

CAPÍTULO 6.

PRODUCCIÓN DE ENERGÍA Y OXIDORREDUCCIONES

En este capítulo se describen las partes de la célula eucariótica animal que intervienen en la producción de energía y las reacciones de oxidorreducción que incluye a las mitocondrias, el REL, los peroxisomas y el citosol.

6.1. MITOCONDRIAS

Las mitocondrias se encuentran en todas las células eucarióticas y su principal función es la respiración celular. En el proceso de la respiración se utiliza el oxígeno para la oxidación y este proceso se denomina aerobiosis, mientras que los organismos que no tienen mitocondrias como todas las células procarióticas, no pueden hacer la oxidación con el oxígeno y se denominan organismos anaerobios. No obstante todos los organismos son capaces de producir energía sin utilizar O_2 realizando otras reacciones de catabolismo como la glicólisis.

En las células eucarióticas, la glicólisis se realiza en el citosol con la producción de energía ligada al ATP, pero son las mitocondrias que generan la mayoría de la energía que utiliza la célula en sus reacciones biosintéticas y motoras. La generación de la energía en las mitocondrias se realiza por una serie de reacciones de oxidorreducción complejas. Los carbohidratos, los ácidos grasos y los aminoácidos son oxidados por el O_2 en dióxido de carbono, agua y en energía libre liberada en forma de calor y en energía ligada en moléculas como ATP. La energía ligada a estas moléculas se reutiliza en la célula en los procesos de anabolismo. Las moléculas de ATP son utilizadas con más frecuencia en la transferencia de energía para los procesos de la célula. El ATP formado en las mitocondrias es también exportado al resto de la célula.

Las mitocondrias pueden considerarse como máquinas de transformación de energía con un gran rendimiento. Por una molécula de glucosa en el citosol se producen 2 moléculas de ATP por la glicólisis y en la mitocondria 38 moléculas de ATP por la respiración (producción neta). La respiración celular es extraordi-

nariamente eficiente: la energía de la oxidación se convierte en más del 40% en energía ligada al ATP y el resto en calor; mientras que la eficiencia o el rendimiento de un motor eléctrico o de gasolina es del 10 al 20%.

La mitocondria fue el primer organelo de la célula eucariótica en ser descrito. A finales de la década de 1880, se describió como una estructura filamentosa y se denominó *fila*. En 1888 Flemming observó las mitocondrias en el músculo de los insectos, y sugirió que podrían estar rodeadas de membrana, lo que fue validado 75 años después.

Los progresos en las observaciones al microscopio óptico y en las técnicas de coloración permitieron distinguir las mitocondrias en las células, entonces las llamaron *mitochondrion* (que significa en griego fibra y gránulo) o *chondriosome*. Al inicio de este siglo se le quiso llamar bioblasto, por ser esencial en la vida de la célula. En 1907 se describió el gran incremento en el número de mitocondrias antes de la división celular, también en esta época se sugirió que las mitocondrias del huevo fertilizado se transmiten como una herencia de generación en generación. Actualmente se conoce bien que todas las mitocondrias en un cigoto provienen del oocito y ninguna del espermatozoide; esta dotación, que incluye el ADN mitocondrial, se denomina herencia materna.

Con el desarrollo de los métodos de cultivo celular y la observación en el microscopio invertido se logró observar el cambio de forma de las mitocondrias según las condiciones del medio ambiente. Además, en las células vivas se pueden teñir las mitocondrias para una mejor observación con colorantes vitales como el verde-Janus.

En 1946 se aislaron las mitocondrias de las células, lo que permitió el estudio de todas las reacciones que ellas realizan. Se describieron las reacciones de deshidrogenación y oxidación, mostrando que los carbohidratos son oxidados en una serie de reacciones cíclicas, denominado ciclo de Krebs. Posteriormente se encontró que este ciclo está acoplado a la síntesis del ATP en las reacciones respiratorias donde el oxígeno se reduce a agua. La síntesis del ATP durante la respiración la llamaron fosforilaciones oxidativas, siendo la mayor fuente del ATP en las células eucarióticas.

En 1953, Palade y Sjöstrand, cada uno por separado, describieron la ultraestructura de las mitocondrias al observarlas en el microscopio electrónico. Desde entonces se conoce muy bien la forma y la función de las mitocondrias. Luego siguió el estudio del ADN mitocondrial y la síntesis de proteínas en su seno. Actualmente las investigaciones se centran más en los procesos de la importación de moléculas del citosol a la mitocondria, el mantenimiento dinámico de este organelo, y el análisis de su ADN para los estudios filogenéticos, es decir el origen y la evolución de las especies.

6.1.1. Organización de la mitocondria

Las mitocondrias se observan en el MO como pequeñas granulaciones dentro del citoplasma de la célula. Su forma es generalmente más o menos esférica, pero, a veces pueden ser alargadas como en las células musculares voluntarias. Sus dimensiones varían de 0,5 a 5 μm según los tipos celulares. Por ejemplo, en un hepatocito existen 1.000 a 2.000 mitocondrias que ocupan alrededor de la mitad del volumen celular.

Las mitocondrias se caracterizan por tener doble membrana, una externa que rodea al organelo de manera regular, mientras que la interna presenta numerosos repliegues o crestas hacia el interior de la mitocondria (Fig. 6.1). La forma general de las mitocondrias, su número por célula y la orientación de las crestas pueden variar de un tipo celular a otro, pero su arquitectura molecular es siempre la misma, testigo de la función esencial de estos organelos en el metabolismo energético cuya importancia no permite una gran variación en el curso de la evolución. Cuando las crestas son láminas aplanadas o en forma de astas más o menos perpendiculares al gran eje de la mitocondria, se denominan mitocondrias lamelares. En las células que sintetizan y secretan hormonas esteroideas, las crestas no son láminas aplanadas sino tienen la forma de un tubo, se las denomina mitocondrias tubulares, o alveolares, o tubulo-alveolares según la incidencia del corte a través de las crestas tubulares.

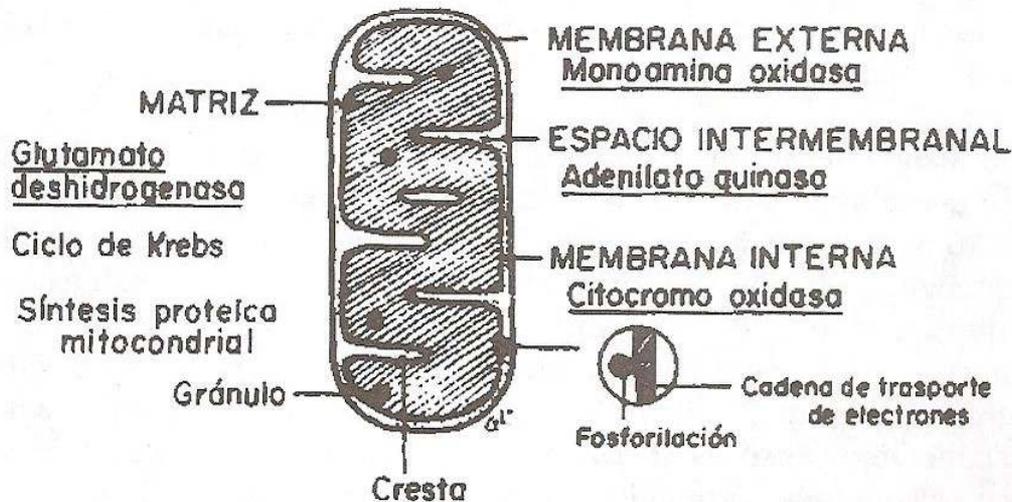


Figura 6.1. Estructura de la mitocondria y localización de sus principales enzimas.

Las enzimas subrayadas son las que se emplean como marcadores para los diferentes constituyentes de la mitocondria. Inserto: partícula de 9 nm.

La membrana interna divide la mitocondria en dos compartimentos. El primero es el delimitado por la misma membrana interna, denominado matriz mitocondrial que es generalmente muy opaco a los electrones, donde se encuen-

tran pequeños gránulos muy densos a los electrones que corresponden a la acumulación de sales inorgánicas de fosfatos de calcio o magnesio. Se piensa que estos gránulos pueden tener un componente proteico. El segundo compartimento es el espacio entre las dos membranas de la mitocondria, denominado espacio intermembranal, de 5 a 10 nm de espesor, que incluye también el espacio situado al interior de las crestas. Este espacio es muy homogéneo y transparente a los electrones (Fig. 6.1).

La membrana externa es muy permeable, deja pasar las moléculas de cerca de 10 kD. Mientras que la membrana interna es sumamente impermeable permitiendo sólo la penetración de pequeñas moléculas sin carga, como el agua y el ácido pirúvico. Se requiere de sistemas de transporte especial para que moléculas más grandes e iones tengan acceso a la matriz. La membrana externa se compone aproximadamente de 50% de lípidos, incluyendo una gran cantidad de colesterol, mientras que la membrana interna posee una proporción de 25% de lípidos y 75% de proteínas. El colesterol es prácticamente ausente de la membrana interna.

6.1.2. Localización de los sistemas de oxidorreducción

Con la técnica de coloración negativa, se observan sobre la faz interna de la membrana interna pequeños corpúsculos pediculados cuya parte más ancha tiene ± 9 nm de diámetro. Estas partículas son estructuras formadas por las proteínas transmembranosas de la membrana interna que intervienen en los procesos de la fosforilación (Fig. 6.1 inserto), mientras que los procesos oxidativos se realizan en la membrana interna fuera de las partículas de 9 nm.

La abundancia de las mitocondrias en muchos tipos celulares permite aislarlas y purificarlas fácilmente por el método de fraccionamiento celular. Las mitocondrias pueden a su vez fraccionarse y separarse en sus diferentes constituyentes. El subfraccionamiento de las mitocondrias se basa en las diferentes sensibilidades de sus membranas a detergentes y a la permeabilidad diferencial a la sacarosa. La membrana externa se rompe primero con una pequeña concentración de detergente o por un choque osmótico controlado. En este último caso, se tiene en cuenta que progresivamente se hincha la matriz mitocondrial y la membrana externa se rompe antes que la interna. Por medio de la centrifugación se separan las membranas externas, el contenido del espacio intermembranal y la matriz dentro de la membrana interna. Una acción más completa de los detergentes, de la hipotonicidad o aún de ultrasonidos, provocan la ruptura de la membrana interna. De esta manera se puede aislar la membrana externa, el contenido del espacio intermembranal, la membrana interna y el contenido de la matriz mitocondrial. La figura 6.1. resume la localización de los grandes sistemas enzimáticos de las mitocondrias, que han podido ser establecidos por las técnicas mencionadas anteriormente. Se muestra también las enzimas de referencia que pueden ser utilizadas como marcadores para los diversos constituyentes de la mitocondria.

6.1.2.1. Ciclo de Krebs o de los ácidos tricarboxílicos y su alimentación

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos, también llamado ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico, efectúa la oxidación completa de una molécula de ácido acético bajo la forma de acetil-coenzima A (acetil-CoA) en CO_2 y H_2O (Fig. 6.2). Las coenzimas piridínicas (NAD^+) y flavínicas (FADH) son reducidas en sus formas NADH y FADH_2 en el curso del ciclo de Krebs y son reoxidadas ulteriormente por el oxígeno, gracias a la intervención de la cadena de transporte de electrones. Como resultado de este proceso de oxidación, reducción y reoxidación se sintetizan las moléculas de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, y se forman también H_2O a partir de moléculas de O_2 y de iones de H^+ .

Las mitocondrias son los únicos organelos que efectúan el conjunto de reacciones del ciclo de Krebs. Las enzimas pertenecientes a esta vía metabólica están localizadas en la matriz mitocondrial, excepto la succinato deshidrogenasa que está asociada a la membrana interna. Las enzimas que intervienen en la alimentación del ciclo de Krebs se encuentran igualmente en la matriz de las mitocondrias. Las más importantes son la piruvato decarboxilasa y las enzimas responsables de la β -oxidación de los ácidos grasos por las mitocondrias.

La contribución más importante del ciclo de Krebs es la producción de moléculas con alta energía bajo la forma de NADH y FADH_2 que serán oxidados por un complejo multienzimático localizado en la membrana interna que se denomina la cadena de transporte de electrones. Las moléculas oxidadas, la NAD^+ y la FADH vuelven al ciclo de Krebs y son reducidas de nuevo y así realimentan la cadena de transporte de electrones.

6.1.2.2. Cadena de transporte de electrones y fosforilaciones

Las mitocondrias son responsables por lo menos del 80% del consumo de oxígeno en las células. Esas oxidaciones hacen intervenir un complejo enzimático, la cadena de transporte de electrones. La energía liberada por las reacciones de oxidación es recuperada por un sistema fosforilante que forma el ATP a partir del ADP y del fosfato inorgánico. El sistema multienzimático de la cadena de transporte de electrones se encuentra en la membrana interna propiamente dicha, mientras que las enzimas responsables de las fosforilaciones (el complejo de ATP sintetasa) están asociadas a las partes de la membrana interna que forman las partículas de 9 nm (Fig. 6.2 1). A estas partículas las denominaron oxisomas cuando se creía que eran las responsables de las oxidaciones. Actualmente este nombre no es adecuado, pues se demostró que no es así. Son preferibles los términos: partículas de 9 nm o partículas fosforilantes. En los tratamientos que eliminan las partículas de 9 nm en las mitocondrias se suprimen las fosforilaciones pero no las oxidaciones, si se añaden las partículas de 9 nm a las membranas internas éstas recuperan las reacciones de fosforilación.

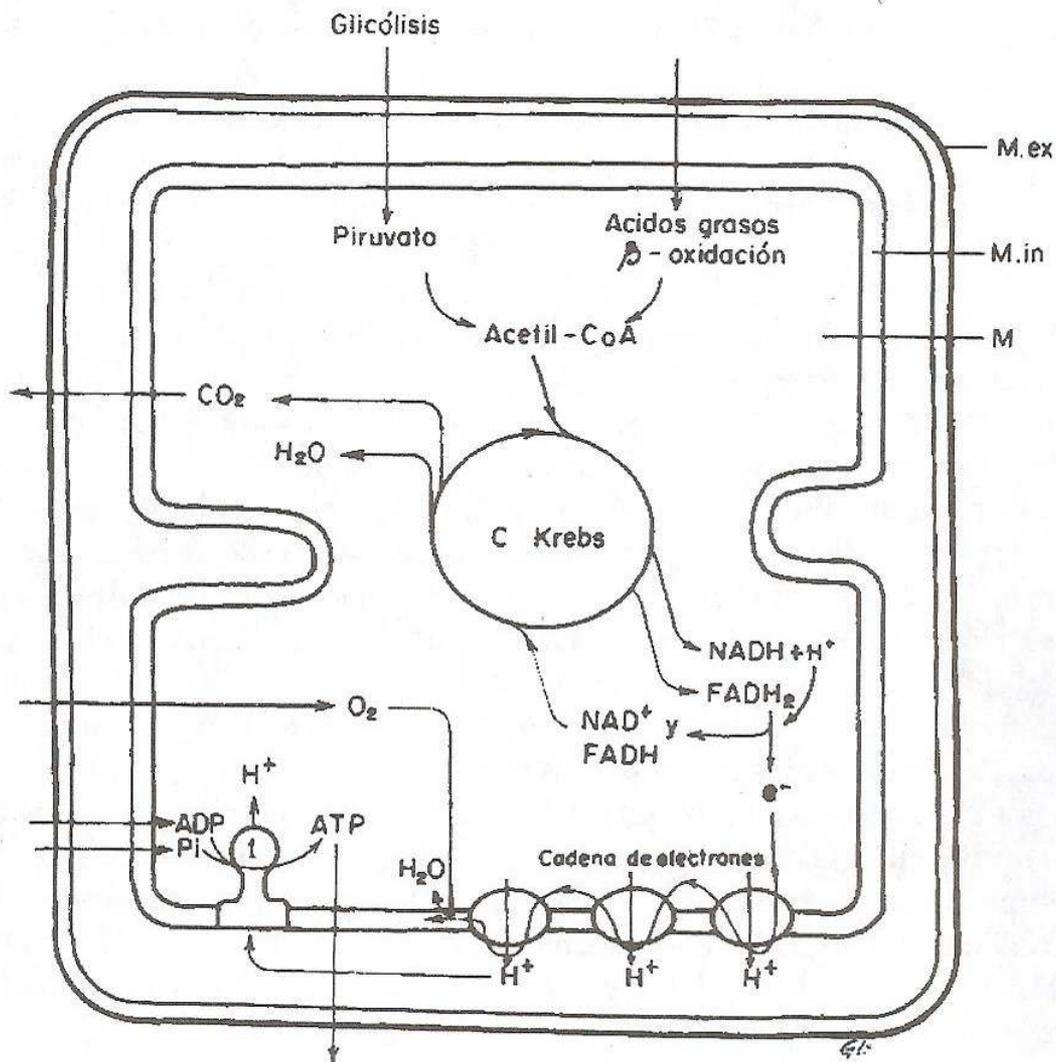


Figura 6.2. Resumen del metabolismo energético de la mitocondria.

El ciclo de Krebs se realiza en la matriz mitocondrial, es alimentado por la acetil-coenzima A que proviene de la β -oxidación de los ácidos grasos y del piruvato de la glicólisis. El NADH y el FADH_2 , productos del ciclo de Krebs, transportan los electrones con alta energía a un complejo proteico de la membrana interna denominado la cadena de electrones, donde los iones hidrógenos de los NADH y de los FADH_2 son translocados al espacio intermembranal generando un gradiente de protones. Los protones entran luego por la partícula de 9 nm induciendo la síntesis de ATP. El oxígeno se une a los protones formando agua.

Mex: membrana externa; EI: espacio intermembranal; Min: membrana interna; M: matriz mitocondrial; C.Krebs: ciclo de Krebs; 1: partícula de 9 nm; CO_2 : dióxido de carbono; Acetil-CoA: acetilcoenzima A; NAD^+ : nicotín-adenina dinucleótido; FADH : flavín-adenina dinucleótido; H^+ : protones; H_2O : agua; ATP: adenosín trifosfato; ADP: adenosín difosfato; Pi: fosfato; O_2 : oxígeno.

El NADH y el FADH_2 formados por el ciclo de Krebs transfieren sus electrones (o iones de hidrógeno) a los acarreadores asociados con la membrana mitocondrial interna (o complejo de cadena de transporte de electrones). Entonces, los electrones pasan de un acarreador al siguiente, hasta que el aceptor final

queda reducido; el aceptor final de esta cadena de electrones es el oxígeno molecular, el cual es reducido a agua, formando el otro producto final de la oxidación metabólica. La pérdida de energía libre que acompaña al transporte de electrones está acoplada a la producción por el mismo complejo enzimático de un gradiente de protones entre el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial.

La teoría más aceptada del acoplamiento de la oxidación del NADH y del FADH_2 con la fosforilación del ADP es la teoría quimiosmótica. La movilización de electrones a través de la cadena respiratoria da como resultado la formación de un gradiente de protones, el cual se forma porque los protones son recogidos en un lado de la membrana y descargados al otro lado. Las partículas de 9 nm están enlazadas con la fosforilación del ADP por la ATP sintetasa gracias al influjo de protones de alta concentración hacia la baja concentración. El continuo transporte de electrones es necesario para mantener el gradiente de protones.

La cadena de transporte de electrones comprende tres complejos enzimáticos transmembranosos, denominados complejos enzimáticos de la respiración que incluyen: el complejo NADH deshidrogenasa, el complejo de citocromos b y c1 y el citocromo oxidasa o citocromos a-a3 (Fig. 6.3).

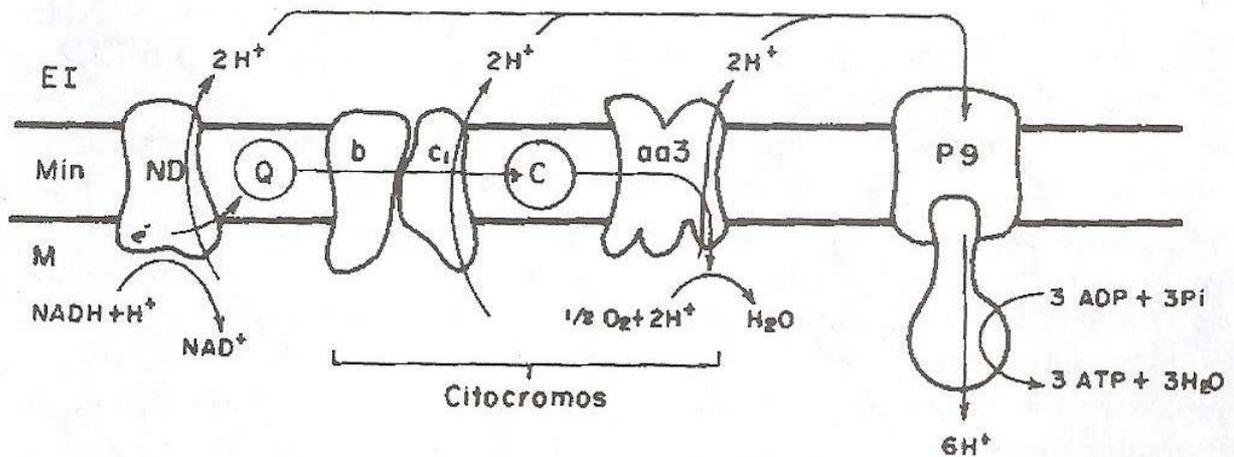


Figura 6.3. Topografía de las enzimas de la cadena respiratoria que realizan las reacciones oxidativas y las enzimas que realizan la fosforilación en la membrana interna de las mitocondrias.

EI: espacio intermembranal; Min: membrana interna; M: matriz mitocondrial; NAD^+ : nicotín-adenina dinucleótido; ND: complejo NADH deshidrogenasa; e^- : electrones; Q: coenzima Q; b-c1: complejo de citocromos b y c1; C: citocromo C; aa3: complejo del citocromo oxidasa o citocromos a-a3; P9: partícula de 9 nm; H^+ : protones; O_2 : Oxígeno; H_2O : agua; ATP: adenosín trifosfato; ADP: adenosín difosfato; Pi: fosfato.

El gradiente formado por los protones a través de la membrana interna aporta la energía necesaria para la fosforilación del ADP y formar ATP, que se acompaña de un retorno de estos protones hacia la matriz a través de las partículas de 9

nm donde interviene el complejo transmembranoso ATP sintetasa (Fig. 6.3 P9). La integridad de la membrana interna es necesaria para que se genere el gradiente electroquímico, pues si hay ruptura de esta membrana se pierde el acoplamiento entre las oxidaciones y las fosforilaciones.

Los mecanismos de síntesis del ATP por el complejo ATP sintetasa en las bacterias y en los cloroplastos son semejantes a lo descrito en las mitocondrias, pero el estudio de estos temas no entra en los objetivos de este libro.

6.1.3. Intercambios con el citosol

La membrana externa de la mitocondria es muy permeable, deja difundir pasivamente moléculas voluminosas como las coenzimas adenílicas o piridínicas y es permeable a los iones inorgánicos, a los metabolitos y a las pequeñas moléculas de 5 kD o menos, pero no deja pasar la gran mayoría de proteínas que son en general más grandes. La gran permeabilidad que presenta se debe a la presencia de porinas que son proteínas que forman poros acuosos como en las bacterias gram negativas. La presencia de las porinas explica porque esta membrana no forma gradiente electroquímico a través de ella.

Pequeñas moléculas tales como el oxígeno, el agua y el CO_2 se intercambian fácilmente entre el citosol y la matriz mitocondrial por simple difusión (Ver 2.1.2.1). El intercambio de las moléculas ionizadas entre citosol y la matriz mitocondrial se realiza generalmente por transportadores específicos, eventualmente la transferencia puede ser en contra del gradiente de concentración como el piruvato, los iones de calcio y el fosfato. En estos casos la energía necesaria la genera las oxidorreducciones de la cadena respiratoria, es decir el gradiente electroquímico de protones. El cotransporte del fosfato, iones de calcio y del piruvato se realiza en el mismo sentido que los protones (Fig. 6.4 E, F y G). Cuando se trata de moléculas ionizables, como los ácidos grasos, sólo su forma no ionizada puede difundir a través de la membrana interna. Cuando los ácidos grasos son ionizados se unen a la carnitina y atraviesan la membrana externa e interna (Fig. 6.4 J), también lo hacen bajo la forma de ácido graso-acetil-CoA, según las necesidades celulares. En la matriz el ciclo de oxidación de los ácidos grasos es realizada por intervención de cuatro enzimas de la matriz mitocondrial que forman moléculas de acetil-CoA para alimentar el ciclo de Krebs.

El piruvato y los ácidos grasos son esenciales para mantener el ciclo de Krebs y en consecuencia para alimentar la cadena respiratoria. Así, la translocación de protones en el espacio intermembranal favorece también la salida de iones hidroxilos que neutralizan las cargas positivas de los protones, y permiten al mismo tiempo la entrada de iones H_2PO_4^- a la matriz (Fig. 6.4 A). El aumento de los iones fosfatos en la matriz se equilibra por su salida a través de permeasas generando una cascada de entrada y salida de metabolitos por transportadores: la salida

de un ion faspato permite la entrada de un ion malato que puede volver a salir por cambio de un ion citrato que entra (Fig. 6.4 B y C). Los tres procesos anteriores se realizan por un cotransporte en sentido contrario. La cadena de reacciones como la del ciclo de Krebs exige para su funcionamiento la conservación y el control preciso de la concentraciones de varios intermediarios, es por ésto que es muy importante la regulación de los cambios entre el citosol y la mitocondria. De otra parte, la entrada de los iones fosfatos en la matriz favorece también la acumulación de calcio bajo la forma de fosfatos de calcio. Cuando el aumento de la concentración del calcio en el citosol se vuelve peligroso para la célula (Ver 3.3.2.2.2), las mitocondrias pueden captar y neutralizar cantidades grandes de iones de calcio.

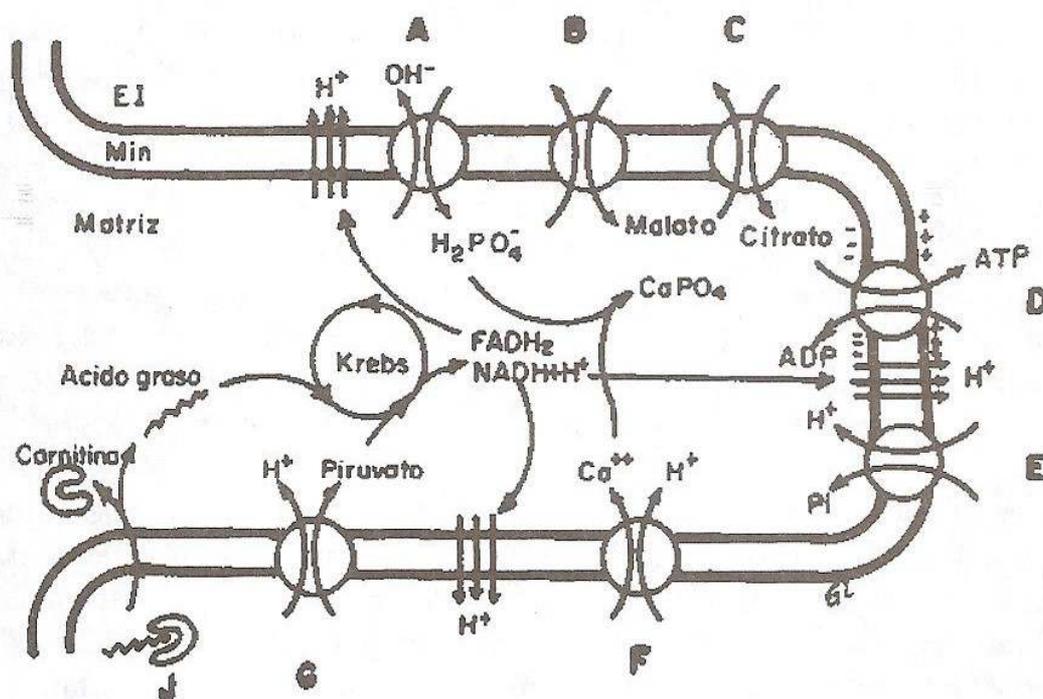


Figura 6.4. Intercambios de moléculas a través de la membrana interna de las mitocondrias.

Los transportadores o permasas de protones están esquematizados por círculos dentro de la membrana interna de la mitocondria.

A, B, C y D: cotransporte en sentido contrario, en D colabora el gradiente de voltaje de la membrana. E, F y G: cotransporte en el mismo sentido. J: traslocación de ácidos grasos.

M: matriz mitocondrial; Min: membrana interna; EI: espacio intermembranal; NADH: nicotín-adenina dinucleótido; FADH: flavin-adenina dinucleótido; H⁻: protones; OH⁻: ion hidroxilo; H₂PO₄⁻: fosfatos; CaPO₄: fosfato de calcio; Ca⁺⁺: iones de calcio; ATP: adonosín trifosfato; ADP: adonosín difosfato; Pi: fosfato.

Los nucleótidos adenílicos tienen un transportador específico en la membrana interna de las mitocondrias que permite la entrada de un ADP por la salida de un ATP, o sea por un cotransporte en sentido contrario. Este cotransporte es favorecido por la existencia del gradiente de voltaje de la membrana interna cuya carga

neta es negativa en su lado interno (Fig. 6.4 D). La mayoría de las moléculas de ATP sintetizadas en la matriz son intercambiadas por las moléculas de ADP. El ATP transportado al citosol es utilizado en los procesos celulares.

El 2-4 dinitrofenol es un ionóforo de H^+ y transporta protones a través de las membranas. En la mitocondria el dinitrofenol desacopla la cadena respiratoria de la síntesis de ATP, e inhibe su formación. Los ionóforos de H^+ se denominan desacopladores y se han empleado para demostrar que la cadena respiratoria es el eje central que coordina la glicólisis, la β -oxidación de los ácidos grasos y el transporte de electrones. La célula regula la proporción ADP/ATP para controlar sus procesos. La bomba $Na^+ - K^+$ de la membrana plasmática consume un tercio del ATP producido por la célula, en presencia del dinitrofenol no se forma ATP y se detiene la función de la bomba $Na^+ - K^+$. Si no se elimina el dinitrofenol, las funciones principales de la membrana celular se pierden y la célula muere.

Las mitocondrias de la grasa parda son redondas y con crestas más largas y abundantes que las mitocondrias normales. En estas mitocondrias se presenta un desacoplamiento normal entre la respiración y la formación de ATP. En este caso la energía de la oxidación es utilizada para generar calor. Estas mitocondrias se encuentran sólo en la grasa parda, tejido que es muy abundante en los animales que hibernan y en regiones específicas de los recién nacidos de mamíferos incluyendo al hombre, para facilitar la regulación de la temperatura corporal de los bebés.

El espacio intermembranal de las mitocondrias contiene la adenilato quinasa, enzima que cataliza la formación de ATP y AMP a partir de dos moléculas de ADP. Esta enzima tiene otras localizaciones, principalmente en el citosol. Como la membrana externa de las mitocondrias es permeable a los nucleótidos adenílicos, la adenilato quinasa del espacio intermembranal juega un papel importante en el equilibrio de las concentraciones celulares de AMP, ADP y ATP. Existen otras enzimas en el espacio intermembranal que utilizan el ATP para fosforilar otros nucleótidos.

Otros sistemas enzimáticos son localizados parcialmente en las mitocondrias y parcialmente en el citosol, lo que implica evidentemente la transferencia de metabolitos. Las mitocondrias son el sitio de las primeras etapas de la formación de la urea, intervienen también en la formación del núcleo hémico al inicio de la biosíntesis de la protoporfirina y en la última etapa, o sea la fijación del átomo de hierro en el núcleo hémico, las otras reacciones se realizan en el citosol. Las mitocondrias intervienen también en la síntesis de las hormonas esteroides.

6.1.4. Biogénesis de las mitocondrias

La biogénesis de las mitocondrias es la formación de nuevas mitocondrias en el seno de la célula. En el primer capítulo se describe la teoría sobre el origen de las

mitocondrias en las células eucarióticas, donde la más aceptada es la simbiótica (Ver 1.3.2.4). No se ha encontrado formación de *novo* de las mitocondrias en las células. Se ha visto que antes de la mitosis las mitocondrias aumentan su tamaño y se dividen por el proceso de gemación, de manera similar a las bacterias. También se ha observado que las mitocondrias se fusionan, pero el significado aún no se conoce.

La gran mayoría de las proteínas de las mitocondrias son codificadas por el genoma nuclear y unas pocas por el ADN mitocondrial. Ésto significa que el crecimiento y el mantenimiento funcional de las mitocondrias están regulados por los dos genomas: el nuclear y el mitocondrial.

Las mitocondrias se encuentran distribuidas en toda la célula y se localizan preferencialmente donde se requiere ATP para los procesos celulares. Por ejemplo, si la membrana plasmática cumple una función muy intensa en el transporte activo, como en la membrana plasmática de la región basal de las células del túbulo contorneado distal del riñón, las mitocondrias son abundantes en esta región de la célula.

La regulación de la forma y la distribución de las mitocondrias dentro de la célula son controladas por los elementos del citoesqueleto relacionados con su membrana externa. Se está comenzando a conocer las moléculas de la mitocondria que están implicadas en estos procesos.

6.1.4.1. Genoma mitocondrial y síntesis proteica local

En las células animales, la matriz mitocondrial contiene ADN mitocondrial que representa aproximadamente 1 % del ADN total de la célula. El ADN mitocondrial es una doble hélice y de forma circular de un longitud alrededor de 5 μm (o sea alrededor de 15.000 pares de nucleótidos). En las levaduras, la molécula es más larga y puede alcanzar 25 μm . Existen intrones en los genes del ADN mitocondrial de las levaduras, de algunas plantas y hongos, al contrario del ADN mitocondrial humano donde ningún gen tiene intrones. Las diferencias entre los ADN de la mitocondria de especies diferentes son grandes, y son mayores cuando se trata de especies alejadas desde el punto de vista evolutivo. Actualmente, los estudios de similitudes en las secuencias moleculares del ADN mitocondrial son empleados para precisar la evolución filogenética y de las razas humanas. Los genes de las mitocondrias son heredados maternalmente en muchos organismos. En los animales superiores, los óvulos contribuyen siempre con más citoplasma al cigoto que el de los espermatozoides. Se conoce que el ADN mitocondrial humano es totalmente heredado de la madre. Existen indicios que la humanidad existente (diferentes razas) proviene de una sola madre, lo que favorece la teoría de un salto en la evolución biológica, al menos para el ser humano.

La secuencia completa de los nucleótidos del ADN mitocondrial humano se culminó en 1981, y se conoce completamente la organización de sus genes (Fig. 6.5). Contiene 16.569 pares de bases, donde la gran mayoría son utilizadas en secuencias codificadoras. Los genes codifican los 2 ARNr de la mitocondria, los 22 ARNt de la mitocondria y 13 proteínas diferentes. Las 13 proteínas son tres

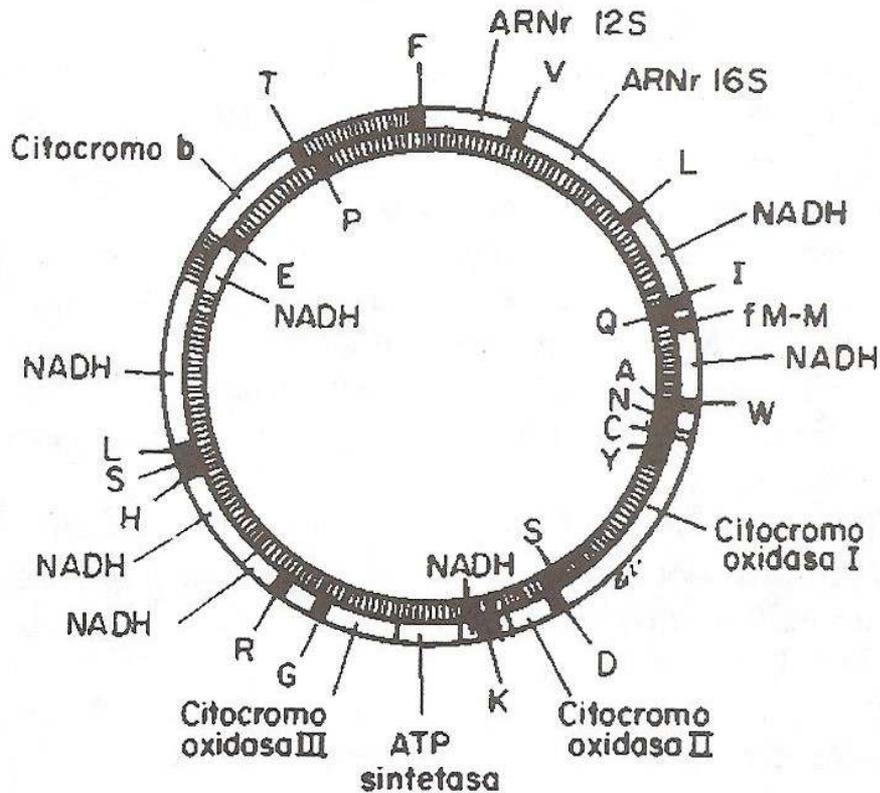


Figura 6.5. ADN mitocondrial humano.

Cada cadena polinucleotídica se esquematizó separadamente. Las regiones codificadoras están representadas en blanco o en negro, las regiones no codificadoras están rayadas. Los ARNt están indicados por la letra de la sigla actual del aminoácido a los cuales se unen respectivamente.

ARNr 12S: ARN de la pequeña subunidad ribosomal de la mitocondria; ARNr 16S: ARN de la gran subunidad ribosomal de la mitocondria; NADH: proteínas que hacen parte del complejo NADH-deshidrogenasa; ATP sintetasa: dos proteínas que hacen parte del complejo de 9 nm; V: valina; L: leucina; I: isoleucina; Q: glutamina; Fm: formil-metionina; M: metionina; W: triptófano; A: alanina; N: asparagina; C: cisteína; Y: tirosina; S: serina; D: ácido aspártico; K: lisina; G: glicina; R: arginina; H: histidina; E: ácido glutámico; T: treonina; P: prolina; F: fenilalanina.

proteínas del complejo citocromo oxidasa, una proteína del complejo citocromo b-c1, dos proteínas del complejo ATP sintetasa y siete proteínas del complejo NADH deshidrogenasa. Las otras proteínas de la membrana interna, las proteínas de la matriz, las del espacio intermembranaral y las de la membrana externa están bajo el control del genoma nuclear y son sintetizadas por los polirribosomas del citosol.

Existe un solo sitio de inicio de la transcripción sobre cada una de las cadenas polinucleotídicas del ADN mitocondrial. El producto primario es entonces una secuencia de ARN complementaria y completa de cada una de las cadenas. Las dos cadenas de ARN sintetizadas son escindidas para dar origen a los ARNr, ARNt y ARNm. Como no existen secuencias de separación no codificadoras, se cree que la escisión está determinada por la enzima que reconoce la configuración de hoja de trébol característica de los ARNt. En efecto los genes de los ARNt se encuentran localizados prácticamente separando los otros genes (Fig. 6.5).

El sistema de la síntesis de proteínas en las mitocondrias tiene varias diferencias con respecto al que está bajo el control del genoma nuclear. Las mitocondrias contienen múltiples copias de su ADN. La correspondencia entre los codones del ADN o del ARN transcrito y los aminoácidos utilizados por la mitocondria muestra algunas variantes con respecto al empleado por el genoma nuclear. La mitocondria tiene 22 ARNt que pueden reconocer los 64 codones del código genético, mientras que los 60 diferentes ARNt nucleares reconocen 60 codones del código genético. Los ribosomas de las mitocondrias son más pequeños que los del citoplasma, y son similares a los ribosomas de las bacterias. A este punto común con las bacterias, se añade el ADN circular, la localización de la cadena de transporte de electrones, el ARNt que reconoce el aminoácido formil-metionina que no se encuentra en el ADN nuclear, la sensibilidad similar a los antibióticos y la presencia de porinas, siendo la base de la teoría del origen simbiótico de las mitocondrias en las células eucarióticas.

Actualmente existen toda una serie de inhibidores específicos de una de las etapas de la síntesis de proteínas bajo el control nuclear o mitocondrial (Fig. 6.6). Algunos son antibióticos, por ejemplo la cicloheximida inhibe la síntesis de proteínas en el citosol, pero no en las mitocondrias. Estos inhibidores son muy útiles para estudiar los diferentes efectos de la expresión o la inhibición del genoma nuclear o mitocondrial.

Como la mayoría de los genes que codifican las proteínas de la mitocondria están en el núcleo, aparentemente hubo una transferencia importante de genes del organelo simbiote primitivo al ADN nuclear y ocurrió muy temprano durante la evolución de los eucariotes. Se piensa que la mitocondria se "deshizo" del ADN que no le servía, como un ADN basura (*junk DNA*) que se integró al genoma nuclear. Es posible también que las mitocondrias se originaron a partir de eventos endosimbióticos separados. Porque las mitocondrias de algunos protozoarios tienen características diferentes a las de los animales y de las plantas. De todos modos sigue el enigma del por qué las mitocondrias tienen su propio sistema genético. Aunque no se conozca el verdadero origen de las mitocondrias es importante recordar que la arquitectura molecular de las mitocondrias es siempre la misma, testigo de la función esencial de estos organelos en el metabolismo energético de la célula, donde su importancia no ha permitido variaciones en el curso de la evolución.

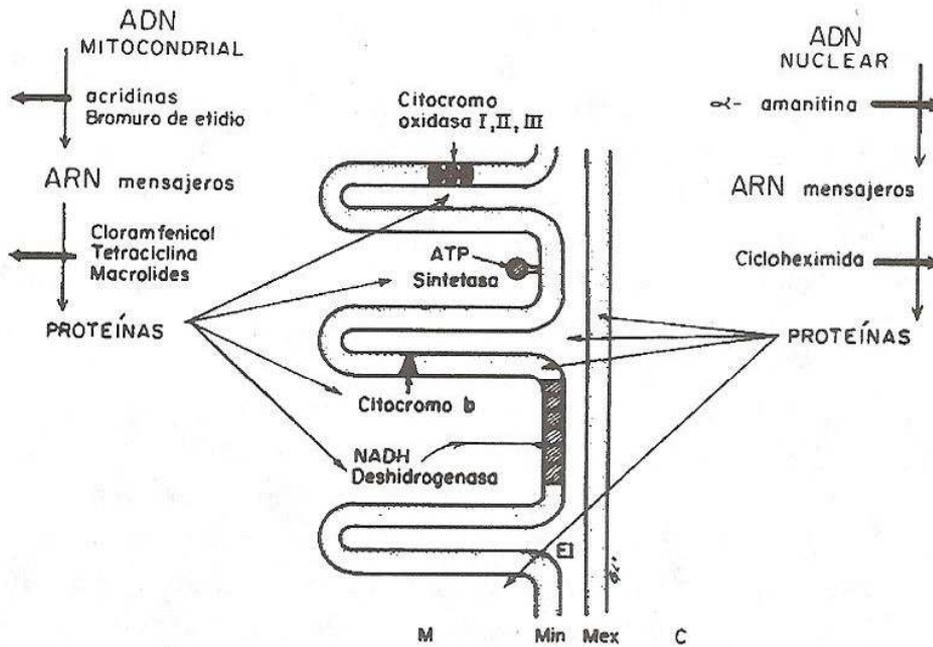


Figura 6.6. Acción de los inhibidores específicos de la síntesis de proteínas controladas por el genoma mitocondrial y nuclear.

Las flechas más gruesas transversales indican el nivel de la inhibición de los antibióticos.

M: matriz mitocondrial; Min: membrana interna de la mitocondria; Mex: membrana externa de la mitocondria; EI: espacio intermembranal; C: citosol.

Las mitocondrias, como los cloroplastos, no se generan de *novo*, lo hacen por crecimiento y división de mitocondrias existentes. La observación en las células vivas indica que no solamente las mitocondrias se dividen sino se fusionan una con otra. En la mayoría de las células, las mitocondrias se dividen durante el interfase, de manera no sincrónica entre ellas ni con la división celular. De manera similar, la duplicación del ADN de las mitocondrias realizada por ADNpoli γ , no está limitada al tiempo de la duplicación del ADN nuclear, sino ocurre durante todo el ciclo celular.

El número de mitocondrias por célula puede ser regulado según la necesidad. Un gran aumento de mitocondrias se observa, por ejemplo, si un músculo esquelético en reposo es estimulado repetidamente para contraerse durante un periodo prolongado.

Las mitocondrias contienen proteínas específicas de los tejidos y existen diferencias en las enzimas de la mitocondria de diferentes tipos celulares. Pueden tener funciones especializadas de acuerdo al tipo particular de la célula. El ADN mitocondrial de las levaduras codifica para tres GTPasas que son esenciales para la integridad de sus mitocondrias. La síntesis de la urea en los mamíferos ocurre únicamente en algunos tejidos como el hígado, las enzimas específicas para esta síntesis en las mitocondrias de los hepatocitos son importadas del citosol a la mitocondria, y esto no ocurre en las células de otros tejidos. Los complejos enzimáticos de la respiración en la membrana interna de las mitocondrias de mamíferos contienen varias subunidades específicas del tejido, codificadas por el

genoma nuclear que actuarían como reguladores del transporte de electrones. De esta manera, en algunas enfermedades genéticas humanas de los músculos existe una subunidad defectuosa de la citocromo oxidasa. Esta subunidad es específica de las células del músculo esquelético, por lo tanto, otros tipos celulares incluyendo las células del músculo cardiaco funcionan normalmente.

6.1.4.2. Importación de proteínas

El carácter muy limitado de la información genética contenida en las mitocondrias hace indispensable la adquisición de proteínas sintetizadas en el citosol. Excepto las 13 proteínas codificadas por el genoma mitocondrial, todas las demás proteínas (más del 98%) de la mitocondria son sintetizadas por los polirribosomas o polisomas en el citosol, y no a nivel del RER. Estas proteínas son destinadas a la membrana externa o interna, al espacio inter-membranal o la matriz de la mitocondria.

La gran mayoría de las proteínas destinadas a las mitocondrias son generalmente sintetizadas bajo la forma de precursores denominadas preproteínas que difieren de las proteínas maduras por la existencia de una secuencia peptídica de señal situada en el extremo amino terminal, caracterizada por 15 aas hidrofóbicos básicos (principalmente arginina y lisina) intercalados entre los primeros 30 aas, de estructura α -hélice y de carácter anfipática, denominada **péptido señal Mit** o preseñal (antes se llamaba secuencia líder). Algunas de estas proteínas tienen señales de parche con aas no cargados que intervienen en el direccionamiento hacia las mitocondrias (Ver 5.2.2). Otras proteínas tienen además señales anfipáticas cargadas positivamente e intercaladas a lo largo de la preproteína. El péptido señal Mit es a menudo más largo que péptido señal RE de las proteínas sintetizadas en el RER. Las proteínas destinadas a la membrana interna o al espacio intermembranal mitocondrial a veces tienen además de la señal Mit otras secuencias de señales. Esas secuencias suplementarias de señales son muy hidrofóbicas y ubicadas estratégicamente después de la señal Mit.

Las preproteínas sintetizadas son reconocidas y transportadas hasta los receptores de la membrana externa de la mitocondria por las proteínas chaperonas citosólicas hsp70c (Fig. 6.7 hsp70c). La hsp70c impiden también el repliegue inadecuado de las preproteínas. El péptido señal Mit de la preproteína es reconocido por el receptor específico de la superficie de la mitocondria denominado Tom (*Translocase of the outer mitochondrial membrane*) (Fig. 6.7 Tom). Luego del reconocimiento, el receptor interviene en el paso de la preproteína por un poro general de importación (PGI) a través de la membrana externa (Fig. 6.7 PGI). La misma preproteína es reconocida por receptores de la membrana interna, denominado Tim (*Translocase of the inner mitochondrial membrane*), y es translocada a la matriz mitocondrial por intermedio de esos mismos receptores (Fig. 6.7 Tim). El pasaje a través de las dos membranas de la mitocondria se realiza al mismo tiempo a nivel

de un punto de contacto entre las dos membranas promovido por los mismos receptores Tom y Tim. La preproteína atraviesa las dos membranas en su forma desplegada. La translocación de la preproteína por la membrana interna necesita el gradiente de protones y la hidrólisis de ATP. Cuando se añaden ionóforos que colapsan el potencial de membrana de las mitocondrias se altera la translocación de las proteínas a la matriz. Todavía es incierto cómo el gradiente electroquímico contribuye a la translocación de las preproteínas. La translocación de la preproteína en la matriz mitocondrial es culminada por la intervención de las proteínas chaperonas hsp70m con actividad ATPásica. Antes de que sea completa la translocación, el péptido de señal Mit de la preproteína es escindido por la peptidasa de señal, y luego la proteína se repliega adecuadamente adquiriendo su conformación madura (Fig. 6.7 proteína).

La mayoría de las preproteínas sintetizadas por los polirribosomas que presentan péptidos de señal interactúan con las chaperonas de la familia hsp70c para transportarlas a su destino final, ya sean las mitocondrias, o ya sean otros organelos. Las hsp70c impiden que las preproteínas se agreguen o se replieguen espontáneamente antes de que se unan a la proteína translocadora de la membrana blanco.

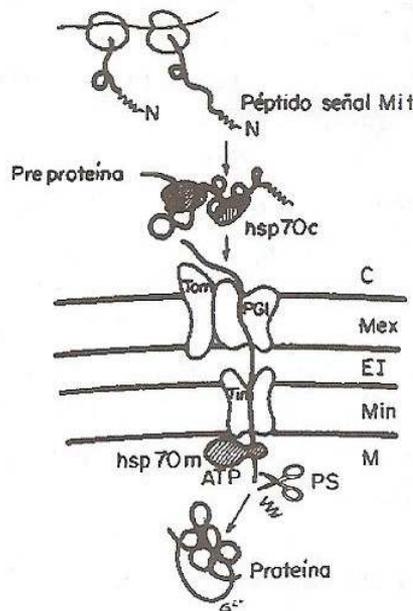


Figura 6.7. Importación de preproteínas a la matriz mitocondrial.

La preproteína es sintetizada por los polirribosomas en el citosol. Las proteínas chaperonas del citosol (hsp70c) se unen a la preproteína y la llevan al receptor de la membrana externa. La secuencia de señal Mit es reconocida por el receptor de la membrana externa (Tom) y pasa a través de un poro (PGI). La preproteína es translocada a la matriz por el receptor de la membrana interna (Tim). Las chaperonas de la matriz (hsp70m) con actividad ATPásica. La peptidasa de señal escinde la secuencia Mit, luego se culminan la translocación a la matriz (Pfanner y col., 1997). N: extremo amino terminal; hsp70c: proteínas chaperonas de choque térmico 70 citosólicas; Tom: receptor *Translocase of the outer mitochondrial membrane*; PGI: poro general de importación; Tim: receptor *Translocase of the inner mitochondrial membrane*; hsp70m: proteínas chaperonas de choque térmico 70 de la matriz; PS: peptidasa de señal; ATP: adenosín trifosfato; C: citosol; Mex: membrana externa; EI: espacio intermembranal; Min: membrana interna de la mitocondria; M: matriz.

receptor Tom 70-37, mientras que las hsp70c lo hacen directamente al receptor Tom 20-22 (Fig. 6.8). No se sabe si los dos receptores tienen que unirse para reconocer las diferentes señales. Cuando la preproteína se une primero al receptor Tom 70-37 tiene que unirse luego al receptor Tom 20-22 para que la secuencia de señal sea insertada en el poro general de importación (Fig. 6.8 PGI). La Tom 22 ejerce una función central en la importación de las preproteínas porque se ha demostrado *in vitro* que en su ausencia las células mueren.

El denominado hasta ahora poro general de importación (PGI) es en realidad una estructura compuesta por muchas proteínas Tom, denominadas Tom 5, Tom 6, Tom 7, Tom 72, Tom 40, los receptores Tom 20-22 y Tom 70-37. Todas estas proteínas Tom conforman el aparato translocador de la membrana externa por donde atraviesan las preproteínas de la mitocondria (Fig. 6.9). Las Tom 6 y 7 modulan la dinámica del aparato translocador, la Tom 6 promueve la asociación de los dos receptores y la Tom 7 estabiliza la interacción entre las diferentes Tom. La

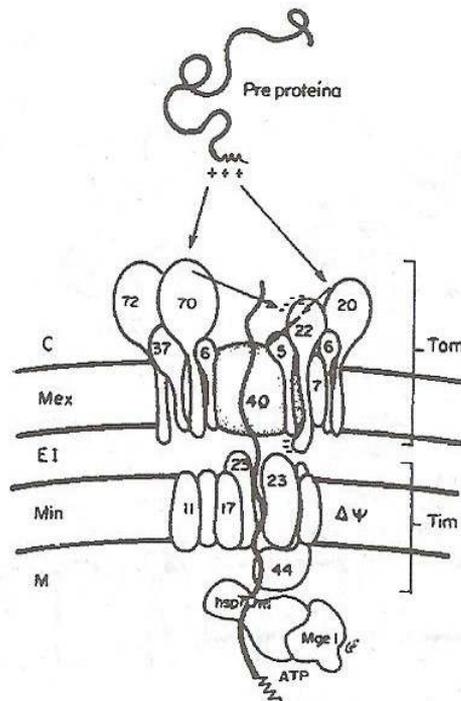


Figura 6.9. Translocación de las preproteínas a través de las membranas de la mitocondria.

Las 10 proteínas Tom conforman el aparato translocador de la membrana externa. Las cinco proteínas Tim forman el aparato translocador de la membrana interna. Cada proteína está representada por el número de su peso molecular en kD. La hsp70m hidroliza ATP para cooperar con el aparato translocador Tim en la penetración de la preproteína a la matriz. La chaperona Mge1 transporta ATP a las hsp70m (Pfaner y col., 1997; Hermann & Shaw, 1998).

N: extremo amino terminal; Tom: *Translocase of the outer mitochondrial membrane*; Tim: *Translocase of the inner mitochondrial membrane*; $\Delta\psi$: gradiente electroquímico; hsp70m: proteína chaperona de choque térmico 70 de la matriz mitocondrial; Mge1: chaperona que transporta ATP; ATP: adenosín trifosfato; C: citosol; Mex: membrana externa; EI: espacio intermembranal; Min: membrana interna; M: matriz mitocondrial.

Tom 5 une la Tom 40 con el receptor Tom 20-22. La Tom 40 es por donde se realiza la translocación de la preproteína en forma desdoblada.

Cuando la preproteína llega a la membrana interna, el péptido de señal Mit es reconocida por las **translocasas de la membrana interna** o Tim, y la preproteína es translocada a la matriz mitocondrial por las Tim. La translocasa de la membrana interna de las mitocondrias está constituida por cinco proteínas Tim. Las Tim se organizan y desorganizan rápidamente cuando es necesario, mientras que las Tom se mantienen más estables. Las Tim 17, 23 y 44 son los elementos principales para la translocación de las preproteínas dentro de la matriz mitocondrial, mientras que las Tim 23 y 11 estabilizan el complejo translocador. Las Tim 17 y 23 forman el canal que interactúan activamente con la preproteína que está en tránsito. El interior del canal cambia dinámicamente durante la translocación de la preproteína para evitar el paso de iones y para mantener el gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna (Fig. 6.9).

El inicio de la translocación de la secuencia de señal con carga positiva de la preproteína a través de las Tim requiere del potencial de membrana (Fig. 6.9 Ly). Se asume que la función del gradiente electroquímico en la translocación es un efecto electroforético sobre la secuencia cargada positivamente. Además, el gradiente electroquímico modularía la conformación de las proteínas Tim y ayudaría a abrir el canal, porque cuando se suprime el gradiente electroquímico se bloquea la translocación.

La Tim 44 es una proteína transmembranosa expuesta principalmente en el lado de la matriz (Fig. 6.9) se asocia a las Tim que forman el canal. Su función principal es unirse a las hsp70m que intervienen en la culminación de la translocación. Las hsp70m quedan unidas a las preproteínas translocadas impidiendo su replegamiento hasta que la peptidasa de señal escinde el péptido señal Mit. En esos procesos interviene también una cochaperona denominada Mge1 (*mitochondrial GrpE*) que transporta el ATP para la hsp70m (Fig. 6.9), y realiza el intercambio del ADP por ATP favoreciendo la liberación de la hsp70m de la Tim 44. Algunas proteínas importadas a la matriz se repliegan espontáneamente a medida que van penetrando en la matriz. En este caso las hsp70m sólo actúan al inicio de la translocación hacia la matriz. En otros casos las hsp70m intervienen en el repliegue adecuado de las proteínas. Existen proteínas que requieren de otras moléculas, como las chaperonas hsp60m, además de las chaperonas hsp70m, para su repliegue adecuado. Después de la maduración de las proteínas translocadas en la matriz intervienen las chaperonas denominadas ciclofinilas que liberan las hsp70m y/o las hsp60m de la proteína madura.

Los mecanismos moleculares de los procesos de direccionamiento para las proteínas de la mitocondria con destinos diferentes a la matriz son menos conocidos. Las preproteínas con la señal Mit en su extremo amino terminal que toman la vía de las Tom seguida de las Tim, la peptidasa de señal escinde el péptido señal Mit

de las preproteínas antes de que penetren completamente a la matriz mitocondrial. La mayoría de estas proteínas se translocan completamente, maduran y se quedan en la matriz (Fig. 6.10 A). Otras proteínas, se separan de su señal Mit pero no se translocan completamente a la matriz, sino pueden tener dos destinos diferentes. Primero, si tienen una secuencia hidrofóbica inmediatamente después de la primera señal Mit quedan insertadas en la membrana interna como la citocromo b2 y la citocromo c (Fig. 6.10 B). Segundo, si tienen señales intermedias, como en el caso de la adenilato quinasa, salen de la membrana interna y se quedan en el espacio intermembranal (Fig. 6.10 C).

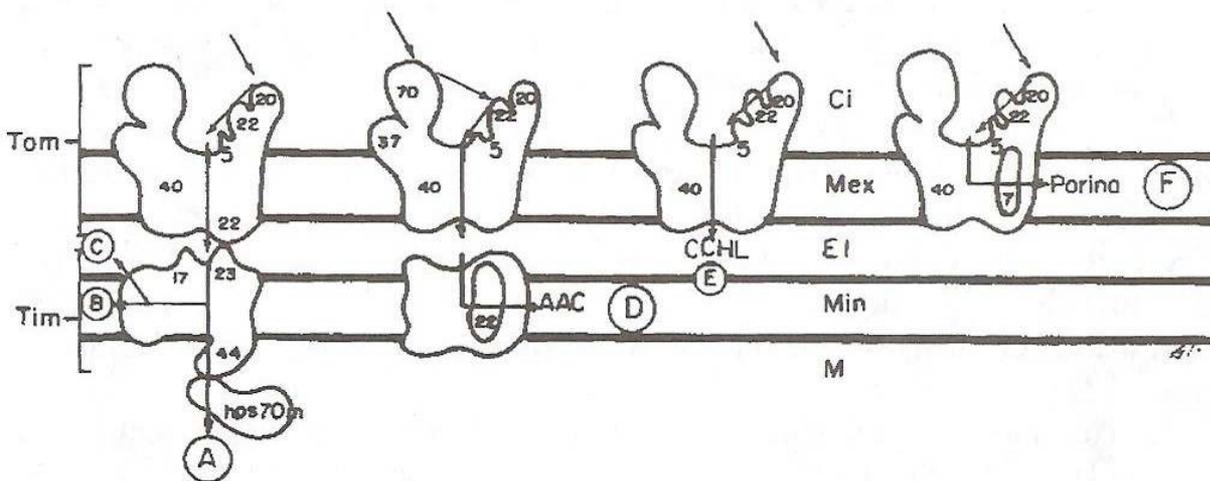


Figura 6.10. La distribución de las proteínas importadas a los diferentes compartimentos de la mitocondria.

- A. Las preproteínas con péptido señal Mit translocadas a la matriz
- B. Cuando la preproteína tiene la señal hidrofóbica seguida de la señal Mit queda insertada en la membrana interna.
- C. Cuando la preproteína tiene señales intermedias además de la señal Mit se vuelven al espacio intermembranal.
- D. Cuando la preproteína tiene únicamente una señal interna hidrofóbica se inserta en la membrana interna.
- E. Cuando las preproteínas tienen solamente otros tipos de señales son translocadas al espacio intermembranal.
- F. Los mecanismos que hacen insertar proteínas en el membrana externa no son conocidos (Pfanner y col., 1997; Hermann & Shaw, 1998)

AAC: permeasa ADP/ATP; CCHL: citocromo c hemeliasa; Tom: *Translocase of the outer mitochondrial membrane*; Tim: *Translocase of the inner mitochondrial membrane*; Números arábigos: pesos molecular en kD; hsp70m: proteína chaperona de choque térmico 70 de la matriz; Ci: citosol; Mex: membrana externa; EI: espacio intermembranal; Min: membrana interna; M: matriz mitocondrial.

Las preproteínas que no presentan señal Mit amino terminal no son translocadas a la matriz mitocondrial. Las preproteínas que tienen una señal de parche u otra clase de señal intermedia inician su translocación por la membrana interna, pero quedan insertadas en ella por la separación de la Tim 22 del complejo translocador. Un ejemplo de este tipo de inserción son las permeasas ADP/ATP de la membrana interna (Fig. 6.10 D).

No se conoce exactamente como cooperan los complejos Tom y Tim. Solamente, aproximadamente 20% de los complejos Tom son necesarios para la transferencia de las proteínas a través de los complejos Tim. Además, los complejos Tom pueden translocar proteínas al espacio intermembranal sin la intervención de las Tim cuando la preproteína no tiene la señal Mit sino otros tipos de señales. La citocromo c hemeliasa es translocada al espacio intermembranal de esta manera (Fig. 6.10 E).

Se conocen muy poco los procesos de transporte e inserción de las proteínas destinadas a la membrana externa. Durante el paso a nivel de las Tom la preproteína queda dentro de la membrana externa, se piensa que debe tener señales como la señal de pare de transferencia de las proteínas de membrana sintetizadas en el RER, para que se “escapen” de la translocación. En el caso de las porinas, la Tom 7 se disocia del complejo y propicia el anclaje de estas proteínas en la membrana externa (Fig. 6.10 F).

6.1.4.3. Importación de lípidos

Una de las pocas reacciones de biosíntesis de lípidos que se efectúan dentro de la mitocondria es la conversión del ácido fosfático en cardiolipina, un fosfolípido que representa el 20% de los lípidos de la membrana interna de las mitocondrias. Las mitocondrias importan la mayor parte de sus lípidos sintetizados por el REL. Los lípidos son transportados de manera individual: se trata entonces de un transporte molecular y no de un transporte vesicular. El transporte de lípidos en una fase acuosa, el citosol, exige proteínas de transporte que se unen a las moléculas de naturaleza lipídica, como se describió en la sección 5.6.2.2. Se conoce una proteína transportadora de fosfatidilcolina (PT-PC) específica que transporta la fosfatidilcolina del REL a la membrana externa de las mitocondrias (Fig. 5.23). No se conoce el mecanismo del paso de los fosfolípidos de una hemicapa a la otra, ni el de la transferencia de fosfolípidos de la membrana externa a la interna de la mitocondria, es posible que se realice en las regiones especiales donde se fusionan las dos membranas.

6.1.5. Alteraciones patológicas

Debido a la importancia que las mitocondrias tienen en el metabolismo energético, no se conocen enfermedades resultantes de una deficiencia mayor de alguno de sus constituyentes. Existen alteraciones más o menos típicas de las mitocondrias en ciertas enfermedades, sin que se conozca el mecanismo molecular. Tal es el caso de las anomalías de la mitocondria de la **enfermedad de Wilson** (defecto en el metabolismo del cobre) o las **anemias sideroblásticas** (acumulación de hierro en las mitocondrias de normoblastos, que son llamados entonces sideroblastos). Se conocen también varios tipos de **miopatías de la mitocondria**, donde las mitocondrias de los músculos estriados muestran anomalías o se encuentran en un número excesivo. Una forma poco frecuente de las miopatías parece resultar de una anomalía del acoplamiento entre las fosforilaciones y las oxidaciones.

La existencia de un sistema genético propio en las mitocondrias hace posible también mutaciones específicas del ADN mitocondrial. Recordemos que el espermatozoide prácticamente no aporta constituyentes citoplásmicos durante la fecundación del huevo, el ADN mitocondrial es exclusivamente de origen materno. La transmisión de una enfermedad genética que afecta el ADN mitocondrial no es pues de tipo mendeliano. Es efectivamente lo que se observa en los individuos con algunas miopatías.

El empleo de antibióticos para ciertas enfermedades pueden causar la disminución o la supresión de la biogénesis de las mitocondrias. Además, se sabe que la sensibilidad del sistema de síntesis de proteínas en las mitocondrias a ciertos antibióticos es muy similar al sistema de síntesis proteica de las bacterias y es evidentemente la base para emplear estas moléculas en la terapéutica contra las infecciones bacterianas. Esto significa que la utilización de esos antibióticos implica un bloqueo de síntesis proteica mitocondrial (Fig. 6.6). En condiciones experimentales, las células en cultivo paran las divisiones celulares cuando se ponen en contacto con tetraciclinas o cloranfenicol, antibióticos que impiden la traducción en las mitocondrias. Estos mismos antibióticos en el organismo no parecen inducir efectos graves y son empleados ampliamente. Estas diferencias entre los resultados *in vitro* e *in vivo* son consecuencias de varios factores. En primer lugar, la mayoría de las células de nuestro organismo no se dividen y en las células diferenciadas la vida media de las mitocondrias es de varios días. El bloqueo de la síntesis

de proteínas de la mitocondria debe ser mantenido durante varios días antes que se traduzca en una disminución del número de mitocondrias. En segundo lugar, se han encontrado antibióticos que no pueden atravesar la membrana interna de la mitocondria, como la eritromicina. Por último, las condiciones locales pueden intervenir, como una alta concentración de Ca^{++} en las células de la médula ósea que puede inducir la formación de complejos Ca^{++} -tetraciclina dentro de la matriz mitocondrial impidiendo su difusión al citosol. Cada uno de esos factores puede intervenir individualmente o en combinación con los otros. En tratamientos prolongados con el cloranfenicol o las tetraciclinas no quedan excluidos ciertos efectos secundarios que tienen como consecuencia la inhibición de la biogénesis de mitocondrias.

6.2. OXIDORREDUCCIONES DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO LISO

En las membranas del retículo endoplásmico liso (REL) se encuentran dos citocromos: el citocromo b5 cuya función metabólica es mal definida, y el citocromo P-450 asociado a una reductasa que es una flavoproteína. Las reacciones catalizadas por la reductasa y el citocromo P-450 están esquematizadas en la figura 6.11. El citocromo P-450 cataliza la fijación de una molécula de oxígeno, donde uno de sus átomos se une al sustrato, mientras que el otro forma agua, las enzimas que catalizan este tipo de reacción se denominan oxigenasas con función mixta. Los sustratos de este sistema incluyen los "xenobióticos" moléculas que se encuentran en las células pero que vienen del exterior del organismo, como los hidrocarburos policíclicos presentes en el humo y en el alquitrán, los hidrocarburos o bifenilos halogenados, las nitrosoguanidinas y las nitrosaminas, las N-acetilarilaminas y los nitrofuranos, muchos aminos aromáticos, y numerosas sustancias farmacológicas. Las hormonas esteroides no son xenobióticas pero son también sustratos de estas oxigenasas con función mixta. Estas oxigenasas tienen la propiedad de ser enzimas inducibles, es decir que las células expuestas a sustratos de estas enzimas sintetizan las oxigenasas en grandes cantidades. De esta manera, la inyección de pentobarbital (molécula xenobiótica) provoca la síntesis y un gran aumento del citocromo P-450 acompañado de una hipertrofia del REL. Desde el punto de vista morfológico, se constata en el ME un aumento importante del REL, semejante a las células que secretan esteroides, que generalmente tienen un REL muy abundante.

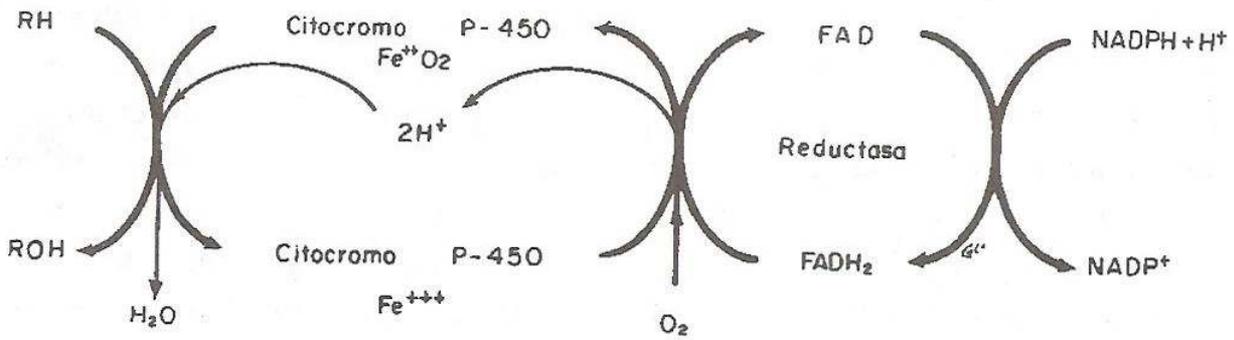


Figura 6.11. Reacciones de las oxigenasas a función mixta.

RH: sustrato; FAD: flavina adenina dinucleótido; $NADP^+$: nicotina adenina dinucleótido fosfato.

El citocromo P-450 existe bajo múltiples formas y corresponde a una familia de proteínas cuya extensión es todavía difícil de evaluar. La P-450 y la reductasa son proteínas integrales de la membrana del REL, cuyos centros activos están expuestos a la faz citosólica del REL, se les denomina el sistema de detoxificación. La reductasa es menos abundante que la P-450, se estima que por una molécula de reductasa se encuentran alrededor de ella 10 a 30 moléculas de citocromo P-450 (Fig. 6.12).

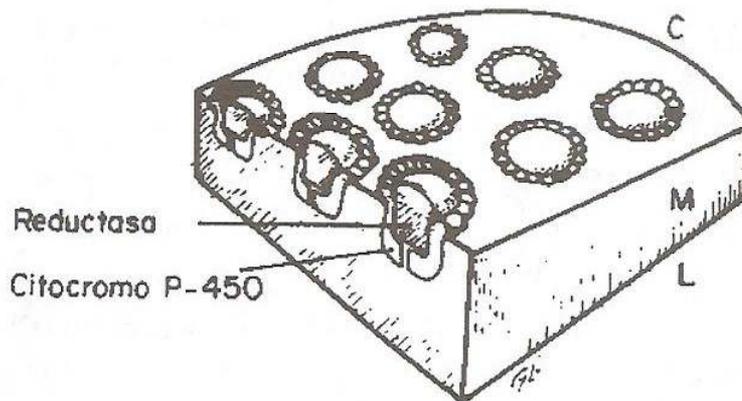


Figura 6.12. Modelo de organización del citocromo P-450 con reductasas en el REL.

C: citosol; M: membrana del REL; L: luz del REL.

La mayoría de los xenobióticos, incluidos algunos cancerígenos químicos, son tan poco solubles en el agua que quedarían indefinidamente en el organismo si no sufrieran modificaciones químicas, denominadas procesos de detoxificación. Los xenobióticos son liposolubles y pueden difundir a través de la membrana plasmática y encontrarse en el citosol. La detoxificación de los xenobióticos puede ser efectuada, en principio, por muchos tipos celulares, pero en nuestro organismo es efectuada principalmente por los hepatocitos. La detoxificación tiene dos fases: durante la primera se sustraen grupos hidrofóbicos como el grupo metilo; y du-

rante la segunda se añaden grupos polares como el grupo hidroxilo, lo que permite la unión de esas moléculas con moléculas hidrosolubles, tal como el ácido glucorónico que permite su excreción en la bilis. El sistema de oxigenasa con función mixta aparece así como una defensa importante del organismo. Pero, los productos que resultan de su acción catalítica pueden ser a veces perjudiciales. Efectivamente, algunos cancerígenos químicos, como los hidrocarburos cíclicos, no parecen ser cancerígenos por ellos mismos, pero sí lo son los productos de su metabolismo.

Uno de los mayores problemas que aún no se ha resuelto, es la especificidad de los citocromos P-450. Es difícil imaginar que la célula posea de antemano enzimas que tienen un centro activo adaptándose a miles de xenobióticos diferentes. Aunque sea menos extendido, este fenómeno presenta cierta similitud con el de la producción de millones de anticuerpos diferentes contra antígenos.

El REL es abundante en células especializadas en la síntesis de hormonas esteroideas (Ver 5.6.2) y en los hepatocitos que realizan la síntesis de las partículas de lipoproteínas de la sangre y las reacciones de destoxificación.

Otra función del REL y del RER, en la mayoría de células eucarióticas es la captación del Ca^{++} citosólico. La liberación del Ca^{++} dentro del citosol a partir del retículo endoplásmico y su recaptura median muchas respuestas celulares rápidas a las señales extracelulares como se ha descrito en el capítulo 3. El almacenamiento del Ca^{++} en la luz del RE es facilitada por la alta concentración de proteínas que se unen al Ca^{++} . En algunos tipos de células, tal vez en los mayoría, regiones específicas del retículo endoplásmico están especializadas para el almacenamiento del Ca^{++} . Por ejemplo, en las células musculares existe un abundante REL especializado, llamado retículo sarcoplásmico, que capta el Ca^{++} a partir del citosol por medio de una Ca^{++} -ATP-asa. La liberación y la recaptura del Ca^{++} por el retículo sarcoplásmico media la contracción y el relajamiento de las miofibrillas durante cada ciclo de la contracción muscular (Ver 7.1.3.1).

6.3. PEROXISOMAS

Las peroxisomas son organelos que existen en algunas células animales. En el hombre se encuentran en las células del túbulo contorneado distal del nefrón, en los hepatocitos y en las neuronas. Las peroxisomas son organelos que contienen ciertas oxidasas que producen el agua oxigenada (H_2O_2) y una enzima que la destruye, la catalasa (Fig. 6.13). Su nombre se refiere a la intervención de estos organelos en el metabolismo del agua oxigenada o peróxido de hidrógeno. Como las mitocondrias, los peroxisomas son lugares de consumo del oxígeno.

6.3.1. Funciones y morfología

La vía de oxidación por las catalasas de los peroxisomas interviene en la destoxificación de varias moléculas tóxicas que entran en el organismo. Por ejemplo, alrededor de un cuarto del alcohol que se consume se destoxifica por esta vía. Además, cuando la acumulación de H_2O_2 excede en la célula, la catalasa la convierte en agua.

Las oxidasas de los peroxisomas catalizan la oxidación de ácidos aminados de la serie D, de los L- α -hidroxiácidos, y en ciertas especies al menos, del ácido úrico.

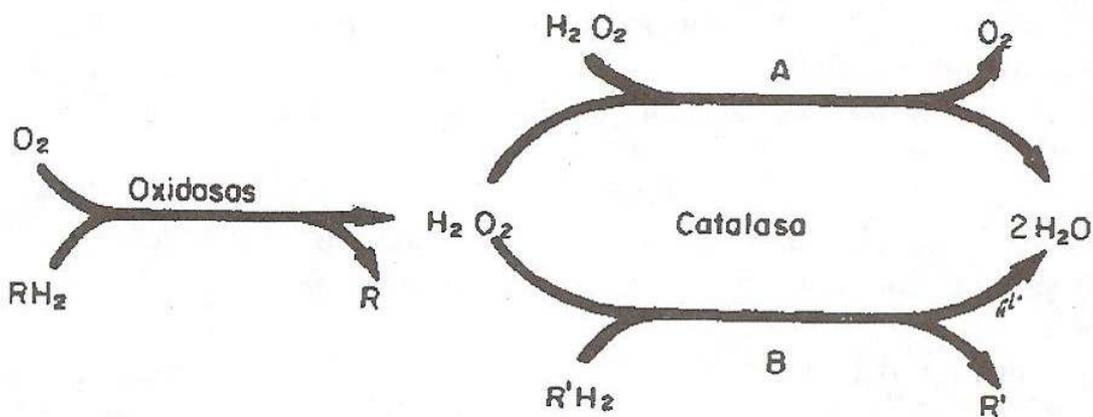


Figura 6.13. Reacciones enzimáticas de los peroxisomas.

La oxidasa forma peróxido de hidrógeno. La reacción de la catalasa hace intervenir ya sea dos moléculas de agua oxigenada (A), denominada reacción catalásica; o ya sea una molécula de agua oxigenada y una molécula reductora (B), reacción peroxidásica.

H_2O_2 : agua oxigenada o peróxido de hidrógeno; RH_2 o $R'H_2$: molécula reductora.

Los peroxisomas hepáticos catalizan además la β -oxidación de ácidos grasos de manera similar a como ocurre en las mitocondrias. Los peroxisomas contienen igualmente una enzima que permite la activación de ácidos grasos en acil-CoA. Finalmente, los peroxisomas poseen la enzima que sintetiza los plasmalógenos (glicerolípidos con uniones de tipo éter). La β -oxidación ocurre en las mitocondrias y en los peroxisomas en las células de los mamíferos; mientras que en las levaduras ocurre únicamente en los peroxisomas.

En su aspecto más típico, tal cual como se encuentra en el hígado, el riñón o el sistema nervioso de mamíferos, el peroxisoma es organelo de $0,5 \mu m$ de diámetro, rodeado de una membrana simple, lo caracteriza la presencia de un nucleoide constituido por una serie de finos tubos paralelos, empaquetados unos contra otros generando así a menudo un aspecto lamelar o de cristal en cortes. Este aspecto corresponde a lo que describieron los citólogos bajo el nombre de *microbodies* o microcorpúsculos (Fig. 1.1 Px).

Por métodos citoquímicos en los mamíferos se puso en evidencia la catalasa en pequeñas vesículas de $0,2 \mu\text{m}$ de diámetro en promedio, en órganos diferentes al hígado y al riñón. Esas vesículas han sido denominadas “microperoxisomas”, pero hasta ahora su asociación eventual con oxidasas que producen agua oxigenada no ha podido ser establecida.

En las células que no presentan este organelo se encuentra una enzima que cubre algunas de las funciones de la oxidasa, es la conocida **peroxidasa**. La localización de esta enzima puede variar según la función de la célula, por ejemplo, en los glóbulos rojos es abundante en el citosol, en los tirocitos se encuentra en la membrana plasmática apical y su acción enzimática es extracelular, hacia el coloi-de (Fig. 5.26). La enzima peroxidasa es ampliamente utilizada como marcador, en las técnicas de localización de moléculas en los análisis bioquímicos y morfológicos de células y tejidos.

6.3.2. Organelos similares

Organelos que contienen la catalasa y oxidasas que producen el agua oxigenada, se encuentran también en otras especies animales y en vegetales. El término de *microbody* o microcorpúsculo utilizado por los morfólogos es sin embargo más amplio que aquel de peroxisomas. En efecto, este término recubre varias especies de organelos citoplásmicos que tienen aspecto morfológico idéntico pero contienen enzimas muy distintas, por lo tanto sus funciones son también muy diferentes.

Los **glioxisomas** se encuentran en los vegetales, las levaduras y en ciertos protozoarios, tienen además de las enzimas de los peroxisomas, otras enzimas que realizan el ciclo del glioxilato que transforman los ácidos grasos en hidratos de carbono. Esas enzimas se perdieron en el curso de la evolución y ya no existen en los animales superiores.

Los **hidrogenosomas** de los *Trichomatidae* son otro ejemplo de organelo con aspecto típico de microcorpúsculos, catalizan la oxidación de una molécula de piruvato en acetato y CO_2 . La reacción es acoplada a la fosforilación de una molécula de ADP en ATP, y a la transferencia de los electrones al oxígeno en ambientes aerobios o a los protones con formación de hidrógeno en condiciones anaeróbicas. Los **glicosomas** son también microcorpúsculos que se encuentran en *Trypanosomatidae*, contienen una gran cantidad de enzimas de la glicólisis de esos protozoarios patógenos responsables, entre otros, de la enfermedad del sueño (*Trypanosoma gambiense*) y del Kala-azar (*Leishmania donovani*). En los glicosomas faltan las enzimas del metabolismo del agua oxigenada.

6.3.3. Biogénesis e inductores de los peroxisomas

Las enzimas de los peroxisomas son sintetizadas en los polirribosomas. El mecanismo de transporte no se conoce. Para la catalasa, que es un tetrámero compuesto de 4 subunidades idénticas, se sabe que es bajo su forma de apomonómero (es decir de una subunidad sin su grupo hémico) que es transferida a los peroxisomas. Ella se asocia al grupo hémico en el peroxisoma, luego se ensambla para formar el tetrámero de la proteína madura. Una secuencia específica de 3 aas localizada cerca de extremo carboxi terminal de muchas proteínas de los peroxisomas es una señal para su importación en los peroxisomas. Los peroxisomas aparentemente tienen al menos una única proteína expuesta sobre la superficie citosólica para actuar como receptor que reconoce la señal de las proteínas que deben ser importadas en los peroxisomas y una molécula transmembranosa, la *peroxisoma assembly factor-1* que estaría implicada en la translocación de las moléculas del citosol al interior del peroxisoma. Los nuevos peroxisomas se forman a partir de los preexistentes, por el crecimiento del organelo y su fisión como ocurre con las mitocondrias, los plastidios y el RE.

Los agentes hipolipemiantes que disminuyen principalmente los triglicéridos del plasma, como el clofibrato, aumentan el número de peroxisomas en los hepatocitos de los roedores y su contenido en enzimas de la β -oxidación de los ácidos grasos. Esos resultados son interpretados como indicio del papel importante de los peroxisomas hepáticos en el metabolismo de los lípidos. Según el agente hipolipemiante, pueden aumentar entre 8 a 18 veces la β -oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas de los hepatocitos, que disminuye la concentración de los lípidos intracelulares y del plasma sanguíneo. Estos resultados indican un papel importante de los peroxisomas dentro del metabolismo de los lípidos del organismo.

6.3.4. Patología

En la enfermedad hereditaria humana del síndrome cerebro-hepatorenal de Zellweger, los peroxisomas hepáticos y renales son muy escasos o ausentes. Se trata de un carácter autosómico recesivo con múltiples anomalías en los órganos mencionados y el bebé sólo vive algunos meses. La lesión metabólica precisa no ha sido establecida con certeza, se podría tratar de una deficiencia de las enzimas de los peroxisomas que intervienen en la primera etapa de la síntesis de plasmalógenos. Se ha encontrado un defecto en las proteínas que son importadas a las peroxisomas, lo que conlleva a una deficiencia severa de peroxisomas. Las células de estos individuos contienen peroxisomas "vacíos". También se ha encontrado en una de las formas de esta enfermedad una mutación en el gen que codifica la proteína *peroxisoma assembly factor-1*.

6.4. CITOSOL

El interior de una célula excluyendo el núcleo y los organelos con membrana se denomina citosol (Fig. 1.1 C). También se le ha denominado jugo citoplasmático, porque baña los organelos. A menudo se confunden citosol con citoplasma, el término citoplasma se refiere a los organelos con membrana más el citosol excluyendo el núcleo. En el citosol se encuentran también los elementos del citoesqueleto, el centrosoma, gotas lipídicas y en algunas células el glucógeno.

6.4.1. Oxidorreducciones

El citosol contiene algunas oxidasas. Las oxidorreducciones que se realizan en él hacen intervenir las deshidrogenasas. Dos cadenas de reacciones importantes del metabolismo de carbohidratos donde intervienen oxidorreducciones en el citosol son: la **glicólisis** cuya transferencia de electrones reduce el NAD^+ en NADH ; y el **ciclo de fosfopentosas** donde se reduce el NADP^+ en NADPH .

6.4.2. Otras reacciones

En el citosol, además de la síntesis de proteínas que realizan los polirribosomas (Ver 5.2) se efectúa la degradación de proteínas, al igual que en el RE, pero esta función en la célula la ejecuta principalmente los lisosomas (Ver. 4.2). La degradación de proteínas intracelulares es un proceso regulado, puede ser afectada por hormonas, sustancias farmacológicas o la dieta. La mayoría de las proteínas que son degradadas en el citosol son organizadas en complejos proteicos llamados **proteosomas**. Los proteosomas actúan sobre proteínas que han sido marcadas específicamente para su destrucción por una unión covalente de una pequeña proteína llamada ubiquitina. La proteína a ser degradada presenta una señal en su extremo amino terminal que se une a una ubiquitina. Luego de esta unión otras ubiquitinas dentro del proteosoma se unen a la proteína y la fraccionan en cortas secuencias peptídicas, finalmente se liberan sus aminoácidos, todo este proceso se hace en los proteosomas. No se conoce las moléculas que escinden los aminoácidos.

Las ubiquitinas están implicadas en la degradación de proteínas de la luz y de la membrana del RE y de la membrana plasmática. Lo interesante es que las proteínas provenientes del RE ya sea de la luz o las transmembranas son “retro-translocadas” al citosol para ser degradadas por los proteosomas, y en la mayoría de los casos la proteína es poliubiquitinada. La maquinaria conjugada de ubiquitinas y proteosomas puede estar asociada a la hemicapa citoplásmica de la membrana del RE y acoplada al proceso de retro-translocación. En la membrana plasmática se ha encontrado un receptor (c-Met) degradado por los proteosomas. Las ubiquitinas pueden jugar un papel más diverso en la regulación de las proteínas celulares, que lo que se creía hasta hace poco.

La concentración de los constituyentes dentro de la célula resulta esencialmente de un equilibrio entre los procesos de síntesis y de degradación. Prácticamente todas las proteínas celulares son renovadas durante la vida de la célula y tienen en consecuencia una duración de vida más corta que la de la célula que las contiene. La degradación es generalmente un fenómeno exponencial. Para el hígado de la rata, por ejemplo, la vida media ha sido medida para unas cuarenta enzimas. La vida media va de 12 minutos hasta 15 a 25 días, y el promedio se sitúa entre 2 a 3 días. Existen entonces grandes variaciones en la velocidad de la degradación de diferentes proteínas. De manera general, las enzimas que tienen una función de regulación metabólica importante son aquellas que son degradadas más rápidamente.

6.4.3. Substancias de reserva

6.4.2.1. Glucógeno

El glucógeno es la forma de reserva de carbohidratos en las células animales y se encuentra en el citosol. Al ME se observan como agregados de partículas opacas que se presenta bajo dos formas denominadas α y β . Las partículas α son las más voluminosas, su diámetro es del orden de $0,15 \mu\text{m}$, tienen la forma de rosetas y están constituidas por agregados de subunidades más pequeñas. Las partículas β son más pequeñas con un diámetro de $\pm 0,03 \mu\text{m}$, pero tienen el mismo aspecto y forman agregados con las mismas dimensiones que las subunidades de partículas α . En un tipo celular dado, una de las dos formas del glucógeno se encuentra presente o muy predominante. Así por ejemplo, el glucógeno del hígado se encuentra bajo la forma de partículas α , mientras que en el músculo se observan las partículas β . El citosol contiene las enzimas necesarias para la síntesis (glucogenogénesis) y la degradación del glucógeno (glucogenolisis).

La acumulación patológica del glucógeno ocurre en el citosol en casos de enfermedades genéticas que afectan su catabolismo.

6.4.2.2. Gotas lipídicas

Al ME, se puede observar acumulaciones lipídicas en el citosol, bajo la forma de gotas cuya forma y opacidad son variables. Estas gotas no tienen membranas, muestran a veces un borde denso, que no presenta la estructura trilaminar de la membrana unitaria y resulta simplemente de un depósito de osmio más importante en la periferia de las gotas.

En el citosol, las enzimas que catalizan la biosíntesis de ácidos grasos se encuentran organizadas en un complejo multienzimático. En los tejidos donde la β -oxidación de los ácidos grasos constituye la fuente principal de energía, las gotas

lipídicas son frecuentemente observadas en asociación estrecha con las mitocondrias. Se supone que esta cercanía favorece la penetración de los ácidos grasos dentro de las mitocondrias para su β -oxidación.

Las células que secretan hormonas esteroideas presentan gotículas lipídicas en el citosol entre el REL abundante y las mitocondrias túbulo-alveolares, ya que la síntesis de las hormonas se realiza en colaboración entre el REL que sintetiza el colesterol, enzimas del citosol y algunas de la mitocondria.

6.5. BIBLIOGRAFÍA

- Bankaitis, V.A. *Some aspects of intracellular lipid traffic*. En: NATO ASI Series, 82: 43 - 51, 1994
- Bonifacino, J.S. & A.M. Weissman. *Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 14: 19 - 57, 1998.
- de Duve, Ch. *Microbodies in the living cell*. *Sci. Ame.* 248 (5): 52 - 62, 1983.
- Dreyer, Ch., G. Krey, H. Keller, F. Givel, G. Helftenbein & W. Wahli. *Control of the peroxisomal- β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors*. *Cell*, 68: 879 - 887, 1992.
- Govaerts, L., L. Monnens, T. Melis & F. Trijbels. *Disturbed adrenocortical function in cerebro-hepato-renal syndrome of Zellweger*. *Eur. J. Pediatr.*, 143: 10 - 12, 1984.
- Harding, A.E. *The mitochondrial genome-breaking the magic circle*. *New Engl. J. Med.*, 320 (20): 1341 - 1343, 1989.
- Hermann, G.J. & J.M. Shaw. *Mitochondrial dynamics in yeast*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 14: 265 - 303, 1998.
- Kaikaus, R.M., S. Zhihua, N.Y. Wu, P.R. Ortíz de Montellano, R.K. Ockner & N.M. Bass. *Regulation of pathways of extramitochondrial fatty acid oxidation and liver fatty acid-binding protein by long-chain monocarboxylic fatty acids in hepatocytes*. *J. Biol. Chem.*, 268 (36): 26866 - 26871, 1993.
- Montoya, J. & G. Attardi. ADN mitocondrial humano. *Inv. Cien.*, 118: 60 -69, 1986.
- Pfanner, N., E.A. Craig. & A. Hünlinger. *Mitochondrial preprotein translocase*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13: 25 - 51, 1997.