolver la estructura de una gran proteína en diferentes niveles de organización, construyendo cada nivel sobre el anterior de una forma jerárquica. Estos niveles de complejidad organizativa creciente pueden corresponder a las etapas a través de las que una proteína acabada de sintetizar se va plegando hasta alcanzar su estructura nativa dentro de la célula.

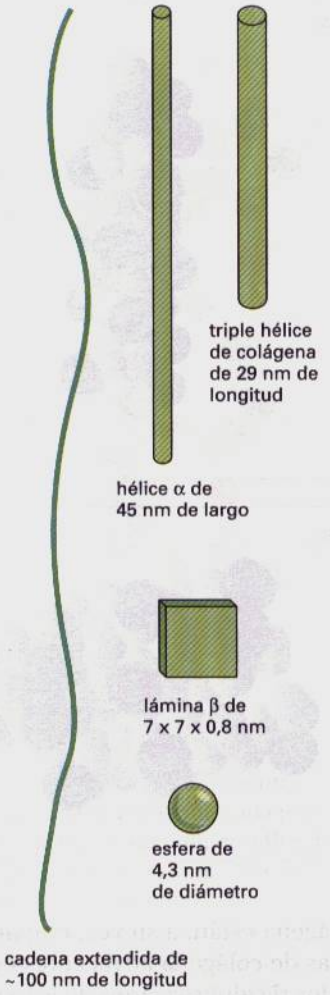


Figura 3-33 Algunas formas y tamaños que puede presentar una molécula proteica típica de 300 residuos de aminoácidos de longitud. La estructura adoptada está determinada por la secuencia de aminoácidos. (Adaptado de D.E. Metzler, Bioquímica. Barcelona: Ediciones Omega S.A., 1981.)

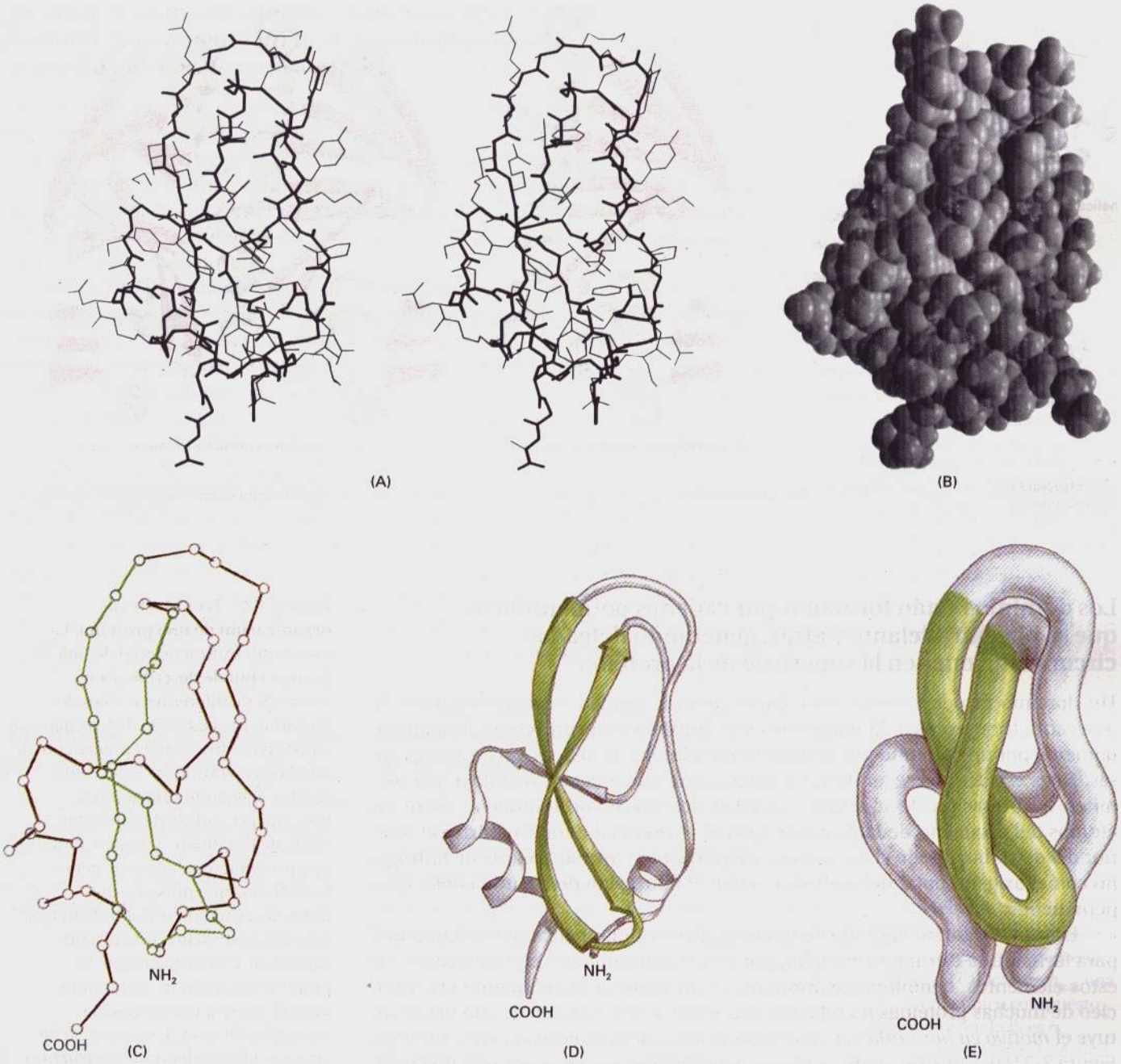
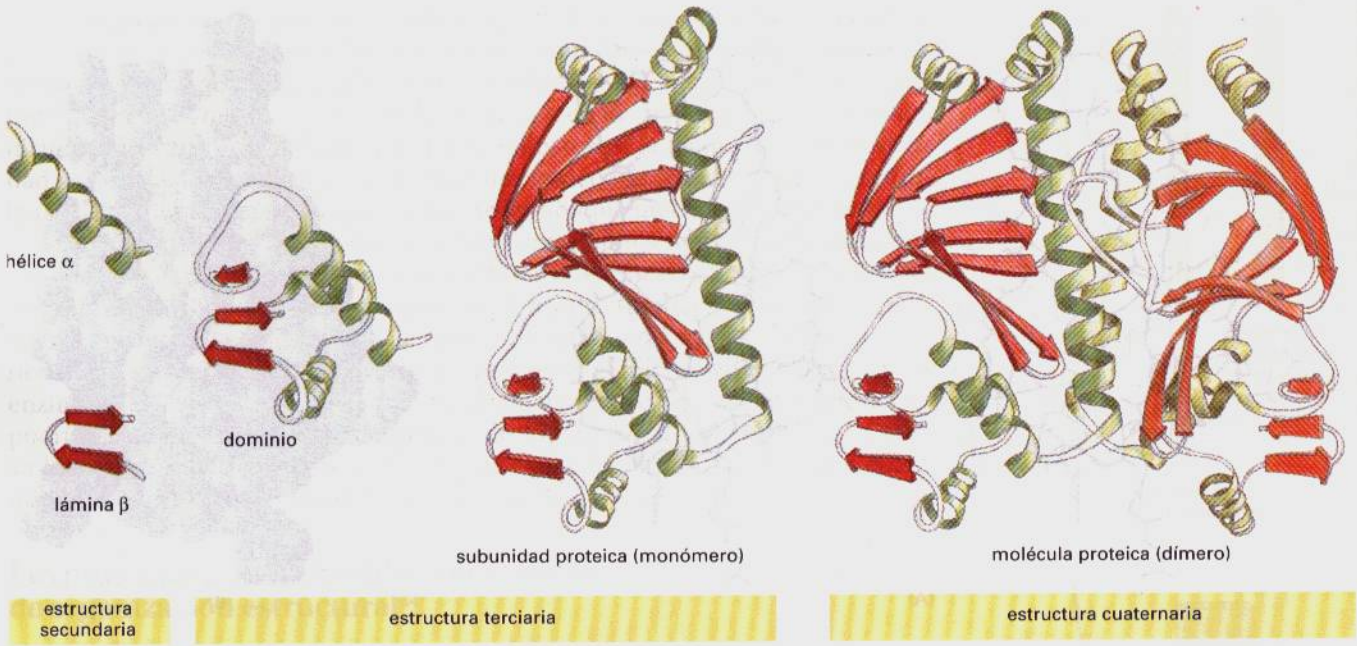


Figura 3-34 Proteína inhibidora de la tripsina pancreática básica (BPTI, de Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor). Conformación tridimensional de esta pequeña proteína, vista en 5 representaciones utilizadas habitualmente. (A) Representación estereoscópica que muestra la posición de todos los átomos excepto los de hidrógeno. La cadena principal se presenta en líneas gruesas y las cadenas laterales en líneas finas. (B) Modelo molecular mostrando el radio de van der Waals de todos los átomos (véase Panel 3-1, págs. 96-97). (C) Modelo de esqueleto de alambre compuesto por líneas que conectan los carbonos α a lo largo del esqueleto polipeptídico. (D) "Modelo de cinta" que representa todas las regiones de interacciones regulares por enlaces de hidrógeno, en forma de hélices (hélices α) o como grupos de flechas (láminas β), las cuales apuntan hacia el extremo carboxilo terminal de la cadena. (E) "Modelo de tubo" que muestra el curso de la cadena polipeptídica omitiendo cualquier detalle de ella. En los tres paneles de la parte inferior de la figura el *motivo en horquilla beta* se ha dibujado en *verde*. Téngase en cuenta que el núcleo de todas las proteínas globulares está densamente empaquetado de átomos. Por lo tanto, la impresión de una estructura abierta producida por la observación de los modelos (C), (D) y (E) es engañosa. (B y C por cortesía de Richard J. Feldmann; A y D por cortesía de Jane Richardson.)



Los dominios están formados por cadenas polipeptídicas que se pliegan adelante y atrás, generando delgadas circunvoluciones en la superficie de la proteína[24]

Un dominio proteico puede concebirse como la unidad estructural básica de una estructura proteica. El núcleo de cada dominio está compuesto fundamentalmente por un conjunto interconectado de láminas β, hélices α o de ambas cosas. Estas estructuras secundarias regulares están favorecidas debido a que permiten la formación de una gran cantidad de enlaces de hidrógeno entre los átomos del esqueleto de la proteína, lo cual es esencial para estabilizar el interior del dominio, donde el agua no es asequible para formar enlaces de hidrógeno con el oxígeno polar del carbonilo o con el hidrógeno de la amida del enlace peptídico.

Existe un número limitado de maneras de combinar hélices α con láminas β para formar una estructura globular, por lo que determinadas combinaciones de estos elementos, denominadas **motivos**, se presentan repetidamente en el núcleo de muchas proteínas no relacionadas entre sí. Un ejemplo de ello lo constituye el *motivo en horquilla beta* encontrado en la BPTI (coloreado en *verde* en la Figura 3-34D). Consiste en dos cadenas β antiparalelas unidas por una fina vuelta formada por un asa de la cadena polipeptídica. Otro ejemplo es el *motivo beta-alfa-beta*, en el que dos cadenas β paralelas están conectadas por un tramo de hélice α (Figura 3-36). En el Capítulo 9 se comentan otros motivos comunes, como los diferentes motivos asociados a DNA encontrados en diversas familias de proteínas reguladoras de genes.

Varias combinaciones de motivos forman el dominio proteico, en el cual la cadena polipeptídica tiende a curvarse arriba y abajo a lo largo de toda la estructura, a veces formando una lámina β o una hélice α, y cambiando de dirección súbitamente dando una vuelta cerrada cuando llega a la superficie del dominio. Como resultado de ello, un dominio típico es una estructura compacta, la superficie de la cual está recubierta de asas protuberantes de cadenas polipeptídicas (Figura 3-37). Las *regiones en asa*, de longitud variable y superficie irregular, a menudo forman los lugares de unión para otras moléculas. Debido a que las regiones en asa están expuestas al agua, son ricas en aminoácidos hidrofílicos, por lo que frecuentemente se pueden predecir sus posiciones a partir de un estudio detallado de la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Figura 3-35 Tres niveles de organización de una proteína. La estructura tridimensional de una proteína puede describirse en términos de diferentes niveles de plegamiento, cada uno de los cuales se construye sobre el nivel precedente de una forma jerárquica. Aquí, estos niveles se ilustran utilizando la proteína activadora de catabolito (CAP, de Catabolite Activator Protein), una proteína reguladora de genes bacterianos que presenta dos dominios. Cuando el dominio mayor se une a AMP cíclico provoca un cambio de conformación de la proteína que permite al dominio menor unirse a una secuencia específica de DNA. La secuencia de aminoácidos se denomina *estructura primaria* y el primer nivel de plegamiento *estructura secundaria*. Tal como se indica sombreado en *amarillo*, la combinación de los niveles de plegamiento segundo y tercero mostrados aquí, se denomina habitualmente *estructura terciaria* y el cuarto nivel (la unión de subunidades) *estructura cuaternaria* de una proteína. (Modificado de un dibujo de Jane Richardson.)

De entre la gran cantidad de cadenas polipeptídicas posibles, únicamente un número relativamente pequeño de ellas llegaría a ser útil

Puesto que cada uno de los 20 aminoácidos es químicamente distinto y cada uno de ellos puede, en principio, presentarse en cualquier posición de una cadena proteica, existen $20 \times 20 \times 20 \times 20 = 160\,000$ posibles cadenas polipeptídicas diferentes de 4 aminoácidos de longitud o, análogamente, 20^n posibles cadenas polipeptídicas diferentes de n aminoácidos de longitud. Así, se podrían producir más de 10^{390} proteínas diferentes de una longitud de 300 aminoácidos, es decir, de un tamaño normal.

Sabemos sin embargo que únicamente un pequeño número de estas posibles proteínas adoptaría una conformación tridimensional estable. La gran mayoría de cadenas tendría un gran número de conformaciones diferentes de energía aproximadamente igual, cada una de ellas con propiedades químicas distintas. Estas proteínas con propiedades tan variables no serían útiles, y por consiguiente, serían eliminadas por la selección natural durante el transcurso de la evolución. Las proteínas actuales tienen una estructura y unas propiedades químicas sorprendentemente sofisticadas debido a sus propiedades únicas de plegado. No sólo sucede que la secuencia de aminoácidos es tal que condiciona que sólo resulte extremadamente estable una sola de las conformaciones posibles, sino que además esta conformación tiene la forma y las propiedades químicas adecuadas para permitir que la proteína realice una función catalítica o estructural determinada en la célula. Las proteínas están construidas de una manera tan precisa que el cambio de tan sólo unos cuantos átomos de un aminoácido puede trastornar toda la estructura y provocar una alteración catastrófica de la función de la proteína.

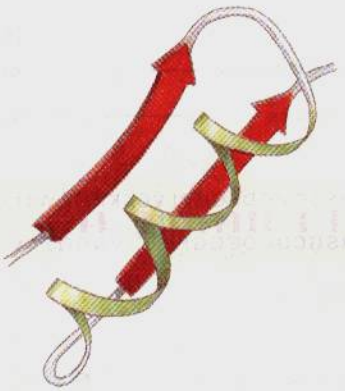
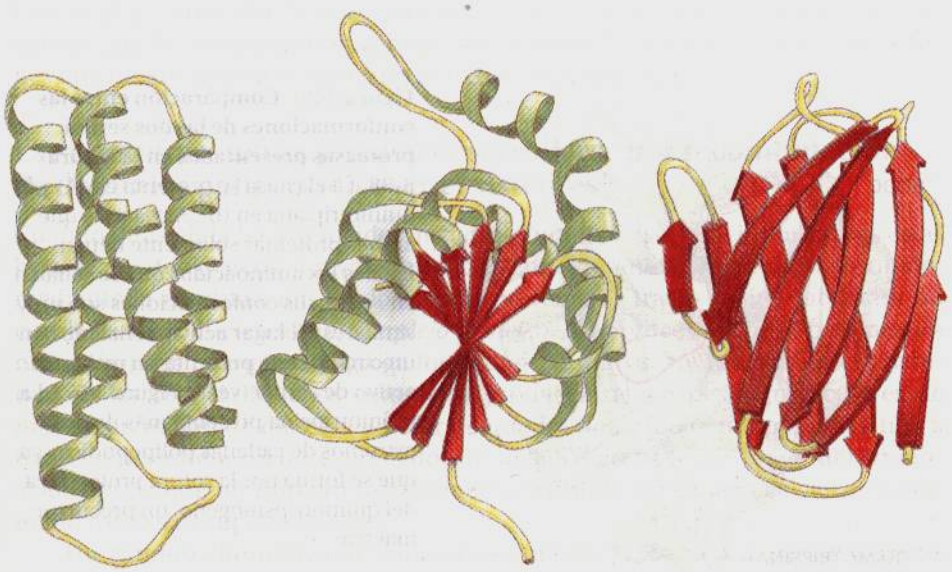


Figura 3-36 Ejemplo de un motivo proteico habitual. En el motivo beta-alfa-beta, dos cadenas paralelas adyacentes que forman una lámina β están conectadas a través de una hélice α. Como en el caso del motivo de horquilla beta, destacado en la Figura 3-34, este motivo se halla en muchas proteínas diferentes.

Normalmente las nuevas proteínas se desarrollan por alteraciones menores de proteínas antiguas [25]

Las células disponen de mecanismos genéticos que permiten que durante la evolución los genes se dupliquen, se modifiquen y se recombinen. Por consiguiente, una vez se ha desarrollado una proteína con propiedades de superficie útiles, su estructura básica puede ser incorporada a muchas otras proteínas. A menudo, las proteínas de función relacionada aunque diferente, de organismos



(A) (B) (C)

Figura 3-37 Modelos de cinta de la estructura tridimensional de algunos dominios de proteínas organizados de forma diferente. (A) Citocromo b_{562}, una proteína de dominio único compuesto casi completamente por hélices α. (B) Dominio que une NAD^+ de la láctico deshidrogenasa, compuesto por una combinación de hélices α y de láminas β. (C) Dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina, compuesto por un sandwich de dos láminas β. En estos tres ejemplos las hélices α se presentan en *verde* mientras que las cadenas organizadas en láminas β se señalan como *flechas rojas*. Nótese que generalmente la cadena polipeptídica cruza hacia adelante y hacia atrás a través de todo el dominio, adoptando curvas cerradas solamente en la superficie de la proteína. A menudo las *regiones en asa (amarillo)* constituyen los lugares de unión de otras moléculas. (Dibujos por cortesía de Jane Richardson.)

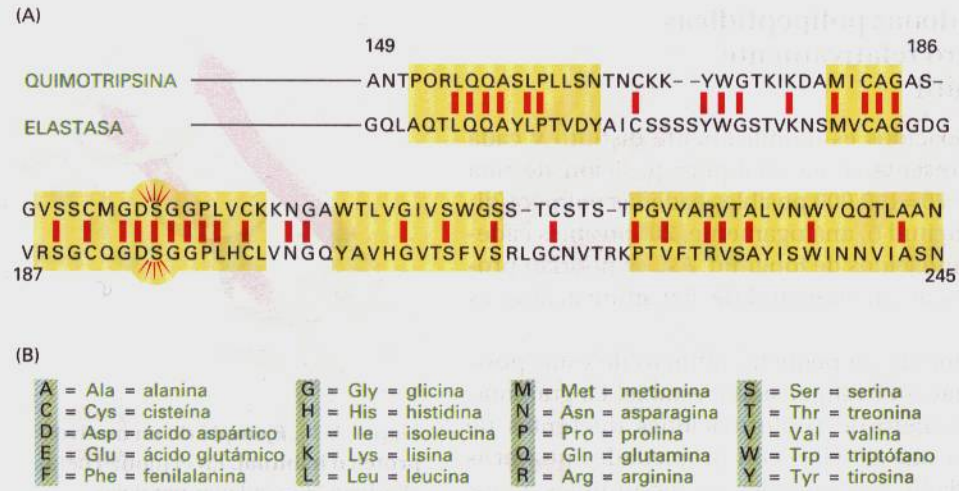


Figura 3-38 (A) Comparación de las secuencias de aminoácidos de dos miembros de la familia de enzimas serina proteasas. Se muestran las zonas carboxilo terminales (aminoácidos 149 a 245) de las dos proteínas. Los aminoácidos idénticos se presentan conectados por barras de color y se destaca el residuo de serina del lugar activo de la enzima (posición 195). En las secciones de la cadena polipeptídica encerradas en cajas *amarillas*, cada aminoácido ocupa una posición espacial altamente equivalente en la estructura tridimensional de las dos enzimas (véase Figura 3-39). (B) Los códigos estándar de una letra y de tres letras que se utilizan para designar los aminoácidos. (Modificado de J. Greer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3393-3397, 1980.)

actuales, tienen secuencias de aminoácidos similares. Se ha creído que estas familias de proteínas evolucionaron a partir de un gen ancestral único que durante el transcurso de la evolución se duplicó dando lugar a otros genes en los que gradualmente se fueron acumulando diferentes mutaciones, generándose así proteínas con funciones nuevas.

Consideremos la familia de las enzimas que degradan proteínas (enzimas proteolíticas) denominadas **serina proteasas**, que incluye a las enzimas digestivas quimotripsina, tripsina y elastasa y algunas de las proteasas de la cascada enzimática de la coagulación de la sangre y de la fijación del complemento. Al comparar dos de estas proteínas se observa que alrededor de un 40% de las posiciones de sus secuencias están ocupadas por el mismo aminoácido (véase Figura 3-38). La semejanza de sus conformaciones tridimensionales, determinadas mediante cristalografía de rayos X, es aún más notable: la mayor parte de los complicados giros y vueltas de sus cadenas polipeptídicas, de varios cientos de aminoácidos, son idénticos (Figura 3-39).

El caso de las serina proteasas se repite en centenares de otros casos de familias proteicas. En muchos casos, la secuencias de aminoácidos han divergido mucho más que en el caso de las serina proteasas, de forma que no podemos estar seguros de la relación familiar entre dos proteínas sin determinar sus estructuras tridimensionales. Por ejemplo, las proteínas $\alpha 2$ de levadura y la proteína

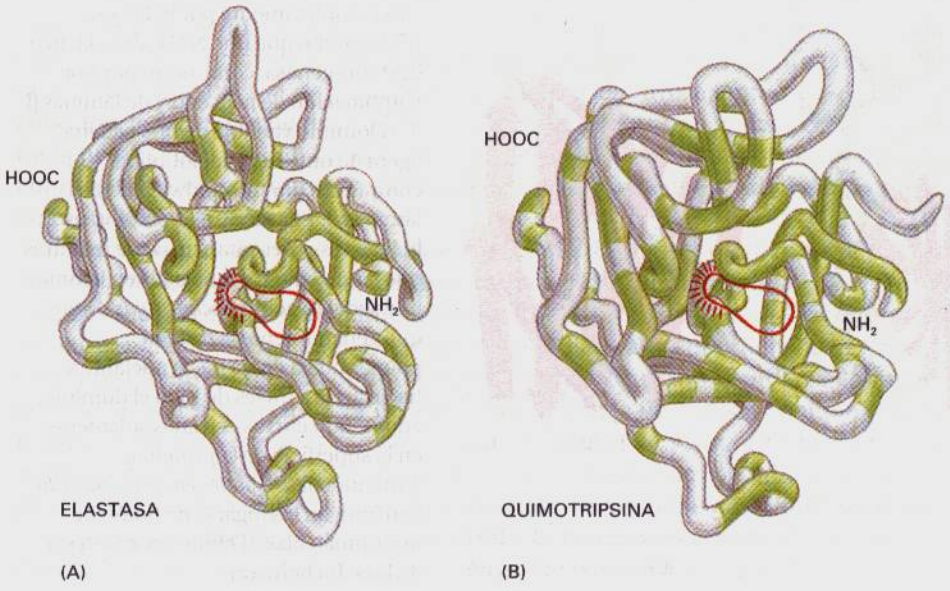


Figura 3-39 Comparación entre las conformaciones de las dos serina proteasas presentadas en la Figura 3-38. La elastasa se presenta en (A) y la quimotripsina en (B). A pesar de que ambas proteínas solamente tienen iguales los aminoácidos que se señalan en *verde*, sus conformaciones son muy similares. El lugar activo, señalado con un círculo *rojo*, presenta un residuo activo de serina (véase Figura 3-57). La quimotripsina presenta más de dos extremos de cadenas polipeptídicas ya que se forma por la rotura proteolítica del quimotripsinógeno, un precursor inactivo.

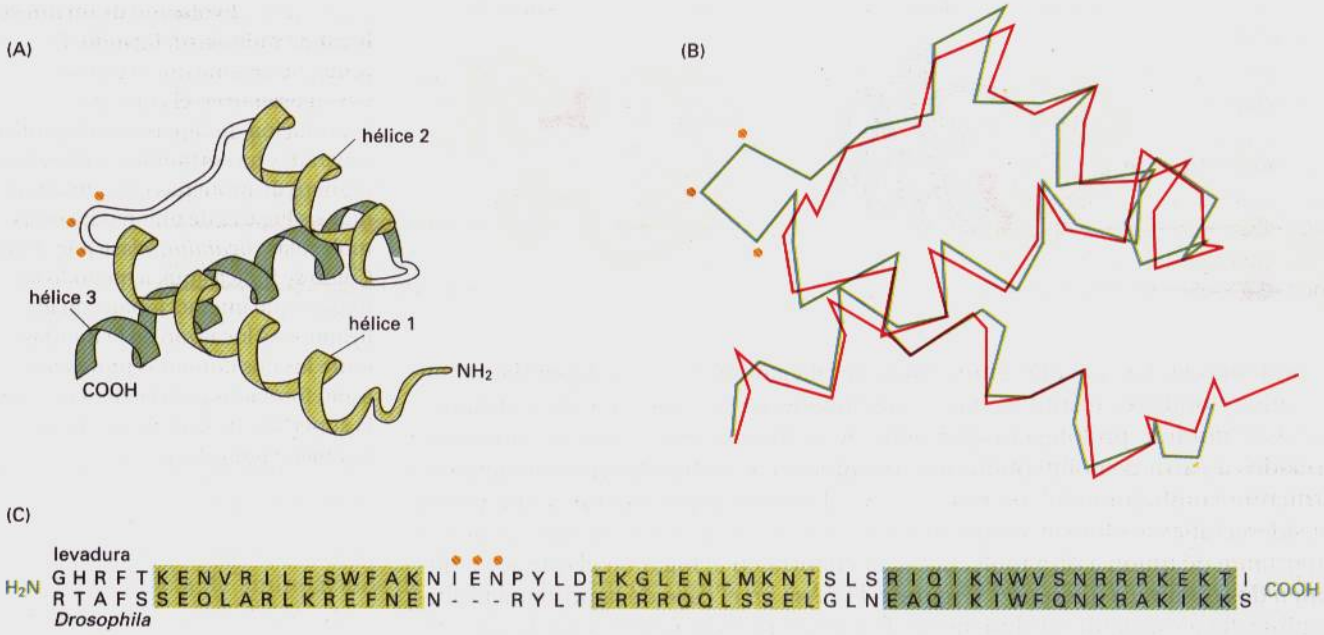


Figura 3-40 Comparación de homodominios de unión al DNA de dos organismos separados por más de mil millones de años de evolución. (A) Estructura esquemática. (B) Localización de las posiciones de los carbonos α. Las estructuras tridimensionales mostradas fueron determinadas por cristalografía de rayos X de la proteína α2 de la levadura *(verde)* y de la proteína angrelada de *Drosophila (rojo)*. (C) Comparación de las secuencias de aminoácidos de la región de las proteínas mostradas en (A) y (B). Los *puntos naranja* señalan la posición de un inserto de tres aminoácidos de la proteína α2. (Adaptado de C. Wolberger et al., *Cell* 67: 517-528, 1991.)

angrelada de *Drosophila* son dos proteínas reguladoras de genes de la familia homeodominio. Solo son iguales en 17 de sus 60 residuos de aminoácidos, de forma que sólo resulta evidente la relación que existe entre ambas cuando se comparan sus estructuras tridimensionales (Figura 3-40).

A menudo, los diferentes miembros de una gran familia de proteínas tienen funciones bastantes diferentes. Algunos de los cambios de aminoácidos que diferencian estas enzimas fueron seleccionados en el transcurso de la evolución probablemente porque daban lugar a cambios en la especificidad del substrato y en las propiedades reguladoras, confiriéndoles las distintas funciones que presentan en la actualidad. Otros cambios de aminoácidos parecen ser "neutros", no teniendo efectos ni beneficiosos ni perjudicales sobre la estructura y la función básicas de una proteína. Puesto que la mutación es un proceso aleatorio, también debieron producirse muchos cambios perjudiciales que alteraron la estructura tridimensional de estas proteínas lo suficiente como que resultaran inactivas. Estas proteínas inactivas debieron perderse en cuanto los organismos individuales que las producían se encontraron en una situación de desventaja y fueron eliminados por la selección natural. Por consiguiente no debe sorprendernos que las células contengan grupos enteros de cadenas polipeptídicas afines que tienen ancestros comunes pero funciones diferentes.

Las nuevas proteínas pueden desarrollarse por recombinación de dominios polipeptídicos preexistentes[26]

Cuando una célula ha producido un cierto número de superficies proteicas estables, se pueden generar nuevas superficies con diferentes propiedades de unión, mediante la combinación de dos o más proteínas a través de interacciones no covalentes, produciendo un *complejo proteico*. Este proceso de unión de proteínas globulares que genera agregados proteicos mayores y funcionales es habitual en las células. Muchos complejos proteicos tienen pesos moleculares de más de un millón de daltons, a pesar de que un una cadena polipeptídica típica tiene un peso molecular de alrededor de 40 000 daltons (entre 300 y 400 aminoácidos) y de que un número relativamente reducido de cadenas alcanza un tamaño tres veces superior a éste.

Un camino alternativo de generar una nueva proteína a partir de cadenas preexistentes consiste en unir las secuencias de DNA correspondientes, produciéndose un gen que codifica una larga cadena polipeptídica única. Se cree que

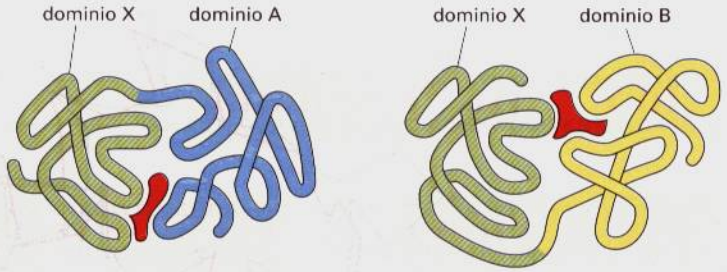


Figura 3-41 Evolución de un nuevo lugar de unión a un ligando. El principio general por el cual la yuxtaposición en el curso de la evolución de superficies de proteína separadas ha permitido incrementar el número de proteínas que presentan nuevos lugares de unión para otras moléculas (*ligandos*, véase pág. 135). Como se indica aquí, a menudo los lugares que interaccionan con los ligandos se localizan en la interfase entre los dos dominios proteicos y están formados por regiones en asa de la superficie de la proteína (véase también Figura 3-42).

las proteínas en las que diferentes zonas se pliegan de forma independiente en dominios globulares distintos, han evolucionado de esta forma, quizás después de existir durante prolongados períodos de tiempo como complejos proteicos formados a partir de polipéptidos independientes. Muchas proteínas tienen una estructura "multidominio" de este tipo, y tal como cabría esperar a raíz de las consideraciones evolutivas mencionadas antes, a menudo ocurre que un punto importante de unión a otra molécula se encuentra en el lugar en el que se yuxtaponen dos dominios diferentes (Figura 3-41). Así, en el caso de la proteína multidominio cuya estructura tridimensional se muestra en la Figura 3-42, la superficie proteica de un dominio que une NAD^+ aparentemente se combina con la superficie de un segundo dominio que une un azúcar, constituyendo parte de un proceso de evolución de un lugar activo que utiliza NAD^+ para catalizar la oxidación de un azúcar.

Existe otra manera, especialmente frecuente en las largas proteínas fibrosas como la colágena, de reutilizar una secuencia de aminoácidos (véase Figura 3-32). En estos casos se forma una estructura a partir de múltiples repeticiones internas de una secuencia ancestral de aminoácidos. Es evidente que la unión de secuencias de aminoácidos a través de la unión de secuencias preexistentes de DNA codificante es una estrategia mucho más eficaz para la célula que la alternativa de obtener nuevas secuencias proteicas mediante mutación aleatoria del DNA.

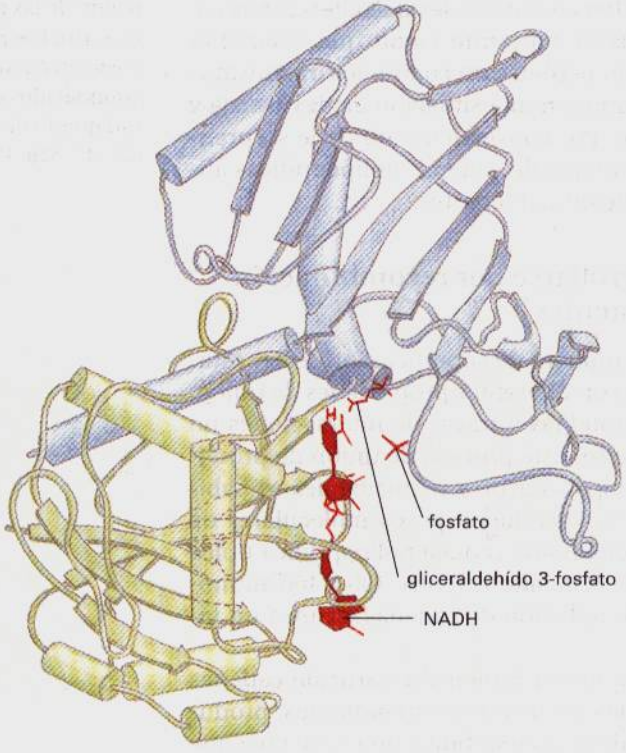


Figura 3-42 Estructura de la enzima glucolítica gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. La proteína está compuesta por dos dominios, que aquí se presentan en colores diferentes, con regiones de hélice α (representadas por cilindros) y zonas de lámina β (representadas como flechas). Los detalles de la reacción que cataliza esta enzima se muestran en la Figura 2-22. Nótese que los tres substratos que intervienen en la reacción se unen a la enzima en una región intermedia entre los dos dominios. (Por cortesía de Alan J. Wonacott.)

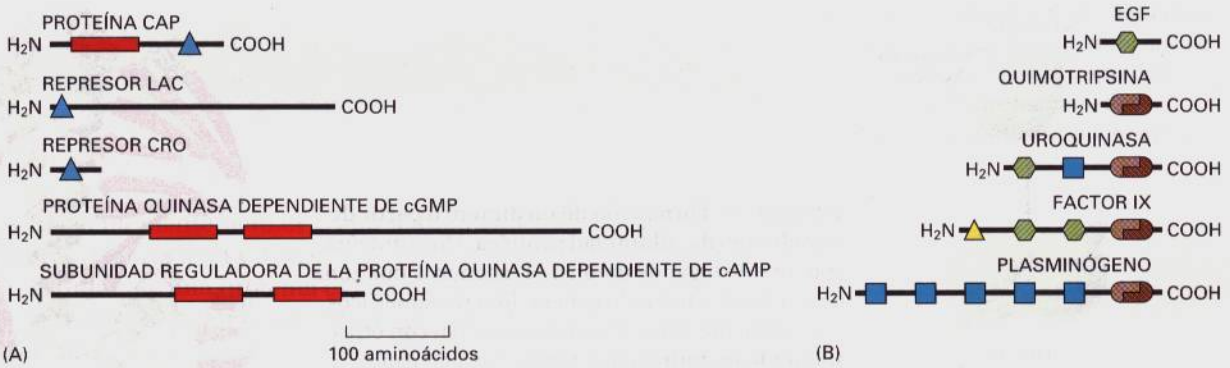


Figura 3-43 Barajado de dominios. Durante la evolución de las proteínas se produjo un extenso barajado de bloques de secuencias de proteína (*módulos* proteicos). En la figura, las zonas señaladas con marcas de la misma forma y color están relacionadas evolutivamente pero no son idénticas. (A) La proteína activadora de gen por catabolitos (CAP, de Catabolite Gen Activator Protein) presenta un dominio (*triángulo azul*) que se une específicamente a una secuencia de DNA, y un segundo dominio (*rectángulo rojo*) que une AMP cíclico (véase Figura 3-35). El dominio que se une a DNA está relacionado con el de muchas otras proteínas reguladoras de genes, como las proteínas represoras lac y cro. Además, se han encontrado dos copias del dominio que une AMP cíclico en proteína quinasas de eucariotas reguladas por la unión de nucleótidos cíclicos. (B) Las serina proteasas semejantes a quimotripsina están formadas por dos dominios (*marrón*). En algunas proteasas relacionadas que están fuertemente reguladas y más especializadas los dos dominios proteasa están conectados a uno o más dominios homólogos a dominios encontrados en el factor de crecimiento epidérmico (*hexágono verde*), a la proteína que une calcio (*triángulo amarillo*) o al dominio "kringle" (*cuadrado azul*) que contienen tres enlaces disulfuro internos.

Las homologías estructurales pueden contribuir en la asignación de funciones a las proteínas descubiertas recientemente[27]

El desarrollo de técnicas de secuenciación rápida del DNA ha permitido determinar la secuencia de aminoácidos de un gran número de proteínas a partir de las secuencias de nucleótidos de sus genes. Así, el disponer de una siempre creciente *base de datos sobre proteínas* hace posible realizar de forma rutinaria un estudio exhaustivo por ordenador para buscar posibles secuencias homólogas entre la de una proteína acabada de sintetizar y las de otras proteínas estudiadas previamente. A pesar de que, por ahora, solamente se han secuenciado un pequeño porcentaje del total de proteínas de los organismos eucariotas, resulta habitual ya encontrar que una proteína que se acaba de secuenciar es homóloga a alguna región de otra proteína conocida, lo cual indica que la mayoría de las proteínas pueden descender de un número de tipos de proteínas ancestrales relativamente reducido. Como era de esperar, a menudo las secuencias de muchas proteínas grandes muestran signos de haber evolucionado a través de la unión de dominios preexistentes generando nuevas combinaciones de ellos, un proceso conocido como *barajado de dominios* ("domain shuffling") (Figura 3-43).

Estos estudios comparativos entre proteínas también son importantes debido a que normalmente una relación estructural supone una relación funcional. Así, el descubrir una homología entre la secuencia de aminoácidos de la proteína estudiada y la de una proteína de función conocida puede suponer el ahorro de muchos años de investigación. Tales homologías entre secuencias indicaron, por ejemplo, que algunos genes reguladores del ciclo celular en células de levadura y otros genes que inducen la transformación de células de mamífero en células cancerosas son proteína quinasas. De esta forma se pudo reconocer que muchas de las proteínas que controlan la génesis de la forma de la mosca del vinagre *Drosophila* son proteínas reguladoras de genes, mientras que otras proteínas también implicadas en este control se pudieron clasificar como serina proteasas.

El descubrimiento de homologías entre dominios también puede ser útil en otro sentido. Resulta mucho más difícil determinar la estructura tridimensional de una proteína que conocer su secuencia de aminoácidos. Sin embargo, es posible intuir la conformación de un dominio de una proteína que se acaba de secuenciar si este dominio es homólogo a otro dominio de una proteína cuya conformación ha sido determinada anteriormente por difracción de rayos X. Asumiendo que los giros y torcimientos de las cadenas polipeptídicas están conservados en ambas proteínas a pesar de las diferencias que existan en la secuencia de aminoácidos, a menudo se puede esbozar la estructura de una nueva proteína con una exactitud razonable (Figura 3-40).

Cada año se añaden muchas nuevas secuencias de proteínas a la base de datos, con lo que paulatinamente se incrementa la posibilidad de encontrar homologías útiles. La comparación entre secuencias de proteínas es una herramienta de la biología celular cada día más importante.

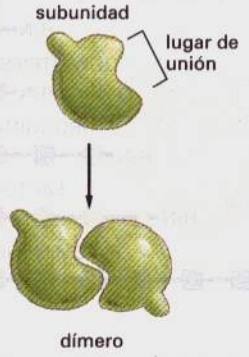


Figura 3-44 Formación de un dímero a partir de un solo tipo de subunidad proteica. Una proteína con un solo lugar de unión que reconozca una zona de sí misma, a menudo genera dímeros simétricos. Normalmente, estos dímeros se asocian con otras subunidades formando tetrámeros y agregados mayores (no se muestra).

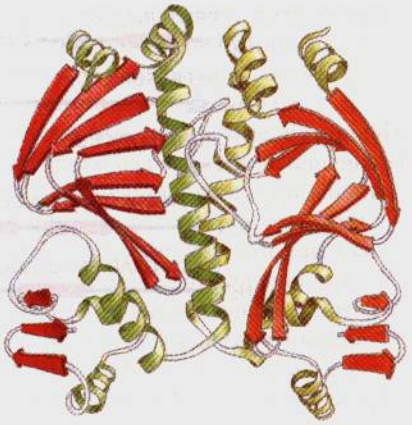


Figura 3-45 Modelo de cinta de un dímero formado a partir de dos subunidades proteicas idénticas (monómeros). La proteína mostrada es la proteína activadora de gen por catabolito (CAP) de bacteria ilustrada previamente en la Figura 3-35. (Por cortesía de Jane Richardson.)

Las subunidades proteicas pueden ensamblarse formando grandes estructuras[28]

Los mismos principios que permiten que varios dominios proteicos se asocien formando lugares de unión, también permiten la formación de estructuras mucho mayores en la célula. Las estructuras supramoleculares tales como los complejos enzimáticos, los ribosomas, los filamentos proteicos, los virus y las membranas no se sintetizan en forma de moléculas gigantes unidas covalentemente; en lugar de ello se forman por agregados no covalentes de muchas moléculas preformadas, que en la estructura final se denominan *subunidades*.

El uso de subunidades pequeñas para construir grandes estructuras presenta varias ventajas: (1) la construcción de una gran estructura a partir de una o algunas subunidades menores repetidas reduce la cantidad de información genética necesaria; (2) puesto que las subunidades se asocian a través de múltiples enlaces de energía relativamente baja, tanto el ensamblaje como la disgregación resultan fáciles de controlar; y (3) el ensamblaje de subunidades minimiza los errores en la síntesis de la estructura ya que en el transcurso del ensamblaje pueden actuar mecanismos de corrección que excluyan las subunidades defectuosas.

Un solo tipo de subunidad proteica puede interaccionar consigo misma formando agregados geométricos regulares[29]

Si una proteína tiene un lugar de unión que es complementario de una región de su propia superficie, se ensamblará espontáneamente formando una estructura mayor. En el caso más sencillo, un centro de unión se reconoce a sí mismo y forma un *dímero* simétrico. Muchas enzimas y otras proteínas forman dímeros de

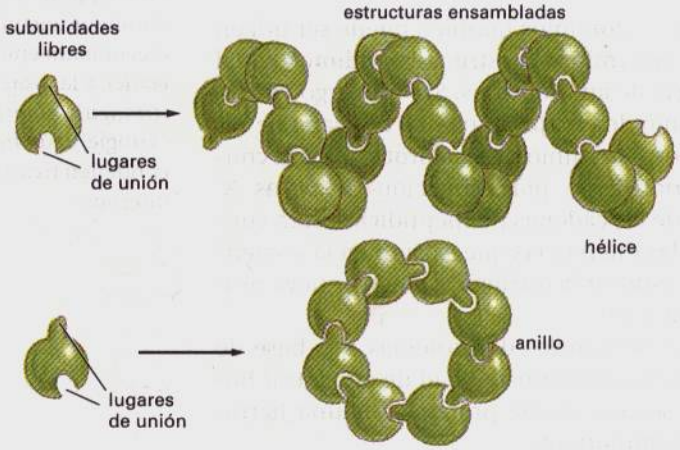


Figura 3-46 Cuando un solo tipo de subunidad proteica interacciona consigo misma, se pueden generar anillos o hélices. En la Figura 3-5 se muestra cómo se forma una hélice; se genera un anillo en lugar de una hélice si las subunidades se unen entre ellas, deteniéndose el crecimiento de la cadena.

Figura 3-47 Un filamento de actina. En este importante filamento, que se discute en detalle en el Capítulo 16, existen aproximadamente dos subunidades proteicas globulares por vuelta.

este tipo, que frecuentemente actúan como subunidades en la formación de agregados mayores (Figuras 3-44 y 3-45).

Si el lugar de unión de una proteína es complementario de una región de su superficie que no incluya al propio lugar de unión, se formará una cadena de subunidades. Determinadas orientaciones de los dos lugares de unión harán que la cadena se cierre pronto sobre sí misma formando un anillo de subunidades (Figura 3-46). Sin embargo es más frecuente que se produzca un largo polímero de subunidades; cuando cada subunidad se una a la siguiente de forma idéntica, las subunidades del polímero se dispondrán siguiendo una hélice prolongada indefinidamente (véase Figura 3-5). Un *filamento de actina*, por ejemplo, es una estructura helicoidal formada a partir de una sola subunidad: una proteína globular denominada *actina*; los filamentos de actina son componentes mayoritarios del citosol de la mayoría de las células eucariotas (Figura 3-47). Como discutimos más adelante las proteínas globulares también pueden asociarse con moléculas semejantes formando grandes láminas o tubos (véase Figura 3-49).

A menudo las proteínas superenrolladas colaboran en la construcción de grandes estructuras en las células[30]

Normalmente cuando la resistencia mecánica es especialmente importante, los agregados supramoleculares se construyen a partir de subunidades fibrosas en lugar de subunidades globulares. Estos agregados pueden estabilizarse por un gran número de regiones de contactos proteína-proteína que se producen cuan-

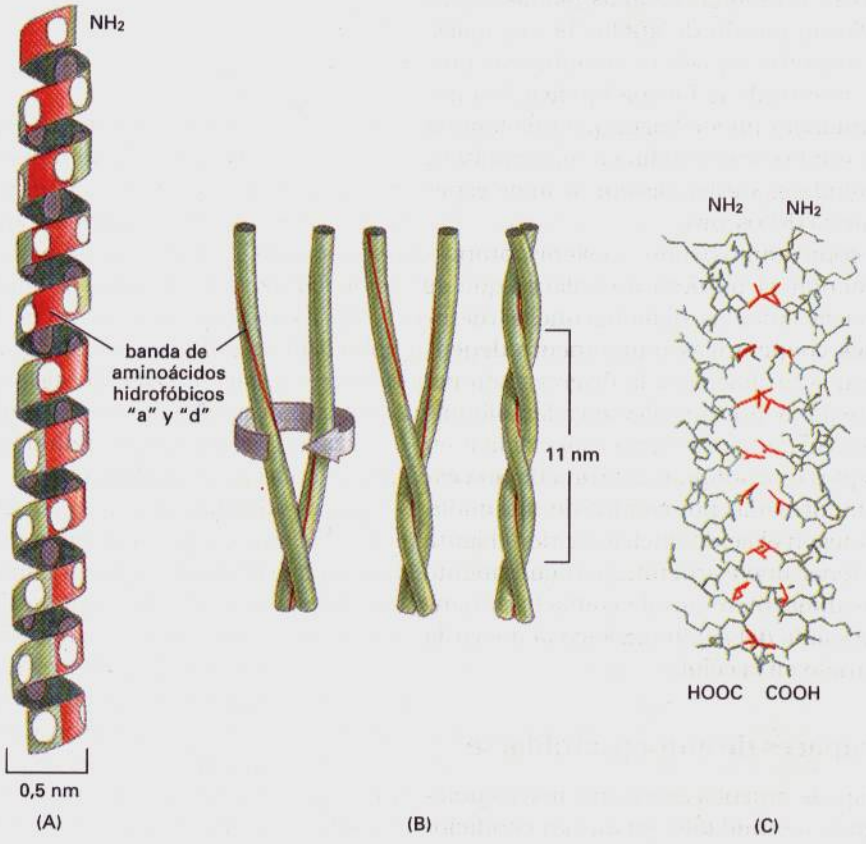


Figura 3-48 Estructura de una hélice superenrollada. En (A) se presenta una hélica α sencilla, con las cadenas laterales de los aminoácidos sucesivos señaladas siguiendo la secuencia de siete elementos "abcdefg" (de abajo a arriba). En esta secuencia los aminoácidos "a" y "d" coinciden sobre la superficie del cilindro formando una "banda" (señalada en *rojo*) que gira lentamente alrededor de la hélice α. Típicamente, las proteínas que forman hélices superenrolladas tienen aminoácidos hidrofóbicos en las posiciones "a" y "d". Por lo tanto, como se muestra en (B), las dos hélices α pueden enroscarse una sobre la otra de forma que las cadenas laterales hidrofóbicas de una hélice α interaccionen con las cadenas laterales hidrofóbicas de la otra, mientras que las otras cadenas laterales, más hidrofílicas, quedan expuestas libremente al entorno acuoso. (C) La estructura atómica de una hélice superenrollada, determinada por cristalografía de rayos X. Las cadenas laterales en *rojo* son hidrofóbicas. (C, de T. Alber, *Curr. Opin. Genet. Devel.* 2:205-210, 1992. © Current Science.)

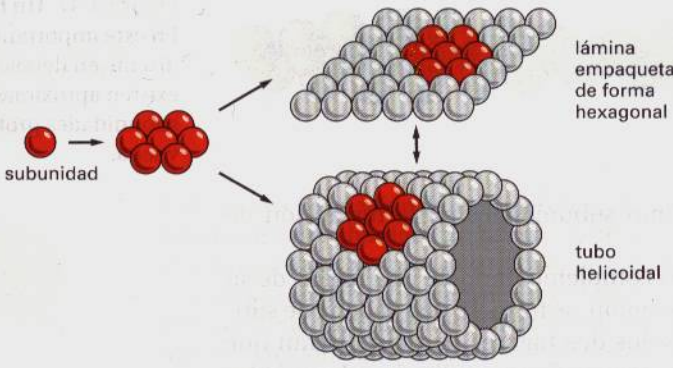


Figura 3-49 Las subunidades proteicas globulares empaquetadas de forma hexagonal pueden generar tanto una lámina plana como un tubo.

do las subunidades se enrollan una respecto a la otra formando una hélice multihebra. Una unidad estructural particularmente estable utilizada repetidamente en este sentido, es la denominada **hélice superenrollada** (**coiled-coil**). Se forma por el apareamiento de dos subunidades de hélice α que tienen una distribución repetida de cadenas laterales no polares. Normalmente las dos subunidades de hélice α son idénticas y corren en paralelo (es decir, en la misma dirección amino-carboxilo terminal). Se enrollan gradualmente una alrededor de la otra generando un filamento rígido de un diámetro de unos 2 nm (Figura 3-48). En algunas familias de proteínas reguladoras de genes las hélices superenrolladas actúan como dominios de dimerización. Más frecuentemente, una hélice superenrollada puede extenderse más de 100 nm y actuar como un bloque de construcción de una gran estructura fibrosa, como el filamento fino en la célula muscular.

Las proteínas pueden ensamblarse formando láminas, tubos o esferas[31]

Algunas subunidades proteicas se ensamblan formando láminas planas en las que las subunidades se disponen siguiendo un patrón de anillos hexagonales. A veces, las proteínas especializadas en transporte a través de membranas presentan una disposición de este tipo en el interior de la bicapa lipídica. Un pequeño cambio de la geometría de las subunidades puede hacer que una lámina hexagonal se convierta en un tubo (Figura 3-49) o, si se producen más cambios, en una esfera hueca. Moléculas proteicas tubulares y esféricas que se unen específicamente al RNA y al DNA forman la cubierta de los virus.

La formación de estructuras cerradas, como anillos, tubos y esferas, proporciona una estabilidad adicional al incrementar el número de enlaces que se pueden formar entre las subunidades proteicas. Además, debido a que estructuras como éstas se forman por interaciones cooperativas mutuamente dependientes entre subunidades, puede inducirse la formación o la disgregación del complejo a través de cambios relativamente pequeños que afecten a las subunidades individuales. Estos principios quedan ilustrados de forma espectacular en las proteínas *cápsides* de muchos virus simples que adoptan la forma de una esfera hueca. A menudo, estas cubiertas están formadas por cientos de subunidades proteicas idénticas que envuelven y protegen el ácido nucleico vírico (Figura 3-50). La proteína de estas cápsides ha de tener une estructura particularmente adaptable, ya que ha de establecer muchos tipos diferentes de contactos y también alterar su disposición para permitir la salida del ácido nucleico al iniciar la multiplicación vírica cuando el virus ha entrado en la célula.

Muchas estructuras celulares son capaces de autoensamblarse[32]

La información necesaria para el ensamblaje de muchos agregados macromoleculares celulares ha de hallarse en las propias subunidades, ya que en condicio-

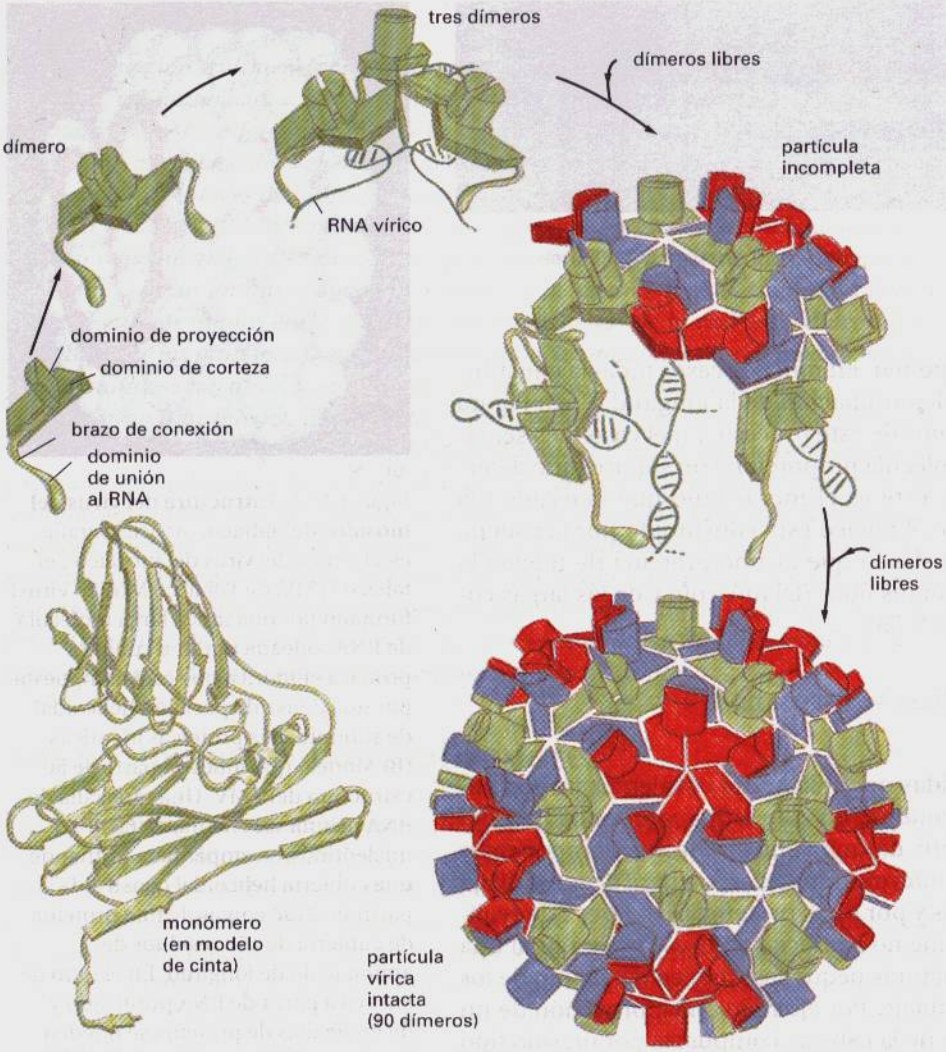
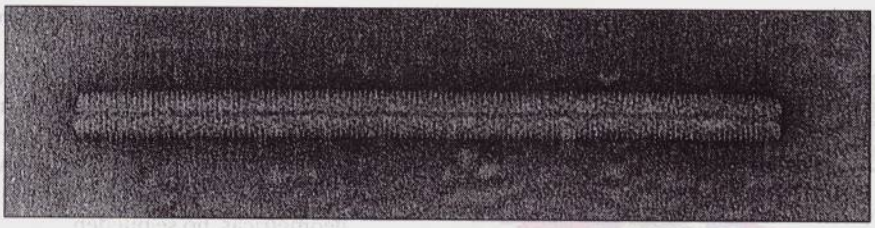


Figura 3-50 Estructura de un virus esférico. En muchos virus se empaquetan subunidadades proteicas idénticas generando un caparazón esférico (una cápside) que contiene el genoma vírico compuesto de RNA o de DNA (véase Figura 6-72). Por razones geométricas, no se pueden empaquetar de una forma simétrica precisa más de 60 subunidades idénticas. Sin embargo, cuando pueden existir pequeñas irregularidades estructurales, se puede generar una cápside mayor utilizando más subunidades. Por ejemplo, el virus del tomate achaparrado (TBSV, de Tomato Bushy Stunt Virus) es esférico, de unos 33 nm de diámetro, formado por 180 copias idénticas de una proteína de la cápside de 386 aminoácidos y un genoma de RNA de 4500 nucleótidos. Para formar una cápside tan grande, la proteína ha de poder colocarse en tres ambientes algo diferentes, cada uno de los cuales se presenta en color en la partícula de la figura. También se muestra una propuesta sobre el proceso de ensamblaje; la estructura tridimensional precisa se ha determinado por difracción de rayos X. (Dibujos por cortesía de Steve Harrison.)

nes adecuadas las subunidades aisladas puedes ensamblarse espontáneamente en el tubo de ensayo dando lugar a la estructura final. El primer agregado macromolecular del que se demostró que era capaz de autoensamblarse a partir de sus elementos constituyentes fue el *virus del mosaico del tabaco* (TMV, de Tobacco Mosaic Virus). Este virus es una larga varilla en la que un cilindro de proteína se halla dispuesto alrededor de un núcleo helicoidal de RNA (Figura 3-51). Si se mezclan en solución el RNA y las subunidades proteicas disociadas, se observa que se recombinan formando partículas víricas completamente activas. El proceso de ensamblaje es sorprendentemente complejo e incluye la formación de anillos dobles de proteína que actúan como intermediarios que se añaden a la cubierta vírica en crecimiento.

Otro agregado macromolecular complejo que se puede reensamblar a partir de sus elementos constituyentes es el ribosoma bacteriano. Estos ribosomas están compuestos por unas 55 moléculas proteicas diferentes y 3 moléculas diferentes de rRNA. Si los 58 componentes se incuban en condiciones apropiadas, espontáneamente forman la estructura original. Lo que es más importante, estos ribosomas reconstruidos son capaces de llevar a cabo síntesis proteica. Como cabía esperar, el proceso de reensamblaje de los ribosomas sigue una vía específica: primero ciertas proteínas se fijan al RNA; luego, este complejo es reconocido por otras proteínas, y así sucesivamente hasta que la estructura está completa.

Todavía no está claro cómo se regulan algunos de los procesos más complicados de autoensamblaje. Por ejemplo, parece que muchas estructuras de la célula tienen una longitud exactamente definida, que es muchas veces superior a



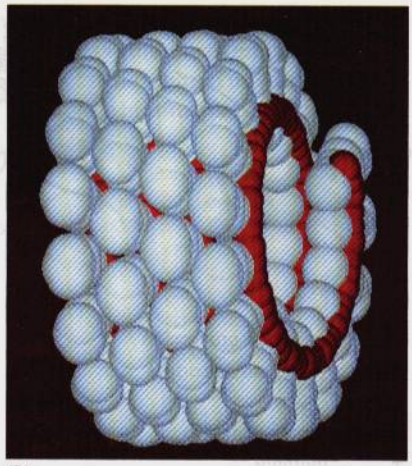

(B)

Figura 3-51 Estructura del virus del mosaico del tabaco. (A) Micrografía electrónica del virus del mosaico del tabaco (TMV, de Tobacco Mosaic Virus) formado por una única larga molécula de RNA rodeada por una cubierta proteica cilíndrica que está compuesta por una densa disposición helicoidal de subunidades proteicas idénticas. (B) Modelo que muestra parte de la estructura del TMV. Una molécula de RNA de una sola hebra, de 6000 nucleótidos, se empaqueta formando una cubierta helicoidal construida a partir de 2130 copias de una proteína de cubierta de 158 residuos de aminoácido de longitud. En el tubo de ensayo a partir de RNA purificado y de moléculas de proteína se pueden autoensamblar partículas del virus con plena capacidad de infección. (A por cortesía de Robley Williams; B por cortesía de Richard J. Feldmann.)

la de las macromoléculas que las componen. En muchos casos todavía constituye un enigma cómo se consigue esta determinación de la longitud. En la Figura 3-52 se ilustran tres posibles mecanismos de este proceso. En el caso más sencillo, un núcleo proteico u otra macromolécula proporciona un soporte que determina el tamaño final del ensamblaje. Éste es el mecanismo que determina la longitud de la partícula TMV en la que el núcleo está constituido por la cadena de RNA. De forma similar se ha demostrado que es una proteína de núcleo la que determina la longitud de los filamentos finos del músculo y de las largas colas de algunos virus bacterianos (Figura 3-53).

No todas las estructuras biológicas se forman por autoensamblaje[33]

Algunas estructuras celulares mantenidas por enlaces no covalentes no son capaces de autoensamblarse. Una mitocondria, un cilio o una miofibrilla no pueden formarse espontáneamente a partir de una solución de sus componentes macromoleculares porque parte de la información necesaria para el ensamblaje es suministrada por enzimas especiales y por otras proteínas celulares que realizan la función de plantilla o patrón y que no aparecen en la estructura final una vez ensamblada. Incluso algunas estructuras pequeñas carecen de alguno de los ingredientes necesarios para su ensamblaje. Por ejemplo en la formación de un pequeño virus bacteriano la estructura de la cabeza, compuesta por un solo tipo de subunidad proteica, se ensambla sobre un armazón transitorio compuesto por una segunda proteína. Puesto que esta segunda proteína no aparece en la partícula vírica final, la estructura no puede reensamblarse espontáneamente después de haber sido disgregada. Se conocen otros ejemplos en los que la degradación proteolítica es un paso esencial e irreversible del proceso de ensamblaje. Éste es el caso de las cápsides de ciertos virus bacterianos e incluso de algunos agregados proteicos sencillos, como por ejemplo la proteína estructural colágena y la hormona insulina (Figura 3-54). Sobre la base de estos ejemplos relativamente simples parece muy probable que el ensamblaje de una estructura tan compleja como una mitocondria o un cilio implique por un lado una ordenación espacial y temporal suministrada por otros componentes celulares, y por otro procesos irreversibles catalizados por enzimas degradativas.

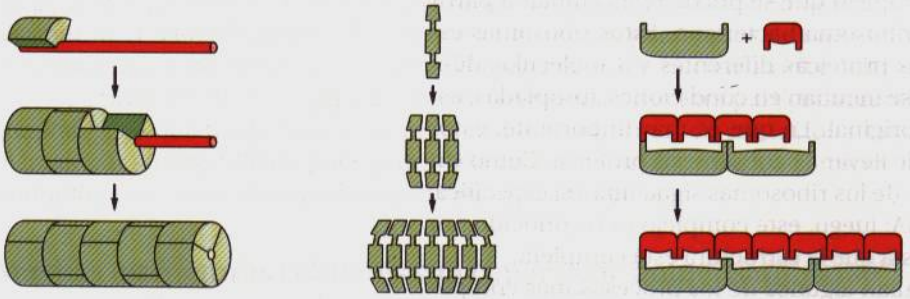


Figura 3-52 Tres posibles sistemas a través de los que se puede formar un gran agregado proteico de una longitud determinada. (A) Coensamblaje a lo largo de un núcleo proteico alargado o de otra macromolécula, las cuales actúan como dispositivo de medida de longitud. (B) El final del ensamblaje se produce debido a la tensión que se acumula en la estructura polimérica a medida que se van añadiendo más subunidades, de forma que a partir de una cierta longitud, la energía necesaria para añadir otra subunidad a la cadena es excesiva. (C) Ensamblaje tipo "pie de rey", en el cual dos tipos de moléculas semejantes a un rodillo, de longitud diferente, forman un complejo escalonado que crece hasta que sus finales coinciden exactamente.

Resumen

La conformación tridimensional de una molécula proteica está determinada por su secuencia de aminoácidos. La estructura plegada está estabilizada por interacciones no covalentes entre diferentes zonas de la cadena polipeptídica. Los aminoácidos cuyo residuo es hidrofóbico tienden a agruparse en el interior de la molécula; las interacciones locales por enlaces de hidrógeno entre los enlaces peptídicos vecinos dan lugar a hélices α y láminas β. Muchas proteínas se construyen a partir de unidades modulares que son regiones globulares conocidas como* dominios*; típicamente las proteínas pequeñas presentan un único dominio mientras que las proteínas más grandes tienen varios dominios unidos entre sí a través de cortas zonas de la cadena polipeptídica. A medida que las proteínas fueron evolucionando, los dominios fueron modificándose y combinándose con otros dominios construyéndose así nuevas proteínas.

Las proteínas pueden unirse entre sí formando grandes estructuras a través de las mismas fuerzas no covalentes que determinan el plegado de las proteínas. Las proteínas que presentan lugares de unión para su propia superficie se pueden ensamblar formando dímeros, anillos cerrados estructuras esféricas o polímeros helicoidales. Algunas mezclas de proteínas y de ácidos nucleicos se pueden ensamblar espontáneamente en un tubo de ensayo produciendo estructuras complejas pero muchos procesos de ensamblaje presentan pasos irreversibles de modo que no todas las estructuras de la célula son capaces de reensamblarse espontáneamente después de haber sido disociadas en sus elementos constituyentes.

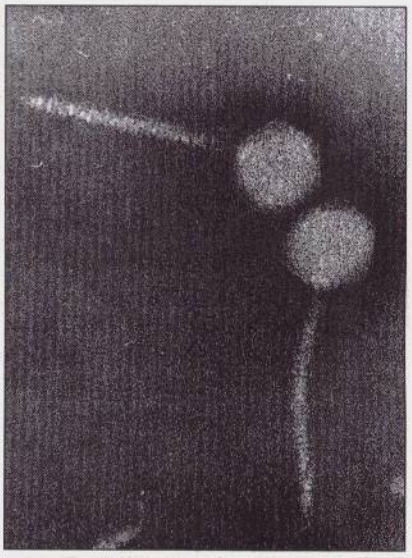


Figura 3-53 Electronmicrografía del bacteriófago lambda. La punta de la cola del virus se une específicamente a una proteína determinada de la superficie de una célula bacteriana, y a continuación un DNA densamente empaquetado, situado en la cabeza del virus, es inyectado a la célula a través de la cola del virus. La cola tiene una longitud precisa, determinada por el mecanismo que se muestra en la Figura 3-52A.

Las proteínas como catalizadores[34]

Las propiedades químicas de una molécula proteica dependen casi completamente de los residuos de aminoácidos que quedan expuestos en su superficie y que son capaces de formar enlaces débiles no covalentes con otras moléculas. Cuando una molécula proteica se une a otra molécula, a esta segunda molécula se la denomina **ligando**. Puesto que la interacción eficaz entre una molécula proteica y un ligando requiere que se formen simultáneamente entre ambas moléculas varios enlaces débiles, los únicos ligandos que se pueden fijar fuertemente a una proteína determinada son los que se adaptan exactamente a su superficie.

La región de una proteína que se asocia con un ligando recibe el nombre de **lugar de unión** de dicha proteína y suele tener forma de cavidad, constituida por una disposición específica de aminoácidos en la superficie de la proteína. A menudo estos aminoácidos pertenecen a zonas muy distantes de la cadena polipeptídica (Figura 3-55) y representan una pequeña fracción del número total de aminoácidos presentes. El resto de la molécula proteica es necesario para mantener la cadena polipeptídica en posición correcta y para suministrar lugares de unión adicionales con finalidad reguladora; normalmente el interior de la proteína únicamente es importante en cuanto confiere a la superficie de la molécula una forma y una rigidez adecuadas.

La conformación de una proteína determina sus propiedades químicas[20]

A menudo los residuos superficiales de una proteína interaccionan de tal manera que alteran la reactividad química de algunos residuos determinados de aminoácidos. Estas interaciones son de diferentes tipos.

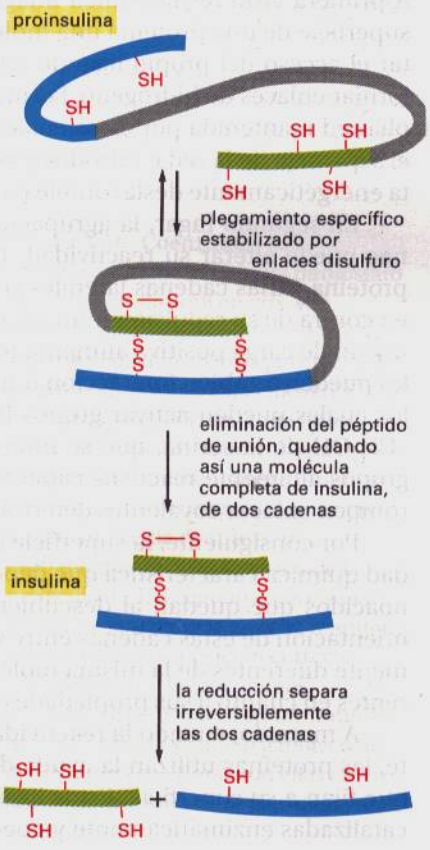


Figura 3-54 La hormona polipeptídica insulina no puede formarse de nuevo de forma espontánea si se rompen sus puentes disulfuro. Se sintetiza como una gran proteína (*proinsulina*), la cual es dividida por una enzima después de que la cadena polipeptídica se haya plegado adoptando una forma específica. La escisión de parte de la cadena polipeptídica de la proinsulina supone una pérdida irreparable de la información necesaria para que la proteína se pliegue espontáneamente adoptando su conformación normal.

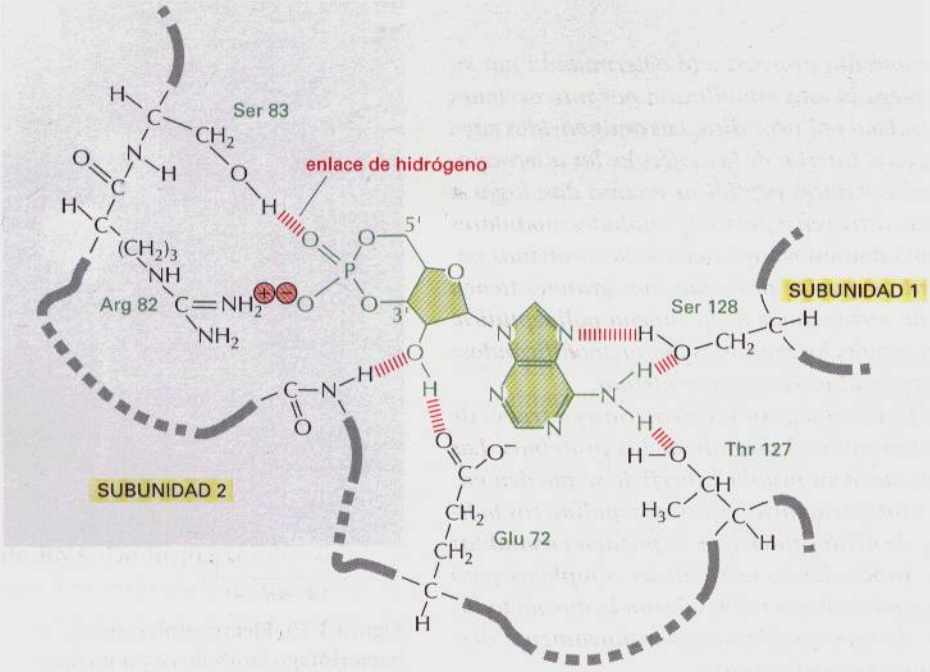


Figura 3-55 Lugar de unión a ligando de la proteína activadora de un gen por catabolito (CAP, de Catabolite Gene Activator Protein). La unión por enlaces de hidrógeno entre CAP y su ligando, el AMP cíclico (*verde*) se determindó por análisis cristalográfico de rayos X del complejo. Como se indica, las dos subunidades idénticas del dímero cooperan formando este lugar de unión (véase también Figura 3-45). (Por cortesía de Tom Steitz.)

En primer lugar, zonas vecinas de la cadena polipeptídica pueden interaccionar de manera que restrinjan el acceso de moléculas de agua a otras zonas de la superficie proteica. Puesto que las moléculas de agua tienden a forma enlaces de hidrógeno, compiten con los ligandos por ciertos residuos de aminoácidos de la superficie proteica (Figura 3-56). Por consiguiente, la intensidad de los enlaces de hidrógeno (y de las interacciones iónicas) entre las proteínas y sus ligandos queda altamente incrementada cuando las moléculas de agua son excluidas. A primera vista resulta difícil imaginar un mecanismo que pueda excluir de la superficie de una proteína una molécula tan pequeña como la del agua sin afectar el acceso del propio ligando. Sin embargo, y debido a su clara tendencia a formar enlaces de hidrógeno, las moléculas de agua se hallan formando una amplia red mantenida por estos enlaces (véase Panel 2-1, págs. 50-51) y a menudo el separarse de la red e introducirse en una grieta de la superficie proteica resulta energéticamente desfavorable para las distintas moléculas individuales.

En segundo lugar, la agrupación de residuos de aminoácidos polares vecinos puede alterar su reactividad. Por ejemplo, si debido al plegamiento de la proteína varias cadenas laterales con carga negativa son inducidas a agruparse, en contra de su repulsión mutua, la afinidad de cada residuo de aminoácido por un ion de carga positiva aumenta marcadamente. Determinadas cadenas laterales pueden también interaccionar una con otra a través de enlaces de hidrógeno, los cuales pueden activar grupos laterales normalmente no reactivos (como el $-CH_2OH$ de la serina, que se muestra en la Figura 3-57) transformándolos en grupos altamente reactivos capaces de intervenir en reacciones que generan o rompen enlaces covalentes determinados.

Por consiguiente, la superficie de cada molécula proteica tiene una reactividad química característica que depende no sólo de las cadenas laterales de aminoácidos que quedan al descubierto, sino que depende también de la exacta orientación de estas cadenas entre sí. Por esta razón, dos conformaciones ligeramente diferentes de la misma molécula proteica pueden ser enormemente diferentes en cuanto a sus propiedades químicas.

A menudo, cuando la reactividad de las cadenas laterales resulta insuficiente, las proteínas utilizan la ayuda de determinadas moléculas no polipeptídicas que fijan a su superficie. Estos ligandos actúan de **coenzimas** en las reacciones catalizadas enzimáticamente y pueden estar tan fuertemente unidas a la proteí-

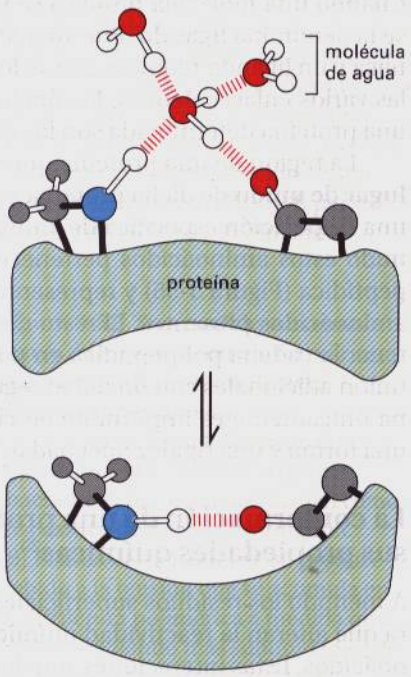


Figura 3-56 Competencia por la formación de enlaces de hidrógeno. La habilidad de las moléculas de agua para favorecer la formación de enlaces de hidrógeno con grupos de la superficie de la proteína reduce notablemente la tendencia de estos grupos a unirse unos con otros.

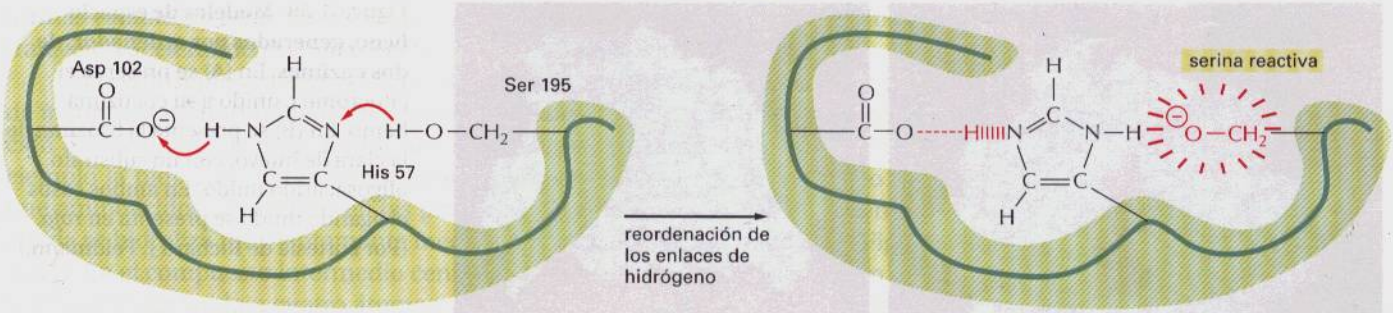


Figura 3-57 Un aminoácido extraordinariamente reactivo en el lugar activo de una enzima. El ejemplo que se muestra es la "tríada catalítica" que se presenta en la quimotripsina, en la elastasa y en otras serina proteasas (véase Figura 3-39). La cadena lateral del ácido aspártico induce a la histidina a eliminar el protón de la serina 195, lo cual activa la serina para formar un enlace covalente con el substrato de la enzima hidrolizando un enlace peptídico como se ilustra en la Figura 3-64.

na que llegan a formar parte efectiva de la propia proteína. Ejemplos de este caso los hallamos en los grupos *hemo* (que contienen hierro) de la hemoglobina y de los citocromos, en la *tiamina pirofosfato* de las enzimas implicadas en la transferencia de grupos aldehído y en la *biotina* de las enzimas que participan en la transferencia de grupos carboxilo. La mayoría de coenzimas son moléculas orgánicas muy complejas, seleccionadas en base a la reactividad química que adquieren cuando se unen a la superficie de una proteína. Además de su lugar reactivo, una coenzima tiene otros residuos que la fijan a su proteína huésped (Figura 3-58). La Figura 3-59A muestra un modelo espacial compacto de una enzima unida a su coenzima.

El primer paso de la catálisis enzimática es la unión del substrato[35]

Una de las funciones más importantes de las proteínas consiste en actuar como enzimas, catalizando reacciones químicas determinadas. En este caso el ligando es la molécula de **substrato** y la unión del substrato a la enzima es un preludio esencial de la reacción química (Figura 3-59B). Si denominamos a la enzima E, al substrato S y al producto P, la reacción básica es $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$. A partir de esta simple representación de una reacción catalizada por una enzima, podemos ver que existe un límite a la cantidad de substrato que cada molécula de enzima puede procesar en un tiempo dado. Si se incrementa la concentración de substrato, la velocidad a la que se forma el producto también se incrementa, hasta alcanzar un valor máximo (Figura 3-60). En este punto la molécula de enzima se halla saturada de substrato y la velocidad de reacción (denominada $V_{máx}$) depende únicamente de la velocidad a la que sea procesada la molécula de substrato. Esta velocidad dividida por la concentración de la enzima constituye

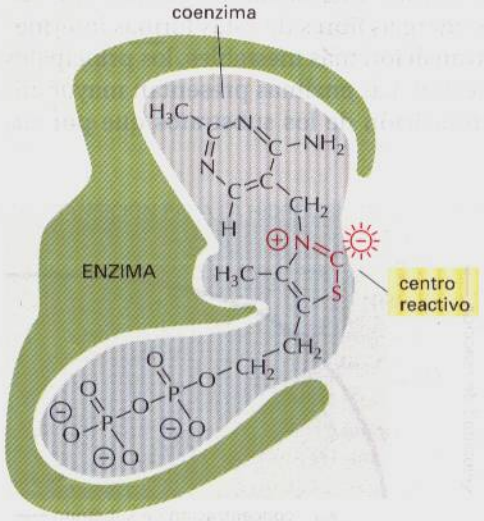


Figura 3-58 Coenzimas. Las coenzimas, como la tiamina pirofosfato (TPP) mostrada aquí en *gris*, son pequeñas moléculas que se unen a la superficie de una enzima permitiéndole catalizar reacciones específicas. La reactividad del TPP depende de su átomo de carbono "acídico", que intercambia rápidamente su átomo de hidrógeno por un átomo de carbono de una molécula de substrato. Probablemente otras regiones de la molécula de TPP actúan como "asas" mediante las cuales la enzima mantiene a la coenzima en posición correcta. Probablemente las coenzimas evolucionaron primero en un "mundo de RNA", donde se unían a moléculas de RNA para colaborar con ellas en los procesos de catálisis (se discute en el Capítulo 1).

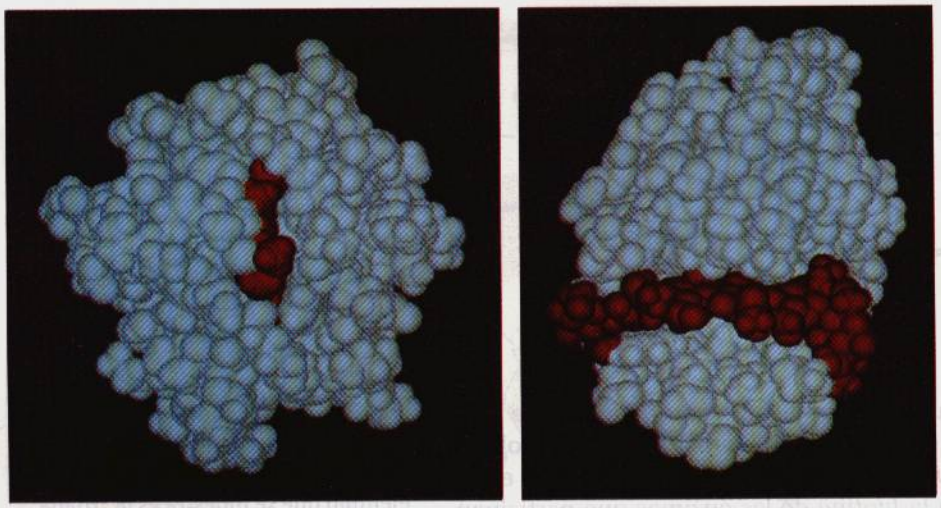


Figura 3-59 Modelos de espacio lleno, generados por ordenador, de dos enzimas. En (A) se presenta el citocromo c unido a su coenzima hemo. En (B) se presenta la lisozima de la clara de huevo, con un substrato oligosacárido unido. En ambos casos el ligando unido se presenta en *rojo*. (Por cortesía de Richard J. Feldmann.)

el **número de recambio**. A menudo el número de recambio es de aproximadamente 1000 moléculas de substrato procesadas cada segundo por cada molécula de enzima pero puede llegar a alcanzar valores mayores en casos extremos.

El otro parámetro cinético utilizado con frecuencia para catacterizar a una enzima es su K_M, que es la concentración de substato que permite alcanzar la mitad de la velocidad máxima de la reacción (Figura 3-60). Una K_M *baja* significa que la enzima alcanza su máxima velocidad catalítica a una *baja concentración* del substrato, y por lo general indica que la enzima se une a su substrato muy fuertemente.

Las enzimas aceleran las reacciones estabilizando determinados estados de transición[36]

Las enzimas consiguen que las reacciones químicas se produzcan a velocidades extremadamente altas –mucho más que a través de cualquier catálisis sintética. Esta eficiencia puede ser atribuida a varios factores. En primer lugar, la enzima actúa aumentando la concentración local de las moléculas de substrato en el lugar catalítico y manteniendo los átomos adecuados en una orientación correcta para la reacción que se producirá a continuación. Sin embargo, lo más importante es que una parte de la energía de fijación contribuye directamente a la catálisis. Antes de formar los productos finales de la reacción, las moléculas del substrato pasan a través de una serie de formas intermedias de geometría y distribución electrónica alteradas y son las energías libres de estas formas intermedias y en especial las de los **estados de transición** más inestables, los principales determinantes de la velocidad de la reacción. Las enzimas presentan mayor afinidad por estos estados inestables de transición de los substratos que por sus

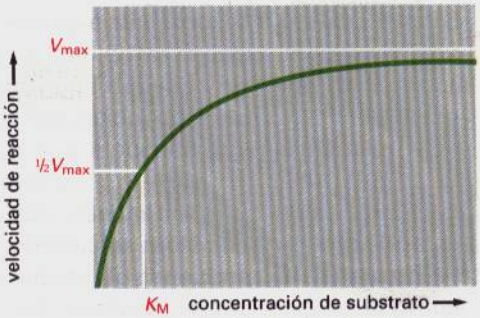


Figura 3-60 Cinética enzimática. La velocidad de una reacción enzimática (V) aumenta cuando aumenta la concentración del substrato, hasta alcanzar un valor máximo (V_{max}). En este punto, todos los lugares de unión al substrato de las moléculas enzimáticas están ocupados, y la velocidad de la reacción está limitada por la velocidad del proceso de catálisis sobre la superficie de la enzima. Para la mayoria de las enzimas la concentración de substrato a la que la velocidad es igual a la mitad de la velocidad máxima (K_M) constituye una medida de la fuerza con que la enzima se une al substrato; cuanto mayor es el valor de la K_M, menor es la fuerza de unión.

formas estables, y estas interacciones disminuyen las energías de los estados de transición acelerando así una reacción determinada (Figura 3-61).

Una clara demostración de cómo al estabilizar un estado de transición se puede incrementar enormemente la velocidad de la reacción la constituye la producción intencionada de anticuerpos que actúan como enzimas. Consideremos por ejemplo la hidrólisis de un enlace amida, que es similar al enlace peptídico que une aminoácidos adyacentes en las proteínas. En una solución acuosa un enlace amida se hidroliza muy lentamente mediante el mecanismo ilustrado en la Figura 3-62A. En el compuesto intermedio central, o estado de transición, el carbono carbonilo se halla unido a cuatro átomos situados en los vértices de un tetraedro. Se puede obtener un anticuerpo que actúe como una enzima generando anticuerpos que se unan fuertemente a un análogo estable de este *compuesto intermedio tetraédrico*, muy inestable, tal como se ilustra en la Figura 3-62B. Este *anticuerpo catalítico* se une al compuesto intermedio tetraédrico y lo estabiliza, incrementando así más de 10 000 veces la velocidad de hidrólisis espontánea del enlace amida.

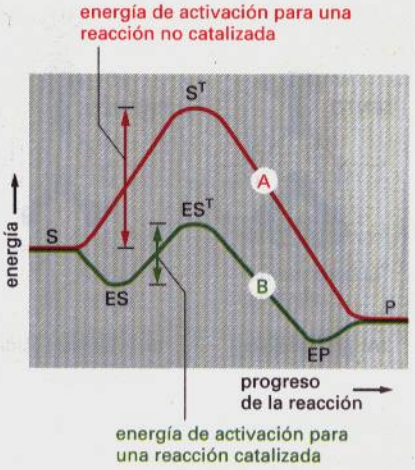


Figura 3-61 Las enzimas aceleran las reacciones químicas disminuyendo la energía de activación. A menudo tanto las reacciones no catalizadas (A) como la catalizada por una enzima (B) se producen a través de diversos estados de transición. El estado de transición de mayor energía (S^T y ES^T) es el que determina la energía de activación y limita la velocidad de la reacción (S=substrato; P=producto de la reacción).

Las enzimas pueden facilitar la formación y la rotura de enlaces covalentes a través de una catálisis ácida y básica simultánea[37]

Las enzimas son mejores catalizadores que los anticuerpos catalíticos. Además de unirse fuertemente al estado de transición, el lugar activo de una enzima contiene átomos situados en el espacio de forma precisa que aceleran la reacción alterando la distribución de los electrones de los átomos implicados en la formación y la rotura de los enlaces covalentes. Los enlaces peptídicos, por ejemplo, pueden ser hidrolizados en ausencia de una enzima exponiendo un polipéptido a una base fuerte o a un ácido fuerte, como se explica en la Figura 3-63B y C. Sin embargo, las enzimas son únicas en hacer posible la catálisis ácida y básica simultánea, ya que impiden que los residuos ácidos y básicos necesarios se combinen unos con otros (como ocurriría si estuvieran en solución) al mantenerlos unidos a la rígida estructura de la proteína (Figura 3-63D).

Hay que precisar la adecuación entre una enzima y su substrato. Un pequeño cambio introducido mediante ingeniería genética en el lugar activo de una enzima puede tener consecuencias extraordinarias. Por ejemplo, al reemplazar un ácido glutámico por un ácido aspártico en una enzima se desplaza la posición del ion carboxilato catalítico alrededor de 1Å (aproximadamente el radio de un átomo de hidrógeno), y ello es suficiente para reducir la actividad de la enzima más de cien veces.

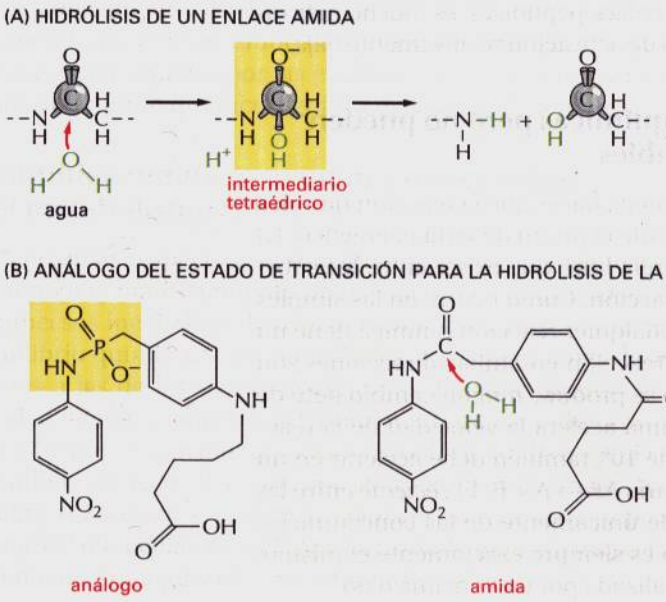


Figura 3-62 Anticuerpos catalíticos. La estabilización de un estado de transición por un anticuerpo genera una enzima. (A) La reacción de la hidrólisis de un enlace amida se produce a través de un *intermedio tetraédrico*, que es el estado de transición de alta energía de la reacción. (B) La molécula mostrada a la izquierda se unió covalentemente a una proteína y se utilizó como antígeno para generar un anticuerpo que resultó unirse fuertemente a la región de la molécula señalada en amarillo. Este anticuerpo también se une fuertemente al estado de transición en (A), por lo que actúa como una enzima que cataliza eficientemente la hidrólisis del enlace amida de la molécula que se muestra a la derecha.

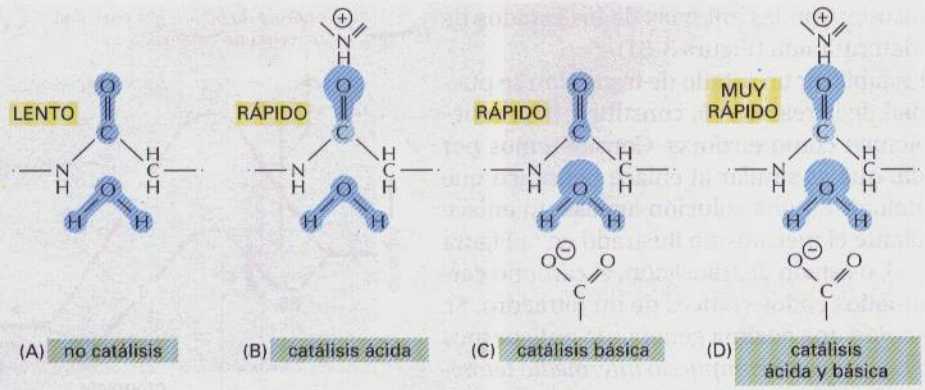


Figura 3-63 Catálisis ácida y catálisis básica. (A) El inicio de la reacción no catalizada que se presenta en la Figura 3-62A se ha dibujado aquí, utilizando el sombreado en *azul* como un indicador esquemático de la distribución electrónica del agua y de los enlaces carbonilo. (B) Un ácido tiende a dar un protón (H^+) a otros átomos. En combinación con el oxígeno del carbonilo, un ácido hace que los electrones tiendan a separarse del carbono carbonilo, haciendo que este átomo atraiga mucho más fuertemente el oxígeno electronegativo de la molécula de agua que ataca el enlace. (C) Una base tiende a captar H^+; en combinación con un hidrógeno de la molécula de agua atacante, una base hace que los electrones se desplacen hacia el oxígeno de la molécula de agua, haciendo que constituya un grupo más reactivo del carbono carbonilo. (D) Al presentar una disposición adecuada de átomos en su superficie, una enzima puede realizar una catálisis ácida y básica simultáneamente.

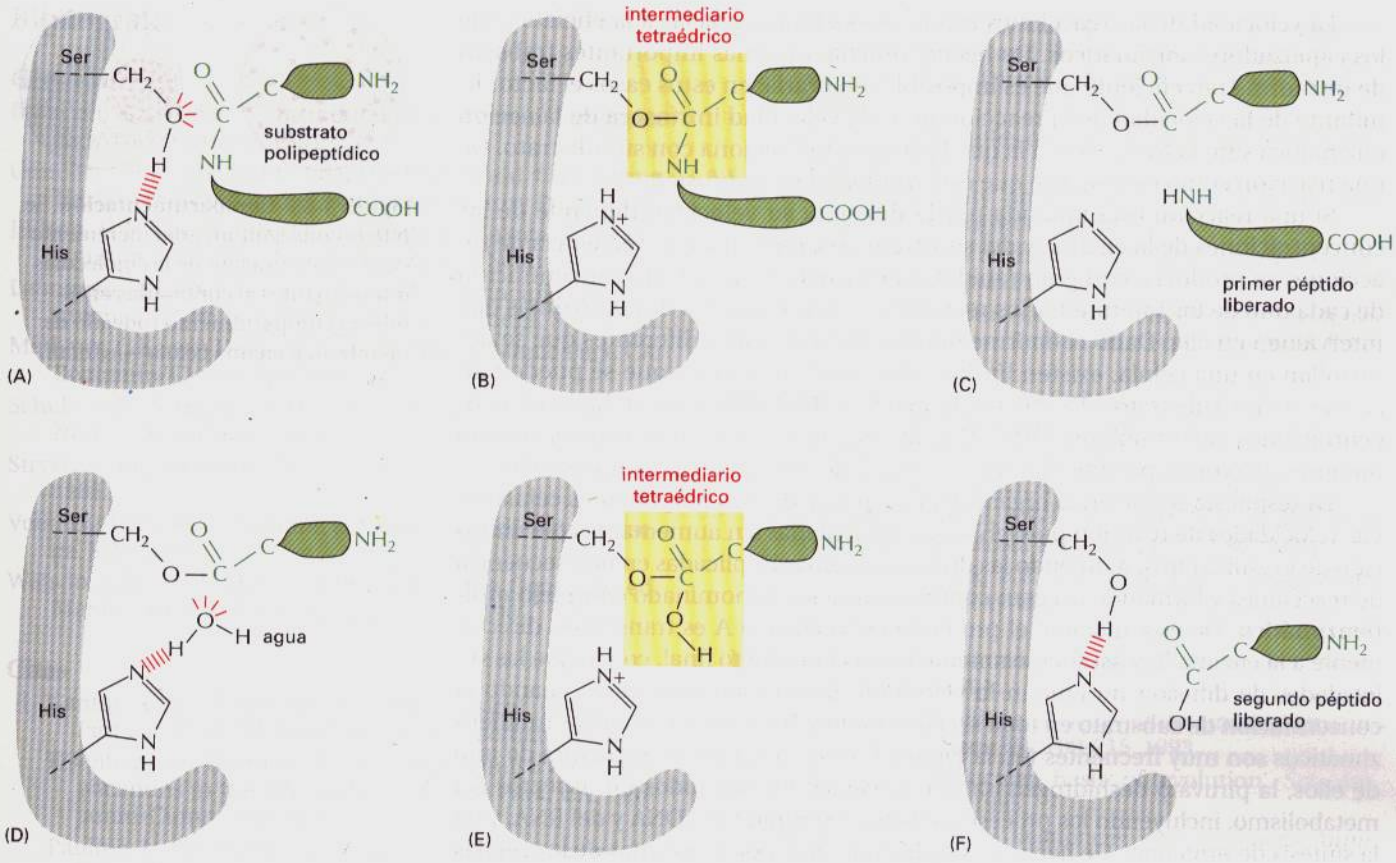
Además, las enzimas pueden incrementar las velocidades de reacción formando enlaces covalentes intermedios con sus substratos[38]

Además de los mecanismos comentados antes, muchas enzimas aceleran la velocidad de la reacción que catalizan interactuando de manera covalente con uno de sus substratos, de modo que el substrato queda unido a un residuo de aminoácido o a una molécula de coenzima. Generalmente cuando un substrato entra en el lugar de unión de la enzima, se une covalentemente a ella y entonces reacciona con un segundo substrato sobre la superficie de la enzima que rompe el enlace covalente que se acaba de formar. Al final de cada ciclo de reacciones se regenera la enzima libre.

Consideremos, por ejemplo, el mecanismo de acción de las serina proteasas. La reacción que catalizan, la hidrólisis de un enlace peptídico, está enormemente acelerada debido a la afinidad de la enzima por el compusto intermediario tetraédrico de la reacción. Pero una serina proteasa hace mucho más que lo que hace un típico anticuerpo catalítico: en lugar de esperar a que una molécula de oxígeno del agua ataque el carbono carbonilo, hace que la reacción transcurra mucho más rápidamente utilizando en primer lugar para este fin una cadena lateral de un aminoácido situada en el lugar adecuado (la serina activada de la Figura 3-57). Este paso rompe el enlace peptídico pero libera la enzima unida covalentemente al grupo carboxilo. Entonces, en un segundo paso muy rápido, este compuesto intermedio covalente se destruye por la adición catalizada enzimáticamente de una molécula de agua, lo cual completa la reacción y regenera la enzima libre (Figura 3-64). A pesar de que esta reacción en dos etapas es menos directa que la reacción en una etapa (en la que el agua se añade directamente al enlace peptídico), es mucho más rápida debido a que cada etapa tiene una energía de activación relativamente baja.

Las enzimas aceleran las reacciones químicas pero no pueden hacerlas energéticamente más favorables

Por muy sofisticada que sea una enzima, no puede hacer que la reacción química que cataliza resulte más o menos favorable desde el punto de vista energético. La enzima no puede alterar la diferencia de energía libre que existe entre los substratos iniciales y los productos finales de la reacción. Como ocurre en las simples interacciones de enlace antes mencionadas, cualquier reacción química tiene un *punto de equilibrio* en el que los flujos de la reacción en ambas direcciones son iguales; por consiguiente, en este punto ya no se produce ningún cambio neto de concentración (véase Figura 3-9). Si una enzima acelera la velocidad de la reacción en un sentido $A + B \rightarrow AB$ en un factor de 10^8, también debe acelerar en un factor de 10^8 la velocidad de la reacción contraria $AB \rightarrow A + B$. El *cociente* entre las velocidades de una y otra reacciones depende únicamente de las concentraciones de A, de B y de AB. El punto de equilibrio es siempre exactamente el mismo, independientemente de si la reacción está catalizada por una enzima o no.



Las enzimas pueden determinar el sentido de una vía acoplando determinadas reacciones a la hidrólisis del ATP[39]

La célula viva es un sistema químico que se halla lejos del equilibrio. El producto de cada enzima suele actuar como substrato de otra enzima de la vía metabólica y es consumido rápidamente. Lo que es más importante, por medio de las vías catalizadas enzimáticamente descritas en el Capítulo 2, muchas reacciones son impulsadas en una dirección gracias a su *acoplamiento* a la hidrólisis energéticamente favorable del ATP a ADP y fosfato inorgánico. Para que esta estrategia sea efectiva, los niveles de ATP se mantienen en unos valores nada cercanos a los de equilibrio, con un cociente elevado entre ATP y sus productos de hidrólisis (véase Capítulo 14). Por consiguiente, este acervo de ATP actúa como una "batería de reserva" manteniendo un flujo continuo de átomos y de energía a través de la célula a través de vías determinadas por las enzimas presentes. Para un sistema vivo, la proximidad al equilibrio químico significa degeneración y muerte.

Los complejos multienzimáticos ayudan a incrementar la velocidad del metabolismo celular[40]

La eficiencia de las enzimas respecto a su función aceleradora de las reacciones químicas es crucial para el mantenimiento de la vida. En efecto, las células han de luchar contra procesos inevitables de degeneración que avanzan inexorablemente hacia el equilibrio químico. Si las velocidades de las reacciones deseables no fueran superiores a las de las recciones opuestas, la célula pronto moriría. Midiendo la velocidad de utilización del ATP podemos tener una idea aproximada de la velocidad a la que se procude el metabolismo celular. Una célula típica de mamífero recambia (es decir, degrada por completo y substituye) todo su acervo de ATP, cada 1 o 2 minutos. Para cada célula esta renovación representa la utilización de una 10^7 moléculas de ATP por segundo (y para el cuerpo humano, aproximadamente un gramo de ATP cada minuto).

Figura 3-64 Algunas enzimas forman enlaces covalentes con sus substratos. En el ejemplo mostrado aquí, un grupo carbonilo de una cadena polipeptídica (en *verde*) forma un enlace covalente con un residuo de serina activado específicamente (véase Figura 3-57) de una serina proteasa (en *gris*), el cual rompe la cadena polipeptídica. Cuando la porción no unida de la cadena polipeptídica se ha alejado por difusión, se produce un segundo paso en el cual una molécula de agua hidroliza el nuevo enlace covalente formado, separando así la porción de la cadena polipeptídica de la superficie de la enzima y liberando la serina para otro ciclo de reacción. Nótese que en esta reacción los intermediarios tetraédricos inestables (en *amarillo*) son los estados de transición, y que ambos son estabilizados por la enzima.

La velocidad de las reacciones celulares es elevada gracias a la eficiencia de los catalizadores enzimáticos. De hecho, muchas enzimas importantes trabajan de una forma tan eficiente que es imposible mejorarla: en estos casos el factor limitante de la velocidad de la reacción no es la velocidad intrínseca de la acción enzimática sino la frecuencia a la que la enzima interaciona con su substrato. De una reacción como ésta se dice que está *limitada por la difusión*.

Si una reacción está limitada por la difusión, su velocidad depende de las concentraciones de la enzima y del substrato. Así, para que una secuencia de reacciones se produzca con gran rapidez ha de existir una elevada concentración de cada uno de los intermediarios metabólicos y de cada una de las enzimas que intervienen en ella. Dado el enorme número de reacciones diferentes que se desarrollan en una célula, existen límites a las concentraciones que se pueden alcanzar de los substratos. De hecho, la mayoría de metabolitos se hallan a concentraciones micromolares (10^{-6} M) y las enzimas a concentraciones mucho menores. ¿Cómo es posible mantener velocidades metabólicas muy elevadas?

La respuesta reside en la organización espacial de los componentes celulares. Las velocidades de reacción pueden ser incrementadas sin aumentar la concentración de los substratos, reuniendo las diversas enzimas implicadas en una secuencia de reacciones y formando un gran complejo proteico denominado **complejo multienzimático**. De esta manera, el producto de la enzima A es transferido directamente a la enzima B, y así sucesivamente hasta el producto final, con lo que las velocidades de difusión no limitan la velocidad de reacción ni siquiera cuando la concentración de substrato en toda la célula es muy baja. Estos complejos multienzimáticos son muy frecuentes (en la Figura 2-41 se mostraba la estructura de uno de ellos, la piruvato deshidrogenasa) e intervienen en casi todos los aspectos del metabolismo, incluyendo los procesos genéticos centrales del DNA y del RNA, y en la síntesis de proteínas. De hecho es posible que muy pocas enzimas de las células eucariotas difundan libremente en solución. Por el contrario, la mayoría de las enzimas pueden haber desarrollado zonas de unión que les permitan concentrarse con otras proteínas de función relacionada en determinadas regiones de la célula, incrementándose así la velocidad y la eficiencia de las reacciones que catalizan.

Las células disponen además de otro sistema de incrementar la velocidad de las reacciones metabólicas. Éste depende del enorme sistema de membranas intracelulares de las células eucariotas. Estas membranas pueden segregar ciertas substancias y las enzimas que actúan sobre ellas, dentro del mismo compartimiento rodeado de membrana, como el retículo endoplasmático o el núcleo celular. Si, por ejemplo, el compartimiento ocupa un total de un 10% del volumen celular, la concentración de los reactantes dentro del compartimiento sería 10 veces mayor que en una célula similar no compartimentada (Figura 3-65). Las reacciones que podrían estar limitadas por la velocidad de difusión, pueden de esta manera incrementar su velocidad en este mismo factor.

En el Capítulo 5 se dan más detalles de la estructura y función de las proteínas. En él se discute de qué forma las células construyen diminutas máquinas proteicas.

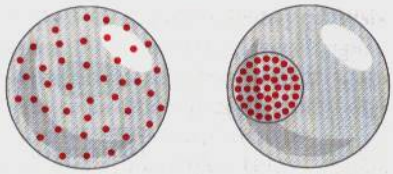


Figura 3-65 Compartimentación. Se puede conseguir un gran incremento en la concentración de las moléculas interactuantes al confinarlas en el mismo compartimiento rodeado de membrana, en una célula eucariota.

Resumen

La función biológica de una proteína depende de las propiedades químicas detalladas de su superficie. Los lugares de unión para ligandos están constituidos por cavidades de la superficie en las cuales diversas cadenas laterales se localizan de una forma precisa gracias al plegamiento de la proteína. De esta forma, las cadenas laterales de aminoácidos normalmente no reactivas puede hallarse activadas. Las enzimas aceleran enormemente las velocidades de las reacciones uniéndose a los estados de transición de alta energía, de una forma especialmente intensa; también desarrollan catálisis ácidas y básicas simultáneamente. A menudo, las velocidades de las reacciones enzimáticas son tan rápidas que únicamente están limitadas por la difusión; las velocidades pueden incrementarse aún más si las enzimas que actúan de forma secuencial se halla unidas formando un mismo complejo multienzimático o si las enzimas y sus substratos se hallan confinadas en el mismo compartimiento de la célula.

Bibliografía

General

Branden, C.; Tooze, J. Introduction to Protein Structure. New York: Garland, 1991.

Gesteland, R.F.; Atkins, J.F., eds. The RNA World. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993.

Judson, H.F. The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology. New York: Simon & Schuster, 1979.

Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. Principios de Bioquímica, 2.ª ed. Barcelona: Ediciones Omega, S.A., 1993.

Mathews, C.K.; van Holde, K.E. Biochemistry. Menlo Park, CA: Benjamin/Cummings, 1990.

Schulz, G.E.; Schirmer, R.H. Principles of Protein Structure. New York: Springer, 1979.

Stryer, L. Biochemistry, 3rd ed. New York: W.H. Freeman, 1988.

Voet, D.; Voet, J.G. Bioquímica. Barcelona: Ediciones Omega, S.A., 1992.

Watson, J.D., et al. Molecular Biology of the Gene, 3rd ed. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings, 1987.

Citas

1. Cantor, C.R.; Schimmel, P.R. Biophysical Chemistry, Part I and Part III. New York: W.H. Freeman, 1980.

   Eisenberg, D.; Crothers, D. Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings, 1979.

   Pauling, L. The Nature of the Chemical Bond, 3rd ed. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1960.

   Whitesides, G.M.; Mathias, J.P.; Seto, C.T. Molecular self-assembly and nanochemistry: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures. *Science* 254:1312-1319, 1991.

2. Abeles, R.H., Frey, P.A.; Jencks, W.P. Biochemistry. Boston: Jones and Bartlett, 1992.

   Fersht, A.R. The hydrogen bond in molecular recognition. *Trends Biochem. Sci.* 12:301-304, 1987.

3. Cohen, C.; Parry, D.A.D. α-helical coiled coils–a widespread motif in proteins. *Trends Biochem. Sci.* 11:245-248, 1986.

   Dickerson, R.E. The DNA helix and how it is read. *Sci. Am.* 249(6):94-111, 1983.

4. Berg, H.C. Random Walks in Biology. Princeton, NJ: Princeton University Press, 1983.

   Einstein, A. Investigations on the Theory of Brownian Movement. New York: Dover, 1956.

   Lavenda, B.H. Brownian motion. *Sci. Am.* 252(2):70-85, 1985.

5. Lehninger, A.L. Bioenergetic: The Molecular Basis of Biological Energy Transformations, 2nd ed. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings, 1971.

6. Karplus, M.; McCammon, J.A. The dynamics of proteins. *Sci. Am.* 254(4):42-51, 1986.

   Karplus, M.; Petsko, G.A. Molecular dynamics simulations in biology. *Nature* 347:631-639, 1990.

   McCammon, J.A.; Harvey, S.C. Dynamics of Proteins and Nucleic Acids. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1987.

7. Kirkwood, T.B.; Rosenberger, R.F.; Galas, D.J.; eds. Accuracy in Molecular Processes: Its Control and Relevance to Living Systems. London: Chapman and Hall, 1986.

8. Berg, P.; Singer, M. Dealing with Genes. The Language of Heredity. Mill Valley, CA: University Science Books, 1992.

   Rosenfield, I.; Ziff, E.; Van Loon, B. DNA for Beginners. London: Writers and Readers Publishing Cooperative. New York: Distribuido en EE UU por Norton, 1983.

   Saenger, W. Principles of Nucleic Acid Structure. Berlin: Springer, 1984.

9. Moore, J. Heredity and Development, 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1992.

   Olby, R. The Path to the Double Helix. Seattle: University of Washington Press, 1974.

   Stent, G.S.; Calendar, A.Z. Molecular Genetics: An Introductory Narrative, 2nd ed. San Francisco: W.H. Freeman, 1978.

10. Watson, J.D.; Crick, F.H.C. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738, 1953.

11. Felsenfeld, G. DNA. *Sci. Am.* 253(4):58-66, 1985.

    Meselson, M.; Stahl, F.W. The replication of DNA in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44:671-682, 1958.

    Watson, J.D.; Crick, F.H.C. Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171:964-967, 1953.

12. Drake, J.W. Spontaneous mutation. *Annu. Rev. Genet.* 25:125-1465, 1991.

    Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709-715, 1993.

    Wilson, A.C. Molecular basis of evolution. *Sci. Am.* 253(4):164-173, 1985.

13. Sanger, F. Sequences, sequences, and sequences. *Annu. Rev. Biochem.* 57:1-28, 1988.

    Thompson, E.O.P. The insulin molecule. *Sci. Am.* 192(5):36-41, 1955.

    Yanofsky, C. Gene structure and protein structure. *Sci. Am.* 216(5):80-94, 1967.

14. Brenner, S.; Jacob, F.; Meselson, M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190:576-581, 1961.

    Darnell, J.E., Jr. RNA. *Sci. Am.* 253(4):68-78, 1985.

15. Chambon, P. Split genes. *Sci. Am.* 244(5):60-71, 1981.

    Steitz, J.A. Snurps. *Sci. Am.* 258(6):58-63, 1988.

    Witkowski, J.A. The discovery of "split" genes: a scientific revolution. *Trends Biochem. Sci.* 13:110-113, 1988.

16. Crick, F.H.C. The genetic code: III. *Sci. Am.* 215(4):55-62, 1966.

    The Genetic Code. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31, 1965.

17. Rich, A.; Kim, S.H. The three-dimensional structure of transfer RNA. *Sci. Am.* 238(1):52-62, 1978.

18. Lake, J.A. The ribosome. *Sci. Am.* 245(2):84-97, 1981.

    Watson, J.D. Involvement of RNA in the synthesis of proteins. *Science* 140:17-26, 1963.

    Zamecnik, P. The machinery of protein synthesis. *Trends Biochem. Sci.* 9:464-466, 1984.

19. Altman, S.; Baer, M.; Guerrier-Takada, C.; Viogue, A. Enzymatic cleavage of RNA by RNA. *Trends Biochem. Sci.* 11:515-518, 1986.

    Cech, T. RNA as an enzyme. *Sci. Am.* 255(5):64-75, 1986.

    Cech, T. Fishing for fresh catalysts. *Nature* 365:204-205, 1993.

    Michel, F.; Westhof, E. Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J. Mol. Biol.* 216:585-610, 1990.

Noller, H.F. Ribosomal RNA and translation. *Annu. Rev. Biochem.* 60:191-227, 1991.

Noller, H.F.; Hoffarth, V.; Zimniak, L. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 256:1416-1419, 1992.

20. Branden, C.; Tooze, J. Introduction to Protein Structure. New York: Garland, 1991.

Creighton, T.E. Proteins: Structure and Molecular Properties, 2nd ed. New York: W.H. Freeman, 1993.

Dickerson, R.W.; Geis, I. The Structure and Action of Proteins. New York: Harper & Row, 1969.

Schulz, G.E.; Schirmer, R.H. Principles of Protein Structure. New York: Springer, 1990.

21. Anfinsen, C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181:223-230, 1973.

Baldwin, R.L. Seeding protein folding. *Trends Biochem. Sci.* 11:6-9, 1986.

Creighton, T.E. Disulphide bonds and protein stability. *Bioessays* 8:57-63, 1988.

Richards, F.M. The protein folding problem. *Sci. Amer.* 264(1):54-63, 1991.

Rupley, J.A.; Gratton, E.; Careri, G. Water and globular proteins. *Trends Biochem Sci.* 8:18-22, 1983.

22. Doolittle, R.F. Proteins. *Sci. Am.* 253(4):88-99, 1985.

Milner-White, E.J.; Proet, R. Loops, bulges, turns and hairpins in proteins. *Trends Biochem Sci.* 12:189-192, 1987.

Pauling, L.; Corey, R.B. Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: two new pleated sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 37: 729-740, 1951.

Pauling, L.; Corey, R.B.; Branson, H.R. The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. Proc. Natl. Acad. Sci. *USA* 27:205-211, 1951.

Richardson, J.S. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* 34:167-339, 1981.

23. Scott, J.E. Molecules for strength and shape. *Trends Biochem. Sci.* 12:318-321, 1987.

24. Branden, C.; Tooze, J. Introduction to Protein Structure. New York: Garland, 1991.

Hardie, D.G.; Coggins, J.R. Multidomain Proteins–Structure and Evolution. Amsterdam: Elsevier, 1986.

25. Doolittle, R.F. The genealogy of some recently evolved vertebrate proteins. *Trends Biochem. Sci.* 10:233-237, 1985.

Neurath, H. Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224:350-357, 1984.

26. Blake, C. Exons and the evolution of proteins. *Trends Biochem. Sci.* 8:11-13, 1983.

Gilbert, W. Genes-in-pieces revisited. *Science* 228:823-824, 1985.

McCarthy, A.D.; Hardie, D.G. Fatty acid synthase: an example of protein evolution by gene fusion. *Trends Biochem. Sci.* 9:60-63, 1984.

Rossmann, M.G.; Argos, P. Protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 50:497-532, 1981.

27. Gehring, W.J. On the homeobox and its significance. *Bioessays* 5:3-4; 1986.

Hanks, S.K.; Quinn, A.m.; Hunter, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241:42-52, 1988.

Shabb, J.B.; Corbin, J.D. Cyclic nucleotide-binding domains in proteins having diverse function. *J. Biol. Chem.* 267:5723-5726, 1992.

Thornton, J.M.; Gardner, S.P. Protein motifs and database searching. *Trends Biochem. Sci.* 14:300-304, 1989.

28. Bajaj, M.; Blundell, T. Evolution and the tertiary structure of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 13:453-492, 1984.

Klug, A. From macromolecules to biological assemblies. *Biosci. Rep.* 3:395-430, 1983.

Metzler, D.E. Bioquímica. Barcelona: Ediciones Omega, S.A., 1981. (El Capítulo 4 describe cómo las macromoléculas se empaquetan formando grandes ensamblajes.)

29. Caspar, D.L.D.; Klug, A. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27:1-24, 1962.

Goodsell, D.S. Inside a living cell. *Trends Biochem. Sci.* 16:203-206, 1991.

30. Cohen, C.; Parry, D.A.D. α-helical coiled coils–a widespread motif in proteins. *Trends Biochem. Sci.* 11:245-248, 1986.

31. Harrison, S.C. Multiple modes of subunit association in the structures of simple spherical viruses. *Trends Biochem. Sci.* 9:345-351, 1984.

Harrison, S.C. Viruses. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 2:293-299, 1992.

Hogle, J.M.; Chow, M.; Filman, D.J. The structure of polio virus. *Sci. Am.* 256(3):42-49, 1987,

Rossmann, M.G.; Johnson, J.E. Icosahedral RNA virus structure. *Annu. Rev. Biochem.* 58:533-573, 1989.

32. Fraenkel-Conrat, H.; Williams, R.C. Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 41:690-698, 1955.

Hendrix, R.W. Tail length determination in double-stranded DNA bacteriophages. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 136:21-29, 1988.

Namba, K.; Caspar, D.L.D.; Stubbs, G.J. Computer graphics representation of levels of organization in tobacco mosaic virus structure. *Science* 227:773-776, 1985.

Nomura, M. Assembly of bacterial ribosomes. *Science* 179:864-873, 1973.

Trinick, J. Understanding the functions of titin and nebulin. *FEBS Lett.* 307:44-48, 1992.

33. Mathews, C.K., Kutter, E.M.; Mosig, G.; Berget, P.B. Bacteriophage T4, Chaps. 1 and 4. Washington, DC: American Society of Microbiologists, 1983.

Steiner, D.F.; Kemmler, W.; Tager, H.S.; Peterson, J.D. Proteolytic processinnn in the biosynthesis of insulin and other proteins. *Fed. Proc.* 33:2105-2115, 1974.

34. Dressler, D.; Potter, H. Discovering Enzymes. New York: Scientific American Library, 1991.

Fersht, A. Enzyme Structure and Mechanism, 2nd ed. New York: W.H. Freeman, 1985.

35. Fersht, A.R.; Leatherbarrow, R.J.; Wells, T.N.C. Binding energy and catalysis. *Trends Biochem. Sci.* 11:321-325, 1986.

Hansen, D.E.; Raines, R.T. Binding energy and enzymatic catalysis. *J. Chem. Educ.* 67:483-489, 1990.

36. Lerner, R.A.; Benkovic, S.J.; Schultz, P.G. At te crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. *Science* 252:659-667, 1991.

Lerner, R.A.; Tramontano, A. Catalytic antibodies. *Sci. Am.* 258(3):58-70, 1988.

Wolfenden, R. Analog approaches to the structure of the transition state in enzyme reactions. *Accounts Chem. Res.* 5:10-18, 1972.

37. Knowles, J.R. Tinkering with enzymes: what are we learning? *Science* 236:1252-1258, 1987.

Knowles, J.R. Enzyme catalysis; not different, just better. *Nature* 350:121-124, 1991.

38. Stroud, R.M. A family of protein-cutting proteins. *Sci. Am.* 231(1):74-88, 1974.
39. Wood, W.B.; Wilson, J.H.; Benbow, R.M.; Hood, L.E. Biochemistry, a Problem Approach, 2nd ed. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings, 1981. (Capítulos 9 y 15 y problemas anexos).
40. Barnes, S.J.; Weitzman, P.D.J. Organization of citric acid cycle enzymes into a multienzyme cluster. *FEBS Lett,* 201:267-270, 1986.

Berg, O.G.; von Hippel, P.H. Diffusion-controlled macromolecular interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Biochem.* 14:131-160, 1985.

Reed, L.J.; Cox, D.J. Multienzyme complexes. In The Enzymes, 3rd ed. (P.D. Boyer, ed.), Vol. 1, pp. 213-240. New York: Academic Press, 1970.

Genética molecular

II

5 Función de las proteínas

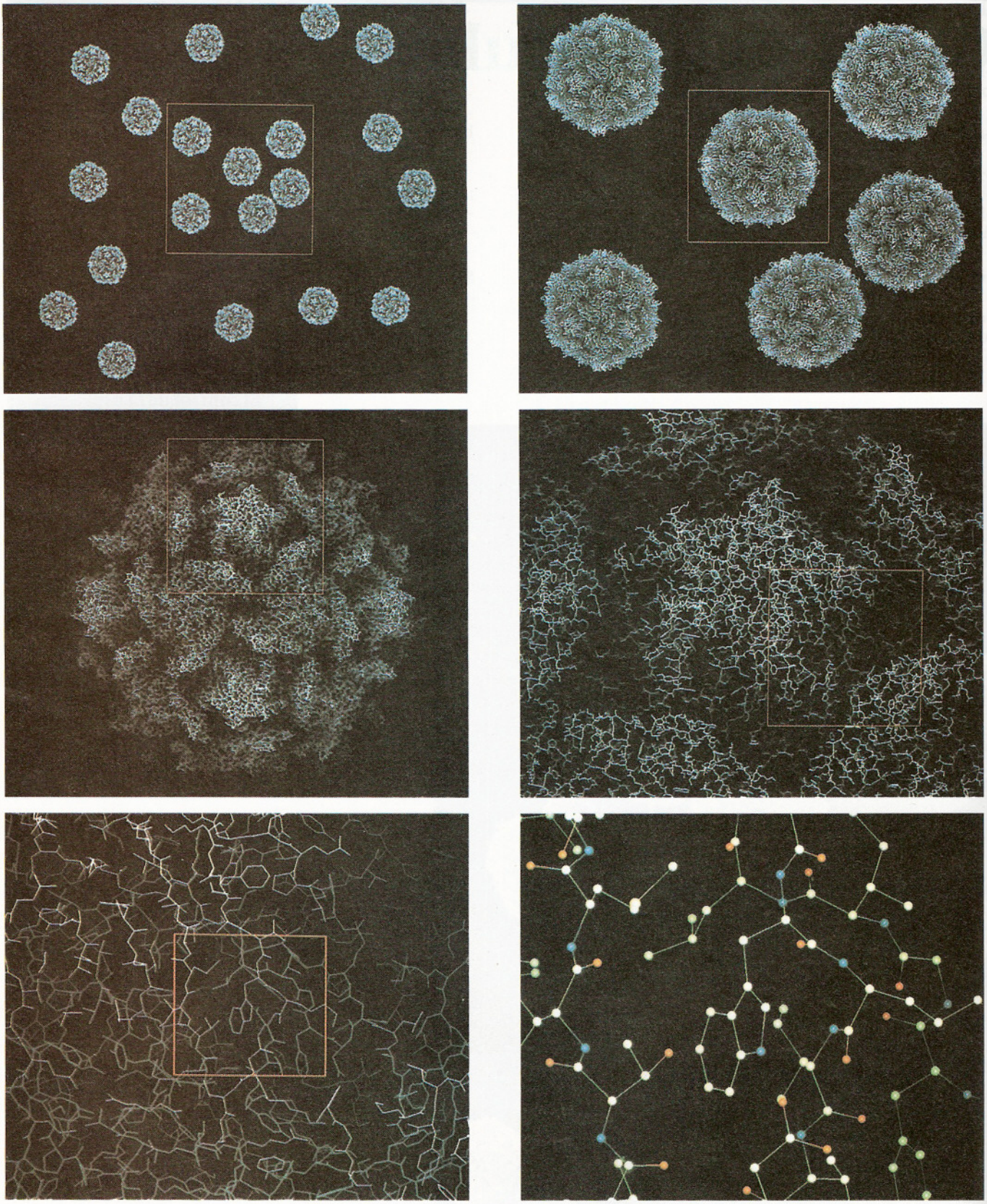
6 Mecanismos genéticos básicos

7 Tecnología del DNA recombinante

8 El núcleo celular

9 El control de la expresión génica

Electronmicrografía de barrido de cromosomas humanos en metafase.
(Por cortesía de Terry D. Allen.)



Serie de seis imágenes de un modelo anatómico de un poliovirus, cuya estructura tridimensional se conoce con exactitud a partir de cristalografía de rayos X. Cada imagen está ampliada tres veces respecto a la anterior, hasta que al final podemos ver una región del virus a nivel de resolución atómica. En el centro de la última imagen puede verse claramente la cadena lateral del aminoácido triptófano. (Por cortesía de James Hogle).

Función de las proteínas

5

- Las proteínas como máquinas
- Nacimiento, ensamblaje y muerte de las proteínas

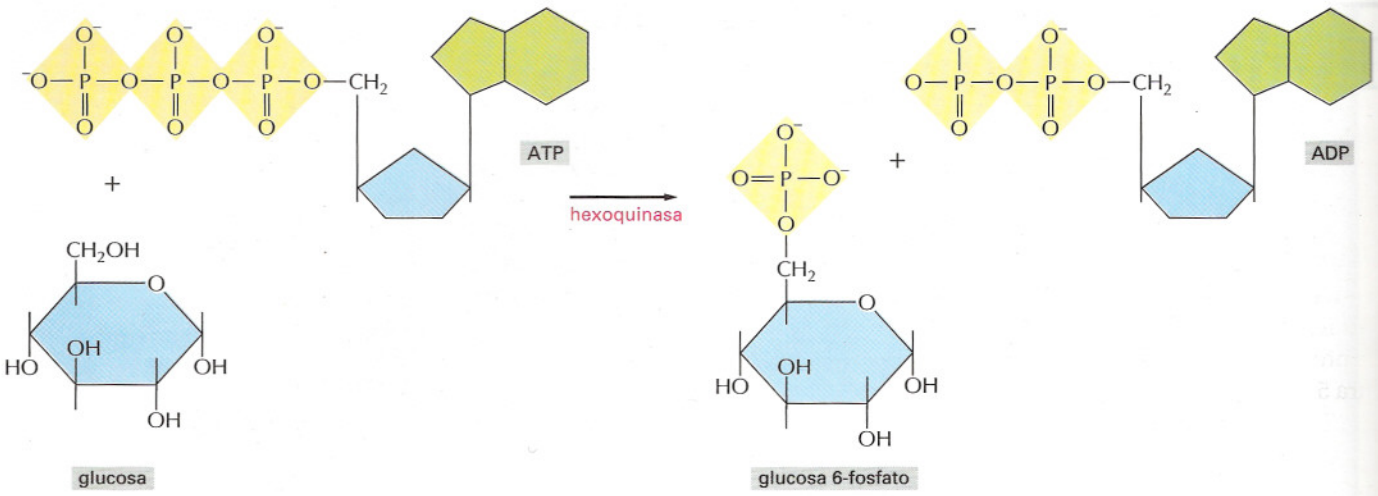
as proteínas constituyen la mayor parte de la masa seca de la célula y desempe-an las funciones predominantes de la mayoría de los procesos biológicos. Sin mbargo, para poder entender lo que son las proteínas, primero hay que inten-r entender cómo es una célula. En el Capítulo 3 presentamos una introducción lemental de la estructura de las proteínas, junto con una visión general de las acromoléculas biológicas, discutiendo su química y su conformación. Sin em-argo, las proteínas no son sólo rígidos grumos de material de superficie químí-amente reactiva. Disponen de zonas móviles estructuradas de manera muy recisa, cuyas acciones mecánicas están acopladas con eventos químicos. Preci-amente es este acoplamiento entre química y movimiento lo que provee a las roteínas de capacidades extraordinarias que están en la base de todos los pro-esos dinámicos de las células vivas. Sin comprender cómo actúan las proteínas omo moléculas con zonas móviles resulta difícil apreciar el resto de la biología elular.

En este capítulo, que inicia las secciones más avanzadas del libro, utiliza-nos ejemplos seleccionados para mostrar de qué manera funcionan las proteí-as, no sólo como catalizadores sino también como sofisticados transductores le movimientos, integradores de señales, y componentes de máquinas protei-as compuestas por muchas subunidades. La discusión se basa en avances que an revelado las estructuras tridimensionales detalladas de muchas proteínas; esalta los principios generales e intenta sentar las bases de descripciones de structuras celulares específicas y de procesos que se detallan en capítulos pos-eriores.

En la última parte del capítulo describimos la vida y la muerte de las proteí-as –desde su plegamiento, guiado por chaperones moleculares, hasta su des-rucción por proteolisis dirigida– poniendo énfasis en la construcción molecular le la mayoría de las proteínas y de los complejos proteicos.

Las proteínas como máquinas

Empezaremos considerando de qué manera se puede alterar la conformación de na proteína debido a la unión de otra molécula denominada *ligando*. Demos-raremos las profundas implicaciones de este fenómeno aparentemente simple describiendo algunas de las muchas maneras por las que las células utilizan las alteraciones de las proteínas inducidas por ligandos.



La unión de un ligando puede cambiar la conformación de una proteína[1]

El primer ejemplo trata de la enzima *hexoquinasa*, la cual está presente en casi todas las células. Esta enzima cataliza una etapa temprana del metabolismo de los azúcares –la transferencia del fosfato terminal de una molécula de ATP a la glucosa, formando glucosa 6-fosfato (como se discute en el Capítulo 2). La hexoquinasa se une fuertemente a glucosa, lo cual incrementa notablemente la afinidad de la enzima por el ATP, que se une a un lugar vecino de la proteína. Entonces, algunas cadenas laterales de determinados aminoácidos de la proteína catalizan la transferencia del fosfato, y los dos productos –la glucosa 6-fosfato y el ADP– se liberan, acabando el ciclo de reacción (Figura 5-1).

La hexoquinasa de levadura está compuesta por dos dominios. Los lugares de unión para la glucosa y para el ATP se hallan en una hendidura situada entre estos dominios, y cuando la glucosa se une, los dominios se desplazan uno hacia el otro cerrando la hendidura (Figura 5-2).

Este tipo de desplazamiento de dominios en respuesta a la unión de un ligando es un proceso habitual y fácil de explicar. En el caso de la hexoquinasa, en la cara interna de cada dominio existen lugares de unión para diferentes zonas de la molécula de glucosa. El cambio desfavorable de la energía libre de la proteína que ocurre cuando los dominios se desplazan uno respecto al otro cerrando la hendidura queda más que compensado por la energía libre liberada cuando la hendidura se cierra sobre la glucosa; en otras palabras, los enlaces no covalentes que forma la glucosa con la proteína "unen" los dos dominios, uno contra otro, haciendo que la proteína salte de una conformación *abierta* a otra *cerrada*.

Figura 5-1 La reacción catalizada por la hexoquinasa. En el primer paso de la degradación de la glucosa se transfiere un grupo fosfato desde el ATP hasta la glucosa, formando glucosa 6-fosfato. Entonces la glucosa 6-fosfato es procesada mediante series de otras enzimas que catalizan la cadena de reacciones conocidas como glucolisis. La glucolisis transforma la glucosa en piruvato y produce una ganancia neta de moléculas de ATP para la célula (véase Figura 2-21).

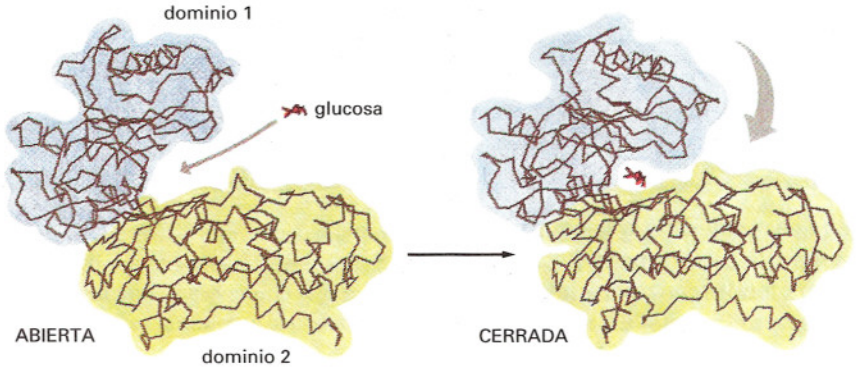


Figura 5-2 El cambio de conformación de la hexoquinasa causado por la unión de glucosa. Las líneas trazan el curso del esqueleto hidrocarbonado de la hexoquinasa. Estas estructuras fueron determinadas por análisis de difracción de rayos X de cristales de la proteína, sin y con glucosa. La unión de glucosa cambia la proteína desde una conformación *abierta* a una conformación *cerrada*.

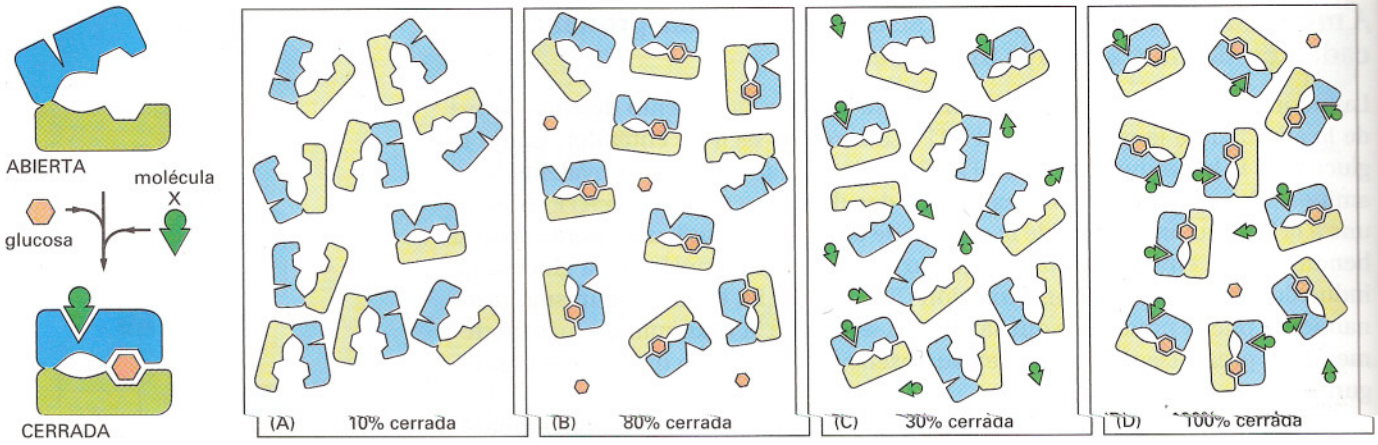


Figura 5-5 Unión cooperativa causada por el acoplamiento conformacional entre dos lugares de unión distantes. En este ejemplo tanto la glucosa como la molécula X se unen mejor a la conformación *cerrada* de una proteína con dos dominios. Tanto la glucosa como la substancia X dirigen la proteína hacia su conformación cerrada, por lo que cada ligando colabora con el otro para que se una a la proteína. Así pues, se dice que la glucosa y la molécula X se unen de forma cooperativa a la proteína.

La figura es muy similar a las Figuras 5-3 y 5-4; la única diferencia es que mientras que el lugar de unión para el ATP se localiza en la hendidura de la hexoquinasa, el lugar de unión para la molécula X se localiza fuera de esta hendidura.

Como discutimos a continuación, las proteínas cuyos cambios de conformación acoplan dos lugares de unión separados de su molécula, han sido seleccionadas durante la evolución ya que permiten a la célula relacionar la presencia de una molécula a la presencia o ausencia de cualquier otra molécula. Este tipo de acoplamiento conformacional se denomina *alostería*. Una proteína cuya actividad está regulada de esta forma se denomina *proteína alostérica* y la transición que sufre se denomina **transición alostérica**.

Dos ligandos cuyos lugares de unión están acoplados pueden afectar recíprocamente la unión del otro[2]

Cuando dos ligandos prefieren unirse a la *misma* conformación de una proteína alostérica, consideraciones termodinámicas básicas aseguran que cada ligando incrementa la afinidad de la proteína por el otro ligando. Este concepto se denomina **conexión** (linkage). Está bien ilustrado por el ejemplo considerado en la Figura 5-5, en el que la unión de la glucosa a la hexoquinasa incrementa la afinidad de la enzima por la molécula X, y viceversa. La relación de conexión es cuantitativamente recíproca de forma, por ejemplo, que si la glucosa tiene un gran efecto sobre la unión de X, X también tendrá un gran efecto sobre la unión de glucosa.

Si dos ligandos se unen a conformaciones *diferentes* de una proteína alostérica, la conexión será negativa. Por regla general un ligando estabiliza la conformación particular de la proteína a la que se une; si esta conformación es diferente de la favorecida por el otro ligando, la unión del primer ligando dificultará la unión del segundo ligando. Así, si el cambio de conformación inducido por la glucosa reduce la afinidad de la proteína por la molécula X, la unión de X disminuirá la afinidad de la proteína por la glucosa (Figura 5-6).

Las relaciones mostradas esquemáticamente en las Figuras 5-5 y 5-6 están en la base de la biología celular. Parecen tan obvias que hoy las damos por sentadas. Pero su descubrimiento, en 1950, seguido por una descripción general de la alostería en 1960, resultó revolucionario. En estos ejemplos X se une a un lugar que es diferente del lugar donde ocurre la catálisis, por lo que no tiene por qué haber ninguna relación con la glucosa o con cualquier otro ligando que se una al lugar activo. En el caso de enzimas que estén reguladas de esta manera, la molécula X puede activar (Figura 5-5) o inactivar (Figura 5-6) la enzima. Por mecanismos de este tipo las proteínas alostéricas pueden actuar como interruptores generales que permiten que una molécula de una célula afecte el destino de otra molécula.

Las transiciones alostéricas colaboran en la regulación del metabolismo[3]

Como describimos en el Capítulo 2, a menudo el producto final de una vía metabólica inhibe la enzima que inicia dicha vía. Debido a esta *retroalimentación ne-*

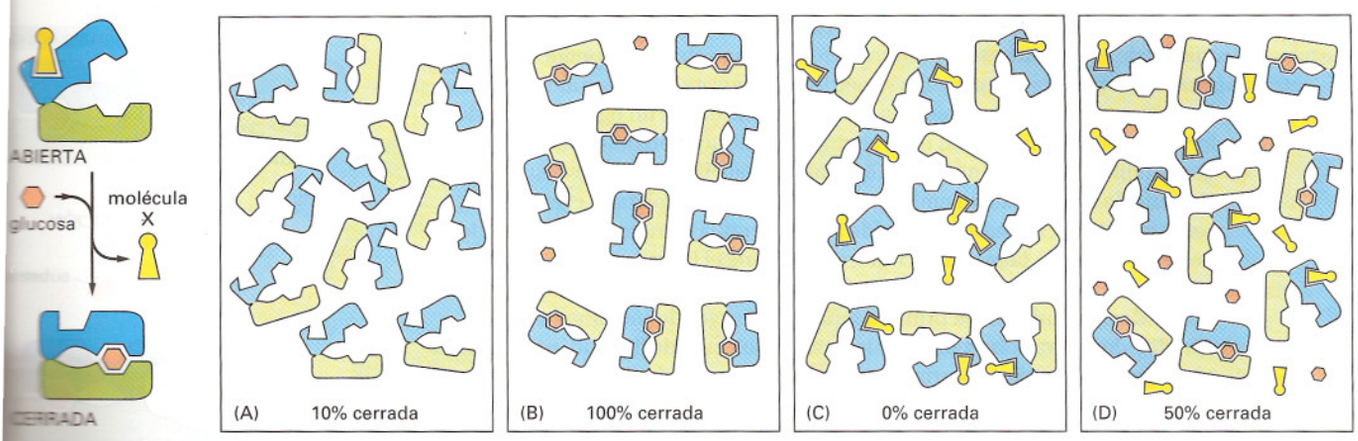


Figura 5-6 Unión competitiva generada por el acoplamiento conformacional entre dos lugares de unión distantes entre sí. El diseño de esta figura es el mismo que el descrito para la Figura 5-5, pero aquí la molécula X prefiere unirse a la conformación *abierta*, mientras la glucosa prefiere la *cerrada*. Ahora la glucosa y la molécula X dirigen la proteína hacia conformaciones opuestas (*cerrada* y *abierta* respectivamente), por lo que la presencia de uno de los ligandos interfiere con la unión del otro.

gativa sobre el flujo de la vía, la concentración intracelular del producto final se mantiene aproximadamente constante a pesar de los grandes cambios de las condiciones químicas de la célula. En este tipo de *regulación por retroinhibición* las transiciones alostéricas son esenciales. Por ejemplo, las enzimas que actúan al principio de una vía generalmente pueden existir en dos conformaciones. Una de ellas es activa y une al substrato en su **lugar activo** catalizando su conversión a la nueva substancia de la vía. La otra es una conformación inactiva que une al producto final de la vía en un lugar diferente, el **lugar regulador**. Cuando se acumula, el producto final se une a la enzima transformándola en su conformación inactiva (véase Figura 2-38).

Una enzima que participa en una vía metabólica también puede ser *activada* por una transición alostérica inducida por la unión de un ligando. En este caso el ligando es una molécula que se acumula cuando la célula es deficiente en un producto de la vía; como el ligando se une preferentemente a la forma activa de la proteína, dirige la enzima hacia su conformación activa. Muchas enzimas que participan en procesos catabólicos que producen ATP proporcionan ejemplos de esta *retroalimentación positiva*; estas enzimas son estimuladas por un incremento de la concentración de ADP, que tiene lugar cuando los niveles de ATP disminuyen. Para estas enzimas el ADP tiene un papel puramente regulador, en contraste con el papel de substrato que juega el ATP en la función de la hexoquinasa.

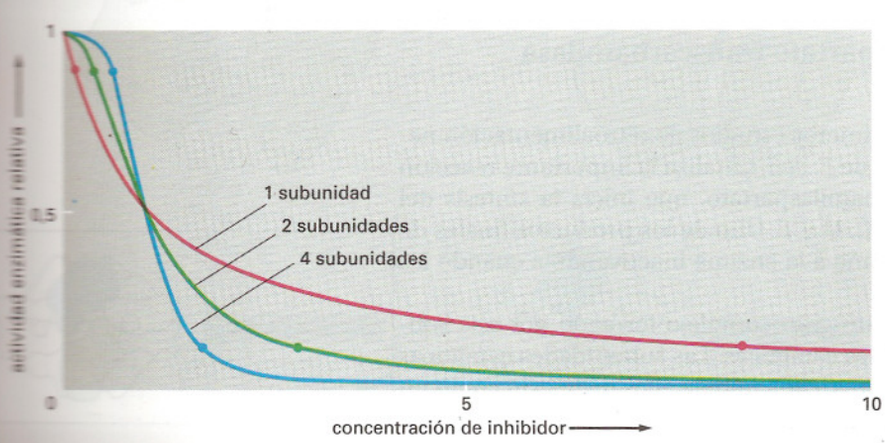


Figura 5-7 Cinética de actividad enzimática respecto a la concentración de ligando inhibidor, para enzimas alostéricas formadas por diferente número de subunidades. En el caso de una enzima con una sola subunidad (*línea roja*), la disminución desde el 90% hasta el 10% de actividad (indicada por *puntos* en la curva) requiere un incremento en la concentración de inhibidor de unas 100 veces. La actividad enzimática se calcula a partir de la relación de equilibrio simple $K=[I][P]/[IP]$, donde P es la proteína activa, I es el inhibidor e IP es la proteína inactiva unida al inhibidor. Ésta es la curva que se aplicaría a cualquier unión simple entre dos moléculas A y B (véase Figura 3-9). Contrariamente una enzima alostérica formada por varias subunidades puede responder a variaciones de la concentración de inhibidor de una manera semejante a un interruptor: la respuesta escalonada se debe a que el ligando se une a la proteína de una forma cooperativa, como se explica en la Figura 5-8. La *línea verde* representa el resultado teórico esperado en el caso de unión cooperativa de dos moléculas de inhibidor a una enzima alostérica con 2 subunidades, y la *línea azul* el resultado teórico esperado de una enzima con 4 subunidades. Como indican los puntos de las curvas, las enzimas más complejas caen del 90% al 10% de actividad con incrementos menores de la concentración de inhibidor que la enzima compuesta por una sola subunidad.

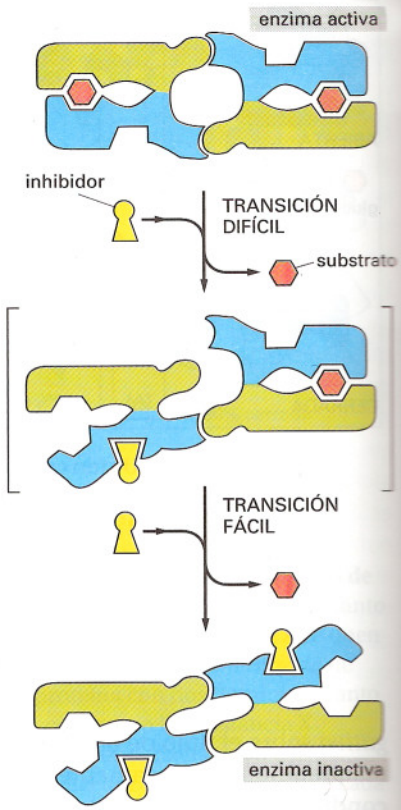


Figura 5-8 Una transición cooperativa alostérica. Diagrama esquemático que ilustra de que forma la conformación de una subunidad puede afectar la de sus vecinas, en una proteína simétrica compuesta por dos subunidades alostéricas idénticas. La unión de una sola molécula de un ligando inhibidor (*amarillo*) a una subunidad de la enzima se produce con dificultad debido a que modifica la conformación de esta subunidad, y por lo tanto destruye la simetría de la enzima. Sin embargo, cuando se ha completado este cambio conformacional, la energía obtenida al recuperar la estructura simétrica de la proteína hace que la segunda conformación una el ligando mucho más fácilmente, sufriendo el mismo cambio conformacional que la otra subunidad. La unión de la primera molécula de ligando incrementa la afinidad de la otra subunidad por la misma molécula de ligando, por lo que la respuesta de la enzima a variaciones de la concentración del ligando es mucho más marcada que la de una enzima monomérica (véase la Figura 5-7).

A menudo las proteínas forman agregados simétricos que sufren transiciones alostéricas cooperativas[4]

Una enzima que esté regulada por retroalimentación negativa y que conste de una sola subunidad con un único lugar regulador, puede disminuir desde el 90% hasta el 10% de actividad en respuesta a un incremento de unas 100 veces de la concentración del ligando inhibidor (Figura 5-7, *línea roja*). Aparentemente, las respuestas de este tipo no son suficientemente marcadas para una regulación celular óptima, y la mayoría de enzimas que se activan o inhiben por la unión de un ligando consisten en agregados simétricos de subunidades idénticas. Mediante esta disposición, la unión de una molécula de ligando al lugar de unión de una de las subunidades puede provocar una alteración alostérica en esta subunidad que puede ser transmitida a la otra subunidad vecina, favoreciendo así que ésta también una otra molécula de ligando. Como resultado de esta transición alostérica *cooperativa*, una variación relativamente pequeña de la concentración del ligando en la célula puede hacer pasar todo el agregado de una conformación casi completamente activa a otra casi completamente inactiva, o viceversa (Figura 5-7, *línea azul*).

Los principios que permiten que se produzca una transición cooperativa del "todo o nada" son más fáciles de visualizar en el caso de una enzima formada por un dímero simétrico. En el ejemplo mostrado en la Figura 5-8, la primera molécula del ligando inhibidor se une con una gran dificultad ya que su unión destruye una interacción favorable entre las dos moléculas idénticas del dímero. Sin embargo, ahora se une mucho más fácilmente la segunda molécula de ligando ya que su unión recupera los contactos monómero-monómero del dímero simétrico (y también inactivando completamente la enzima). Puede obtenerse una respuesta incluso más marcada a la unión de un ligando mediante agregados mayores, como en el caso de la enzima formada por 12 cadenas polipeptídicas que discutiremos a continuación.

La transición alostérica de la aspartato transcarbamilasa se conoce a nivel atómico[5]

Una de las enzimas utilizadas en los primeros estudios de retroalimentación negativa es la aspartato transcarbamilasa de *E. coli*. Cataliza la importante reacción carbamilfosfato + aspartato → N-carbamilaspartato, que inicia la síntesis del anillo pirimidínico de los nucleótidos C, U y T. Uno de los productos finales de esta vía, el citosín trifosfato (CTP), se une a la enzima inactivándola cuando las concentraciones de CTP son elevadas.

La aspartato transcarbamilasa es un gran complejo formado por seis subunidades reguladoras y seis subunidades catalíticas. Las subunidades catalíticas están dispuestas en forma de dos trímeros, cada uno de ellos dispuesto como un triángulo equilátero. Ambos trímeros se mantienen uno contra otro a través de

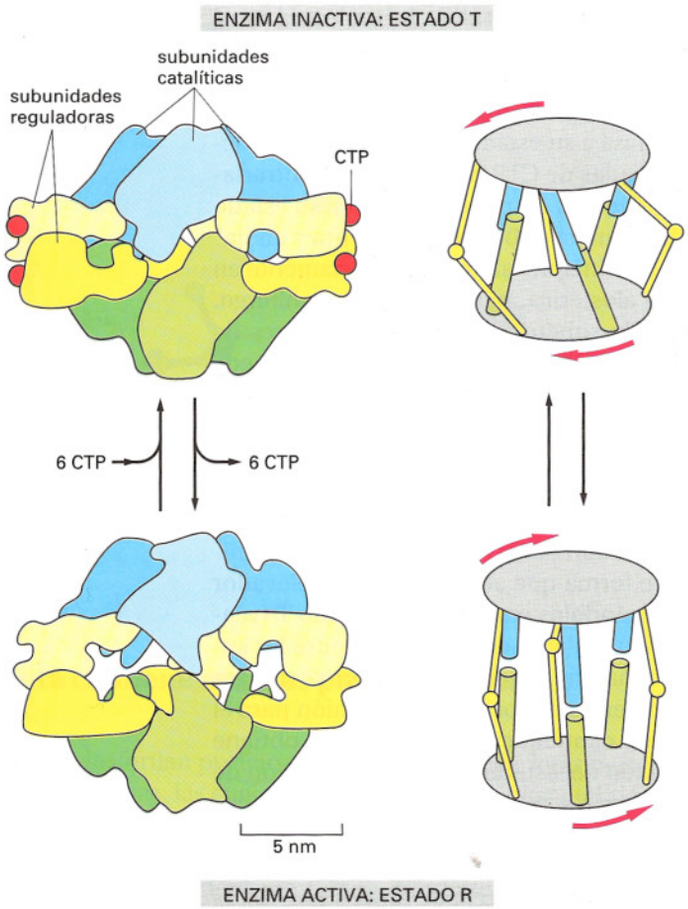


Figura 5-9 Transición entre los estados R y T en la enzima aspartato transcarbamilasa. La enzima está compuesta por un complejo de seis subunidades catalíticas y seis subunidades reguladoras. La estructura de las formas inactivas (*estado T*) y de las formas activas (*estado R*) se han determinado por cristalografía de rayos X. La enzima se inhibe cuando aumenta la concentración de CTP. Cada una de las subunidades reguladoras puede unir una molécula de CTP, el cual es uno de los productos finales de la vía. Mediante esta regulación por retroalimentación negativa se impide que la vía produzca más cantidad de CTP de la que necesita la célula. (Basado en K.L. Krause, K.W. Volz y W.N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1643-1647, 1985).

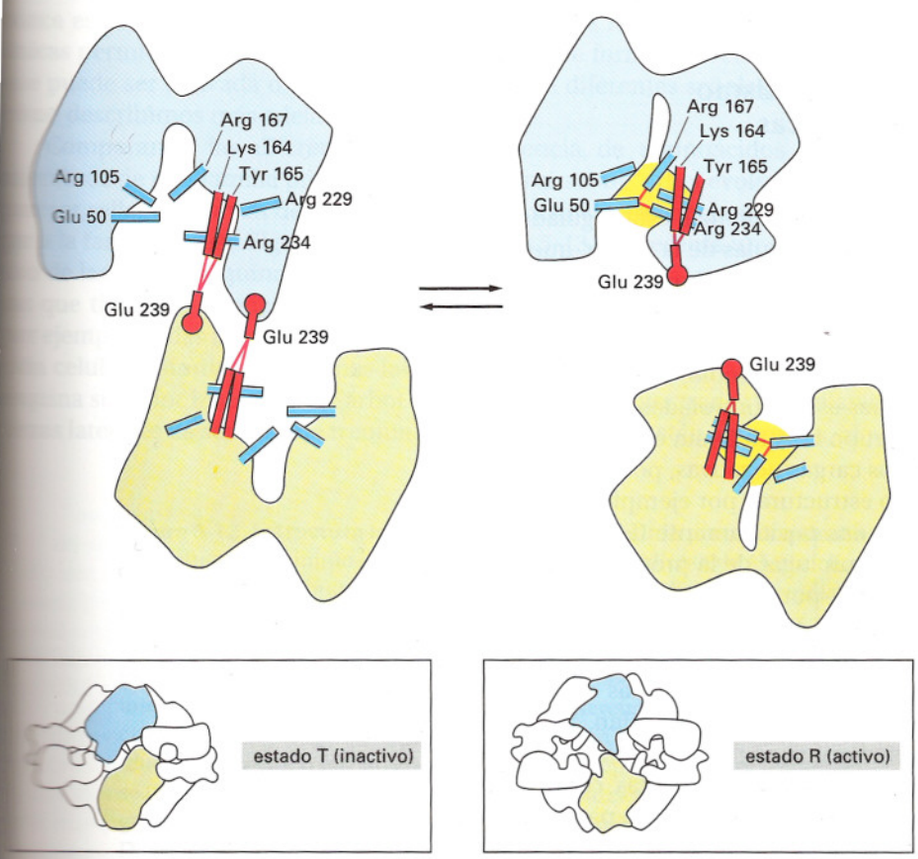


Figura 5-10 Parte del interruptor si/no de la subunidad catalítica de la aspartato transcarbamilasa. Variaciones en las interacciones entre enlaces de hidrógeno indicadas son parcialmente responsables del "salto" que sufre el lugar activo de esta enzima desde la conformación activa (*amarilla*) a la inactiva. Los enlaces de hidrógeno se indican como *finas líneas rojas*. Los aminoácidos que participan en las interacciones entre las dos subunidades se indican en *rojo* mientras que los que forman el lugar activo de la enzima se muestran en *azul*. La parte superior de la figura muestra el lugar catalítico en el interior de la enzima; la parte inferior muestra la superficie externa de la enzima. (Adaptado de E.R. Kantrowitz y W.N. Lipscomb, *Trends Biochem. Sci.* 15:53-59, 1990.)

las subunidades reguladoras, que hacen de puente entre ellos. La molécula completa puede sufrir transiciones alostéricas del "todo o nada" entre dos conformaciones, los estados T ("tenso") y R ("relajado") (Figura 5-9).

La unión de los substratos (carbamilfosfato y aspartato) a los trímeros catalíticos empuja a la aspartato transcarbamilasa a su estado R, catalíticamente activo, del que entonces se disocian las moléculas de CTP, reguladoras. Contrariamente, la unión de CTP a los dímeros reguladores empuja la enzima a su estado T, catalíticamente inactivo, del cual se disocian los substratos. Este "tira y afloja" entre el CTP y los substratos es idéntico, en principio, al descrito previamente en la Figura 5-6 para el caso de una proteína alostérica más sencilla. Sin embargo, aquí el tira y afloja ocurre en una molécula simétrica con muchos lugares de unión, por lo que el efecto es una transición alostérica cooperativa que puede activar la enzima rápidamente cuando se acumulan los substratos (transformándola en su estado R) o inactivarla repentinamente cuando se acumula CTP (transformándola en su estado T).

Una combinación de bioquímica y de cristalografía de rayos X ha revelado una gran cantidad de fascinantes detalles de esta transición alostérica. Cada subunidad reguladora tiene dos dominios, y la unión de CTP hace que ambos dominios se desplacen uno respecto al otro, de forma que actúan como un elevador que hace rotar los trímeros catalíticos acercándolos entre sí, en el estado T (véase Figura 5-9). Cuando esto ocurre se forman enlaces de hidrógeno entre las subunidades catalíticas opuestas que ensanchan la hendidura que forma el lugar activo en cada subunidad catalítica, destruyendo así los lugares de unión para el substrato (Figura 5-10). Añadiendo grandes cantidades de substrato se obtiene el efecto contrario, favoreciendo la formación del estado R mediante la unión de moléculas de substrato en la hendidura de cada subunidad catalítica y oponiéndose así al cambio conformacional descrito. Las conformaciones intermedias entre los estados R y T son inestables, de forma que la enzima fundamentalmente salta entre las formas R y T, produciéndose una mezcla de ambas formas, la composición de la cual varía en función de las concentraciones relativas de CTP y de substratos.

La fosforilación de proteínas es un mecanismo habitual de dirigir transiciones alostéricas en las células eucariotas[6]

En una bacteria como *E. coli* la actividad de las proteínas está regulada fundamentalmente por una miríada de pequeñas moléculas de la célula, que se unen específicamente a determinadas proteínas causando transiciones alostéricas que controlan la actividad de estas proteínas. Muchas de las proteínas reguladas de esta manera son enzimas que catalizan reacciones metabólicas; otras transducen señales o activan o inactivan genes (como ejemplo, véase la Figura 9-27). Sin embargo, algunas proteínas bacterianas están controladas de forma diferente –mediante la unión covalente de un grupo fosfato a una cadena lateral de un aminoácido. Cada grupo fosfato tiene dos cargas negativas, por lo cual su unión a una proteína puede generar un cambio estructural, por ejemplo atrayendo entre sí a dos grupos de aminoácidos cargados positivamente (Figura 5-11). A su vez, un cambio de este tipo que ocurra en un lugar de la proteína puede alterar la conformación de otra zona de la proteína –por ejemplo controlando alostéricamente la actividad de un lugar de unión alejado.

La fosforilación reversible de las proteínas es la estrategia más utilizada para controlar la actividad en las células eucariotas. Se cree que más del 10% de las 10 000 proteínas de una célula típica de mamífero se fosforilan. El fosfato se transfiere desde una molécula de ATP mediante una *proteína quinasa* y es eliminado mediante una *proteína fosfatasa.* Las células eucariotas contienen una gran variedad de estas enzimas, muchas de las cuales juegan un papel central en la señalización intracelular (como se discute en al Capítulo 15).

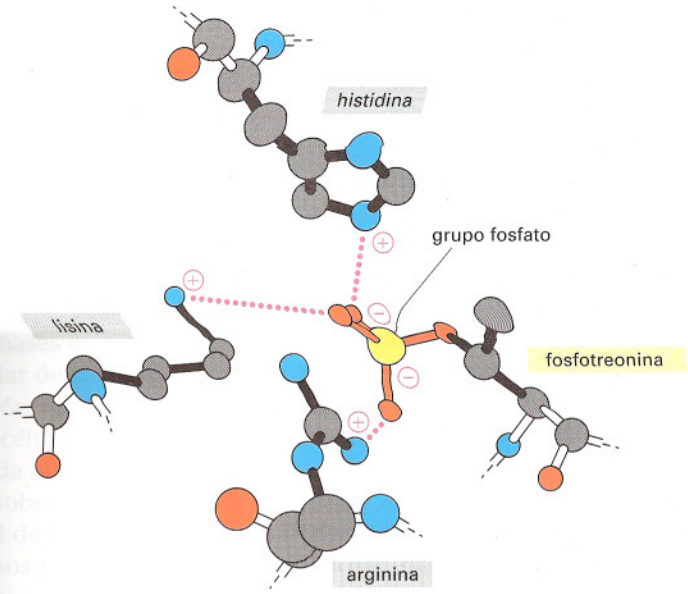


Figura 5-11 Influencia de un grupo fosfato sobre una proteína. El grupo fosfato, cargado negativamente, que se muestra aquí está unido covalentemente a una cadena lateral de una treonina de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico que se discute en el Capítulo 15. Como se determinó por cristalografía de rayos X, el fosfato está rodeado de diversas cadenas laterales de aminoácidos cargadas positivamente de la propia proteína. (Adaptado de S.S. Taylor et al., *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8:429-462, 1992. ©1992 Annual Reviews Inc.)

Una célula eucariota contiene muchas proteína quinasas y fosfatasas[7]

Las **proteína quinasas** que fosforilan proteínas en las células eucariotas pertenecen a una gran familia de enzimas, las cuales contienen un dominio catalítico de 250 aminoácidos (quinasa) similar (Figura 5-12). Los diversos miembros de la familia contienen diferentes secuencias de aminoácidos a ambos lados del dominio quinasa y a menudo dentro del dominio tienen diferentes secuencias formando asas (véanse las *cabezas rojas de flecha* en la Figura 5-12). Algunas de estas secuencias adicionales de aminoácidos permiten que cada quinasa reconozca específicamente el conjunto de proteínas que fosforila. Otras secuencias les permiten que cada quinasa esté regulada de forma diferente, de manera que puede ser activada o inhibida en respuesta a diferentes señales específicas, como describimos más adelante.

Comparando las diferencias en la secuencia de aminoácidos entre los miembros de una familia proteica puede construirse un "árbol evolutivo", que al menos refleja el patrón de duplicación génica y de divergencia que ha dado lugar a la familia (véase Figura 8-76). En la Figura 5-13 se presenta un árbol evolutivo de las proteína quinasas. No resulta sorprendente que a menudo las quinasas que tienen funciones relacionadas se localicen en ramas vecinas del árbol: por ejemplo, todas las proteína quinasas que participan en procesos de señalización celular fosforilando cadenas laterales de tirosina se hallan agrupadas en la región superior izquierda del árbol. Las otras quinasas mostradas fosforilan cadenas laterales de serina o de treonina, y muchas de ellas están agrupadas, al pa-

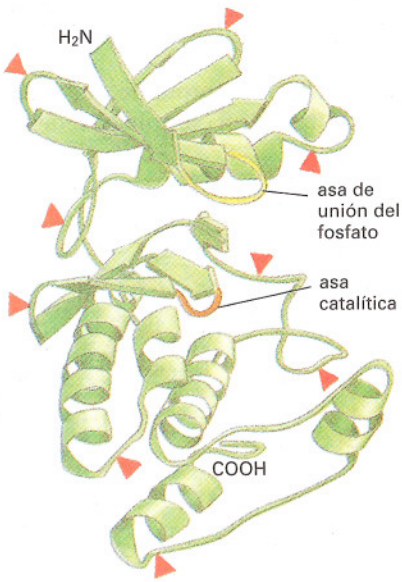


Figura 5-12 Estructura tridimensional de un dominio proteína quinasa. Estructura del dominio quinasa de la quinasa dependiente de AMP cíclico. Superpuestas al dibujo de la estructura, las *cabezas de flecha rojas* indican lugares en que se han encontrado insertos de entre 5 y 100 aminoácidos en otros miembros de la familia de proteína quinasas. Estos insertos están localizados en asas sobre la superficie de la enzima, donde otros ligandos interactúan con la proteína. Así, los insertos diferencian las distintas quinasas confiriéndoles la capacidad de interaccionar con otras proteínas. El ATP (dador de un grupo fosfato en la reacción) y el péptido que será fosforilado se unen en el lugar activo de la enzima, que abarca desde el asa que une el grupo fosfato (*amarillo*) hasta el asa catalítica (*naranja*). (Adaptado de D.R. Knighton et al., *Science* 235:407-414, 1991. © 1991 the AAAS.)

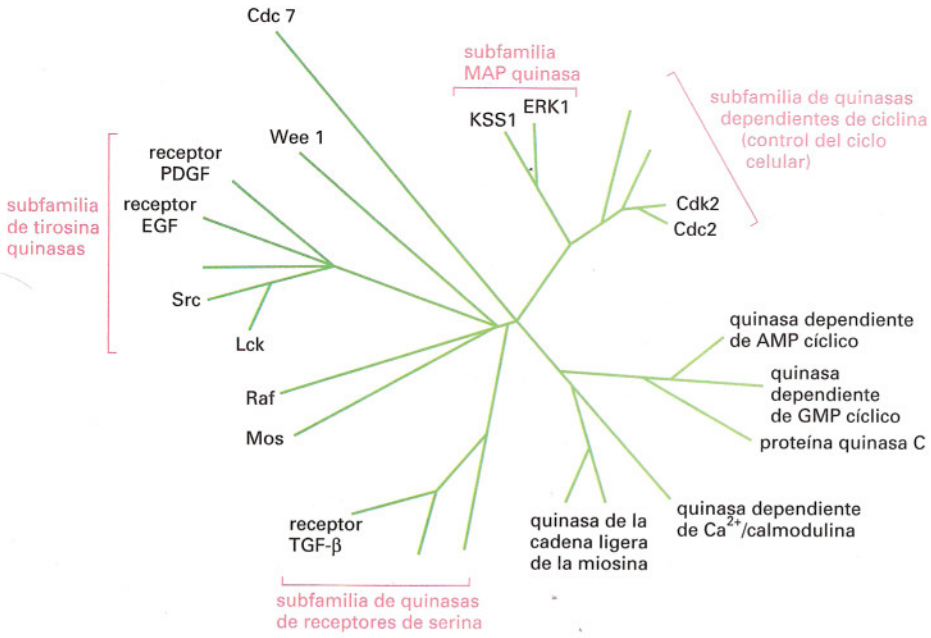


Figura 5-13 Árbol evolutivo de algunas proteína quinasas. A pesar de que las células eucariotas superiores contienen centenares de tales enzimas, en la figura sólo se muestran algunas de las que se discuten en este libro.

recer, según su función –en la señalización transmembrana, en la amplificación de señales, en el control del ciclo celular, etc.

En la Figura 5-14 se ilustra la reacción básica catalizada por una proteína quinasa. Un grupo fosfato es transferido desde una molécula de ATP hasta un grupo hidroxilo de una cadena lateral de una serina, una treonina o una tirosina de una proteína. Esta reacción es esencialmente unidireccional debido a la gran cantidad de energía libre liberada cuando se rompe el enlace fosfato-fosfato, produciéndose ADP (véase Figura 2-28). Sin embargo, las fosforilaciones catalizadas por proteína quinasas pueden revertirse mediante un segundo grupo de enzimas denominadas **proteína fosfatasas**, las cuales eliminan el fosfato (véase Figura 5-14). Hay varias familias de proteína fosfatasas, algunas de las cuales son muy específicas eliminando grupos fosfato únicamente de una o unas cuantas proteínas, mientras que otras son relativamente inespecíficas, actuando sobre una gran diversidad de proteínas. El nivel de fosforilación de una proteína determinada en una célula en un momento dado depende de las actividades relativas de las proteína quinasas y fosfatasas que actúan sobre ella.

La estructura de la proteína quinasa Cdk muestra de qué forma una proteína puede actuar como un microchip[8]

El centenar de proteína quinasas diferentes que tiene una célula eucariota están organizadas en complejas redes de etapas señalizadoras que ayudan a coordinar

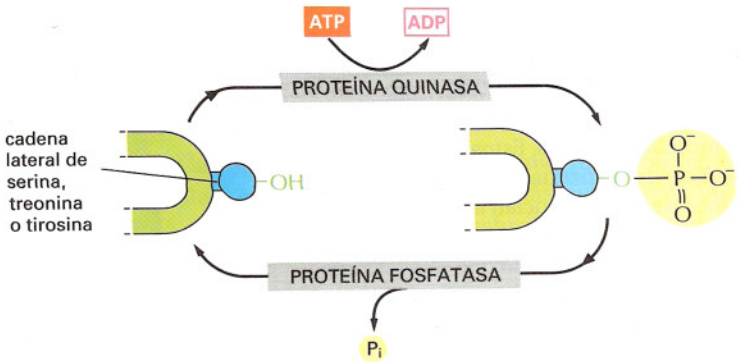


Figura 5-14 Las enzimas que controlan la fosforilación de las proteínas en las células. La reacción catalizada por una proteína quinasa añade un fosfato a una cadena lateral de un aminoácido, mientras que la reacción catalizada por una fosfatasa elimina este fosfato.

actividades celulares, dirigen el ciclo celular y transmiten señales extracelulares al interior de la célula. Muchas de las señales implicadas han de ser integradas y amplificadas. Cada proteína quinasa (y otras proteínas señalizadoras) actúa como elementos de procesamiento, o "microchips" en los procesos de integración. Una parte importante de la regulación de estas proteínas proviene del control que ejercen los fosfatos que les añaden otras proteína quinasas de la célula: determinados grupos fosfato activan la proteína mientras que otros grupos la desactivan.

Una **proteína quinasa dependiente de ciclina (Cdk**, de Cyclin-Dependent Protein Kinase) constituye un buen ejemplo de un elemento de procesamiento de este tipo. Las quinasas de esta clase son los componentes centrales del sistema de división celular de las células eucariotas (como se discute en el Capítulo 17). En una célula de vertebrado, una enzima Cdk se activa e inhibe sucesivamente mientras la célula atraviesa las diferentes fases de su ciclo de división, y cuando está activada afecta a varios aspectos del comportamiento celular a través de sus efectos sobre las proteínas que fosforila. Ahora conocemos la estructura tridimensional de las enzimas de esta importante clase de proteína quinasa, y la utilizaremos para demostrar de qué forma una proteína puede actuar como un microchip.

Una proteína Cdk sólo es activa como proteína quinasa cuando está unida a una proteína llamada *ciclina*. Sin embargo, como se ilustra en la Figura 5-15 la unión de la ciclina sólo es una de las tres entradas de información necesarias para activar la Cdk: además, se ha de añadir un fosfato a una cadena lateral de una determinada treonina y se ha de eliminar otro grupo fosfato de la proteína que se halla unido covalentemente a una cadena lateral de una determinada tirosina. Así, la Cdk integra un conjunto específico de componentes celulares

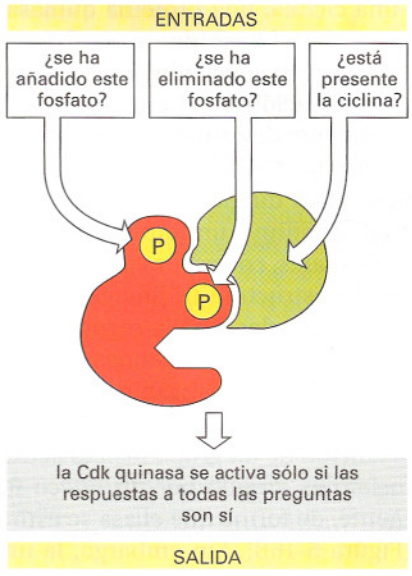
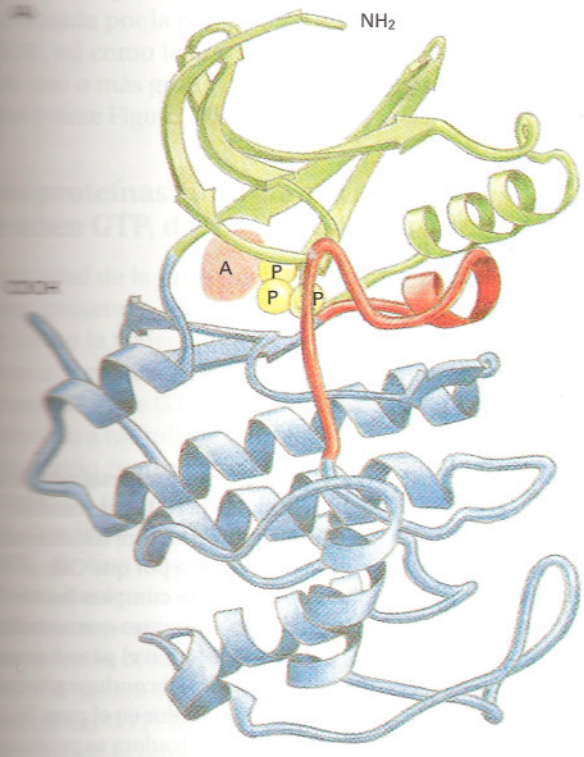


Figura 5-15 Una Cdk como un elemento integrador. En el Capítulo 17 se discute la función de estos reguladores centrales sobre el ciclo celular.



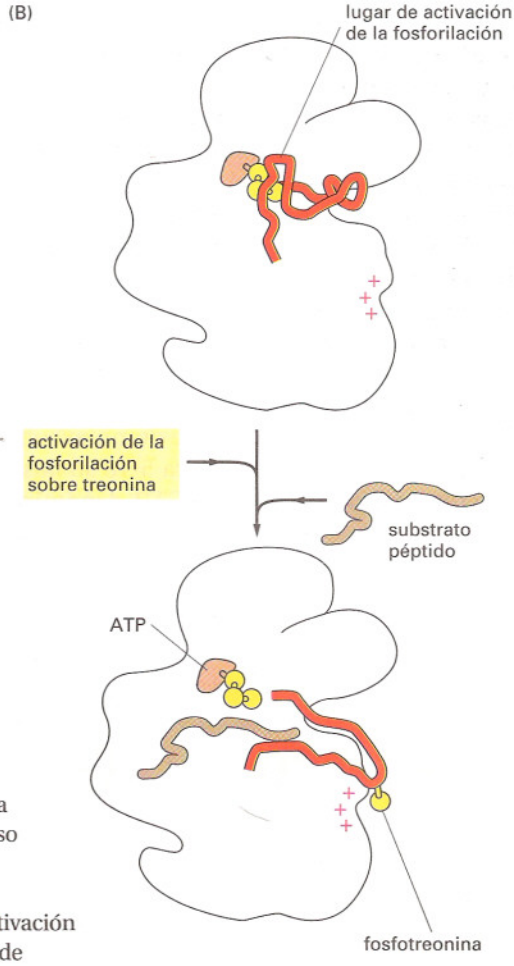


Figura 5-16 Estructura tridimensional de una Cdk. (A) Diagrama de la estructura tridimensional, determinada por análisis de difracción de rayos X. En *rojo claro* se muestra el ATP unido, mientras que sus tres fosfatos se representan en *amarillo*. (B) El proceso requerido para la activación de la enzima incluye la fosforilación de una treonina específica localizada en la cola de una asa flexible (*rojo*) que, de no estar fosforilada, bloquea el acceso del substrato proteico al lugar activo del dominio quinasa. Esta activación también requiere la unión de ciclina, como se ilustra en la Figura 5-17. (A, adaptado de T. Hellmuth et al., *Nature* 363:595-602, 1993. © 1993 Macmillan Magazines Ltd.)

–una ciclina, una proteína quinasa y una proteína fosfatasa– y se activa únicamente en el caso de que cada uno de estos componentes adquiera su estado de actividad adecuado. Por ejemplo, algunas ciclinas aumentan y disminuyen de concentración en determinadas etapas del ciclo celular, incrementando gradualmente de cantidad hasta que repentinamente empiezan a ser destruidas en un punto determinado del ciclo. La repentina destrucción de una ciclina (por proteolisis dirigida) inmediatamente inhibirá una enzima Cdk determinada, lo cual constituye un importante sistema de controlar determinados procesos intracelulares, como por ejemplo la mitosis.

La estructura tridimensional de la Cdk (Figura 5-16A) sugiere una explicación molecular para la regulación de esta enzima. La proteína Cdk en sí misma es inactiva, por dos razones: su lugar de unión al ATP está distorsionado y existe una asa de unos 20 aminoácidos que bloquea el acceso del substrato al centro activo. La unión de la ciclina por un lado elimina la distorsión y por otro permite la adición de un grupo fosfato activador a la cola del asa flexible; se cree que este fosfato es atraído por un hueco formado por aminoácidos cargados positivamente, de forma que el asa se estira y baja permitiendo el acceso al lugar activo (Figura 5-16B). Sin embargo, la unión de la ciclina también permite la rápida adición de un fosfato inhibidor, que interfiere con el lugar del ATP, lo cual coloca la Cdk en un estado inactivo. Finalmente, la quinasa es activada cuando una fosfatasa específica elimina el fosfato inhibidor (Figura 5-17).

Las proteínas que unen e hidrolizan GTP son reguladores celulares ubicuos[9]

Hemos descrito de qué forma la célula puede utilizar la adición o la eliminación de grupos fosfato de una proteína para controlar la actividad de la proteína. En los ejemplos discutidos hasta ahora el fosfato es transferido desde una molécula de ATP a una cadena lateral de un aminoácido de la proteína, a través de una reacción catalizada por una proteína quinasa específica. Las células eucariotas también utilizan otra vía para controlar la actividad de las proteínas mediante la adición o eliminación de fosfatos. En este caso, el fosfato no se añade directamente a la proteína; por el contrario, forma parte del dinucleótido de guanina GTP, el cual se une fuertemente a la proteína. Cuando la proteína está unida a GTP, es activa. La pérdida del grupo fosfato ocurre cuando el GTP unido es hidrolizado a GDP, a través de una reacción catalizada por la propia proteína; cuando la proteína está unida a GDP, es inactiva.

Las **proteínas que unen GTP** (también denominadas *GTPasas* debido a que también catalizan la hidrólisis de GTP) constituyen una gran familia de proteínas, que tienen un dominio globular de unión a GTP similar. Cuando el GTP unido es hidrolizado a GDP, este dominio sufre un cambio de conformación que inactiva la proteína. En la Figura 5-18 se ilustra la estructura tridimensional de una pequeña proteína que une GTP, denominada *Ras*.

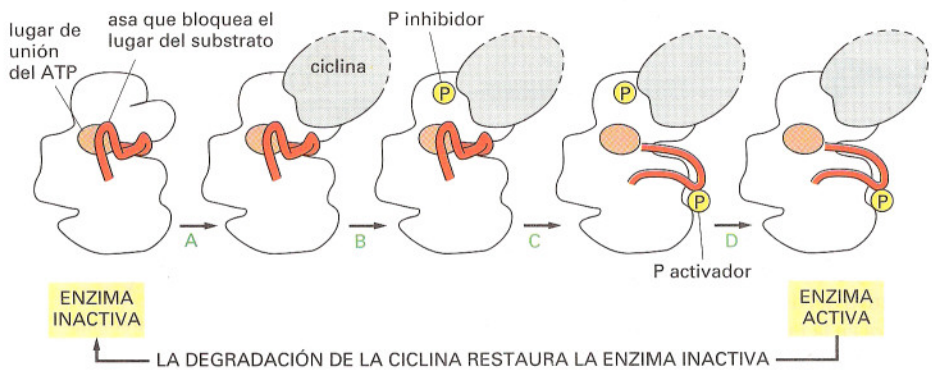


Figura 5-17 Modelo detallado de la activación de la Cdk. Este modelo, basado en la estructura tridimensional de la Cdk, explica por qué Cdk se inactiva sólo si se cumplen las tres condiciones diferentes que se indican en la Figura 5-15. En el paso A se une una ciclina, lo cual conduce a la unión del fosfato inhibidor en el paso B. La fosforilación activadora se produce en el paso C, pero la enzima sólo se activa después de que se haya eliminado el fosfato inhibidor, en el paso D. La degradación repentina de la ciclina, tras el paso D, hace que la enzima se inactive, liberándose el fosfato activador, con lo que el sistema vuelve al estado inactivo inicial.

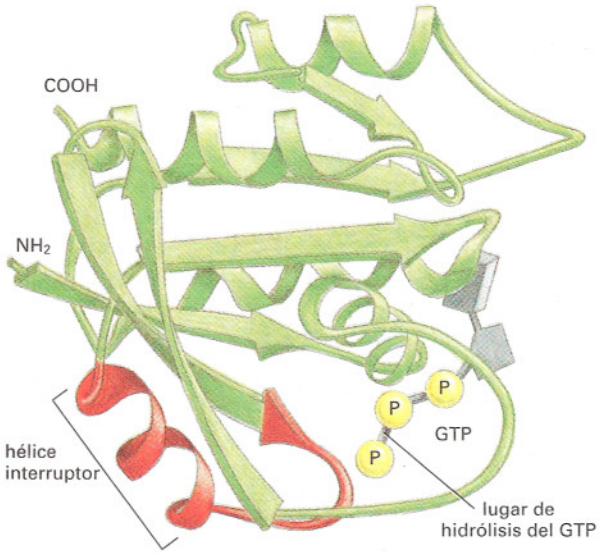


Figura 5-18 Estructura de la proteína Ras, en su forma unida a GTP. Esta proteína relativamente pequeña ilustra la estructura de un dominio de unión a GTP, que se halla presente en otras proteínas que unen GTP (como ejemplo, véase Figura 5-20). Las regiones mostradas en *rojo* cambian su conformación cuando la molécula de GTP es hidrolizada a GDP y fosfato inorgánico por la proteína; el GDP queda unido a la proteína mientras que el fosfato inorgánico es liberado. Más adelante se explica el papel especial que juega la "hélice interruptor" en las proteínas relacionadas con Ras (véase Figura 5-20).

La **proteína Ras** juega un papel crucial en la señalización celular (como se [illegible] en el Capítulo 15). Unida a GTP es activa y estimula cascadas de fosforilación de proteínas en la célula. Sin embargo, generalmente está en su forma inactiva, unida a GDP. Se activa cuando cambia la molécula de GDP que tiene unida por una de GTP, en respuesta a señales extracelulares como factores de crecimiento, que se unen a receptores de la membrana plasmática (véase Figura [illegible]). Así, la proteína Ras actúa como un interruptor si-no, cuya actividad está determinada por la presencia o ausencia de un fosfato extra sobre una molécula de GTP, tal como la actividad de la proteína Cdk está controlada por la presencia de uno o más grupos fosfato sobre determinadas cadenas laterales de aminoácidos (véase Figura 5-17).

Otras proteínas controlan la actividad de las proteínas que unen GTP, determinando si se une GDP o GTP[10]

La actividad de la proteína Ras y de otras proteínas que unen GTP está controlada por proteínas reguladoras que determinan cuándo se une GDP y cuándo GTP, como la actividad de la proteína Cdk está controlada por ciclinas, proteína quinasas y proteína fosfatasas. Ras se inactiva por una **proteína activadora de GTPasa** (**GAP**, de GTPase-Activating Protein), la cual se une a la proteína Ras incrementando la capacidad a hidrolizar la molécula de GTP que lleva unida, formando GDP –que queda unido fuertemente a ella– y fosfato inorgánico (P_i) –que es rápidamente liberado. La proteína Ras quedará en su conformación inactiva, unida a GDP, hasta que interactúe con una **proteína liberadora de nucleótidos de guanina** (**GNRP**, de Guanine Nucleotide Releasing Protein), la cual se une al complejo GDP-Ras haciendo que Ras libere su GDP. El lugar, ahora vacío, de unión a nucleótidos, es ocupado inmediatamente por una molécula de GTP (el GTP está presente en la célula a concentraciones mucho mayores que las de GDP), por lo que GNRP activa Ras mediante la adición *indirecta* del fosfato eliminado por la hidrólisis del GTP. Así, en cierto sentido los papeles de GAP y de GNRP son análogos de la proteína fosfatasa y de la proteína quinasa, respectivamente (Figura 5-19).

La transición alostérica de la proteína EF-Tu muestra de qué manera pequeñas moléculas pueden generar grandes movimientos[11]

La proteína Ras es uno de los miembros de una familia de *GTPasas reguladoras* [illegible], cada una de las cuales está formada por un dominio de unión a

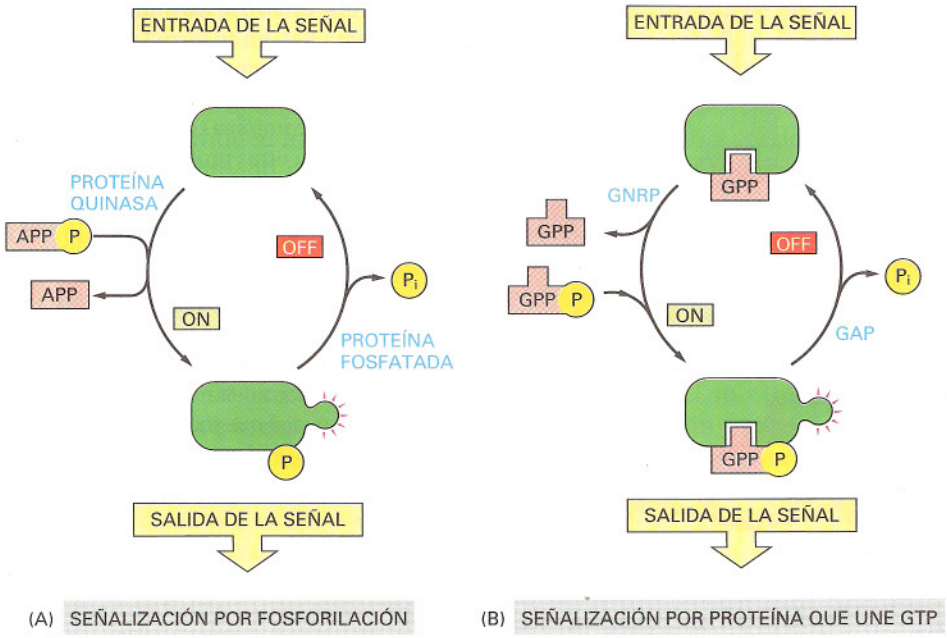


Figura 5-19 Comparación entre los dos principales mecanismos de señalización de las células eucariotas. En ambos casos una proteína de señal es activada mediante la adición de un grupo fosfato, e inactivada mediante la eliminación de este fosfato. Para enfatizar las similitudes de ambos procesos, ATP y GTP se han dibujado como APPP y GPPP, y ADP y GDP como APP y GPP respectivamente. Como se muestra en la Figura 5-17, la adición de un fosfato a una proteína también puede inhibirla.

GTP de unos 200 aminoácidos. En el transcurso de la evolución, este dominio también se ha unido a otros dominios proteicos, generando una gran familia de proteínas que unen GTP, entre las que se hallan las proteínas G triméricas asociadas a receptores (discutidas en el Capítulo 15), proteínas reguladoras del tráfico de vesículas entre compartimientos intracelulares (discutidas en el Capítulo 13) y proteínas que se unen al RNA de transferencia y que son necesarias para que se produzca la síntesis proteica en los ribosomas (discutidas en el Capítulo 6). En cada caso, una importante actividad biológica está controlada por un cambio en la conformación de la proteína, producido por la hidrólisis de GTP en un dominio semejante a Ras.

La *proteína EF-Tu* proporciona un buen ejemplo de cómo actúan los componentes de esta familia de proteínas. EF-Tu es una molécula muy abundante en células bacterianas, donde actúa como un factor de elongación en la síntesis proteica, cargando en el ribosoma cada molécula aminoacil-tRNA. La molécula de tRNA forma un íntimo complejo con la forma de EF-Tu unida a GTP. En este complejo el aminoácido unido al tRNA está enmascarado; su desenmascaramiento, necesario para que se produzca la síntesis proteica, tiene lugar sobre el ribosoma cuando el tRNA es liberado tras la hidrólisis del GTP unido a EF-Tu (la Figura 6-31 ilustra el funcionamiento de EF-Tu, preciso como un reloj).

La estructura tridimensional de EF-Tu, tanto en su forma unida a GTP como a GDP, se ha determinado por cristalografía de rayos X. Estos estudios revelan cómo ocurre el desenmascaramiento del tRNA. La disociación del fosfato inorgánico (P_i), procedente de la reacción GTP→ GDP + P_i, genera una ligerísima deformación (de unas décimas de nanómetro) del lugar de unión a GTP, tal como ocurre en la proteína Ras. Este ligero movimiento, equivalente únicamente a algunas veces el diámetro de un átomo de hidrógeno, genera un cambio de conformación que se propaga a lo largo de una pieza crucial de hélice α, llamada *hélice interruptor*, en el dominio semejante a Ras de la proteína. Al parecer la hélice interruptor actúa como un pestillo que se une específicamente a una zona de otro dominio de la molécula, manteniendo la proteína en una conformación "cerrada". El cambio de conformación desencadenado por la hidrólisis de GTP hace que la hélice interruptor se desenganche, dejando que los dominios de la proteína, ahora separados, se desplacen una distancia de unos 4 nanómetros, liberando así la molécula de tRNA que estaba unida (Figura 5-20).

Este ejemplo pone de manifiesto de qué forma las células aprovechan cambios químicos sencillos que ocurren sobre la superficie de pequeños dominios

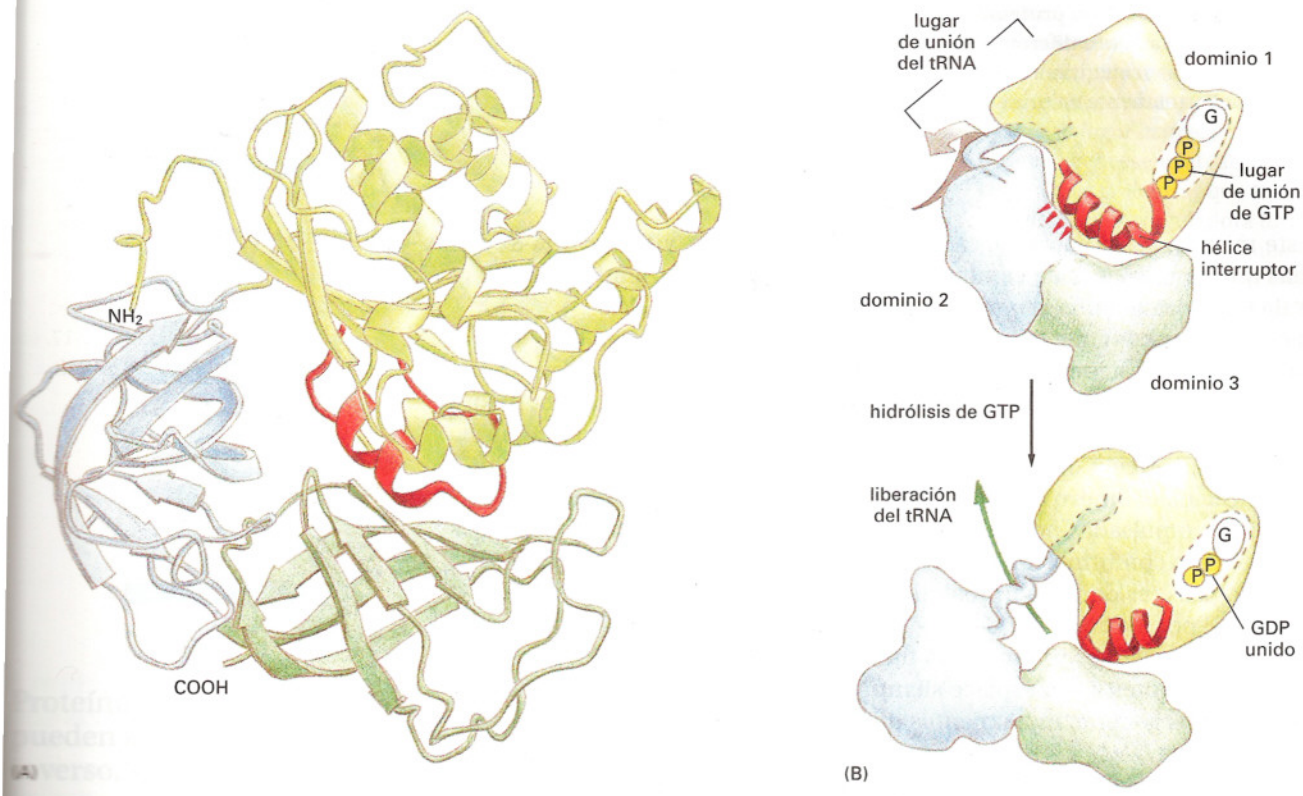


Figura 5-20 El gran cambio conformacional de EF-Tu está producido por la hidrólisis de GTP. (A) Estructura tridimensional de EF-Tu cuando une GTP. El dominio superior es homólogo a la proteína Ras y la hélice α en *rojo* es la "hélice interruptor" que se desplaza cuando el GTP se ha hidrolizado, como se muestra en la Figura 5-18. (B) El cambio de conformación de la hélice interruptor en el dominio 1 hace que los dominios 2 y 3 giren, como una sola unidad, unos 90° hacia el observador, liberando el tRNA. (A, adaptado de Berchtold et al., *Nature* 365:126-132, 1993. © 1993, Macmillan Magazines Ltd; B, por cortesía de Mathias Sprinzl y Rolf Hilgenfeld.)

proteicos para modificar grandes proteínas con sofisticadas funciones. En la transición de Ras a EF-Tu hemos entrado en un mundo que "huele" a biología.

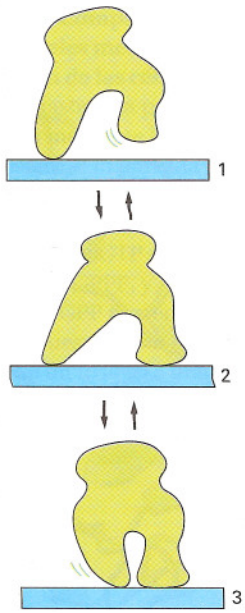
Proteínas que hidrolizan ATP realizan trabajo mecánico en las células[12]

Los cambios alostéricos de forma pueden utilizarse para regular reacciones químicas, pero también para generar movimientos ordenados en las células. Supongamos, por ejemplo, que se necesita una proteína que "camine" a lo largo de un fino hilo, como es el caso de una molécula de DNA. En la Figura 5-21 se muestra esquemáticamente cómo una proteína alostérica puede hacerlo adoptando una serie de cambios conformacionales. Sin embargo, si no hubiera nada que dirigiera estas modificaciones para que siguieran una secuencia ordenada, serían perfectamente reversibles y la proteína se desplazaría al azar, arriba y abajo, a lo largo del filamento.

Podemos considerar la situación desde otro punto de vista. Como el movimiento direccional de una proteína produce trabajo, las leyes de la termodinámica dicen que un movimiento como éste ha de consumir energía libre de otra fuente (de lo contrario la proteína podría utilizarse para construir una máquina de movimiento continuo). Por lo tanto, sean cuales fueren las modificaciones que introduzcamos en el modelo mostrado en la Figura 5-21, como añadir ligandos *que favorezcan* determinadas conformaciones, sin un aporte de energía la molécula proteica deambulará sin rumbo.

¿Cómo se puede conseguir que las modificaciones conformacionales sean unidireccionales? Para lograr que todo el ciclo se produzca en una dirección basta con que una cualquiera de sus etapas sea irreversible. Una manera de conseguirlo es utilizar el mecanismo que acabamos de describir para dirigir las alteraciones alostéricas en una molécula proteica mediante la hidrólisis de GTP. Por ejemplo, debido a la gran cantidad de energía libre que se libera cuando se hidroliza el GTP, resulta muy improbable que la proteína EF-Tu pueda añadir directamente una molécula de fosfato al GDP, invirtiendo así la hidrólisis de

Figura 5-21 Una proteína alostérica "que anda". A pesar de que sus tres conformaciones diferentes le permiten desplazarse al azar adelante y atrás mientras se mantiene unida a un filamento, la proteína no puede moverse uniformemente en una sola dirección.



GTP. Este mismo principio se aplica a la hidrólisis del ATP, y la mayoría de las proteínas que son capaces de caminar en una dirección recorriendo largas distancias (la llamadas *motores proteicos*) lo hacen hidrolizando ATP.

En el modelo altamente esquemático de la Figura 5-22, la unión de ATP impulsa la transformación del motor proteico de la conformación 1 a la conformación 2. Entonces, el ATP unido se hidroliza produciendo ADP y fosfato inorgánico (P_i), lo cual genera un cambio de la conformación 2 a la conformación 3. Finalmente, la liberación del ADP y del P_i, que estaban unidos a la proteína, impulsa a la proteína de nuevo a adoptar la conformación 1. Las transiciones 1 → 2 → 3 → 1 están impulsadas por la energía de hidrólisis del ATP, por lo que estas series de cambios conformacionales serán efectivamente irreversibles en condiciones fisiológicas (es decir, la probabilidad de que el ADP se recombine con P_i formando ADP por la ruta 1 → 3 → 2 → 1 es extremadamente baja). Así pues, el ciclo entero de reacciones se producirá únicamente en una dirección, haciendo que la molécula proteica se desplace siempre hacia la derecha en este ejemplo. Muchos proteínas generan movimientos direccionales a través de este mecanismo, incluyendo las *DNA helicasas*, enzimas que se impulsan a sí mismas a lo largo del DNA a velocidades tan elevadas como 1000 nucleótidos por segundo.

La estructura de la miosina revela de qué forma los músculos generan fuerza[13]

En el Capítulo 16 discutimos de qué manera diversos movimientos celulares están producidos por motores proteicos que se desplazan rápidamente a lo largo de filamentos proteicos, dirigidos por ciclos repetidos de hidrólisis de ATP (véase Figura 5-22). El mejor conocido de estos motores proteicos es la **miosina**, cuyos movimientos dirigidos a lo largo de filamentos de actina genera movimientos intracelulares y contracción muscular. Las estructuras tridimensionales de la miosina (y de la actina) se han determinado mediante análisis de cristalografía de rayos X, lo cual nos permite vislumbrar el mecanismo interno de un motor biológico. La estructura del dominio de la cabeza de la miosina (Figura 5-23) sugiere de qué forma la hidrólisis de ATP se puede acoplar a la generación de fuerza. Se cree que la unión y la hidrólisis del ATP generan una serie de cambios de conformación ordenados que desplazan la punta de la cabeza unos 5 nanómetros, como se ilustra esquemáticamente en la Figura 5-24). Este movimiento, acoplado a la formación y rotura de interacciones con la actina, repitiéndose en cada ciclo de hidrólisis del ATP, propulsa la molécula de miosina unidireccionalmente a lo largo del filamento de actina (véase Figura 16-91). Así en la miosina, como en la proteína EF-Tu discutida anteriormente, una pequeña perturbación del lugar de unión del nucleótido, a través de transiciones alostéricas que aumentan el efecto, genera movimientos proteicos ordenados mucho más acusados, que están en la base de la biología celular.

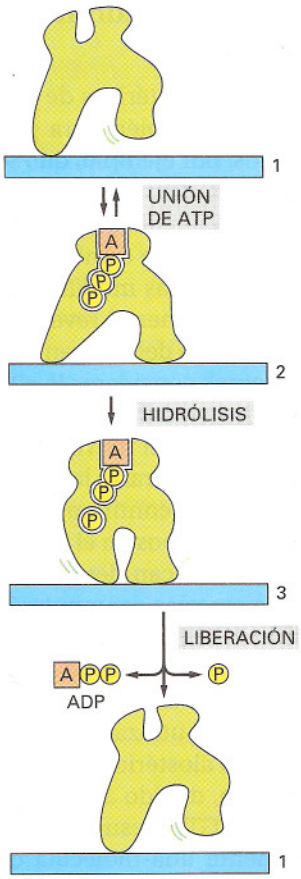


Figura 5-22 Una proteína alostérica "motor". Una transición ordenada entre tres conformaciones está impulsada por la hidrólisis de una molécula de ATP unida a ella. Debido a que una de estas transiciones está acoplada a la hidrólisis de ATP, el ciclo es esencialmente irreversible. Al repetirse el ciclo la proteína se desplaza siempre en la misma dirección (hacia la derecha en la figura) a lo largo del filamento.

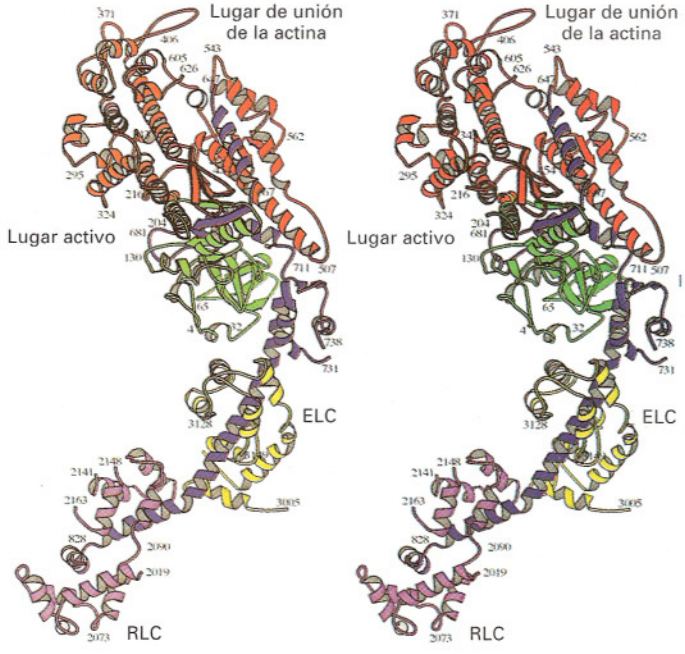


Figura 5-23 Estructura de la cabeza de la miosina. En este diagrama estereoscópico del dominio cabeza de la miosina, se produce hidrólisis de ATP en el *lugar activo*. ELC indica la cadena ligera esencial (de Essential Light Chain) mientras que RLC indica la cadena ligera reguladora (de Regulatory Light Chain); ambas contribuyen, a lo largo de la cadena pesada de la miosina, al dominio cabeza. (De I. Rayment et al., *Science* 261:50-58, 1993. © 1993 the AAAS.)

Proteínas alostéricas unidas a membrana y dirigidas por ATP pueden actuar como bombas iónicas o trabajar en sentido inverso, sintetizando ATP[14]

Además de generar fuerza mecánica, las proteínas alostéricas pueden utilizar la energía de la hidrólisis del ATP para realizar otras formas de trabajo, como el bombeo específico de iones al interior o al exterior de la célula. Un importante ejemplo al respecto es la **ATPasa Na^+-K^+**, que se encuentra en la membrana plasmática de todas las células animales, y que bombea 3 Na^+ hacia el exterior de la célula y 2 K^+ hacia el interior en cada ciclo de cambios conformacionales dirigidos por la hidrólisis del ATP (véase Figura 11-11). En la mayoría de las células esta bomba impulsada por ATP consume más del 30% del total de la energía que requiere la célula. Bombeando continuamente Na^+ hacia el exterior y K^+ hacia el interior, mantiene la concentración de Na^+ mucho menor en el interior de la célula que en el exterior y la de K^+ mucho mayor en el interior que en el exterior, generando así dos gradiente iónicos (en direcciones opuestas) a través de la membrana plasmática. Estos y otros gradientes iónicos a través de diferentes membranas de la célula pueden almacenar energía, tal como lo hace una diferencia de nivel de agua a cada lado de las paredes de una presa. La energía se utiliza para dirigir cambios conformacionales en una gran variedad de proteínas alostéricas asociadas a membrana, que realizan trabajo útil. El gran gradiente de Na^+ a través de la membrana plasmática, por ejemplo, dirige muchas otras bombas proteicas unidas a dicha membrana, que transportan glucosa o determinados aminoácidos hacia el interior de la célula; tanto la glucosa como los aminoácidos son arrastrados hacia el interior mediante el influjo simultáneo de Na^+ que ocurre cuando el Na^+ se desplaza a favor de su gradiente de concentración.

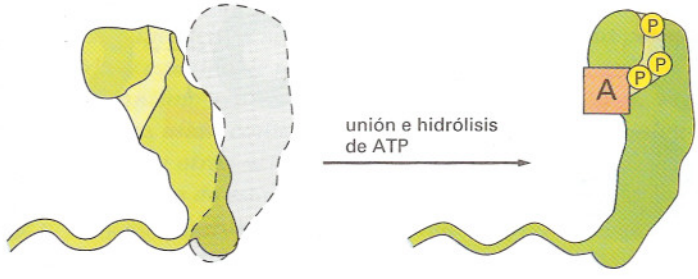


Figura 5-24 Visión conceptual de un gran cambio de conformación en la miosina, probablemente causado por la unión e hidrólisis de ATP. Este modelo está basado en la estructura mostrada en la Figura 5-23. En el siguiente paso en el proceso de hidrólisis, la molécula de fosfato inorgánico producida (*arriba*) se libera a la solución. (Según I. Rayment et al., *Science* 261:58-65, 1993. © 1993 the AAAS.)

Las bombas alostéricas asociadas a membrana dirigidas por la hidrólisis de ATP también pueden actuar en sentido inverso, utilizando la energía del gradiente iónico para sintetizar ATP. De hecho, la energía asequible en el gradiente de H^+ a través de la membrana mitocondrial interna se utiliza de esta forma por el complejo proteico alostérico unido a membrana, **ATP sintasa**, el cual sintetiza la mayor parte del ATP que necesita la célula animal, tal como discutiremos en el Capítulo 14.

Las transiciones alostéricas acopladas energéticamente permiten a las proteínas actuar como motores, como relojes, como factores de ensamblaje o como transductores de información[15]

Muchas proteínas sufren cambios conformacionales ordenados acoplados a la liberación de energía que se produce cuando un nucleósido trifosfato (tanto ATP como GTP) se hidroliza a nucleósido difosfato (ADP o GDP respectivamente). Algunos de estos cambios comprenden la unión covalente del grupo fosfato a la proteína (fosforilación proteica), pero muchos otros no, como la miosina. Generalmente cada cambio se desencadena por un evento específico (la unión de la miosina a la actina, por ejemplo, desencadena la hidrólisis de ATP por la miosina), lo cual marca una dirección y ordena las interacciones de las macromoléculas en la célula.

La capacidad de utilizar la energía de un nucleósido trifosfato para dirigir cambios alostéricos en proteínas ha resultado crucial para la evolución de las células, exactamente de la misma forma en que la capacidad de utilizar la energía eléctrica ha resultado crucial para el desarrollo de la tecnología moderna. En ambos casos se han abierto enormes posibilidades para desarrollar aparatos útiles. Por ejemplo, proteínas como Cdk actúan como interruptores integradores sofisticados (véase Figura 5-15), recibiendo la información del entorno de la célula y del estado del ciclo celular y utilizándola para coordinar el comportamiento de la célula. Motores proteicos, como la miosina, se desplazan unidireccionalmente a lo largo de filamentos generando varios tipos de movimientos y generando orden en el interior de la célula. Proteínas como EF-Tu actúan como instrumentos medidores de tiempo, mejorando la fidelidad de importantes reacciones biológicas (véase Figura 6-31). Otras proteínas utilizan la energía liberada por la hidrólisis de un nucleósido trifosfato para catalizar el ensamblaje de determinados complejos proteicos. En la Figura 5-25 se recoge un resumen de estas diferentes posibilidades.

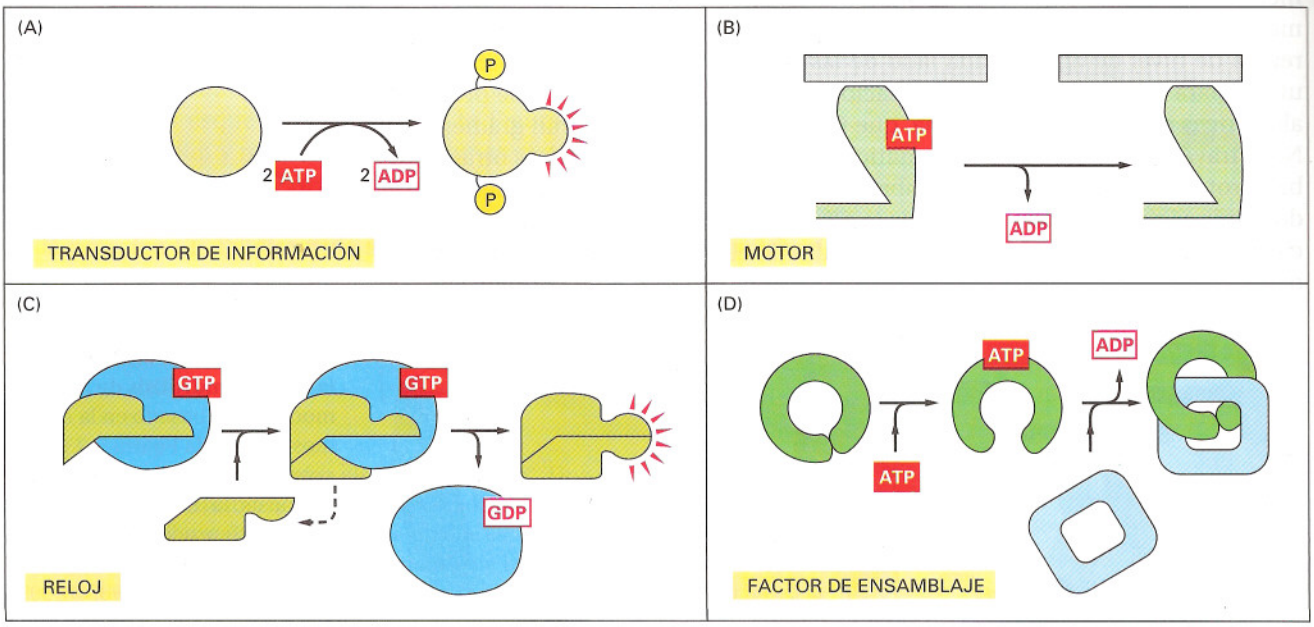


Figura 5-25 Algunos dispositivos fabricados con proteínas. *En estos ejemplos la energía de hidrólisis de* nucleósido trifosfato se utiliza para dirigir cambios de conformación en proteínas alostéricas. (A) Un transductor de información, como una proteína quinasa. (B) Un motor, como la miosina. (C) Un reloj, como EF-Tu que retrasa el ensamblaje de un complejo activo para asegurar que los complejos incorrectos se disocien (*línea discontinua*). (D) Un factor de ensamblaje que genera grandes estructuras.

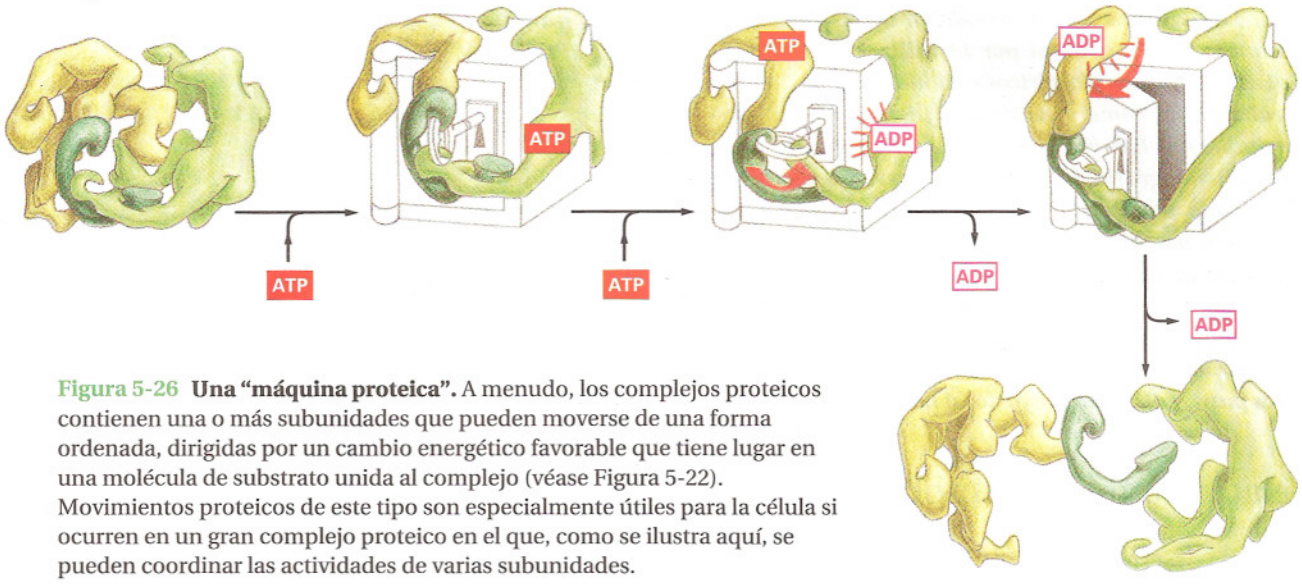


Figura 5-26 **Una "máquina proteica".** A menudo, los complejos proteicos contienen una o más subunidades que pueden moverse de una forma ordenada, dirigidas por un cambio energético favorable que tiene lugar en una molécula de substrato unida al complejo (véase Figura 5-22). Movimientos proteicos de este tipo son especialmente útiles para la célula si ocurren en un gran complejo proteico en el que, como se ilustra aquí, se pueden coordinar las actividades de varias subunidades.

A menudo las proteínas forman grandes complejos que actúan como máquinas proteicas[16]

En el progreso desde las pequeñas proteínas hasta las grandes proteínas formadas por muchos dominios, las funciones que puede realizar una proteína son cada vez más elaboradas. Sin embargo, las tareas más imprevisibles las llevan a cabo grandes agregados proteicos formados por muchas subunidades individuales. Actualmente es posible reconstruir la mayoría de los procesos biológicos en un sistema libre de células en el tubo de ensayo, y como puede observarse cada proceso central de una célula –como la replicación del DNA, del RNA o la síntesis de proteínas, la formación de vesículas o la señalización transmembrana– está catalizado por un complejo de más de 10 proteínas. En estas **máquinas proteicas** la hidrólisis de moléculas de nucleósidos trifosfato (ATP o GTP) unidas a la propia máquina dirige cambios de conformación ordenados en las proteínas individuales, permitiendo que todas las proteínas del complejo se muevan de forma coordinada. De esta forma, por ejemplo, las enzimas apropiadas se desplazan directamente hacia posiciones donde son necesarias para producir reacciones en serie, en lugar de esperar a que se produzcan colisiones aleatorias de cada uno de los componentes necesarios. En la Figura 5-26 se ilustra una analogía mecánica sencilla.

Las células han desarrollado máquinas proteicas por la misma razón que los humanos hemos inventado máquinas mecánicas y electrónicas: las manipulaciones que están espacial y temporalmente coordinadas a través de procesos de unión son mucho más eficientes desarrollando casi cualquier tarea que la utilización secuencial de cada uno de los acontecimientos individuales.

Resumen

Las proteínas alostéricas cambian reversiblemente de conformación cuando determinados ligandos se unen a su superficie. A menudo los cambios producidos por un ligando afectan a otro ligando, y este tipo de relación entre dos lugares de unión de ligandos proporciona un mecanismo crucial de regular procesos celulares. Por ejemplo, los procesos metabólicos están controlados por retroalimentación: algunas moléculas pequeñas inhiben y otras activan a enzimas iniciales del proceso. Generalmente las enzimas reguladas de esta manera forman ensamblajes simétricos, permitiendo que se produzcan cambios conformacionales cooperativos que generan respuestas escalonadas a los ligandos.

Los cambios de conformación de las proteínas pueden estar dirigidos de una manera unidireccional por la utilización de energía química. Por ejemplo, acoplando cambios alostéricos a la hidrólisis de ATP las proteínas pueden desarrollar trabajo útil, como generar una fuerza mecánica o bombear iones a través de una membrana. Las estructuras tridimensionales de varias proteínas, determinadas por cristalografía de rayos X, han revelado de qué forma un pequeño cambio local generado por la hidrólisis de un nucleósido trifosfato se amplifica dando lugar cambios mayores en otros lugares de la proteína; de esta forma estas proteínas son capaces de actuar como transductores de información, motores, relojes o factores de ensamblaje. Se forman "máquinas proteicas" altamente eficientes mediante la incorporación de muchas subunidades proteicas diferentes a un gran agregado, en el cual los movimientos alostéricos de cada componente individual están coordinados para realizar la mayoría, si no todas, las reacciones biológicas.

Nacimiento, ensamblaje y muerte de las proteínas

Hemos descrito algunos de los extraordinarios instrumentos celulares formados por proteínas. Ahora consideraremos de qué manera se forman y se destruyen estos instrumentos. El mecanismo de la síntesis proteica se discute en otra parte. Ahora empezaremos considerando cómo se pliega y cómo se ensambla una proteína a medida que va abandonando el ribosoma en forma de cadena polipeptídica.

Se cree que las proteínas se pliegan a través de un intermediario globular fundido[17]

Muchas proteínas purificadas se pliegan *in vitro* de forma adecuada después de haber sido desplegadas, por lo que durante muchos años se pensó que las proteí-

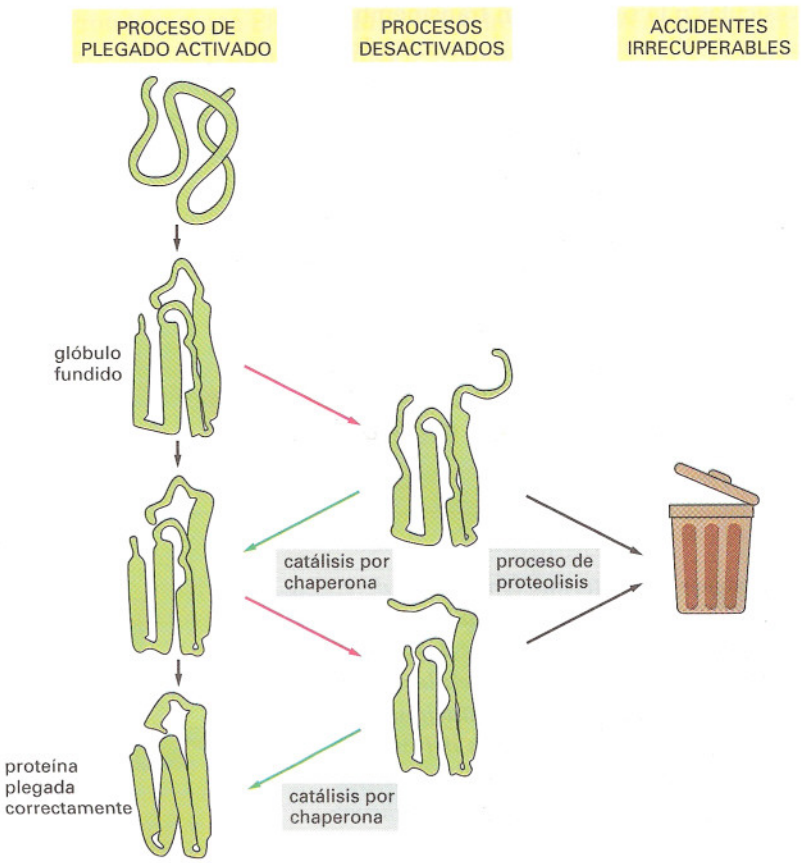
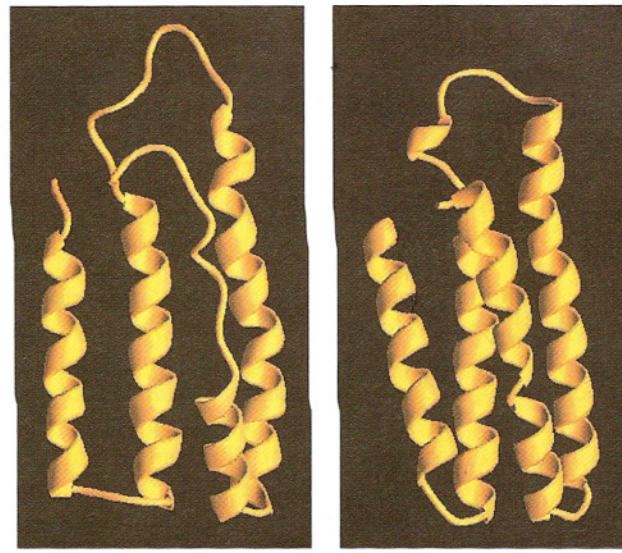


Figura 5-27 Visión actual del plegamiento proteico. Una proteína acabada de sintetizar rápidamente adquiere un estado de "glóbulo fundido" (véase Figura 5-28). Después, más lentamente, se producen plegamientos a través de múltiples etapas, algunas de las cuales producirían la muerte de la proteína sin la ayuda de chaperonas moleculares. Algunas moléculas pueden no conseguir plegarse correctamente y serán reconocidas y degradadas por enzimas proteolíticas (véase Figura 5-39).



(A) (B)

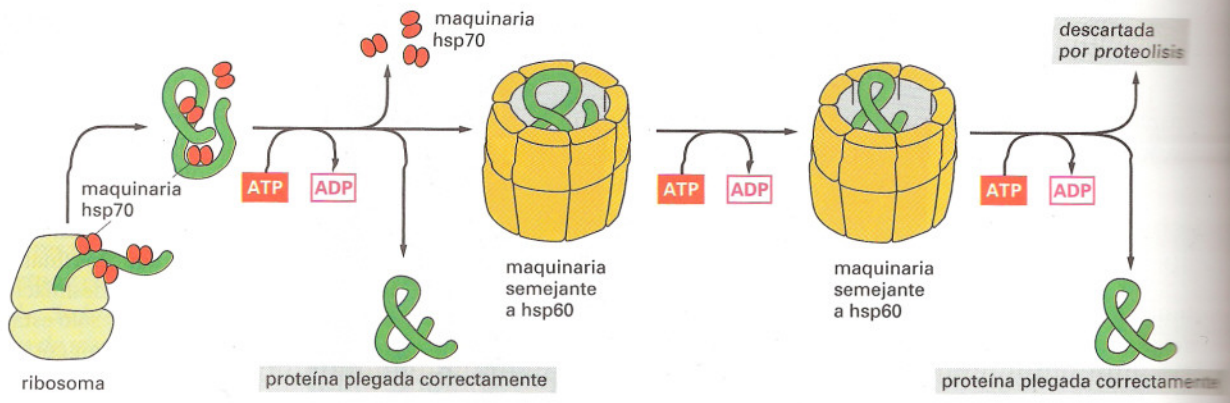
Figura 5-28 Estructura de un glóbulo fundido. (A) La forma de glóbulo fundido del citocromo b562 es más abierta y menos ordenada que la proteína nativa, mostrada en (B). Nótese que el glóbulo fundido contiene la mayor parte de la estructura secundaria de la forma nativa, aunque los finales de las hélices α están deshilachados y una de estas hélices sólo está formada parcialmente. (Por cortesía de Joshua Wand).

pueden adoptar todas las conformaciones posibles mientras se van plegando, hasta que consiguen adoptar la conformación de menor energía posible, la cual se supone que es el estado correcto de la proteína. Ahora sabemos que esto no es así: a pesar de las altas velocidades que adquieren los movimientos moleculares en una proteína (véase pág. 101), para cualquier proteína grande existen muchísimas más conformaciones posibles de las que se pueden explorar durante los pocos segundos que tarda la proteína en plegarse. Además, la existencia de proteínas mutantes que tienen defectos específicos de plegamiento indica que durante la evolución se ha ido seleccionando una secuencia de aminoácidos determinada, no sólo en función de las propiedades de la estructura final sino también por la capacidad de plegarse rápidamente adoptando su conformación nativa.

La capacidad de algunas proteínas purificadas y desnaturalizadas de recuperar sus estructuras nativas por sí mismas ha hecho posible disecar experimentalmente los procesos del plegamiento de las proteínas. Las proteínas se pliegan rápidamente formando estructuras en las que se ha formado la mayor parte (aunque no toda) de la estructura secundaria final (hélices α y láminas β) y en las que estos elementos se disponen de una forma extraordinariamente semejante a la nativa (Figura 5-27). Esta conformación extraordinariamente abierta y flexible, denominada *glóbulo fundido* (molten globule) (Figura 5-28) es el punto de partida de un proceso relativamente lento en el que se producen muchos ajustes entre cadenas laterales intentando formar correctamente la estructura terciaria. Las etapas posteriores hacia la conformación final se han de producir diferentes procesos. Algunos de ellos pueden conducir a plegamientos incorrectos a no ser que se den con la colaboración de una *chaperona molecular*, proteínas especiales de las células cuya función consiste en ayudar a otras proteínas a plegarse o ensamblarse en estructuras estables y activas (Figura 5-27).

Las chaperonas moleculares facilitan el plegamiento de las proteínas[18]

Las chaperonas moleculares se identificaron por primera vez en las bacterias, cuando se estudiaron mutantes de *E. coli* que eran incapaces de utilizar bacteriófago lambda para replicarse. Estos mutantes producen versiones ligeramente alteradas de dos componentes de la maquinaria de chaparones, relacionada con las proteínas de estrés por calor 60 y 70 (hsp60 y hsp70, de Heat-Shock Proteins), que resultaban defectuosas en determinadas etapas del ensamblaje de proteínas víricas.



Las células eucariotas tienen familias de proteínas hsp60 y hsp70, de forma que diferentes miembros de las familias actúan en compartimientos celulares distintos. Así, como discutimos en el Capítulo 12, las mitocondrias contienen sus propias moléculas hsp60 y hsp70, diferentes de las que actúan en el citosol, y en el retículo endoplasmático existe una hsp especial (llamada *BIP*) que colabora en el plegamiento de las proteínas.

Tanto las proteínas hsp60 como las hsp70 actúan con un reducido número de proteínas asociadas, cuando colaboran en el plegamiento de otras proteínas. Presentan afinidad por las zonas hidrofóbicas asequibles que muestran las proteínas plegadas de forma incompleta e hidrolizan ATP, posiblemente uniéndose y liberándose de su proteína en cada ciclo de hidrólisis del ATP. Originalmente se pensó que las chaperonas moleculares sólo actuaban impidiendo la agregación promiscua de las proteínas todavía no plegadas (de ahí su nombre; *chaperon* significa "dama de compañía de señoritas"). Sin embargo ahora se cree que también interactúan más íntimamente con sus "clientes" produciendo efectos que podrían asemejarse a un "masaje proteico". Las chaperonas se unen a las regiones hidrofóbicas expuestas, y dan un masaje a las regiones de la proteína que están medio plegadas a partir del intermediario globular fundido, cambiando su estructura de tal manera que proporciona a la proteína otra posibilidad de plegarse (véase Figura 5-27).

En otros aspectos los dos tipos de proteínas hsp actúan de forma diferente. Se cree que la maquinaria hsp70 actúa precozmente en la vida de una proteína, uniéndose a cadenas de unos siete aminoácidos hidrofóbicos antes de que la proteína se libere del ribosoma (Figura 5-29). Por el contrario, las proteínas semejantes a hsp60 forman una estructura parecida a un gran barril (Figura 5-30) que actúa más tarde en la vida de la proteína; se cree que esta chaperona forma una "cámara de aislamiento" dentro de la cual se colocan las proteínas a medio plegar, y se les facilita un entorno favorable donde puedan intentar volverse a plegar (véase Figura 5-29).

Estas chaperonas moleculares se denominan *proteínas de estrés por calor* debido a que su síntesis se incrementa notablemente tras una breve exposición

Figura 5-29 Dos familias de chaperonas moleculares. Las proteínas hsp70 actúan de forma temprana, reconociendo pequeñas zonas de la superficie de las proteínas. Las proteínas semejantes a hsp60 actúan más tarde y forman una especie de contenedor dentro del cual se transfieren las proteínas que todavía no se han plegado completamente. En ambos casos, ciclos repetidos de hidrólisis de ATP contribuyen a que las proteínas hsp sigan ciclos de unión y liberación de la proteína cliente, facilitando su plegamiento.

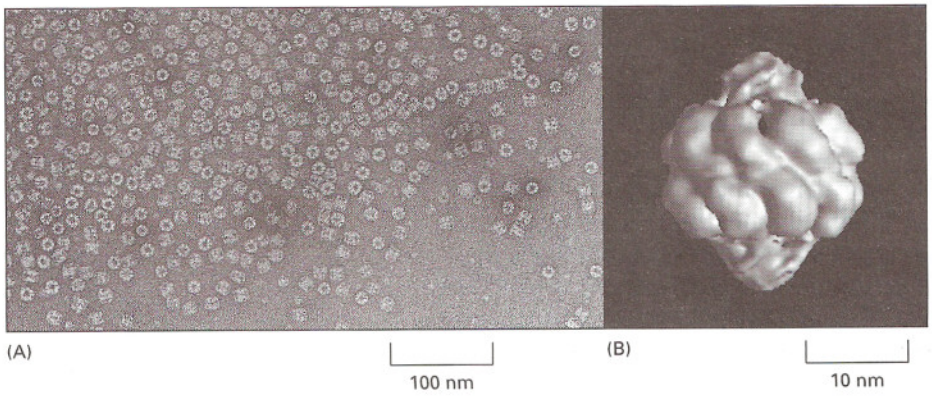


Figura 5-30 Estructura de una chaperona semejante a hsp60, determinada por microscopia electrónica. En (A) se muestra un gran número de partículas contrastadas negativamente y en (B) un modelo tridimensional de una de estas partículas, obtenido por métodos de procesamiento de imágenes basados en ordenador. Tanto en procariotas como en eucariotas se encuentran estructuras similares, parecidas a un gran barril. A este tipo de proteína se le denomina hsp60 en las mitocondrias, groEL en bacterias y TCP-1 en el citosol de las células de vertebrados. (A, de B.M. Phipps et al., *EMBO J.* 10:1711-1722, 1991; B, de B.M. Phipps et al., *Nature* 361:475-477, 1993. © Macmillan Magazines Ltd.)

de las células a elevadas temperaturas (por ejemplo, 42ºC). Ello parece reflejar una operación de retroalimentación que responde a un incremento de la cantidad de proteínas medio desplegadas (como las producidas por las elevadas temperaturas), de forma que se incrementa la síntesis de chaperonas que ayudan a las proteínas a volverse a plegar.

Muchas proteínas contienen series de moléculas plegadas de forma independiente[19]

A menudo el plegamiento de una proteína acabada de sintetizar empieza con la formación de un determinado número de dominios estructurales estables, que se corresponden con unidades funcionales, y que parecen tener orígenes evolutivos muy antiguos. En otros apartados del libro discutimos los procesos por los que se cree que han evolucionado las proteínas, poniendo de relieve de qué manera se forman nuevas proteínas mediante el barajado de exones que codificaban dominios conservados de proteínas útiles (véanse págs. 413-424). La evolución ha preservado algunos de estos dominios en forma de unidades plegadas que retienen su estructura incluso cuando son separados de la proteína –bien sea por proteólisis selectiva, bien, de manera más eficiente, por técnicas de ingeniería genética. Los dominios proteicos de este tipo, que muy a menudo participan en el barajado evolutivo de exones, se denominan **módulos**; ahora que conocemos las secuencias de DNA de centenares de genes, se ha puesto de manifiesto la importancia de estos módulos.

Los módulos proteicos tienen típicamente entre 40 y 100 aminoácidos de longitud. Su pequeño tamaño y su capacidad de plegarse independientemente han hecho posible determinar la estructura tridimensional de muchos de ellos en solución, mediante técnicas de NMR de elevada resolución, la cual es una alternativa conveniente a la cristalografía de rayos X. En la Figura 5-31 se ilustran al-

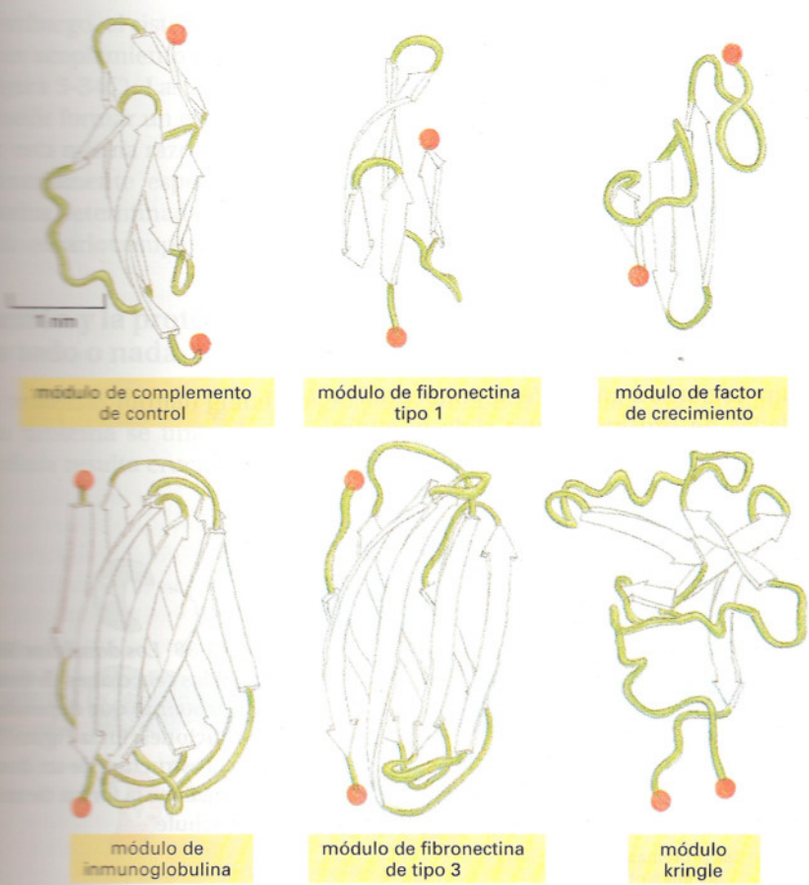
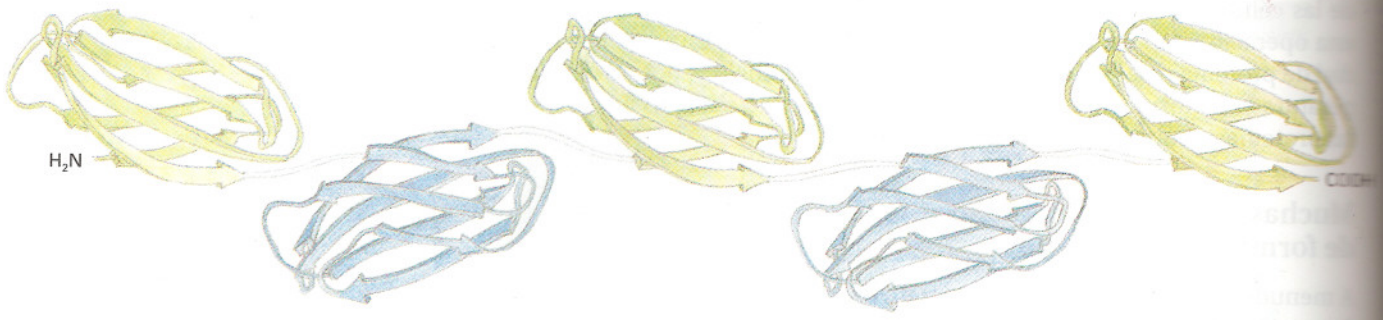


Figura 5-31 Estructuras tridimensionales de algunos módulos proteicos. En estos diagramas, las zonas de lámina β se presentan como *flechas* y los extremos N y C están marcados como *bolas rojas*. (Adaptado de M. Baron, D.G. Norman e I.D. Campbell, *Trends Biochem. Sci.* 16:13-17, 1991 y D.J. Leahy et al., *Science* 258:987-991, 1992. © de AAAS.)



gunos módulos típicos. Cada uno de ellos tiene un núcleo con una estructura estable formado por cadenas o por láminas β, del que salen asas de cadenas polipeptídicas menos ordenadas (mostradas en *verde*). Idealmente las asas están situadas formando lugares de unión para otras moléculas, como se ha demostrado para el plegado de las inmunoglobulinas que fue reconocido primero en las moléculas de anticuerpo (véase Figura 23-35). Es posible que el éxito evolutivo de los módulos basados en láminas β se deba al hecho de que constituyeron unidades adecuadas para la generación de nuevos lugares de unión para ligandos, a través de variaciones en estas asas que sobresalen del núcleo del módulo.

Figura 5-32 Larga estructura formada a partir de series de módulos en línea. Aquí se muestran cinco módulos de fibronectina de tipo 3 formando una disposición repetitiva. Estructuras similares se encuentran en varias moléculas de matriz extracelular. Se cree que interacciones entre cadenas laterales de los extremos de los módulos proporcionan rigidez a las estructuras de este tipo.

Los módulos confieren versatilidad y a menudo median las interacciones proteína-proteína[19, 20]

Una segunda característica de los módulos proteicos que explica su utilidad es la facilidad con la que pueden ser integrados en otras proteínas. Cinco de los seis módulos que se ilustran en la Figura 5-31 tienen sus extremos C y N (señalados con *bolas rojas)* en extremos opuestos del módulo. Estas disposiciones "en línea" significan que cuando un DNA que codifica un módulo de este tipo se duplica en tándem, lo cual es habitual en la evolución de los genes (como se discute en el Capítulo 8), los módulos duplicados se pueden acomodar fácilmente en la proteína. De esta forma estos módulos pueden unirse en serie tanto consigo mismos (Figura 5-32) como con otros módulos en línea, formando largas estructuras. Habitualmente se encuentran estructuras rígidas y largas compuestas por series de módulos, tanto en moléculas de la matriz extracelular como en regiones de proteínas receptoras situadas en la superficie celular.

Otros módulos, como el "kringle" que se muestra en la Figura 5-31, son de tipo "enchufe". Tras redistribuciones genómicas pueden ser fácilmente acomodados en forma de inserto en una región de un asa de otra proteína. Algunos de estos módulos actúan como lugares de unión específicos de otras proteínas o de otras estructuras celulares. Un ejemplo importante al respecto es el dominio SH2, que puede unirse fuertemente a una región de una cadena polipeptídica que contenga cadenas laterales fosforiladas de tirosina. Como cada dominio SH2 también reconoce otras características del polipéptido, sólo se une al subgrupo de proteínas que contienen tirosinas fosforiladas. La presencia de dominios SH2 en una proteína le permite formar complejos con proteínas que se fosforilen en tirosinas en respuesta a procesos de señalización celular (Figura 5-33).

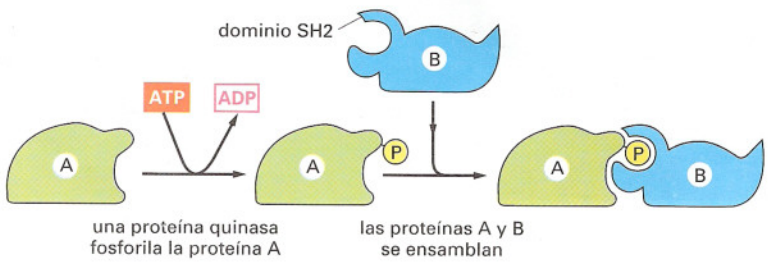


Figura 5-33 Los dominios SH2 median las reacciones de ensamblaje de las proteínas que dependen de fosforilaciones. En la Figura 15-49 se ilustra la estructura de un dominio SH2, que tiene la forma de un módulo tipo "enchufe".

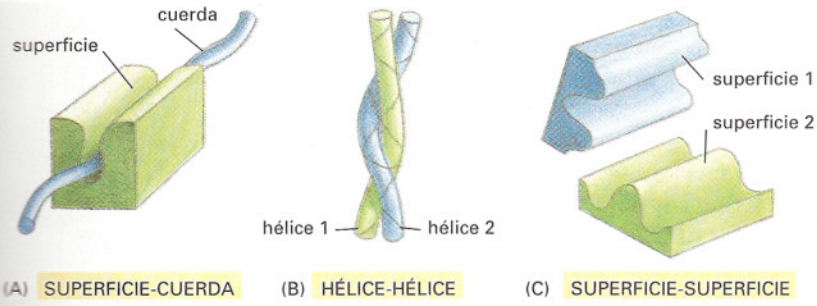


Figura 5-34 Tres sistemas a través de los que se pueden unir entre sí dos proteínas. Sólo se muestran las zonas que interactúan de las dos proteínas. (A) Una superficie rígida de una proteína puede unirse a una larga asa de cadena polipeptídica (una "cuerda") de otra proteína. (B) Dos hélices α pueden unirse entre sí formando una hélice superenrollada. (C) A menudo dos superficies rígidas complementarias unen entre sí dos proteínas.

Estos complejos proteicos que se forman y se deshacen como resultado de cambios en la fosforilación de la proteína juegan un papel central en la transducción de señales extracelulares en señales intracelulares, como se describe en el Capítulo 15.

Las proteínas pueden unirse unas a otras a través de diferentes tipos de interfases

Las proteínas pueden unirse entre sí al menos de tres maneras: en muchos casos una porción de la superficie de una proteína contacta con un asa extendida de una cadena polipeptídica (una "cuerda") de otra proteína (Figura 5-34A). Las interacciones de este tipo permiten, por ejemplo, que el dominio SH2 reconozca un asa fosforilada de otra proteína, y también permiten a una proteína quinasa reconocer las proteínas que fosforilará (véase Figura 5-16B).

El segundo tipo de interacciones entre la superficie de dos proteínas consiste en apareamiento de dos hélices α, una de cada proteína, formando una hélice superenrollada (Figura 5-34B). Este tipo de interacciones entre proteínas se halla en algunas familias de proteínas reguladoras de genes, como se discute en el Capítulo 9.

Sin embargo, el sistema más común de interacción entre dos proteínas consiste en un acoplamiento preciso entre dos superficies rígidas, una de cada proteína (Figura 5-34C). Las interacciones de este tipo pueden ser muy fuertes, ya que se puede formar un elevado número de enlaces si las superficies se acoplan bien. Por esta misma razón, estas interacciones superficie-superficie pueden ser extraordinariamente específicas, permitiendo que una proteína seleccione a una proteína determinada de entre los muchos miles de proteínas que presenta una célula eucariota superior.

La conexión y la proteolisis selectiva aseguran los ensamblajes del tipo todo o nada

Muchas proteínas forman grandes agregados con otras proteínas. Ello requiere que cada proteína se una selectivamente a otras proteínas simultáneamente. Para la célula resulta crucial que cada complejo proteico se forme de modo efi-

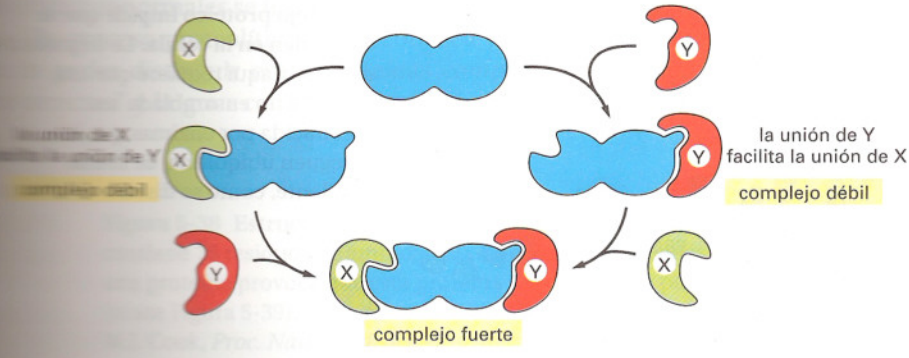


Figura 5-35 La conexión facilita un ensamblaje de tipo todo o nada de los complejos proteicos. Como se indica, cada una de las dos proteínas X e Y inducen un cambio alostérico en una tercera proteína (mostrada en *azul*), que permite la unión de la otra proteína. Como resultado de ello, solamente el complejo formado por las tres proteínas es suficientemente fuerte para existir en la célula, lo cual resulta efectivo en el ensamblaje del tipo todo o nada.

ciente, y que otros complejos parciales, cuya formación interferiría con la función del complejo final, se formen en cantidades mínimas. Por ello, debe haber *mecanismos que aseguren que los ensamblajes se produzcan por sistemas del* todo o nada.

Un mecanismo importante radica en el fenómeno de la *conexión* (linkage), que hemos descrito antes. Gracias a la conexión, si un ligando cambia la conformación de una proteína alostérica de forma que la proteína se una a otro ligando de forma más eficiente, el segundo ligando puede, a su vez, incrementar la afinidad de la proteína por el primer ligando (véase Figura 5-5). Este mismo principio se aplica a las interacciones proteína-proteína. Cuando dos proteínas se unen entre sí, a menudo una de ellas incrementa su afinidad por una tercera proteína. Debido a esta conexión el complejo de las tres proteínas será más estable que el complejo de una sola proteína. Un mecanismo de este tipo puede producir un ensamblaje del tipo todo o nada (Figura 3-35).

Aunque se produzcan mecanismos de ensamblaje del tipo todo o nada que dirijan la conformación de complejos proteicos completos, a no ser que la célula presente las cantidades exactas de las proporciones adecuadas de cada proteína del complejo, sobrarán proteínas no ensambladas. De hecho, la células no siempre producen sus componentes en las cantidades precisas; sin embargo, las células son capaces de degradar selectivamente cualquier complejo proteico mal ensamblado (Figura 5-36). Así pues, las células necesitan disponer de un sofisticado sistema para identificar las proteínas ensambladas de forma anormal y para destruirlas. Efectivamente, las células eucariotas contienen un elaborado conjunto de proteínas que permite dirigir específicamente los ensamblajes incompletos de este tipo hacia la maquinaria de degradación proteica, como discutiremos a continuación.

La proteolisis dependiente de ubiquitina es la responsable principal del recambio proteico selectivo en los eucariotas[21]

Una de las funciones de los mecanismos intracelulares de proteolisis es, como acabamos de decir, reconocer y eliminar las proteínas no ensambladas. Otra de las funciones consiste en desechar las proteínas dañadas o mal plegadas (véase Figura 5-27). Otra es conferir una corta vida media a ciertas proteínas normales cuya concentración ha de cambiar rápidamente en respuesta a alteraciones del estado de la célula; muchas de estas proteínas de corta vida son degradadas rápidamente de forma habitual, mientras que otras, especialmente las ciclinas, son estables hasta que son degradadas repentinamente en un determinado momento del ciclo celular. Aquí discutiremos fundamentalmente cómo se degradan las proteínas en el citosol, pero también se producen procesos importantes de degradación en el retículo endoplasmático (ER) y, como se discute en el Capítulo 13, en los lisosomas.

La mayoría de las proteínas que son degradadas en el citosol son liberadas a grandes complejos proteicos denominados **proteosomas**, de los que hay mu-

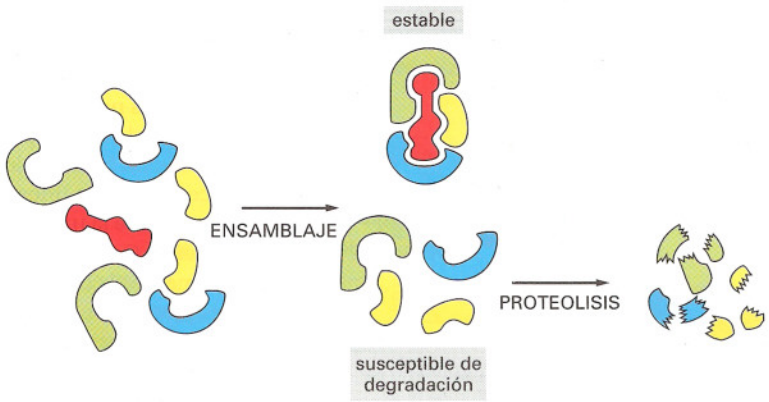


Figura 5-36 La proteolisis de los componentes sobrantes de un complejo proteico impide que se acumulen en la célula. La degradación mostrada aquí requiere que una proteína no ensamblada sea reconocida por enzimas que le agreguen ubiquitina, de forma covalente, como se discute en el texto.

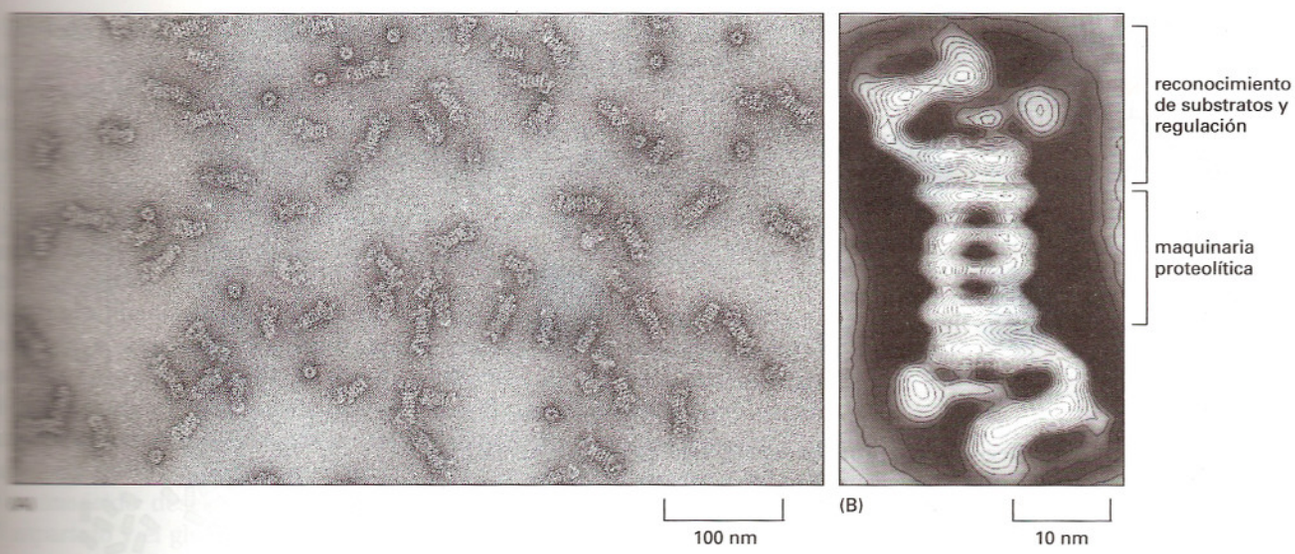


Figura 5-37 Un proteosoma. En (A) se muestra un gran número de partículas contrastadas negativamente. En (B) se presenta un modelo tridimensional de un complejo de proteosoma completo, obtenido por procesamiento de imágenes en un ordenador. Se presentan muchas copias de estas estructuras, distribuidas por toda la célula, donde actúan como bidón de basura para las proteínas celulares no deseadas. (Micrografías electrónicas por cortesía de Wolfgang Baumeister, de J.M. Peters et al., *J. Mol. Biol.* 234: 1993.)

copias dispersas por toda la célula. Cada proteosoma consiste en un cilindro central formado por múltiples proteasas distintas, cuyos lugares activos, al parecer, forman una cámara central. Cada extremo del cilindro está "cerrado" por un gran complejo proteico formado por al menos 10 tipos de polipéptidos, algunos de los cuales hidrolizan ATP (Figura 5-37). Se cree que estos tapones proteicos seleccionan las proteínas que deberán ser destruidas, uniéndose a ellas e introduciéndolas en la cámara del cilindro; allí las proteínas son degradadas hasta cortos péptidos, los cuales son liberados al exterior.

Los proteosomas actúan sobre proteínas que han sido marcadas específicamente para su destrucción, mediante la adición covalente de una pequeña proteína, la **ubiquitina** (Figura 5-38). La ubiquitina existe en todas las células, libre o unida covalentemente a proteínas. La mayoría de las proteínas ubiquitinadas están marcadas para ser degradadas. (Algunas proteínas de larga vida como las histonas también están ubiquitinadas, pero en estos casos la función de la ubiquitina es desconocida.) Diferentes procesos proteolíticos *dependientes de ubiquitina* utilizan enzimas que conjugan ubiquitina, estructuralmente similares entre sí pero diferentes, asociadas con subunidades de reconocimiento que las dirigen hacia las proteínas que presentan alguna señal determinada de degradación. La enzima de conjugación añade ubiquitina a un residuo de lisina de la proteína diana, y posteriormente añade series de ubiquitinas adicionales, formando una cadena multiubiquitina (Figura 5-39), la cual, al parecer, es reconocida por un receptor proteico específico del proteosoma.

Las proteínas desnaturalizadas o mal plegadas, así como las proteínas que contienen aminoácidos oxidados o anormales, son reconocidas y degradadas por el sistema proteolítico dependiente de ubiquitina. Probablemente, las enzimas que conjugan ubiquitina reconocen señales que estas proteínas tienen expuestas al exterior debido a su mal plegamiento o a su alteración química; se cree que estas señales son secuencias de aminoácidos o motivos conformacionales que en las proteínas normales se hallan en su interior, es decir, inasequibles.

Un proceso proteolítico que reconozca y destruya las proteínas anormales ha de poder distinguir entre proteínas *completas* que tienen conformaciones "incorrectas" y la gran cantidad de polipéptidos que están creciendo sobre los

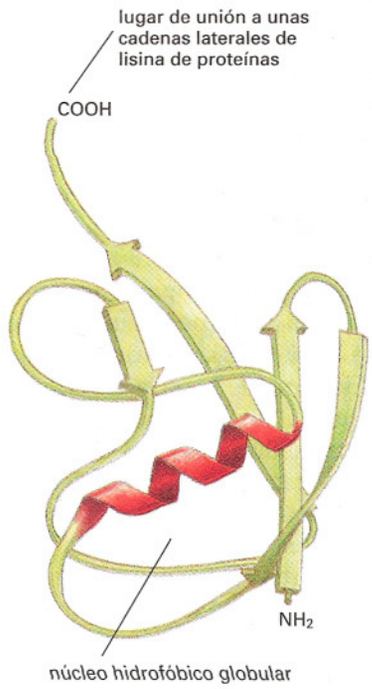


Figura 5-38 Estructura tridimensional de la ubiquitina. Esta proteína contiene 76 residuos de aminoácido. La adición de cadenas de ubiquitina a una proteína provoca que esta proteína sea degradada por el proteosoma (véase Figura 5-39). (Basada en S. Vijay-Kumar, C.E. Bugg, K.D. Wilkinson y W.J. Cook, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3582-3585, 1985.)

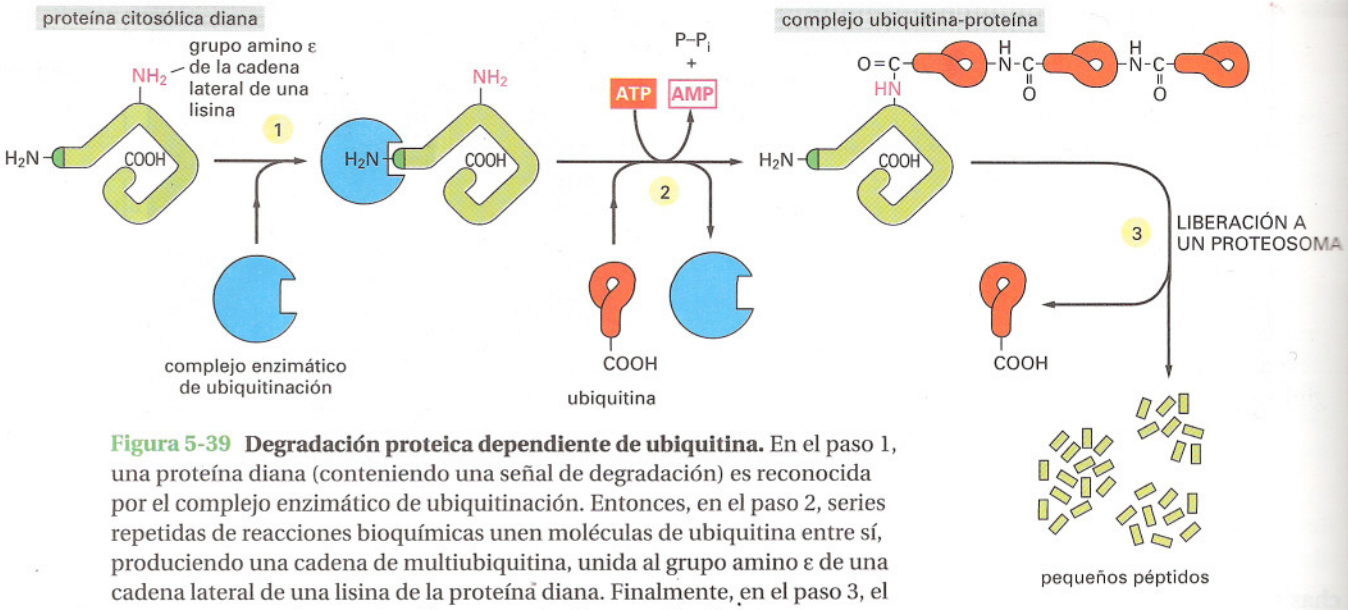


Figura 5-39 Degradación proteica dependiente de ubiquitina. En el paso 1, una proteína diana (conteniendo una señal de degradación) es reconocida por el complejo enzimático de ubiquitinación. Entonces, en el paso 2, series repetidas de reacciones bioquímicas unen moléculas de ubiquitina entre sí, produciendo una cadena de multiubiquitina, unida al grupo amino ε de una cadena lateral de una lisina de la proteína diana. Finalmente, en el paso 3, el proteosoma corta la proteína diana en series de pequeños fragmentos.

ribosomas (así como los polipéptidos que acaban de ser liberados de los ribosomas) y que todavía no han adoptado su conformación plegada normal. Puede demostrarse experimentalmente que éste no es un problema trivial: si se añade puromicina a las células –un inhibidor de la síntesis de las proteínas– las proteínas que se acaban de forma prematura son eliminadas rápidamente mediante un proceso dependiente de ubiquitina. Una posibilidad es que las proteínas formadas normalmente estén protegidas temporalmente por la maquinaria de traducción o por moléculas de chaperones. Otra posibilidad sería que las proteínas nacientes y acabadas de sintetizar son de hecho vulnerables a la proteolisis pero se pliegan adoptando su conformación nativa muy rápidamente, antes de poder ser marcadas para su destrucción por proteolisis.

La vida media de una proteína puede ser determinada por enzimas que alteran su extremo N[22]

Una característica que tiene una influencia importante en la estabilidad de una proteína es la naturaleza del primer aminoácido (del extremo N) de su cadena polipeptídica. Hay una estrecha relación, denominada la *regla N-terminal* entre la vida media *in vivo* de una proteína y la identidad de su aminoácido N-terminal. En todos los organismos estudiados, desde bacterias hasta mamíferos, existen distintas versiones de la regla N-terminal. Los aminoácidos Met, Ser, Thr, Ala, Val, Cys, Gly y Pro, por ejemplo, protegen las proteínas en la levadura *S. cerevisiae* cuando se presentan en el extremo N; estos aminoácidos no son reconocidos por los componentes de marcaje del proceso de la regla N-terminal mientras que los otros 12 aminoácidos atraen un ataque proteolítico. Todavía se han de identificar la mayoría de las proteínas que son rápidamente degradadas por el sistema de la regla N-terminal (que actúa tanto en el citoplasma como en el núcleo). Sin embargo, se sabe que no es frecuente la presencia de aminoácidos desestabilizantes en el extremo N de las proteínas del citosol, pero que es habitual en las proteínas que han sido transportadas a otros compartimientos. Por ello, una hipotética función del proceso de la regla N-terminal sería degradar las proteínas que normalmente actúan en el ER, en el complejo de Golgi o en otros compartimientos delimitados por membrana, pero que por alguna razón se han quedado o han vuelto al citosol.

No se conoce todavía de qué forma se exponen los aminoácidos desestabilizantes en el extremo N de las proteínas acabadas de sintetizar. Como se discute

Capítulo 6, inicialmente todas las proteínas son sintetizadas con una metionina (o con una formil-metionina en las bacterias) en su extremo N. A menudo esta metionina, que es un aminoácido estabilizante en la regla N-terminal, es eliminada por una aminopeptidasa específica. Sin embargo, las aminopeptidasas conocidas actualmente eliminan la metionina N-terminal si y sólo si el segundo aminoácido *también* es un aminoácido estabilizante en la regla N-terminal. Todavía no conocemos las proteasas que producen substratos fisiológicos del proceso de la regla N-terminal, ni las secuencias que son reconocidas como sitios de hidrólisis.

Algunos aminoácidos N-terminales desestabilizantes, como el aspartato y el glutamato, no son reconocidos directamente por el componente señalizador del proceso de la regla N-terminal. En lugar de ello, son modificados por la enzima arginil-tRNA-proteína transferasa, que une la arginina, uno de los aminoácidos desestabilizantes reconocibles directamente, al extremo N de las proteínas que presentan aspartato o glutamato como aminoácido N-terminal. Así, la arginina es un aminoácido desestabilizante *primario* en la regla N-terminal, mientras que el aspartato y el glutamato son aminoácidos desestabilizantes *secundarios*. En los eucariotas existen también aminoácidos desestabilizantes *terciarios* –la asparagina y la glutamina– los cuales desestabilizan a través de su transformación, mediante una amidasa específica, a los aminoácidos desestabilizantes secundarios aspartato y glutamato.

A menudo se da el caso de que el aminoácido N-terminal de una proteína es resistente a hidrólisis por los reactivos utilizados en los secuenciadores de proteínas. Tales proteínas tienen un aminoácido N-terminal modificado ("bloqueado"); la modificación más frecuente es la acetilación. Se cree que esta modificación juega un papel protegiendo las proteínas de larga vida de ser degradadas. Sin embargo, experimentos recientes con mutantes de levaduras que carecen de las principales especies de acetilasas N-terminales, muestran que la mayoría de estas proteínas no acetiladas siguen manteniendo vidas largas. Así, la función de la N-acetilación de estas proteínas está por descifrar.

Resumen

Desde el momento de su nacimiento, en un ribosoma, hasta su muerte por proteolisis dirigida, las proteínas son acompañadas por chaperones moleculares y por otros elementos de supervivencia cuya función es "dar masajes" a su forma, repararlas o eliminarlas. Las proteínas mal plegadas son inducidas, en primer lugar, a volverse a plegar correctamente mediante la participación de los chaperones moleculares hsp60 o hsp70; si esto fracasa, son acopladas a ubiquitina y, así, marcadas para ser digeridas en los proteosomas.

A menudo las proteínas están compuestas por dominios modulares discretos que durante la evolución se han yuxtapuesto por duplicación y barajado de las secuencias de DNA que los codifican. Habitualmente los módulos contienen lugares de unión específicos para otras moléculas, incluyendo otras proteínas, y a menudo permiten que las proteínas se ensamblen formando grandes complejos. El principio de cooperación explica de qué forma las células utilizan las transiciones alostéricas para ensamblar estos complejos proteicos, por sistemas del todo o nada.

Bibliografía

General

Branden, C.; Tooze, J. Introduction to Protein Structure. New York: Garland, 1991.

Creighton, T.E. Proteins: Structures and Molecular Properties. 2nd ed. New York: W.H. Freeman, 1993.

Citas

1. Steitz, T.A.; Shoham, M.; Bennett, W.S., Jr. Structural dynamics of yeast hexokinase during catalysis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 293:43-52, 1981.
2. Monod, J.; Changeux, J.-P.; Jacob, F. Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6:306-329, 1963.

Perutz, M. Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1990.

3. Koshland, D.E., Jr. Control of enzyme activity and metabolic pathways. *Trends Biochem. Sci.* 9:155-159, 1984.

Umbarger, H.E. The origin of a useful concept–feedback inhibition. *Protein Sci.* 1:1392-1395, 1992.

4. Cantor, C.R.; Schimmel, P.R. Biophysical Chemistry. Part III: The Behavior of Biological Macromolecules, Caps. 15 ad 17. New York: W.H. Freeman, 1980.

Dickerson, R.E.; Geis, I. Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology. Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings, 1983.

Monod, J.; Changeux, J.-P.; Jacob, F. Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6:306-329, 1963.

5. Kantrowitz, E.R.; Lipscomb, W.N. *Escherichia coli* aspartate transcarbamylase: the relation between structure and function. *Science* 241:669-674, 1988.

Kantrowitz, E.R.; Lipscomb, W.N. *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase: the molecular basis for a concerted allosteric transition. *Trends. Biochem. Sci.* 15:53-59, 1990.

Schachman, H.K. Can a simple model account for the allosteric transition of aspartate transcarbamoylase? *J. Biol. Chem.* 263:18583-18586, 1988.

6. Fischer, E.H.; Krebs, E.G. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J. Biol. Chem.* 216:121-132, 1995.

Johnson, L.N.; Barford, D. The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22:199-232, 1993.

7. Cohen, P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 58:453-508, 1989.

Hanks, S.K., Quinn, A.M.; Hunter, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241:42-52, 1988.

Taylor, S.S.; Knighton, D.R.; Zheng, J.; Ten Eyck, L.F.; Sowadski, J.M. Structural framework for the protein kinase family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:429-462, 1992.

8. DeBondt, H.L.; Rosenblatt, J.; Jancarik, J.; et al. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 363:595-602, 1993.

9. Bourne, H.R.; Sanders, D.A.; McCormick, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349:117-127, 1991.

Wittinghofer, A.; Pai, E.F. The structure of ras protein: a model for a universal molecular switch. *Trends Biochem. Sci.* 16:382-387, 1991.

10. McCormick, F. *ras* GTPase activating protein: signal transmitter and signal teminator. *Cell* 56:5-8, 1989.

11. Berchtold, H.; Reshetnikova, L.; Reiser, C.O.A.; et al. Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature* 365:126-132, 1993.

Kjeldgaard, M.; Nissen, P.; Thirup, S.; Nyborg, J. The crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus* in the GTP conformation. *Structure* 1:35-50, 1993.

12. Hill, T.L. Biochemical cycles and free energy transduction. *Trends Biochem. Sci.* 2:204-207, 1977.

13. Rayment, I.; Holden, H.M.; Whittaker, M.; et al. Structure of the actin-myosin complex and its implications or muscle contraction. *Science* 261:58-65, 1993.

14. Hokin, L.E. The molecular machine for driving the coupled transports of Na^+ and K^+ is an $(Na^+ + K^+)$-activated ATPase. *Trends Biochem. Sci.* 1:233-237, 1976.

Jencks, W.P. How does a calcium pump pump calcium? *J. Biol. Chem.* 264:18855-18858, 1989.

15. Alberts, B.; Miake-Lye, R. Unscrambling the puzzle of biological machines: the importance of the details. *Cell* 68:415-420, 1992.

16. Alberts, B.M. Protein machines mediate the basic genetic processes. *Trends Genet.* 1:26-30, 1985.

17. Udgaonkar, J.B.; Baldwin, R.L. NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A. *Nature* 335:694-699, 1988.

Kuwajima, K. The molten globular state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins* 6:87-103, 1989.

18. Agard, D.A. To fold or not to fold. *Science* 260:1903-1904, 1993.

Georgopoulos, C.; Welch, W.J. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:601-634, 1993.

Martin, J.; Langer, T.; Boteva, R.; et al. Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a "molten globule"-like intermediate. *Nature* 352:36-42, 1991.

19. Baron, M.; Norman, D.G.; Campbell, I.D. Protein modules. *Trends Biochem. Sci.* 16:13-17, 1991.

20. Koch, C.A.; Anderson, D.; Moran, M.F.; Ellis, C.; Pawson, T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252:668-674, 1991.

21. Hershko, A.; Ciechanover, A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61:761-807, 1992.

Rechsteiner, M.; Hoffman, L.; Dubiel, W. The multicatalytic and 26S proteases. *J. Biol. Chem.* 268:6065-6068, 1993.

22. Varshavsky, A. The N-end rule. *Cell* 69:725-735, 1992.

El código genético

1.ª posición (extremo 5') ↓	2.ª posición U	2.ª posición C	2.ª posición A	2.ª posición G	3.ª posición (extremo 3') ↓
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	STOP	STOP	A
	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Aminoácidos y sus símbolos			Codones					
A	Ala	Alanina	GCA	GCC	GCG	GCU		
C	Cys	Cisteína	UGC	UGU				
D	Asp	Ácido aspártico	GAC	GAU				
E	Glu	Ácido glutámico	GAA	GAG				
F	Phe	Fenilalanina	UUC	UUU				
G	Gly	Glicina	GGA	GGC	GGG	GGU		
H	His	Histidina	CAC	CAU				
I	Ile	Isoleucina	AUA	AUC	AUU			
K	Lys	Lisina	AAA	AAG				
L	Leu	Leucina	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
M	Met	Metionina	AUG					
N	Asn	Asparagina	AAC	AAU				
P	Pro	Prolina	CCA	CCC	CCG	CCU		
Q	Gln	Glutamina	CAA	CAG				
R	Arg	Arginina	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
S	Ser	Serina	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
T	Thr	Treonina	ACA	ACC	ACG	ACU		
V	Val	Valina	GUA	GUC	GUG	GUU		
W	Trp	Triptófano	UGG					
Y	Tyr	Tirosina	UAC	UAU				

Léxico de términos utilizados en esta edición

allolactose = alolactosa
annealing = unión, enlace
antiport = transporte de intercambio
antisense = antisentido, sin sentido
backstitching = punto hacia atrás
beads on a string = cuentas ensartadas
blott = transferencia
branch migration = migración de la cadena
boundary = límite
budding yeast = levadura de gemación
bulk lesion = gran lesión
cap = capucha, caperuza
capping = formación de la capucha o caperuza
catabolite activator protein = proteína activadora de los catabolitos
chromosome walking = caminar por el cromosoma
cleavage = fragmentación
cloth of tissue fluid = coágulo de plasma
cloverleaf = estructura en hoja de trébol
cluster = grupo, agregación
coated pits = depresiones revestidas (o recubiertas)
coated vesicles = vesículas revestidas (o recubiertas)
cohesive ends = extremos cohesivos
coiled coil = hélice sobreenrollada
combinatorial gene regulation = regulación génica por combinación
core = núcleo, zona central
cosmids = cósmidos (clones de *C. elegans* en vectores del fago lambda)
counterpart = complementario
crossing-over = entrecruzamiento
cross-strand exchange = intercambio cruzado de cadenas; entrecruzamiento
decondensation = desespiralización
deep-etch = sublimación
depurination = despurinación
derepressed = desreprimido (operón inducible)
directs = guía
DNA-looping model for enhancer action = modelo de acción de los activadores mediante asas de DNA
domain shuffling = barajado de los dominios
donor junction acceptor = enlace entre la región dadora y la aceptora
donor splice junction = región dadora en la maduración
double minute chromosomes = pares de cromosomas diminutos
down-stream = en direcció 3'
down regulation = regulación por disminución
ear vesicle = vesícula auditiva
engineered = construido *in vitro*
enhancer element = elemento activador ("enhancer", aumentador, activador)
expression vectors = vectores de expresión
feedback = retroalimentación
fingerprint = análisis de huellas dactilares
fision yeast = levadura de fisión
footprinting = análisis de huellas
frameshifting = modificación de la pauta de lectura
freeze-drying = liofilización
freeze-etch = grabado por congelación
fruit fly = mosca del vinagre
gap junctions = uniones comunicantes, uniones de tipo "gap"
gel-mobility shift studies = experimentos de retención en geles
gene cassettes = casettes génicas
gene regulatory protein = proteína reguladora de genes, proteína reguladora
general transcription machinery = maquinaria general para la transcripción
genetic linkage = ligamiento genético
hairpin = horquilla
helix-turn-helix = hélice-vuelta-hélice
helper virus = virus auxiliar
heteroduplex joint = unión heterodúplex
Holliday junction = intermedio de Holliday
housekeeping = constitutivo

hybride selection = selección de híbridos
hybride ion = ion hidruro (H)
input = aporte
insertional mutagenesis = mutagénesis por inserción
interspersed repeated DNAs = secuencias repetidas intercaladas de DNA
lactose repressor protein = proteína represora de la lactosa
lagging strand = hebra retardada, hebra retrasada
lampbrush = plumulados (cromosomas)
large T-antigen = antígeno T grande
leader = guía
leading strand = hebra conductora
leak = fuga (del K^+)
left-handed = levógira
ligand = ligando
mapp (to) = hacer un mapa
master gene = gen patrón
mating-type = tipo de apareamiento
membrane zippering mechanism = cierre de la membrana por cremallera
midbrain = mesencéfalo
mismatch = error de apareamiento
natural killer = células agresoras naturales
nick = muesca
NMR = resonancia magnética nuclear
notochord = notocorda
nuclear run on = "run on" nuclear
nuclease-hipersensitive site = zona hipersensible a las nucleasas
nucleosome phasing = distribución de los nucleosomas en fase
off = inactivado
on = activado
output = salida
patch = mancha, porción, zona
patch clamp recording = registro de zona
patching = parcheamiento
pattern = patrón
pellet = precipitado
phase variation = cambio de fase
photobleaching = fotoblanqueamiento
playing head = aparato reproductor
polimerase chain reaction = reacción en cadena de la polimerasa
pool = acervo
primase = primasa
primer = cebador
primosome = primosoma
probe = sonda
probe (to) = sondar
processing = maduración
proofreading mechanism = verificación de lectura
puff = asa, protuberancia, lazo
pulse-field gel electrophoresis = electroforesis en gel de campo pulsante
rate = proporción, relación
reading frame = pauta de lectura
recording patch = registro de zona
replication bubble = burbuja de replicación
replication forc = horquilla de replicación
reporter gene = gen informativo
restrictrion fragment length polymorphism = polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
reverse genetics = genética reversa, genética inversa
right-handed = dextrógira
scanning = barrido
sea squirt = ascidia
self assembly = autoensamblado
self splicing = automaduración
selfish = egoísta, interesado
SEM = microscopia electrónica de barrido
Semliki forest virus = virus Semliki forest
sequence-specific DNA-binding protein = proteína que se une a secuencias específicas del DNA
shadowing = sombreado
shotgun = perdigonada
shuffling = mezclado, barajado

sinaptonemal = sinaptonémico
single-strand DNA-binding protein = proteína de unión al DNA de una sola hebra
site specific recombination = recombinación de sitio específico
size = centro, lugar
slot = muesca
snRNP = RPNsn
solid bead = superficie de cuentas
space-filling model = modelo tridimensional
spliceosome = espliceosoma
splicing = maduración por corte y empalme
stable transcription complex = completo transcripcional estable
staggered = escalonados, protuberantes
staggered joint = unión solapada, enlace o unión de extremos protuberantes
start site = lugar de iniciación
start site for RNA synthesis = punto de inicio de la síntesis de RNA
step = etapa
stepwise = gradualmente
stop codons = codones de terminación
strand = hebra, cadena
stringency = rigor, grado, exigencia
substractive hybridization = hibridación substractiva
subvert = destruir, trastornar
supercoil = sobreenrollado
swivel = desenrollamiento alrededor de la cadena intacta
symport = cotransporte unidireccional
target = diana
TATA box = caja TATA
template = patrón, molde
tight junction = unión hermética, unión fuerte, unión estable
time-lapse microcinema = microcinematografía a intervalos
tomato bushy stunt virus = virus achaparrado peludo del tomate
transcripts = transcritos
transposable = transponible
transposases = transposasas
trigger = poner en marcha, disparar
trimming = ajuste
turn off a gene = desactivar un gen
turn on a gene = activar un gen
two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis = electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida
underfocus = desenfocado
uniport = transporte sencillo
unwing = desenrollar
upstream = en dirección 5'
upstream promotor element = elemento promotor en dirección 5', elemento promotor
video-enhanced contrast light microscopy = microscopia de contraste vídeo-amplificada
western blotting = transferencia de proteínas desde un gel de poliacrilamida a un filtro de nailon o nitrocelulosa, transferencia de tipo western
whisker = pelo, fleco
wind = enrollar, empaquetar
wing bud = yema de ala
wobble (tercera base) = balanceo
zinc finger = dedos de cinc