

LA REGULACION DE LAS FUNCIONES CELULARES *

GUILLERMO SOBERÓN ‡

LA FUNCIÓN primordial del médico es preservar y restaurar el estado de salud de sus semejantes. El estado de salud es el resultado del desarrollo armónico de las funciones del organismo que conducen a la condición del bienestar integral del individuo. El estado patológico implica una perturbación de las funciones del organismo como consecuencia de distintos agentes etiológicos originados en el medio ambiente que nos rodea o inherentes a la estructura funcional propiamente dicha del sujeto afectado.

Es una lógica inferencia que el médico debe tener un conocimiento profundo de la naturaleza de las funciones que tienen lugar en el ser humano.

En los últimos decenios han surgido conceptos aportados por la biología molecular, que nos permiten aproxima-

rnos a un mejor entendimiento de la manera en que se llevan a cabo las funciones del organismo humano. Aunque apenas nos asomamos dentro de la gran complejidad de estas cuestiones, lo que ya hemos aprendido nos permite, por lo menos, vislumbrar la naturaleza de los mecanismos que entran en juego para el desarrollo y control de los distintos procesos que tienen lugar en el ser humano. Es la intención de la presente conferencia revisar, así sea en forma somera, algunos de estos conceptos y derivar de ellos ciertas implicaciones que, pensamos, resultan de un interés directo para el médico.

Medio interior, unidad funcional y homeostasis

Cabe recoger tres conceptos de gran trascendencia a manera de antecedentes para enfocar el cometido que nos hemos impuesto: la constancia del medio interno y la unidad funcional de los organismos descritos por Claudio

* Presentada en la XII Jornada Médica Nacional de la Academia Nacional de Medicina, celebrada en Puebla, en enero de 1971.

‡ Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Bernard y el de la homeostasis, originado por Walter B. Cannon.

Sobre los dos primeros conceptos transcribimos la glosa que hace el maestro Don José Joaquín Izquierdo, estudioso de la obra del genial fisiólogo francés: "Con justicia consideró Bernard como fundamental para la fisiología general, a otro de los conceptos más brillantes que llegó a concebir en el curso de su carrera, el del *medio interior*, o sea de que las células del interior de los organismos, particularmente de los superiores, se hallan bañadas por líquidos, plasma sanguíneo y linfa, que constituyen el medio en que viven, que la composición de éste sólo puede variar dentro de muy estrechos límites sin que peligre la vida, y que los organismos tienden continuamente a mantenerlo lo más constante posible". . . . "asentó que todos los mecanismos vitales, con ser variados, sólo tienen un objeto: el de mantener constantes las condiciones del medio interno. Consideraba que tal fijeza era la condición de la vida libre independiente y que implicaba un perfeccionamiento del organismo, que hace que las variaciones externas queden compensadas y equilibradas en él a cada paso, gracias a una continua y delicada compensación que resulta establecida como por la más sensible de las balanzas. Como consecuencia consideró a las células del interior de los organismos, particularmente de los superiores, y aun virtualmente a éstos, como independientes del medio exterior, gracias a que se hallan como en un invernadero que impide que sean alcan-

zados por los incesantes cambios del medio cósmico por lo que decía que el organismo superior es libre e independiente. Tal fue la estupenda generalización en que asentó Bernard que la vida de los animales goza de libertad dentro de ciertos límites."

"Bernard expuso su concepto del medio interno, en íntima conexión con el no menos importante de la unidad de los organismos. Hasta su tiempo había predominado la tendencia de considerar a cada organismo como un conjunto de órganos, cada uno de los cuales desempeñaba sus funciones de modo independiente. Cuvier, según lo relatado por el mismo Bernard, hacía del organismo un todo viviente, en el cual todas las partes estarían ligadas de tal suerte, que no podrían obrar sino estando unidas entre sí. Con lo que pretendía que la unidad de los seres vivientes era debida a fuerzas vitales especiales que los hacían inaccesibles a la experimentación. Bernard, tras de negar esto último, oponiéndole su principio del determinismo, consideraba que la unidad orgánica era el resultado de que los diversos órganos guardasen, unos con otros, relaciones de interdependencia establecidos por la mediación del sistema nervioso y de los líquidos orgánicos." ¹

El pensamiento de Cannon, que dio lugar al concepto de la homeostasis quedó plasmado en su libro *The wisdom of the body*, cuya primera versión fue publicada en 1932. El título del libro le fue inspirado por Starling quien así designó su Oración Harveiana que dio en 1923. "Starling, al

expresar su admiración por los maravillosos y hermosos ajustes del organismo, proclamó que solamente entendiendo la sabiduría del cuerpo, alcanzaremos el dominio de la enfermedad y el dolor lo cual nos permitirá aliviar la carga de la humanidad." ² Cannon reconoció que los organismos bien dotados, por ejemplo los mamíferos, pueden confrontarse con peligrosas condiciones originadas en su mundo exterior y con otras, igualmente peligrosas, emanadas en el interior de su cuerpo y, sin embargo, continúan viviendo y llevando a cabo sus funciones con relativamente pequeñas alteraciones. Introdujo el término homeostasis para connotar a los procesos fisiológicos coordinados que mantienen la mayor parte de los "equilibrios de los flujos metabólicos y de los procesos orgánicos", que son tan complejos y peculiares de los seres vivos y que pueden involucrar el cerebro y los nervios, el corazón, los pulmones, los riñones y el bazo, todos trabajando cooperativamente.

Expresó que aunque algunos órganos están bajo un control que les impide funcionar demasiado rápido o demasiado lento, estos casos deben ser vistos como formas secundarias coadyuvantes de autorregulación. Principalmente los estados estables * de todas las partes del organismo se logran al conservar la uniformidad de los ambientes naturales de dichas partes, es

decir su ambiente interno o matriz fluida. Este es el intermediario común que, por medio del intercambio de materiales como transportador de sustancias de aporte y de desecho y mantenedor de una temperatura constante, proporciona las condiciones fundamentales que facilitan la estabilización de dichas partes. Este medio interno, según lo estableció Claudio Bernard, es el producto del organismo vivo. En tanto se conserve uniforme, es innecesaria la intervención de dispositivos especiales para mantener la constancia y el ritmo de trabajo de los diferentes órganos.

Cannon estableció que la regulación homeostática se ejerce manteniendo constantes la concentración de los materiales y la actividad de los procesos fisiológicos. Los excesos de los materiales se controlan por medio de su almacenamiento, sea por "inundación" de los espacios extracelulares o bien segregándoles en forma de depósitos que constituyen así verdaderas reservas; también interviene el rebosamiento de los emuntorios cuando se sobrepasan los niveles correspondientes a los distintos niveles de excreción. La movilización de los materiales almacenados toma cuenta de su disminución en la matriz líquida. Los procesos fisiológicos pueden apresurarse o hacerse más lentos, según la necesidad específica, aumentando o disminuyendo los elementos que les generan o a los que dan lugar y modificando las velocidades de los mecanismos involucrados. Estableció, así mismo, que los dispositivos responsables de la homeos-

* Neologismo aceptado en nuestro medio como traducción del concepto expresado en inglés como *steady state*.

tasis se ponen en juego en forma automática no volitiva y que muchos de ellos están bajo el control del sistema nervioso autónomo, particularmente del sector simpático suprarrenal y postuló que dichos dispositivos representan ventajas metabólicas que han sido adquiridas durante la evolución biológica de modo que las formas vivientes más evolucionadas pueden desarrollarse con mayor independencia en su *habitat*. La homeostasis surge precisamente de la inestabilidad de la materia viva que, paradójicamente, utiliza esta propiedad para mantenerse dentro de un marco de relativa inmutabilidad ante las condiciones cambiantes. Como regla, siempre que estas condiciones afectan adversamente al organismo, se accionan mecanismos en su interior que le protegen y que restablecen el balance alterado.

De Bernard y Cannon a Jacob y Monod

Por lo relatado anteriormente nos percatamos que ya hace más de un siglo que se tenía habida cuenta de que el medio interior de los organismos no permite grandes fluctuaciones y, al respecto, desde hace cuatro decenios se estableció que la constancia de la matriz fluida resulta de la intervención de dispositivos que le preservan en respuesta a los estímulos del exterior o a perturbaciones del interior que tienden a modificar el sistema y, por lo tanto, a alterar dicha constancia. La existen-

cia de tales dispositivos indica a las claras, que la totalidad de las funciones del organismo están sujetas a mecanismos de control.

Cannon derivó su concepto de la homeostasis de una serie de observaciones sobre el equilibrio hidroelectrolítico, la regulación de la glucemia, el equilibrio acidobásico, el metabolismo del calcio y la temperatura corporal, entre otros. Puesto que estos procesos se manifiestan y fueron estudiados en el animal intacto o sometido a endocrinectomías, dedujo que los mecanismos de control de las funciones corporales actúan al nivel del organismo completo. Ahora sabemos que las funciones de las células mismas están sujetas a una cuidadosa y delicada regulación y podemos ahora adentrarnos en los mecanismos responsables, procurando entenderles a un nivel molecular. También parece desprenderse del libro de Cannon que la regulación de las funciones corporales se traduce en ajustes que necesariamente se reflejan en el medio interno. Hay evidencia de que el control de las funciones puede limitarse a territorios circunscritos, órganos y células específicas. Cabe recordar, a manera del ejemplo ilustrativo, que la relación estroma/parénquima se mantiene constante en distintas condiciones de hipertrofia e involución en el útero, en el hígado y en el corazón.³

Por otra parte no se piense que los mecanismos regulatorios son privativos de las formas biológicas más evolucionadas, pues encontramos manifestaciones de ellas en las formas más simples de vida como las bacterias y los virus

filtrables. De hecho, lo mucho que se ha aprendido en los últimos años sobre regulación metabólica se debe a que se escogieron sistemas biológicos primitivos como sujetos de experimentación. Por ello habremos de referirnos frecuentemente a conceptos establecidos en estos sistemas, lo cual, por lo demás, es perfectamente válido para tratar de entender el control del funcionamiento de los organismos superiores. En efecto, sobre el particular, anteriormente tuvimos ocasión de expresar: "...el ser humano, es un intrincado sistema biológico que ha recogido a través de la evolución de los seres vivos toda una herencia de intentos y frustraciones y de esfuerzos coronados con el éxito, que han llevado a constituir una maquinaria metabólica de gran complejidad. De esto se sigue que los conocimientos que podemos recoger en sistemas biológicos simples como pueden ser las bacterias y aún los virus filtrables, son relevantes y pertinentes para entender al hombre".⁴ Por otra parte no debe inferirse que lo que atañe mecánicamente a una bacteria se aplica necesariamente en las formas más avanzadas. Al respecto, en el mismo ensayo tuvimos ocasión de introducir una nota precautoria: "Si bien los conocimientos obtenidos de formas biológicas más simples son relevantes y pertinentes para los organismos superiores, resulta peligroso y en cierta forma es ingenuo, hacer una extrapolación directa, ignorando que en estos últimos la complejidad creciente ha traído como consecuencia la superposición de otros sistemas y mecanismos

que deben coordinarse entre sí. La diferenciación celular ha reclamado otros niveles de control que son ejercidos por el sistema nervioso central y por las glándulas de secreción interna. Así las cosas, las semejanzas entre un organismo superior y sus ancestros filogénicos nos ilustra sobre el pasado biológico; las diferencias entre ellos nos enseñan los mecanismos que han tenido que implantarse para su selección y subsistencia."⁴

Cabe aquí mencionar que hay diferencias importantes entre los organismos procariotes y eucariotes que es necesario tener presente para tomar plena conciencia de la situación planteada. Los procariotes son haploides, tienen su genoma desnudo en contacto directo con el citoplasma; durante su crecimiento exponencial sus proteínas no recambian, solamente se sintetizan y los excesos se diluyen por el incremento en masa bacteriana y en el número de células; los ácidos ribonucleicos mensajeros en general, son de vida corta y en muchos casos los genes responsable de la síntesis de las enzimas que participan en una vía metabólica determinada se encuentran agrupados en el genoma. Los eucariotes son diploides; tienen su genoma principalmente confinado al núcleo, donde se encuentra unido a proteínas básicas llamadas histonas (no obstante se ha descrito la existencia de DNA redundante en otras partículas subcelulares); sus proteínas recambian y se toma cuenta de los "excesos" por degradación catabólica; los ácidos ribonucleicos mensajeros generalmente tie-

nen una vida prolongada; los agrupamientos de genes correspondientes a enzimas involucradas en una misma vía metabólica distan de ser frecuentes. En las células animales hay un rápido recambio de RNA en el núcleo mismo y el DNA es en gran parte redundante.

Hay otra razón poderosa para que el médico conozca los mecanismos regulatorios de los organismos inferiores. Tal conocimiento le llevará a entender de mejor manera la naturaleza de las interacciones huésped-agente infeccioso y huésped-parásito, lo que le dará armas para contender con numerosos padecimientos que afligen al género humano.

El último decenio ha testificado el esclarecimiento de los procesos regulatorios intracelulares, al menos en la concepción general de los mecanismos involucrados. Desde este punto de vista, la proposición que hicieron Jacob y Monod sobre el control de la síntesis de proteínas, de la cual nos ocuparemos más adelante, ha sido de una gran trascendencia, puesto que además de explicar congruentemente numerosos datos de la fisiología bacteriana, suscitó un cúmulo de trabajo experimental que en gran parte ha hecho valer las predicciones que hicieron. Constituye el modelo del operón de Jacob y Monod un orden de ideas sobre la esencia misma del fenómeno biológico y el inicio de nuestra comprensión de la regulación metabólica al nivel molecular. Este tipo de conceptos forman el marco de referencia de nuestra comunicación.

La actividad de las enzimas y el control de las funciones celulares

Para comprender los mecanismos responsables de la regulación de las funciones celulares es preciso partir de la premisa de que éstas, cualquiera que sea su naturaleza, son el resultado de reacciones químicas que requieren de enzimas específicas para llevarse a cabo. El metabolismo intermedio es el conjunto de reacciones químicas que acontecen en el interior de un sistema biológico, por las cuales las sustancias que provienen del medio ambiente son sucesivamente transformadas en otras más pequeñas, cada vez más simples, hasta llegar a los compuestos que son excretados. Algunas de las moléculas que se producen durante el transcurso de esta degradación paulatina constituyen precursores que la célula utiliza para la construcción del material que le es propio. Queda claro, por lo demás, que hay gran sentido de organización en el interior de la célula, tanto en lo que se refiere al control de la velocidad de las reacciones enzimáticas como a las estructuras que se forman por la interacción de ciertas moléculas específicas.

El control de las reacciones enzimáticas se ejerce fundamentalmente por la actividad o la cantidad de las enzimas mismas. Es decir, otros factores que modifican la velocidad de una reacción enzimática *in vitro*, tales como la concentración de hidrogeniones, la concentración del sustrato, la temperatura, la fuerza iónica y otros, tienen

una significación menor *in vivo*. Para entender los mecanismos de regulación de las funciones celulares, es preciso comprender qué es lo que puede controlar la cantidad y la actividad de una o varias enzimas que intervienen en las reacciones químicas responsables de dichas funciones.

¿Qué factores afectan la cantidad de las enzimas? Debemos considerar el dogma central en biología que puede enunciarse de la siguiente manera: el flujo de información va del ácido desoxirribonucleico al ácido ribonucleico y de éste a las proteínas. Dicho más ampliamente, la información genética que, por una parte, perpetúa las especies biológicas y por otra condiciona sus características y su funcionamiento, se deposita en el ácido desoxirribonucleico. La información genética subsiste cuando la doble hélice del ácido desoxirribonucleico se duplica y da formas semejantes a sí misma durante la división celular; la información genética se expresa para determinar el fenotipo al transcribirse para la síntesis de ácido ribonucleico y de éste se traduce para la síntesis de proteínas. Distinguiamos así dos niveles en la biosíntesis de las proteínas: la transcripción de la información genética (lenguaje de ácidos nucleicos da lugar a lenguaje de ácidos nucleicos) y la traducción de la información genética (lenguaje de ácidos nucleicos origina lenguaje de proteínas). Se determina en esta forma una colinearidad en la ordenación de las bases nitrogenadas que forman el ácido desoxirribonucleico y la ordenación de los aminoácidos que forman

una cadena peptídica. El reciente hallazgo de una DNA polimerasa dependiente de RNA hace posible que el flujo de información pueda realizarse en algunos casos en sentido inverso es decir, de RNA a DNA.

Control de la cantidad de una enzima

a) *Control de la síntesis de proteínas al nivel de la transcripción de la información genética*

La información genética se transcribe mediante la síntesis de RNA que depende de DNA. La ordenación de los nucleótidos del primero depende de la ordenación de las bases nitrogenadas que componen el DNA. Esto se lleva a cabo por la especificidad de apareamiento entre guanina y citosina y entre adenina y uracilo. Para la síntesis de ácido ribonucleico se requiere de la enzima RNA polimerasa y se utilizan como sustratos los nucleósidos trifosfatados ATP, GTP, CTP y UTP.⁵ En base a evidencia experimental obtenida fundamentalmente con el sistema *lac* (información genética responsable de las síntesis de tres enzimas que participan en la utilización de la lactosa) de *Escherichia coli* postularon un modelo para el control de la expresión de la información genética que explica los fenómenos de inducción y represión enzimática. Designaron con el nombre de operón al conjunto de genes estructurales responsables de la síntesis de varias enzimas generalmente relacionadas metabólicamente, que se agrupan unos junto a los otros en el genoma y que

obedecen a un mismo mecanismo regulatorio. Señalaron que inmediatamente adyacente al primer gen estructural o formando parte de él, se encontraba el sitio inicial de copia al que se le llamó operador. Si este sitio se encuentra libre de RNA polimerasa puede interactuarse con el DNA y la síntesis de los ácidos ribonucleicos mensajeros se lleva a cabo; en cambio, si el operador está asociado a otra molécula, la polimerasa no puede llevar a cabo su actividad y en consecuencia, no hay síntesis de RNA mensajero ni de las enzimas comprendidas en el operón. La molécula que se interacciona con el operador, designada aporepresor, es altamente específica y se sintetiza por la expresión de un gen llamado regulador, que se encuentra en una región del genoma distinta del operón. Cuando hay inducción enzimática, una molécula pequeña, el agente inductor que incluso puede ser el sustrato de la enzima, se combina con el aporepresor, producto del gen regulador y le produce cambios en su conformación que así no resulta adecuada para unirse al operador. De esta forma, el sitio inicial de copia queda libre y la RNA polimerasa puede proceder a la síntesis de RNA, transcribiéndose la información contenida en los genes estructurales. Cuando hay represión enzimática, el aporepresor no es capaz por sí solo de interactuarse con el operador, pues requiere ponerse en contacto con una molécula pequeña, el agente represor, para adquirir la forma conveniente para dicha interacción. En general son inducibles las

enzimas catabólicas sujetas a control y son represibles las enzimas anabólicas que están reguladas.

El mecanismo de la inducción y la represión enzimática implica que las enzimas correspondientes a los genes agrupados en un operón varíen sus actividades en forma coordinada bajo la aplicación de distintos estímulos que les afecten. Aunque esta predicción se cumple hay casos de variación coordinada de enzimas que no pertenecen a un operón, lo cual sugiere en estos casos, la existencia de mecanismos de control que se ejercen a otros niveles (ver más adelante). Hay sistemas regulatorios que abarcan más de un operón, por lo que se ha sugerido el término "regulón" para el conjunto de operones que se expresan de manera similar aunque no necesariamente en forma coordinada.⁶

Se ha demostrado sin lugar a dudas que el aporepresor es una proteína altamente específica,^{7, 8, 9} que se interacciona fuertemente con el operador, ya que tiene una constante de disociación de orden de 2×10^{-12} . Así mismo, el aporepresor del sistema *lac* se une *in vitro* específicamente con el agente inductor. Se han aislado mutantes que tienen la característica de sintetizar el aporepresor a una mayor velocidad.¹⁰ Algunos aporepresores que han sido aislados son capaces de inhibir *in vitro* la síntesis de los ácidos ribonucleicos mensajeros correspondientes.^{11, 12} De esta forma se han corroborado las propiedades funcionales del producto del gen regulador originalmente propuestas por Jacob y Monod.⁶

Al sitio de iniciación de la transcripción del DNA se le ha llamado promotor. Es más bien un concepto funcional, ya que correspondería al sitio de aplicación de la RNA polimerasa y no al concepto de sitio físico que estaría representado por el operador. Ahora bien, lo interesante es que ha sido posible disociar el promotor del operador en mutantes adecuadas.¹³ Por lo menos en el operón *lac*, la región del operador se encuentra más próxima que el promotor a los genes estructurales. Es entonces posible que la aplicación del aporepresor al operador impida la unión de la RNA polimerasa al promotor o que la unión del aporepresor interfiera con el progreso de la polimerasa desde el promotor hasta los genes estructurales del operón.¹⁴

Los fenómenos de inducción y represión enzimática explicados de acuerdo con el modelo de Jacob y Monod, implican un control negativo, en el sentido que el producto del gen regulador, al interactuarse con el operador, impide la transcripción genética. No obstante, con posterioridad se ha descrito que hay sistemas en donde la transcripción puede regularse por un control positivo, es decir, el producto del gen regulador se requiere para activar la síntesis del ácido ribonucleico mensajero.¹⁵

b) *Control de la síntesis de las proteínas al nivel de la traducción de la información genética*

El control al nivel de la transcripción hace depender la síntesis de las proteínas de la cantidad de ácido ri-

bonucleico mensajero sintetizado. Se constituye la maquinaria biosintética de las proteínas, al asociarse este polinucleótido con los ribosomas existentes y con el ácido ribonucleico de transferencia portador de los aminoácidos que serán polimerizados. Para que exista la renovación de las especies de proteínas, que se sintetizan en concordancia con las condiciones metabólicas cambiantes de la célula, es preciso que los ácidos ribonucleicos mensajeros tengan una vida media corta que permita que los ribosomas se interaccionen con las nuevas especies de ácidos ribonucleicos mensajeros que se van formando. Efectivamente, este parece ser el caso general en bacterias, que ciertamente son polifacéticas en sus funciones, ya que se ha aventurado que los mensajeros son traducidos menos de 100 veces.¹⁶ No obstante, en los organismos superiores la diferenciación celular ha traído consigo la especialización de funciones, haciendo menos necesaria la renovación de los mensajes. Así se ha originado el concepto del mensajero estable, que es la forma habitual encontrada en las células de las formas biológicas más evolucionadas.

Si el mensaje es permanente, el control de la síntesis de las proteínas no puede hacerse al nivel de la transcripción, ya que la población de los RNA mensajeros es mucho más constante. Se precisa otro nivel de regulación, el control al nivel de la traducción de la información genética, que ha sido plenamente demostrado mediante el uso del antibiótico actinomicina D, que

inhibe la síntesis del ácido ribonucleico mensajero. Cuando el inhibidor se administra después de iniciado el incremento en la actividad de la enzima triptófano pirrolasa que sigue a la inyección de glucocorticoides, se provoca un aumento añadido de la enzima, lo cual ha sido interpretado en el sentido de que el antibiótico impide la síntesis de una proteína de vida corta que reprime la traducción del mensaje correspondiente a la enzima triptófano pirrolasa. Efectivamente, Tomkins y colaboradores¹⁷ han propuesto un modelo de regulación en el cual el control se ejerce por un represor postranscripcional, que al combinarse con el RNA mensajero impide su traducción y le prepara para ser catabolizado. También se ha atribuido un efecto regulador a la concentración de aminoacilribonucleicos de transferencia específicos, que sería ejercido, naturalmente al nivel de la traducción de la información.¹⁸

c) *Control de la cantidad de una enzima por modificación de su catabolismo*

Anteriormente dijo que en los organismos superiores las proteínas están sujetas a recambio metabólico, es decir, continuamente se construyen y se destruyen. La velocidad con la que estos procesos se llevan a cabo es distinta para cada especie de proteínas. Al catabolizarse, la macromolécula se desdobla en los aminoácidos que la componen. La cantidad de una enzima determinada en un momento dado, depende pues de la velocidad a la que

se sintetiza y de la rapidez con que se degrada, por lo que puede aumentar o disminuir, modificando cualquiera de las constantes de velocidad de estos procesos que le forman y que le destruyen. El control de la síntesis de las proteínas al nivel de la transcripción y al nivel de la traducción, se ejerce precisamente sobre la velocidad de dicha síntesis.

El concepto del recambio metabólico fue demostrado experimentalmente por Schoenheimer¹⁹ quien aplicó el uso de isótopos para conocer el camino que siguen distintos metabolitos en un organismo. Su contribución, de una gran trascendencia, quedó plasmada en tres conferencias que, sustentadas por H. T. Clarke después de la muerte de Schoenheimer, fueron agrupadas en el libro titulado *The dynamic state of body constituents* el cual ha venido a ser uno de los clásicos en biología. Schoenheimer estableció que los constituyentes celulares, en apariencia estáticos cuando su concentración no cambia, están sujetos a un continuo recambio, pues son constantemente degradados y sintetizados de modo que la cantidad absoluta no varía, si las velocidades de ambos procesos se igualan. El proceso de degradación afecta al azar a la población total de moléculas sin que sean preferentemente catabolizadas las que fueron sintetizadas primero, por lo que no existe propiamente, al nivel molecular, un "decaer por envejecimiento".

Que la regulación de la cantidad de una enzima puede hacerse por modificación de la velocidad a la que es ca-

tabolizada se ha demostrado recientemente por los trabajos de Schimke,²⁰ quien ha descrito, por ejemplo, que el aumento en la actividad de la arginasa hepática que se ocasiona por la alimentación a la rata de una dieta hiperproteica, se debe a síntesis *de novo* y que en cambio, el incremento en la actividad de la enzima que se observa en el animal sometido a inanición es causado porque en estas condiciones la arginasa prácticamente no se cataboliza.

Hay algunos casos en los que el aumento de una actividad enzimática obedece a un aumento en la síntesis o a una disminución en el catabolismo, según sea la naturaleza del estímulo empleado. Tal es el caso de la triptófano pirrolasa del hígado de la rata, que aumenta su velocidad de síntesis después de la administración de glucocorticoides y disminuye la rapidez con la que se destruye cuando se administra triptófano.²¹

Control de la actividad de una enzima

Hay ciertas enzimas que tienen propiedades regulatorias, ya que modifican su capacidad catalítica cuando se interaccionan con otras moléculas pequeñas que actúan como inhibidores o como activadores, sea que aumenten o que disminuyan la velocidad a la cual el sustrato, se convierte en producto. Tales inhibidores o activadores en general tienen una estructura molecular muy diferente a la del sustrato y la del producto, de modo que no establecen

competencia con estas moléculas por el sitio activo de la enzima, pues tienen especificidad por interaccionarse con otra parte de la superficie de la enzima. ¿Cómo es que pueden modificar las propiedades catalíticas de la enzima? Las enzimas que son afectadas modifican su conformación cuando se interaccionan con las moléculas que las regulan, de modo que al adoptar una nueva forma, modifican la relación espacial de los grupos funcionales que constituyen el sitio activo de la enzima y le hacen entonces inadecuado o más adecuado para combinarse con grupos funcionales del sustrato. La plasticidad de la arquitectura proteica confiere grandes posibilidades para regular la actividad de las enzimas. Este mecanismo de control es muy eficiente y ciertamente barato desde el punto de vista del gasto de la energía, ya que no se requiere sintetizar mayor número de moléculas de enzima, con el gasto consiguiente que implica la biosíntesis de una proteína. Mediante el control de la actividad de una enzima, una determinada acción química puede proceder o interrumpirse, dependiendo de la concentración de moléculas pequeñas específicas que existen en el ámbito de la enzima, las cuales, de esta suerte, se constituyen en efectores metabólicos.

Las enzimas que tienen la característica de responder a este tipo de control, se conocen con el nombre de enzimas alostéricas, en consideración a que actúan sobre ellas moléculas que tienen una estructura química muy diferente a la del sustrato. Las moléculas pequeñas que funcionan como efecto-

res metabólicos se conocen con el nombre de agentes alostéricos, sean inhibidores o activadores y al sitio de interacción se le llama sitio alostérico. Las enzimas alostéricas están formadas por varias subunidades, y en algunos casos, se ha demostrado que el sitio activo y el sitio alostérico se encuentran en distintas subunidades. Las subunidades se interaccionan entre sí adoptando una conformación determinada, y al combinarse con moléculas pequeñas, sustratos o agentes alostéricos, por un efecto llamado cooperativo se causan cambios en dicha conformación. La plasticidad de estas moléculas proteicas produce una cinética enzimática diferente a la que se observa en las enzimas que no tienen esa propiedad. En efecto, cuando se estudia el efecto de concentraciones crecientes de sustrato sobre la actividad enzimática, en el caso de las enzimas alostéricas se obtiene una curva de tipo de S itálica, a diferencia de las otras enzimas en las que la misma curva corresponde a una hipérbola rectangular. La curva de saturación de la hemoglobina, a medida que se incrementa la tensión de oxígeno, tiene también una forma de S itálica semejante a la observada en las enzimas alostéricas, debido a que también existe un efecto cooperativo entre las subunidades que le componen. Ha sido posible anular las propiedades regulatorias de algunas enzimas alostéricas, sometiendo a calentamiento, a enfriamiento o haciéndoles reaccionar con sustancias químicas, pues así desaparece su capacidad de interaccionarse con los agentes alostéricos y al mismo

tiempo su cinética adquiere características normales. Este fenómeno se conoce con el nombre de desensibilización y se ha interpretado como indicador de la separación o encubrimiento de los sitios alostéricos.

Hay muchas enzimas alostéricas que han sido descritas; entre ellas, vale la pena mencionar la aspartato transcarbamilasa, la treonina desaminasa, la fructosa 1,6, difosfatasa, la deshidrogenasa isocítrica, la deshidrogenasa glutámica y la fosforilasa B.

Las hormonas y la regulación de las funciones celulares

En los organismos unicelulares, un efectivo control de la transcripción de la información genética o de la actividad de las enzimas es suficiente para una regulación satisfactoria de sus funciones. En los organismos multicelulares, se requiere además mantener una coordinación entre las funciones de las células de diferentes órganos y tejidos, lo cual ha hecho necesario el advenimiento de otros mecanismos superiores de control, como el sistema endocrino y el sistema nervioso. Las hormonas, que desempeñan el papel de mensajeros químicos responsables de esta coordinación, son compuestos sintetizados en bajas concentraciones en una célula que provocan respuestas fisiológicas en otra célula distante. Moléculas de naturaleza química distinta funcionan como hormonas: aminoácidos, péptidos, proteínas, derivados de ácidos grasos y compuestos esteroides de variada índole.

Algunas hormonas tienen un efecto directo sobre ciertas enzimas; por ejemplo, la tiroxina provoca la disociación de la enzima deshidrogenasa glutámica en las subunidades que la componen. Otras hormonas, como la insulina y la oxitocina se interaccionan con estructuras de la membrana y modifican el transporte de metabolitos al través de ellas. Varias hormonas, como la adrenocorticotrófica, la tiroxina, la insulina, la vasopresina, los estrógenos, la testosterona y los glucocorticoides, producen sus efectos a través de modificar la transcripción genética.

Para ilustrar esto último, es oportuno transcribir la evidencia que indica la participación de las hormonas esteroides en el control de la síntesis de ácidos ribonucleicos mensajeros específicos, según lo señalan Martín y Tomkins.²² Puede resumirse en la siguiente forma:

a) Las hormonas esteroides administradas *in vivo* causan un aumento en la velocidad de la incorporación de precursores marcados en RNA; en algunos casos efectos similares han sido observados *in vitro*.

b) La cromatina aislada de los tejidos tratados con hormonas muestran una actividad mayor de "molde" * cuando se utiliza para dirigir la síntesis de RNA.

c) La "inducción" hormonal se inhibe por los inhibidores de la síntesis de RNA.

d) Aparecen nuevas especies o cantidades aumentadas de especies de ácido ribonucleico en animales que han sido tratados con hormonas.

e) Algunas hormonas esteroides se localizan en el núcleo unidas a la cromatina.

f) Después de ser tratadas con ecidisona se observa un abollamiento ** de los cromosomas de larvas de insectos en ciertas regiones específicas.

Se han identificado en algunas células "proteínas receptoras" con las cuales se interaccionan las hormonas esteroides, algunas de carácter citoplásmico, mientras que otras son las intranucleares y, al parecer, hay una transferencia de la hormona de unos receptores a otros.

Varias hormonas, como el glucagon, la adrenalina, la noradrenalina, la insulina y la vasopresina ejercen su acción a través de la producción de AMP cíclico (cAMP), otro mensajero químico recientemente descrito que tiene una gran importancia en la regulación de las funciones celulares. Esta molécula está formada por adenina, ribosa y fosfato, que está unido por dos enlaces de tipo éster con los oxhidrilos 5' y 3' del azúcar.

El compuesto se forma por la acción sobre el ATP de la enzima adenil ciclasa, que se encuentra unida a la membrana. En los organismos multicelulares, el cAMP actúa como un activador alostérico de varias quinasas,

* Neologismo aceptado en nuestro medio del vocablo inglés *template*.

** Neologismo aceptado en nuestro medio del vocablo inglés *puffing*.

que fosforilan distintas proteínas utilizando ATP como donador del fosfato. Tal tipo de actividad se ha encontrado en el músculo, en el cerebro y en varios tejidos de vertebrados e invertebrados. Las proteínas que son sustratos de tales fosforilizaciones son enzimas y proteínas sin actividad catalítica, como las histonas. Se ha propuesto que la fosforilización de las histonas permite la transcripción de la información genética y esto explica la inducción de varias enzimas hepáticas por la administración de glucagon. Así mismo, se ha postulado que cAMP participa en la regulación de la traducción del RNA mensajero, o sea por la fosforilización de las proteínas de los ribosomas o bien a través de los factores de iniciación.

El cAMP se encuentra también en bacterias, de modo que puede ser verdaderamente un precursor evolutivo de los mecanismos de control hormonal en los animales superiores. En *E. coli* se interacciona con una proteína receptora a la que se le ha adjudicado el papel de favorecer la interacción de la RNA polimerasa con la región del promotor del operón del sistema *lac*. Además, el cAMP favorece la traducción del RNA mensajero, ya que estimula la inducción de ciertas enzimas aún en presencia de inhibidores de la síntesis del RNA.

Las histonas en el control de la expresión génica

La información genética contenida en las células somáticas de un organ-

mo multicelular se origina de la que llevan el espermatozoide y el óvulo. La multiplicación celular trae consigo la diferenciación celular o sea la especialización de las funciones celulares y puesto que éstos resultan de la actividad de enzimas que se sintetizan por la expresión de la información genética, pueden existir dos alternativas: las células somáticas durante la diferenciación celular han perdido la información genética que no manifiestan, o bien todas las células somáticas son totipotenciales, en el sentido que son portadoras de la totalidad de la información genética, pero ésta se expresa de manera diferente en las distintas células. La respuesta es positiva para la segunda posibilidad. Esta situación predice que si la imposibilidad de sintetizar ciertas proteínas se debe a la ausencia de transcripción, los ácidos ribonucleicos mensajeros formados en diferentes células somáticas son originados en diferentes regiones del genoma, lo cual ha sido comprobado experimentalmente por medio de la hibridación entre moléculas de DNA y RNA.²³

Cabe pues preguntar: ¿qué puede inhibir permanentemente, en distintas células, la transcripción de la información genética? Desde hace 25 años se ha propuesto que las histonas, proteínas básicas que están asociadas al DNA en el núcleo de los organismos eucariotes, reprimen selectivamente la síntesis de RNA condicionada por el DNA. Por lo que se discute, es relevante que las histonas aparecen desde el punto de vista evolutivo en orga-

nismos que han desarrollado membrana nuclear, cromosomas y la propiedad de diferenciación celular.

Georgiev ²⁴ ha revisado recientemente la evidencia experimental acumulada sobre el papel de las histonas en el control de la expresión génica, concluyendo que lo más probable es que la interacción de las histonas con el DNA no sea específica y que se combinen con todos los tipos de DNA, cubriendo sin discriminación cualquier ordenación de sus bases, quedando a las proteínas distintas de las histonas el reconocimiento específico de ciertas ordenaciones de bases con las que se unirían, impidiendo así el efecto inhibitorio de la histona. También podría ser que por lo menos una parte de las histonas, en particular aquéllas que son ricas en lisina, reconozcan ciertas ordenaciones de las bases del DNA en los principios de los operones. La formación irreversible de complejos con las histonas lleva a la completa exclusión del operón para la síntesis del RNA. Las proteínas distintas a las histonas también están involucradas en la regulación de la transcripción, pero los complejos que forman con las regiones correspondientes del DNA tienen constantes de disociación que son medibles, lo cual permite a la RNA polimerasa moverse a través de dichas regiones, aunque a una velocidad reducida. De acuerdo con este concepto, las histonas o algunas de ellas determinan el estado de diferenciación y las otras proteínas regulatorias determinan la velocidad de síntesis del RNA en las regiones abiertas del genoma.

Regulación de vías multienzimáticas

Hemos visto la forma en que se regula la velocidad de una reacción química aislada. Los mecanismos de control operan sobre el funcionamiento de la enzima específica que cataliza dicha reacción. Es pertinente ahora considerar que las transformaciones de los metabolitos en el interior de un sistema biológico se hacen por reacciones sucesivas, pues el producto de una reacción enzimática es a su vez sustrato de otra enzima, constituyéndose vías metabólicas por la continuidad de una serie de reacciones. Las enzimas que participan en una vía metabólica forman así una vía multienzimática. Cabe ahora preguntarse: ¿cómo se regula el rendimiento del flujo metabólico en una determinada vía multienzimática? Tomemos como ejemplos la vía de biosíntesis de la histidina, que se lleva a cabo mediante la intervención de nueve enzimas (fig. 1). La primera de ellas, que se conoce con el nombre de fosforribosil-ATP pirofosforilasa, utiliza como sustrato ATP y fosforribosil pirofosfato que se combina para dar N' (5'-fosforribosil [-ATP]). La enzima se inhibe por el producto final de la vía o sea la histidina. Se trata pues de una enzima alostérica, que puede ser desensibilizada del efecto del aminoácido cuando se le almacena en frío o por la acción de sales mercuriales, sin que haya pérdida apreciable de la actividad catalítica. El sitio alostérico que se interacciona con la histidina, es diferente pues

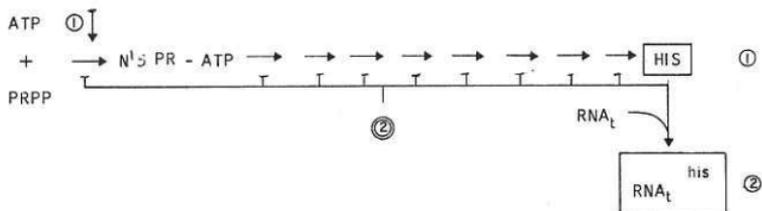


FIG. 1. Regulación de la vía de la biosíntesis de histidina. Cada una de las flechas sencillas indica una enzima de la vía. Abreviaciones: *ATP*, trifosfato de adenosina; *PRPP*, 5 fosforibosil 1 pirofosfato; *N⁵ PR-ATP*, *N⁵* (5-fosforibosil (trifosfato de adenosina); *HIS*, histidina; *RNA_t*, ácido ribonucleico de transferencia; *RNA_t^{his}*, histidinol-ácido ribonucleico de transferencia. Los números y los otros símbolos indican que la histidina inhibe (círculo sencillo) la primera enzima y que *RNA_t^{his}* reprime (círculo doble) todas las enzimas de la síntesis del aminoácido.

del sitio activo donde entran los sustratos de la enzima.

Es muy eficiente el control ejercido mediante la regulación de la primera enzima que participa en su vía biosintética; se conoce con el nombre de inhibición por retroregulación. Si la vía está expedita, se forma una gran cantidad del producto final que aumenta de concentración hasta el punto en que eficientemente puede unirse con la enzima alostérica a la que inhibe. Al ser inhibida su primera enzima, la vía deja de funcionar. El producto final sigue distintos caminos metabólicos, por lo que su concentración tiende a bajar al utilizarse en otros procesos, lo que provoca que se disocie del sitio alostérico de la enzima y al quedar ésta libre del efecto inhibitorio, cataliza nuevamente la primera reacción, por lo que la vía vuelve a quedar expedita y el proceso se repite.

Por otra parte, las enzimas que participan en la vía de biosíntesis de la histidina están sujetas a represión, es decir, dejan de sintetizarse. Sin embar-

go, se ha aclarado recientemente que la histidina no es el efector metabólico que se combina con el aporrepresor, sino que la represión se provoca por el histidinil-RNA de transferencia, un intermediario en la síntesis de proteínas. Algunas moléculas análogas a la histidina, como la metilhistidina, inhiben la enzima activadora del aminoácido, produciendo una disminución del producto de la reacción, o sea el histidil-RNA_t, y un aumento de la concentración del aminoácido libre. En estas condiciones, todas las enzimas se elevan en cantidad, debido a que se provoca su derepresión. La inhibición por retroregulación se ejerce de una manera rápida, prácticamente instantánea, en cuanto aumenta de concentración el agente alostérico inhibitorio, producto final de la vía biosintética, por lo que se ha designado como adaptación aguda, mientras que en el caso de la represión, aunque el efecto no se observa de inmediato, se ponen en juego procesos que tienden a mantener el sistema bajo un control más per-

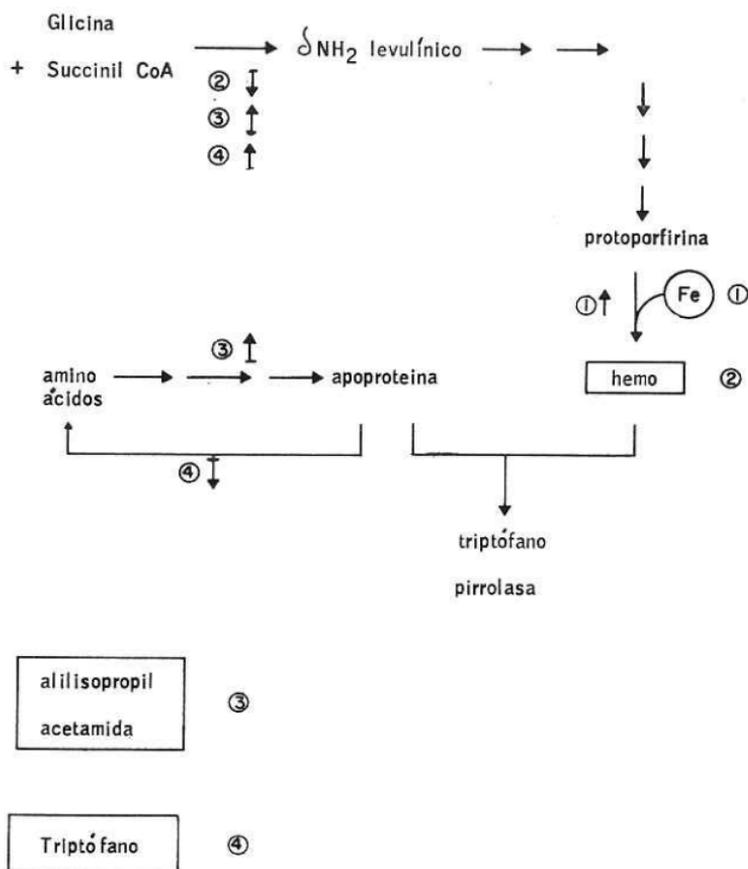


FIG. 2. Regulación de la síntesis de triptófano pirrolasa. Cada una de las flechas sencillas indica una enzima de la síntesis del grupo hemo y de la apoproteína. Los otros símbolos indican: inhibición de la primera enzima por hemo y activación de la misma por alilisopropil acetamida y triptófano; activación por Fe de la conversión de protoporfirina en hemo; activación de la síntesis de la apoproteína por alilisopropil acetamida e inhibición de su catabolismo por triptófano.

sistente y por ello se le refiere como adaptación crónica.

La biosíntesis de la arginina es otro ejemplo de control de una vía multi-enzimática, semejante al anteriormente

descrito. En efecto, la acetilación del ácido glutámico, que es la primera reacción que lleva a la formación de arginina, está sujeta a inhibición por retroregulación por este aminoácido y

por otra parte, el arginil-RNA_t reprime la síntesis de todas las enzimas involucradas en *E. coli*.

Control recíproco de vías metabólicas que suman sus productos finales

La enzima triptófano pirrolasa es una hemoproteína. La primera enzima de la vía que se lleva a la síntesis del grupo hemo, la delta-amino levulínico sintetasa, utiliza glicina y succinil coenzima A para formar delta amino levulínico (fig. 2). Sucesivamente se producen porfobilinógeno, polipirril metano, uroporfirinógeno, coproporfirinógeno y protoporfirina, que se asocia con hierro para constituir el grupo hemo. La vía se regula por retroinhibición, pues la delta amino levulínico sintetasa es una enzima alostérica que se inhibe al asociarse con el producto final de la vía, o sea el grupo hemo. El hierro actúa como activador de la reacción de su asociación con la protoporfirina. Los aminoácidos forman

la apoproteína específica de la triptófano pirrolasa mediante el proceso de síntesis de proteínas. La apoproteína está sujeta a recambio, ya que se cataboliza y libera los aminoácidos que le componen. Existe un control recíproco de ambas vías pues la alil-isopropil acetamida produce un incremento en la síntesis de la delta-amino levulínico sintetasa y aumenta también la velocidad de síntesis de la apoproteína. Así mismo, el triptófano que es activador de la primera enzima de la vía biosintética del hemo, al asociarse con la triptófano pirrolasa, aumenta la concentración de ésta porque disminuye la constante de velocidad del proceso que le cataboliza.

Otro ejemplo de control recíproco lo encontramos en las vías de formación de nucleótidos trifosfatados de pirimidinas y de nucleótidos trifosfatados de purina (fig. 3). La carbamil fosfato-aspartato transcarbamilasa, la primera enzima de la síntesis de pirimidinas utiliza los sustratos que su nombre implica y les convierte en ácido

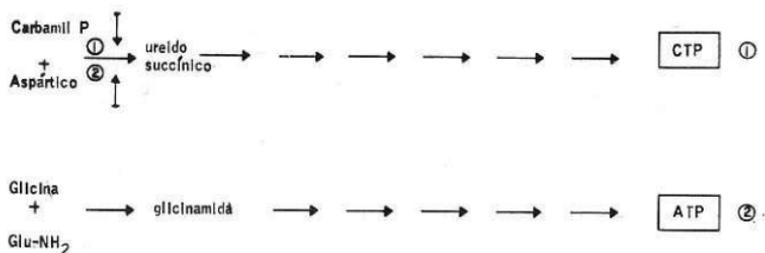


FIG. 3. Regulación de la biosíntesis de trifosfato de citidina (CTP) y trifosfato de adenosina. Cada una de las flechas sencillas indica una enzima de las vías. *Glu-NH₂* representa glutamina. Los otros símbolos expresan la inhibición de la aspartato transcarbamilasa por CTP y su activación por ATP.

uréido succínico. En seis pasos más se forma trifosfato de citidina (CTP). Por otra parte la vía de síntesis de purinas se inicia con glicina y glutamina para formar ATP en una vía en la que intervienen seis pasos enzimáticos. La carbamil fosfato-aspartato transcarbamilasa se inhibe por CTP y se activa por ATP. Cuando hay un exceso de este compuesto, se promueve la formación de nucleicos trifosfatados a fin de asegurar un balance de los otros precursores para la formación de ácidos nucleicos. En la misma forma, cuando existe un exceso de CTP por

retroinhibición se regula la primera enzima y se interrumpe el proceso que lleva a la formación del nucleótido.

Problema en la regulación de vías biosintéticas ramificadas

Los aminoácidos treonina, metionina, lisina e isoleucina, se forman a partir de ácido aspártico que se fosforila por intervención de la enzima aspartoquinasa en la primera reacción, común a todas las vías (fig. 4). Esta enzima se inhibe por treonina y lisina y se reprime cuando existe elevada

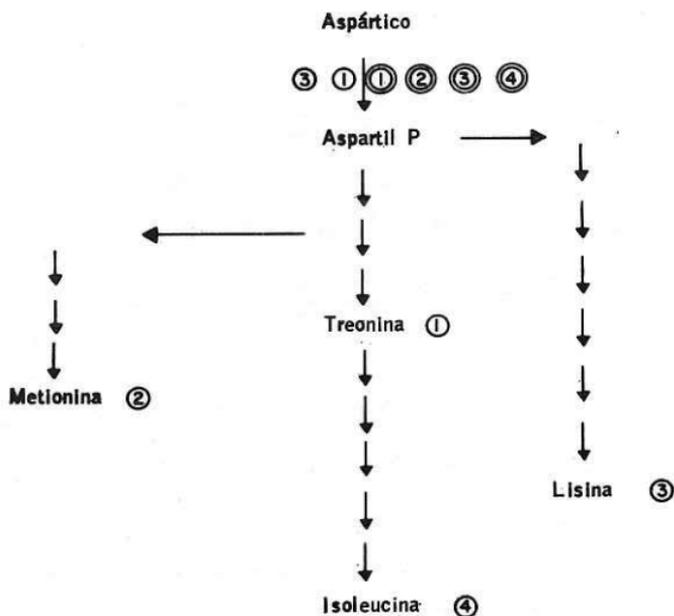


FIG. 4. Problemas en la regulación de la síntesis de aminoácidos que se forman a partir del aspártico. Cada una de las flechas sencillas indica una de las enzimas de la vía. Los otros símbolos expresan que la aspartoquinasa se inhibe (círculo sencillo) por treonina y lisina y se reprime (doble círculo) por estos dos aminoácidos y también por metionina y por isoleucina.

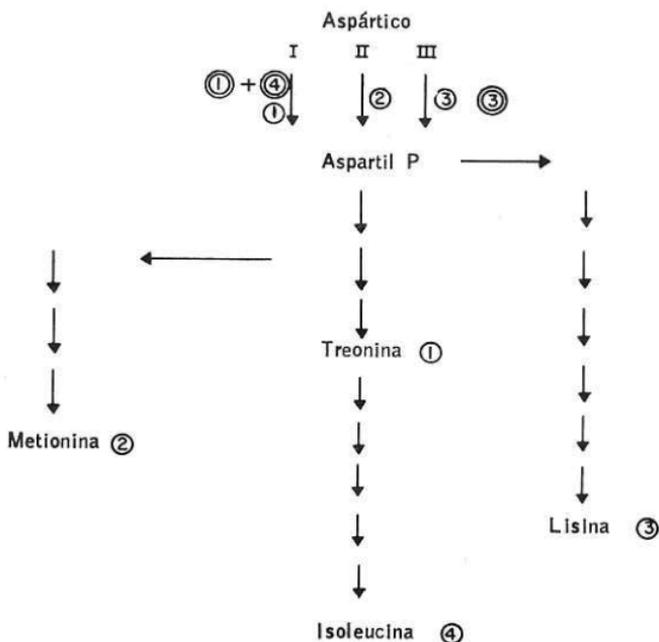


Fig. 5. Regulación de la síntesis de los aminoácidos que se forman a partir de aspártico en *E. coli*. Existen tres aspartoquinasa: la I se inhibe (círculo sencillo) por treonina y se reprime (doble círculo) por la acción combinada de este aminoácido y de isoleucina; la II se inhibe por metionina y la III se inhibe y se reprime por lisina.

concentración de cualquiera de los cuatro aminoácidos que se forman a partir del aspártico.

Esta situación impone un serio problema para la célula, ya que por ejemplo, si existiese un exceso de lisina, este aminoácido al ser inhibidor alostérico y represor de la primera enzima, interrumpiría el paso que inicia la formación de treonina, metionina e isoleucina, lo que significaría que la abundancia de un aminoácido acarrearía necesariamente carencia de otros. ¿Cómo hace la célula para resolver este tipo de problema?

En el caso de *E. coli* (fig. 5) se ha demostrado que hay tres isoformas de la aspartoquinasa (I, II y III); una de ellas es inhibida por treonina y reprimida por la acción combinada de este aminoácido y de isoleucina. Otra isoforma se retroinhibe por metionina (II) y la última aspartoquinasa se retroinhibe y se reprime por lisina (III). En esta forma si ocurre el exceso de lisina antes mencionado, únicamente cesa en su función una aspartoquinasa mientras que continúan operando las otras, produciendo así suficiente aspartil fosfato precursor de los otros tres aminoácidos.

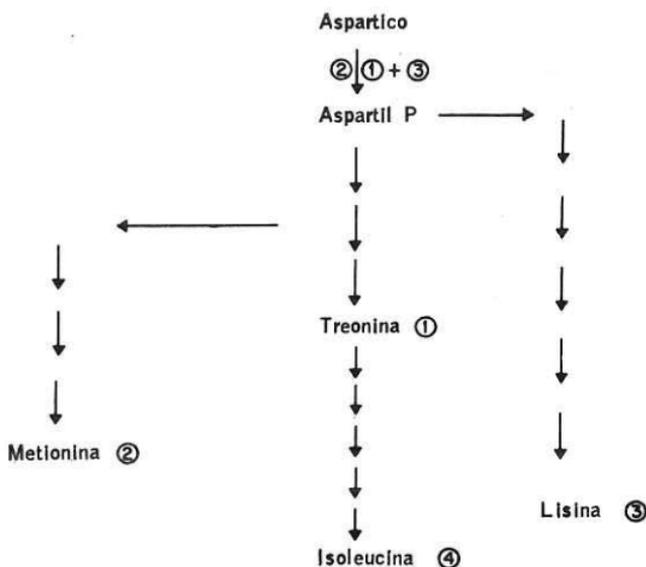


FIG. 6. Regulación de la síntesis de los aminoácidos que se forman a partir de aspártico en *R. capsulatum*. Solamente hay una aspartoquinasa que se inhibe por la acción combinada de treonina y lisina.

El problema se ha resuelto de manera distinta en *Rhodospseudomonas capsulatum* (fig. 6). En este microorganismo solamente existe una aspartoquinasa que se retroinhibe por metionina o por la acción combinada de treonina y lisina. El requerimiento absoluto de dos o más productos finales de una vía ramificada a fin de lograrse la retroregulación, se conoce con el nombre de inhibición por retroregulación concertada o inhibición por retroregulación multivalente. Este mecanismo de control parece ser menos delicado que el que usa las isozimas.

La glutamina cede su nitrógeno amídico para la formación de triptófano, AMP, GMP (glucosamina 6 fosfato)

histidina y carbamil fosfato. También participa en procesos de transaminación, cediendo su grupo alfa amino para la conversión de pirúvico en alanina y de ácido glioxílico en glicina. Los compuestos mencionados inhiben la enzima glutamina sintetasa. No obstante, cada uno de los inhibidores parece ejercer su efecto independientemente de la presencia o ausencia de los otros. En efecto, el triptófano inhibe la actividad enzimática en 84 por ciento, el AMP 59 por ciento, el GMP 86 por ciento y el carbamil fosfato 87 por ciento. Si se administran estos cuatro compuesto en concentraciones saturantes, la inhibición total es de 63 por ciento, que resulta de la acción su-

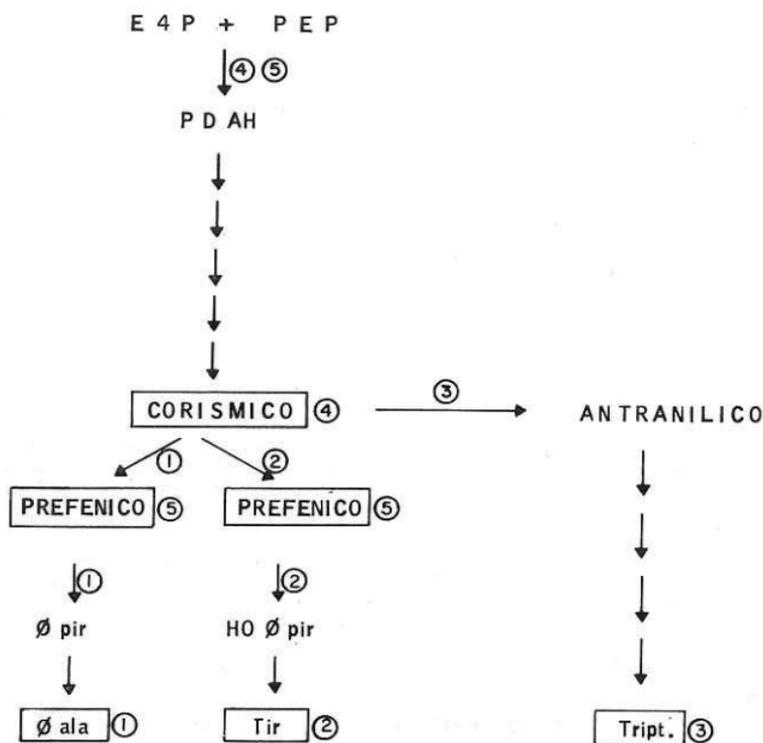


FIG. 8. Regulación de la síntesis de aminoácidos aromáticos en *B. subtilis*. Las abreviaturas son las mismas que en la figura 7. Cada flecha sencilla corresponde a una enzima. Los números expresan los sitios en que los metabolitos ejercen acción reguladora. Solamente existe una aldolasa que se regula por inhibición concertada de los ácidos corísmico y prefénico. La fenilalanina inhibe la corísmico mutasa y la prefénico deshidratasa, la tironina inhibe la isozima de la corísmico mutasa y la prefénico deshidrogenasa. El triptófano inhibe la antranilato sintetasa.

a la formación de fenilalanina, tirosina y triptófano, eritrosa 4 fosfato y fosfoenolpirúvico se condensan en forma aldólica para producir un compuesto de siete átomos de carbono, el 7 fosfo deoxi arábino heptusolónico (PDAH) siendo la PDAH aldolasa la enzima responsable de catalizar la reacción. En *E. coli* (fig. 7) existen tres isozimas de la PDAH aldolasa; la primera es

reprimida por fenilalanina, la segunda es reprimida por tirosina y la tercera se retroinhibe por triptófano. En *B. subtilis* (fig. 8) existe solamente una aldolasa que se regula por inhibición concertada de los ácidos corísmico y prefénico, que no son los productos finales de la vía sino intermediarios. Estos compuestos a su vez, llevan a la formación de fenilalanina mediante la

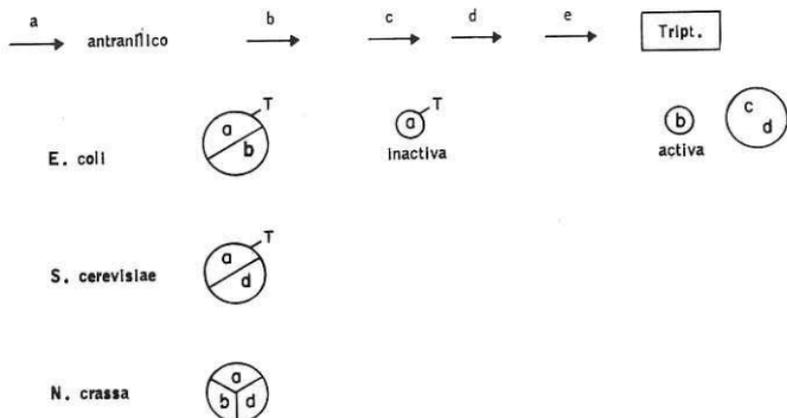


FIG. 9. Agregados multienzimáticos en la biosíntesis del triptófano. Cada flecha sencilla indica una de las enzimas de la vía. En *E. coli* la antranilato sintetasa (*a*) se encuentra asociada a la antranilato fosforibosil transferasa (*b*) y se inhibe por el triptófano (*T*); cuando las proteínas se disocian esta enzima, pierde su actividad catalítica más conserva su capacidad de unirse al triptófano mientras que la segunda conserva su actividad catalítica. Las enzimas fosforibosil antranilato isomerasa (*c*) y la indol glicerolfosfato sintetasa parecen ser una proteína única. En *S. cerevisiae*, la antranilato sintetasa está asociada a la indol glicerolfosfato sintetasa.

En *N. crassa*, el complejo multienzimático se establece por la antranilato sintetasa, la antranilato fosforibosil transferasa y la indol glicerolfosfato sintetasa.

acción sucesiva de la mutasa del ácido corísmico primero y después de la prefénico deshidratasa; se forma así fenilpirúvico que por transaminación da fenilalanina. Para la síntesis de tirosina se forma prefénico a partir del corísmico por la acción de la mutasa, que sin embargo, es una proteína distinta de aquella que participa en la formación de fenilalanina; el prefénico se transforma por medio de una deshidrogenasa en *p*-hidroxifenil pirúvico, que por transaminación da tirosina. El triptófano retroinhibe la enzima antranilato sintetasa que forma ácido antranílico a partir de ácido corísmico. La fenilalanina retroinhibe la deshidratasa y la corísmico mutasa correspondiente, mientras que la tirosina retroinhibe la

deshidrogenasa y la corísmico mutasa de su vía.

De esta manera, un aumento en la concentración de fenilalanina, tirosina o triptófano ocasiona que se incremente la concentración de los intermediarios prefénico y corísmico; éstos a su vez frenan la acción de la PDAH aldolasa. A esta forma de control se le ha designado como inhibición secuencial.

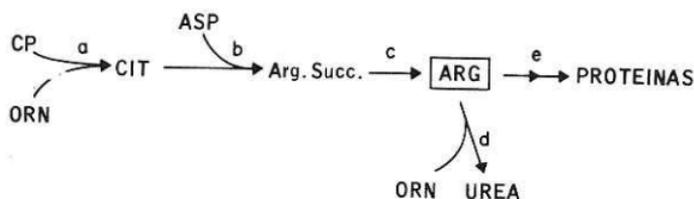
La formación de agregados multienzimáticos

La vía de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos proporciona otra dimensión en los mecanismos regulatorios. En *E. coli* la corísmico mutasa y la prefénico deshidratasa, enzimas que

participan en la biosíntesis de fenilalanina, forman un solo complejo proteico y, en la misma forma, la isozima de la corísmico mutasa que lleva a tirosina forma un solo complejo proteico con la prefénico deshidrogenasa. El prefénico deja de ser así intermediario común para la síntesis de fenilalanina y de la tirosina ya que en una misma población de moléculas no está en disponibilidad para la síntesis de uno y otro aminoácido. El prefénico que proviene de la corísmico mutasa relacionada a la deshidratasa necesariamente, encuentra su camino hacia fenilalanina y el prefénico que se forma por la acción de la corísmico mutasa asociada a la prefénico deshidrogenasa sigue a la formación de tirosina (fig. 7).

La formación de triptófano a partir del ácido corísmico es también de interés, puesto que ilustra sobre la formación de otros complejos multienzí-

máticos (fig. 9). En *E. coli* la enzima antranílico sintetasa (a) cuya actividad se inhibe por triptófano se encuentra asociada a la enzima antranilato fosforibosil transferasa (b) que cataliza la reacción entre el ácido antranílico y 5-fosforibosil pirofosfato, para dar el ribósido correspondiente al ácido antranílico; lo interesante es que cuando las proteínas se encuentran separadas, la antranilato sintetasa no muestra actividad catalítica, mas conserva su capacidad para unirse al triptófano. En cambio la transferasa aislada sí conserva su actividad catalítica. Las enzimas fosforibosil antranilato isomerasa (c) que forma el desoxiribósido a partir del ribósido y la indol glicerol fosfato sintetasa (d) parecen ser una proteína única capaz de catalizar dos reacciones químicas diferentes. En la levadura *Sacharomyces cerevisiae* la antranilato sintetasa (a) está asociada a la indol



no tiene actividad de a

tiene actividad de d.

FIG. 10. Regulación de la síntesis de arginina en *S. cerevisiae*. Cada flecha indica una enzima de la vía. La arginasa (d), se asocia reversiblemente con la ornitina transcarbamilasa (a) en presencia de ornitina y arginina.

glicerolfosfato sintetasa (d). En *N. crassa*, el complejo multienzimático se establece por la antranilato sintetasa (a), la antranilato fosforibosil transferasa (b), y la indol glicerol fosfato sintetasa (d), es decir no forma parte del complejo la antranilato fosforibosil isomerasa (c). Es difícil de explicar en ambos casos por qué no se asocian en los complejos de proteínas enzimas que intervienen en la catálisis de reacciones sucesivas.

La formación de agregados ilustra sobre otro mecanismo regulatorio de una vía multienzimática (fig. 10). La vía de biosíntesis de la arginina en levadura toma a la ornitina proveniente de glutámico hasta la formación de arginina. El exceso de este metabolito induce la enzima arginasa (d) que le transforma en ornitina y urea. Messenguy y Wiame²⁵ han demostrado que la arginasa misma actúa como agente regulador, ya que se interacciona con la enzima ornitina transcarbamilasa (a) y le inhibe su actividad. Para formarse el agregado de estas dos enzimas, se requiere de la presencia de arginina y de ornitina. Cabe mencionar que la arginasa conserva su actividad cuando está asociada a la ornitina transcarbamilasa.

Los complejos multienzimáticos así organizados han sido definidos por Ginsburg y Stadtman²⁶ como agregados de enzimas diferentes, relacionadas funcionalmente, unidas por fuerzas no covalentes en estructuras altamente organizadas. Tanto en microorganismos como en organismos superiores se ha demostrado la presencia de otros agre-

gados que constituyen vías multienzimáticas; por ejemplo los agregados responsables de la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico y del ácido alfaetoglutámico, la vía responsable de la síntesis extramitocondrial de ácidos grasos y la vía biosintética poliaromática ya referida.

Desde el punto de vista de la regulación, la organización de un sistema multienzimático en forma de un agregado multiproteico tiene ventajas definidas que han sido señaladas por Mora.²⁷

a) El eficiente flujo y control del encauzamiento de los metabolitos intermedios de la vía.

b) La adecuada regulación de ésta y en especial la retroinhibición de la primera enzima de la vía por el producto final.

c) La distribución del agregado en diferentes sitios u organelos celulares para el suministro local del metabolismo.

d) La selección de mutaciones en los genes responsables de la síntesis de los polipéptidos del agregado o en otros genes que resulten en un funcionamiento más eficiente del agregado como unidad.

Además, desde el punto de vista de la regulación de las funciones celulares, la existencia de agregados multienzimáticos ofrece otras posibilidades de control, puesto que un metabolito específico al intraaccionarse con una proteína puede inducir cambios conformacionales que afectan todo el sistema. Se da el caso que el sustrato de una enzima, al interactuarse con su sitio

activo, actúa como agente alostérico de otras enzimas con las que se integra el agregado. Más aún, los cambios conformacionales que se producen en las enzimas cuando se forman agregados pueden ocasionar diferentes velocidades de la reacción que catalizan. En muchos casos la actividad de una enzima cuando está asociada a otras es mucho mayor que la que se observa en la enzima aislada. Así, la antranilato sintetasa se activa al asociarse con la fosforibosil antranilato isomerasa y con la indol difosfato sintetasa.²⁸ La enzima aislada cataliza la reacción de descarboxilación del piruvato a una velocidad cien veces menor que la del complejo.²⁹

Consideraciones sobre la regulación metabólica en organismos superiores

En organismos superiores se producen modificaciones en las actividades de ciertas enzimas a consecuencia de la administración de hormonas, de distintas drogas o por medios dietéticos. Con frecuencia se refieren a tales cambios con los nombres de inducción y represión, sin que haya justificación para esto, ya que no se tiene el pleno conocimiento de que las alteraciones observadas obedezcan a mecanismos bien dilucidados en la fisiología bacteriana.²⁰ Hay algunos casos en que los cambios son muy parecidos a los que se observan en las formas biológicas simples. Por ejemplo, la disminución de las actividades de la glicina transaminasa después de la alimentación

de creatina³⁰ y el impedimento en la conversión de β hidroxil, β metil glutárico a mevalónico por la alimentación de colesterol o ubiquinona, representan dos ejemplos del control de una vía metabólica por su producto final en los organismos superiores. Así mismo se ha visto que una sola mutación en el ratón involucra las actividades de tres enzimas que intervienen en el catabolismo de las pirimidinas, lo que sugiere que esta situación podría corresponder a la existencia de un operón en organismos superiores.³¹

Se ha insistido con anterioridad que en los organismos multicelulares se hizo necesaria la existencia de supramecanismos de control representados por el sistema endocrino y por el sistema nervioso. Se han dado ejemplos de cambios en actividades enzimáticas que se producen después de la administración de hormonas. Si bien el sistema nervioso podría tener una participación directa en la regulación de las actividades enzimáticas de las células, según se desprende el trabajo de Shimazu y Amakawa,³² quienes encontraron que la estimulación del sistema simpático causa un aumento en las actividades de la fosforilasa y la glucosa 6 fosfatasa del hígado, mientras que la excitación del sistema parasimpático ocasiona un aumento en la actividad de la glucógeno sintetasa, es a través de su conexión con el sistema endocrino que tiene ingerencia en el control de las funciones celulares. Las interacciones entre los sistemas nervioso y endocrino están también sujetas a regulación; por ejemplo, cabe recordar

lo que acontece en el sistema hipófisis-suprarrenal, que comprende células nerviosas y hormonas coordinadas en un sistema de regulación por retroalimentación. En efecto, un estímulo "estresante" que alcance las células neurosecretoras del hipotálamo en la base del cerebro, les estimula para suministrar el factor de liberación de la hormona adrenocorticotrófica, el cual se desplaza al lóbulo anterior de la hipófisis al través de vasos sanguíneos cortos. Las células hipofisarias reaccionan mediante la producción de la hormona adrenocorticotrófica, que pasa a la circulación. Esta hormona estimula las células de la corteza suprarrenal, que secretan hormonas glucocorticoides hacia la circulación. Cuando los glucocorticoides llegan a las células neurosecretoras del hipotálamo o a otras células cerebrales, modulan la producción del factor de liberación de la hormona adrenocorticotrófica.³³

Los microorganismos toman los nutrientes que requieren de un medio ambiente al que están constantemente expuestos, mientras que los organismos superiores han desarrollado el hábito de la alimentación intermitente, por lo que tienen que contender con verdaderas "cargas" metabólicas a las que se les somete periódicamente. Después de la digestión y de la absorción de los alimentos ingeridos, los nutrientes pasan a ser metabolitos que fluyen a través del organismo, provocando cambios en la maquinaria metabólica, tendientes a aminorar los efectos de su aumento transitorio en células y de líquidos biológicos. Por mecanismos ho-

meostáticos que entran en juego se restituyen las concentraciones que prevalecen en el estado de equilibrio de flujos característicos del periodo post-absortivo. Estos ajustes se hacen, según hemos visto, por cambios en actividades enzimáticas, ya que al fin y al cabo son las enzimas las responsables de transformar los excesos de los metabolitos ingeridos. Existen diferencias bien claras en la manera como se lleva a cabo el metabolismo intermediario en animales alimentados *ad libitum* y en los que ingieren alimentos en forma intermitente. En estos últimos se observa: hiperfagia o sea la capacidad de consumir grandes cantidades de alimentos durante un intervalo relativamente corto; hipertrofia del aparato digestivo que explica la mayor capacidad digestiva y de absorción intestinal; un cociente respiratorio más elevado después de la ingestión de carbohidratos y un aumento en la capacidad *in vitro* del hígado y del músculo para sintetizar ácidos grasos. La hiperlipogénesis se acompaña de un aumento en la actividad de las enzimas involucradas en la conversión de glucosa a ácidos grasos. También hay un aumento en la cantidad de lipocitos en el tejido adiposo, cuyo contenido en DNA es mayor e incorporan una mayor cantidad de timidina marcada en esta macromolécula. Hay una sensibilidad aumentada del tejido adiposo al efecto de insulina y adrenalina y existe una mayor actividad de la adenil ciclasa de las membranas de los lipocitos; la capacidad para almacenar glucógeno en el músculo del tejido adiposo es mayor,

concomitante con un incremento en las enzimas que intervienen en la síntesis del polisacárido.

La alimentación bien controlada de ratas en tiempos definidos ha mostrado que en el hígado se producen cambios marcados en diferentes actividades enzimáticas. Algunos de ellos guardan relación directa con la ingestión de alimentos, mientras que otros parecen no tener relación con este factor.

Se ha suscitado una controversia sobre la verdadera naturaleza de muchas de las variaciones cíclicas que se ven en las enzimas. Por ejemplo en relación a las variaciones diarias de tiro-sina transaminasa que han sido muy estudiadas Potter³⁴ ha expresado: "El cambio en la actividad de la tiro-sina transaminasa puede ser visto solamente como una respuesta a una sucesión coordinada de cambios cíclicos de los niveles de los aminoácidos, de la cortisona, del glucagon y de la insulina circulantes y posiblemente también adrenalina y noradrenalina, asociados con respuestas conductuales a los ciclos de oscuridad y luz. Parece probable que los ciclos circadianos en la vida real sean el resultado de una amalgama de factores internos y externos."

Hay distintos factores que influyen la naturaleza y la magnitud de la respuesta adaptativa a diferentes estímulos. Así encontramos que en las interacciones endocrino-nutricionales, la especie, la cepa y la edad del animal experimental juegan un papel definitivo en la manera de responder a los estímulos. Más aún una misma enzima localizada en órganos diferentes del

animal responde de manera distinta a estímulos semejantes.⁴

La significación fisiológica de los cambios en las actividades enzimáticas

Ha quedado claro que los sistemas biológicos tienen cierto grado de adaptabilidad a las condiciones cambiantes del ambiente, fundamentalmente por la forma en que se regulan sus funciones celulares. Cabe preguntar si los cambios provocados por estímulos del exterior son siempre de naturaleza adaptativa, en el sentido que tienden a mantener la constancia del medio interno. La relación es bien aparente en muchos casos; por ejemplo la alimentación de un animal con una dieta hiperproteica ocasiona un catabolismo aumentado de las proteínas y de los aminoácidos, lo cual se acompaña del aumento de varias actividades enzimáticas que participan en tales procesos, en la gluconeogénesis y en la conversión de amoníaco en urea. No es muy aparente, por lo demás, la intención de la lipogénesis hepática aumentada que se observa cuando se realimenta un animal previamente sometido a inanición, ya que el proceso lleva hasta una verdadera esteatosis, lo cual constituye una condición anormal. Podemos también pensar que un cambio determinado en una enzima puede ser el responsable o la consecuencia de una alteración metabólica. Por ejemplo, el incremento en las actividades de las transaminasas glutámico oxalacética y glutámico pirúvica que aparece por la alimentación

hiperproteica, la inanición, la diabetes y la administración de cortisona o ACTH, condiciones todas que implican una gluconeogénesis aumentada. En cada una de estas situaciones se ha postulado que las actividades elevadas pueden ser la respuesta a otros cambios primarios en el estado fisiológico de los tejidos o bien la causa de algunos de los cambios fisiológicos secundarios. Al respecto, transcribimos la posición adoptada por Knox y Greengard²⁵ respecto al problema planteado: "La interrelación funcional entre la causa y el efecto puede presentar un serio problema. El incremento en ciertas enzimas, ¿causa el incremento en el catabolismo proteico o el catabolismo aumentado causa la elevación de las enzimas? Los biólogos generalmente se abstienen de hacerse tales preguntas, porque la respuesta puede involucrarles en el problema de la intención: que el resultado final puede causar el efecto. Con nuestro conocimiento actual sobre los mecanismos regulatorios de retroalimentación, este problema ya no corresponde a la metafísica sino a la transferencia de información. Antes de que debamos discutir los mecanismos del control debemos identificar el sistema que se controla."

Hay ciertas situaciones en las que los cambios no pueden ser interpretados de naturaleza adaptativa, sino que más bien son una secuencia circunstancial de la alteración metabólica; por ejemplo, la disminución en la isozima ósea de la fosfatasa alcalina sérica, que se observa en la desnutrición calórico-proteica crónica infantil y que está re-

lacionada a la detención del crecimiento, puesta de manifiesto por estudios radiológicos.

Debe esperarse que los cambios en las actividades enzimáticas que obedecen a adaptaciones metabólicas tengan un carácter reversible, es decir, una vez que cesa el estímulo que ocasiona el cambio, debe restaurarse la situación inicial. Mecánicamente, lo anterior podría expresarse en el sentido de que la actividad de una enzima correspondiente a un determinado equilibrio de flujos puede ser ajustada a las condiciones metabólicas que prevalecen, alterando su velocidad de síntesis o su velocidad de degradación o bajo la influencia de la concentración de efectores metabólicos. Hay cambios que no tienen este carácter de reversibilidad, ya que significan la expresión de un daño causado por una nutrición defectuosa, como sucede por ejemplo en la disminución de las actividades enzimáticas de los eritrocitos que se observa en casos de desnutrición crónica.

El aumento o disminución del rendimiento de una vía metabólica puede ser satisfactoriamente explicado por el cambio en la actividad de una o varias de las enzimas involucradas, particularmente cuando éstas determinan el sentido del desplazamiento de los metabolitos en el flujo, el cual se determina por las actividades y de los equilibrios de las enzimas que constituyen la vía multienzimática. El control de los flujos de glicólisis y gluconeogénesis ilustra lo anterior (fig. 11). Las enzimas a cuya actividad se atribuye la determinación del flujo de metabolitos

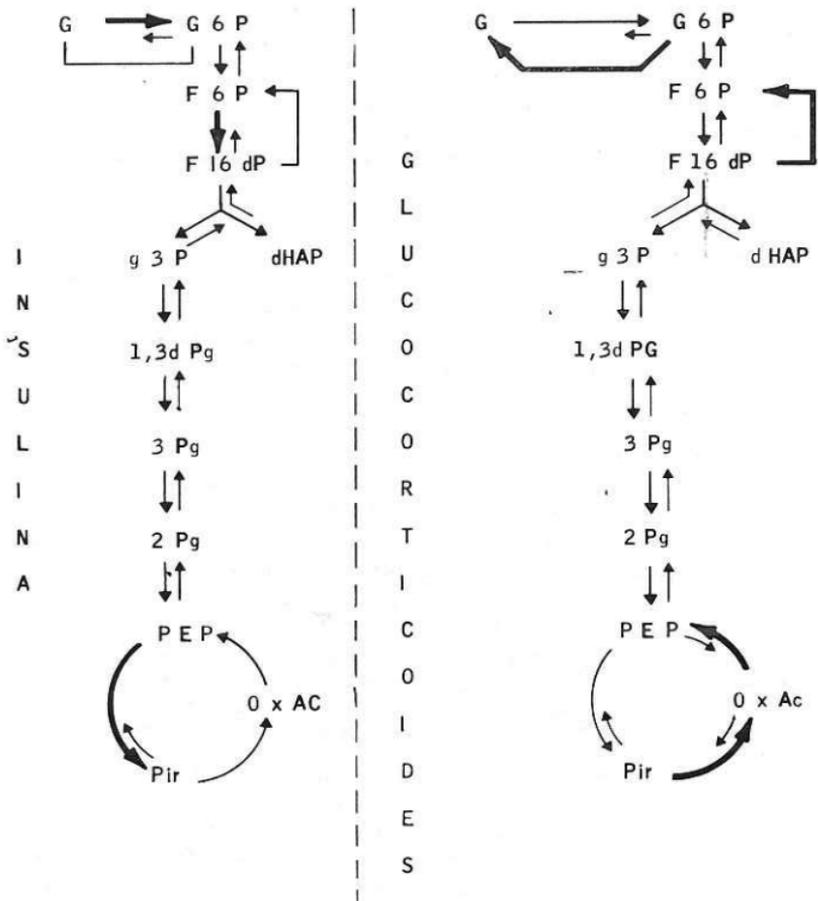


FIG. 11. Regulación de glucólisis y gluconeogénesis. Cada flecha indica una enzima. Las letras y los números se refieren a los metabolitos involucrados.

Cuando se administra insulina se incrementan las actividades de las enzimas glucoquinasa, fosfofructoquinasa y quinasa pirúvica (indicadas en la parte izquierda de la figura) con líneas gruesas de arriba a abajo, en el orden señalado. Cuando se administran glucocorticoides aumentan las actividades de la pirúvico carboxilasa, la fosfoenol pirúvico carboxilasa, la fructosa 1.6 difosfatasa y la glucosa 6 fosfatasa (indicadas en la parte derecha de la figura) con líneas gruesas, de abajo hacia arriba en el orden señalado.

de glucosa a pirúvico son la glucoquinasa, la fosfofructoquinasa y la quinasa pirúvica. Disminuyen por el ayuno y aumentan cuando se realimenta el animal después de un periodo de inanición y después de la administración de insulina. Las enzimas responsables de orientar el flujo de metabolitos de piruvato a glucosa, o sean la carboxilasa pirúvica, la carboxilasa fosfoenolpirúvica, la fructosa 1.6. difosfatasa y la glucosa 6 fosfatasa, aumentan durante el ayuno y cuando se inyectan glucocorticoides. Tales cambios están acordes con el predominio de la gluconeogénesis o de la glucólisis en las condiciones señaladas. Los cambios indicados llevaron a Weber³⁶ a sugerir la existencia de "unidades funcionales génicas" para cada grupo de las enzimas que se han mencionado. No obstante, la administración de fructosa y de glicerol, que equivale a una carga de triosas, causa un incremento en la quinasa pirúvica, en la glucosa 6 fosfatasa y la fructosa 1.6. difosfatasa y una disminución en la glucoquinasa y en la fosfofructoquinasa, lo cual indica que los mecanismos de regulación en los organismos superiores se diversifican en relación a los estímulos; esto ofrece mayor grado de libertad y versatilidad en los ajustes metabólicos.

En otras situaciones, todas las actividades de una vía se incrementan; por ejemplo, las cinco enzimas que participan en la biosíntesis de la urea aumentan en condiciones en las que hay incremento en el catabolismo de las proteínas y los aminoácidos. La arginasa tiene una elevada actividad aún

en condiciones normales, probablemente muy por encima de lo que se requiere para funcionar eficientemente en la vía metabólica, como se demuestra por el hecho de que hemos sido capaces de disminuir la actividad de la arginasa hepática a 2 por ciento de la actividad original y aún en estas condiciones la arginina se transforma eficientemente en urea. Probablemente los mecanismos regulatorios involucran todas las enzimas en estos casos, sin que necesariamente fuese indispensable el cambio de todas ellas para corregir las alteraciones metabólicas cambiantes.

Hay situaciones en las que el cambio de una enzima se traduce en una alteración del rendimiento integral de una vía metabólica determinada, como sucede en la mayor velocidad de conversión de uracilo a CO_2 radioactivo que se observa en una mutante de ratones caracterizada por una elevación de tres enzimas que participan en el catabolismo de las pirimidinas. Esta relación no es muy clara en otros casos. La administración de L-metil-triptófano aumenta la actividad de la triptófano pirrolasa y produce una mayor conversión de triptófano ^{14}C a CO_2 radioactivo; sin embargo, la administración de cortisona, que también eleva la misma actividad enzimática, no produce el mismo aumento. Así mismo, hay condiciones en las que las actividades enzimáticas están disminuidas, sin que necesariamente se produzca disminución del flujo de los metabolitos; por ejemplo la capacidad de depuración del amoníaco está conservada

en condiciones en las que se encuentran muy disminuidas las enzimas que participan en la biosíntesis de la urea,³⁷ y es posible disminuir la actividad de la glucosa 6 fosfatasa hasta 20 por ciento de la actividad normal, sin que haya ninguna alteración en el mantenimiento de la glucemia.

Mucho se ha aprendido recientemente sobre la regulación de las funciones celulares. Los conceptos que han surgido de experimentos realizados en sistemas simples, como las bacterias y los virus, son seguramente relevantes para entender los mecanismos de control en los animales superiores. No obstante, no puede hacerse una extrapolación directa, ya que la diferenciación celular ha traído una complejidad creciente que requiere de mecanismos adicionales. Es de la mayor trascendencia que el médico se compenetre de estos conceptos a medida que van surgiendo, pues así estará capacitado a incorporarse en el avance constante de la disciplina que ejerce.

REFERENCIAS

- Izquierdo, J. J.: *Bernard, Creador de la Medicina Científica*. México, Imprenta Universitaria, 1942, p. 39.
- Cannon, W. B.: *The Wisdom of the Body*. New York, W. Norton & Co. Inc. Publ., 1939.
- Pérez Tamayo, R. y Montfort, I.: *Homeostasis of connective tissue*. En: *Injury, Inflammation and Immunity*. Thomas, Z., Uhr, J. W. y Grandt, K. (Eds.) Baltimore, Williams and Wilkins Co.
- Soberón, G.: *¿Qué hay detrás de lo aparente?* GAC. MÉD. MÉX., 98:809, 1968.
- Jacob, F. y Monod, J.: *Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins*. J. Molec. Biol. 3:318, 1961.
- Maas, W. K. y Clark, A. J.: *Studies on the mechanism of repression of arginine biosynthesis in Escherichia coli. II-Dominance of repressibility in diploids*. J. Molec. Biol. 8:365, 1964.
- Ptashne, M.: *Isolation of the phage repressor*. Proc. nat. Acad. Sci. 57:306, 1967.
- Gilbert, N. y Muller-Hill, B.: *The LAC operator is DNA*. Proc. nat. Acad. Sci. 58:2415, 1967.
- Riggs, A. D. y Bourgeois, S.: *On the assay, isolation and characterization of the LAC repressor*. J. molec. Biol. 34:361, 1968.
- Muller-Hill, B. y Crapo, L.: *Mutants that make more LAC repression*. Proc. nat. Acad. Sci. 59:1259, 1968.
- Zubay, G., Lederman, M. y DeVries, J. K.: *DNA-directed peptide synthesis. III-Repression of β -galactosidase synthesis and inhibition of repression by inducer in a cell-free system*. Proc. nat. Acad. Sci. 58:1669, 1967.
- Echols, H., Pilarski, L. y Cheng, P.: *In vitro repression of phage λ DNA transcription by a partially purified repressor from lysogenic cells*. Proc. nat. Acad. Sci. 59:1016, 1968.
- Jacob, F. y Monod, J.: *Genetic mapping of the elements of the lactose region in Escherichia coli*. Biochem. biophys. Res. Commun. 18:693, 1965.
- Epstein, W. y Beckwith, J. R.: *Regulation of gene expression*. Ann. Rev. Biochem. 37:411, 1968.
- Sheppard, D. E. y Englesber, E. G.: *Further evidence for positive control of the L-arabinose system by gene ARA-C*. J. Molec. Biol. 25:443, 1967.
- Martin, D. W. Jr. y Tomkins, G. M.: *The appearance and disappearance of the post-transcriptional repressor of tyrosine aminotransferase synthesis during the HTC cell cycle*. Proc. nat. Acad. Sci. 65:1064, 1970.
- Tomkins, G. M., Gelehrter, T. D., Granner, D., Martin, D. Jr., Samuels, H. y Thompson, E. B.: *Control of specific gene expression in higher organisms*. Science. 166:1474, 1969.
- Ames, B. N. y Martin, R. G.: *Biochemical aspects of genetics: the operon*. Ann. Rev. Biochem. 33:235, 1964.
- Schoenheimer, R.: *The Dynamic State of Body Constituents*. Cambridge, Harvard University Press, 1942.
- Schimke, R. T. y Doyle, D.: *Control of enzyme levels in animal tissues*. Ann. Rev. Biochem. 39:929, 1970.
- Knox, W. E.: *The regulation of tryptophan pyrrolase activity by tryptophan*. Adv. Enzyme Regul. 4:287, 1966.

22. Martin, D. W. Jr. y Tomkins, G. M.: *The appearance and disappearance of the post-transcriptional repressor of tyrosine aminotransferase synthesis during the HTC cell cycle.* Proc. nat. Acad. Sci. 65:1064, 1970.
23. McCarthy, B. J. y Hoyer, B. H.: *Identity of DNA and diversity of messenger RNA molecules in normal mouse tissues.* Proc. nat. Acad. Sci. 52:915, 1964.
24. Georgiev, G. P.: *On the structure organization of operon and the regulation of RNA synthesis in animal cells.* J. theor. Biol. 25:473, 1969.
25. Messenguy, F. y Wiame, J. M.: *The control of ornithine transcarbamylase activity by arginase in Saccharomyces cerevisiae.* FEBS Ltrs. 3:47, 1969.
26. Ginsburg, A. y Stadtman, E. R.: *Multienzyme systems.* Ann. Rev. Biochem. 39: 429, 1970.
27. Mora, J.: En: *Ensayos bioquímicos.* Soberón, G. (Ed.) México. La Prensa Médica Mexicana, 1969, p. 231.
28. Arroyo-Begovich, A. y De Moss, J. A.: *In vitro formation of an active multienzyme complex in the tryptophan pathway of Neurospora crassa.* New York, W. Norton & Co. Inc. Publ. 1939.
29. Reed, G. B. Jr. y Cox, A. J. Jr.: *The human liver after radiation injury. A form of venoocclusive disease.* Amer. J. Path. 48:597, 1966.
30. Walker, J. B.: *End-product repression in the creatine pathway of the creatine pathway of the developing chick embryo.* Adv. Enzyme Regul. 1:151, 1963.
31. Dagg, C. P., Coleman, D. I. y Fraser, G. M.: *A gene affecting the rate of pyrimidine degradation in mice.* Genetics. 49: 979, 1964.
32. Shimazu, T. y Amakawa, A.: *Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. III. Differential effects of sympathetic nerve stimulation and of catecholamines on liver phosphorylase.* Biochim. Biophys. Acta 65:349, 1968.
33. Levine, S.: *Stress and behavior.* Scient. Amer. 224:26, 1971.
34. Potter, V. R., Watanabe, M., Becker, J. E. y Pitot, H. C.: *Hormonal effects on enzyme activities in tissue culture and in whole animals.* Adv. Enzyme Regul. 5:303, 1967.
35. Knox, W. E. y Greengard, O.: *The regulation of some enzymes of nitrogen metabolism; an introduction to enzyme physiology.* Adv. Enzyme Regul. 3:247, 1965.
36. Weber, G.: *Regulation of pyruvate kinase.* Adv. Enzyme Regul. 7:15, 1969.
37. Flores, G., Rosado, A., Torres, J. y Soberón, G.: *Liver enzyme activities in ammonia fixation by the rat.* Amer. J. Physiol. 203:43, 1962.