

Ciclo del Ácido Cítrico

Miguel Ángel Ordorica Vargas & María de la Luz Velázquez Monroy

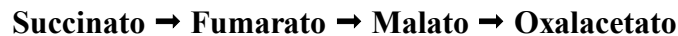
Introducción

El **Ciclo del Ácido Cítrico** es la vía central de metabolismo aeróbico; en esta vía se oxidan los compuestos de carbono que proviene de la degradación de todos los principios inmediatos y también se forman moléculas precursoras para la síntesis de muchos de ellos. Su nombre proviene del primer intermediario formado, el Citrato. También se conoce como **Ciclo de los Ácidos Tri-carboxílicos** porque dos intermediarios de la vía son ácidos de este tipo.

Desarrollo

En 1920 Thumberg, Batelli y Stern descubrieron que ácidos orgánicos como Succinato, Fumarato, Malato y Citrato, son rápidamente oxidados, estimulando en forma catalítica el consumo de Oxígeno y la producción de Dióxido de Carbono. Posteriormente, descubrieron otros ácidos tri-carboxílicos como el Isocitrato y el *cis*-Aconitato, que tienen el mismo efecto

En 1935 Albert Szent-Görgyi propone una secuencia para la oxidación enzimática del succinato:



Además, descubre que la adición de Oxalacetato produce un consumo de Oxígeno mucho mayor que el teóricamente necesario.

Ese mismo año, Martius y Knoop determinan la secuencia enzimática de oxidación de Citrato:



En 1937 *Hans Adolph Krebs* descubre que en condiciones anaeróbicas, la adición de Oxalacetato al medio provoca la acumulación de Citrato. También encuentra que la inhibición específica de la enzima Succinato Deshidrogenasa (EC 1.3.99.1) con Malonato, anula el efecto catalítico de todos los ácidos, con acumulación de Succinato en forma proporcional a la cantidad añadida de ácido. También probó que en estas condiciones, la adición de Oxalacetato restablece el consumo de Piruvato, pero en proporción 1 a 1 y no en forma catalítica, como descubrió Szent-Görgyi.

Con base en sus resultados, Krebs propuso el esquema general del ciclo (Figura 2) y demostró la existencia de todas las enzimas involucradas. Por la importancia de su contribución, el Ciclo del Ácido Cítrico también se conoce como **Ciclo de Krebs**.

En 1945, Albert L. Lehninger y Eugene P. Kennedy, determinaron que el Ciclo de Krebs se lleva a cabo en la Matriz Mitocondrial.



Figura 1. Hans A. Krebs

Reacciones del Ciclo del Ácido Cítrico

En la Figura 2, se presenta el esquema completo del ciclo en su forma actual, que es esencialmente igual a la propuesta por Krebs, y a continuación se discuten las reacciones individuales.

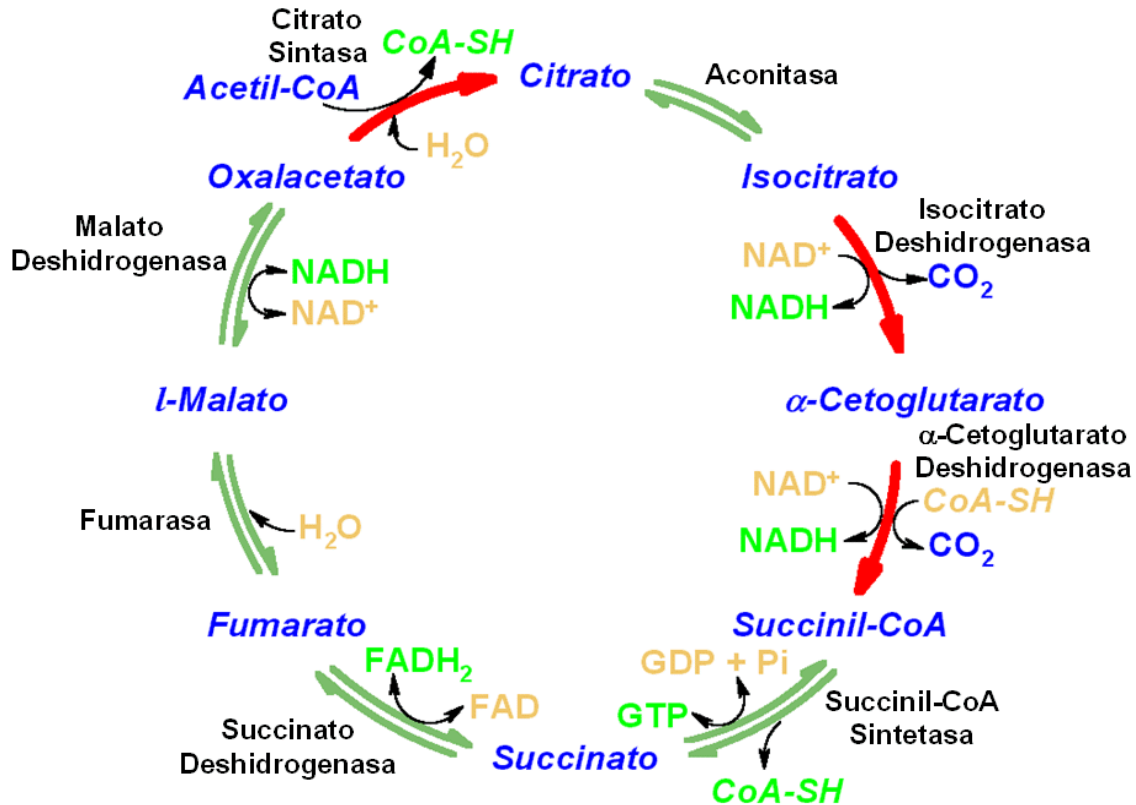


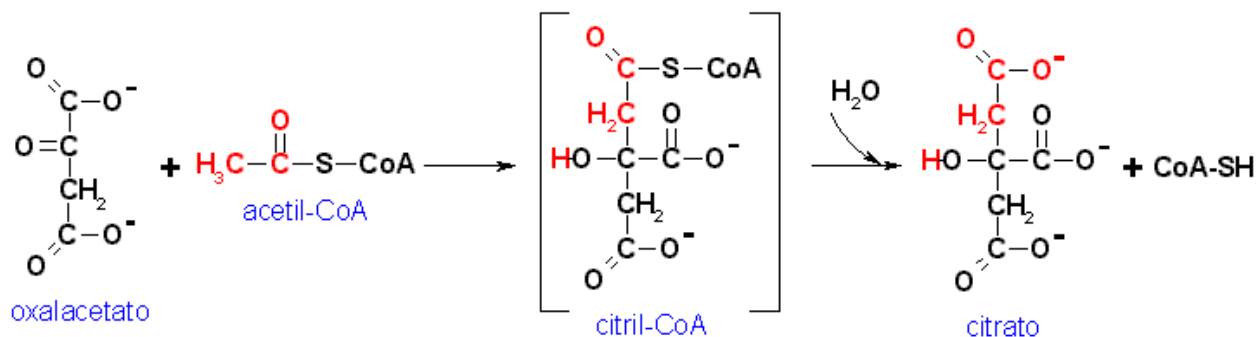
Figura 2. Esquema del Ciclo del Ácido Cítrico

Citrato Sintasa (E.C. 4.1.3.7)

La **Citrato sintasa** es una enzima del grupo de las **Liasas**, que cataliza la condensación del Oxalacetato y la Acetil-CoA, para formar Citrato. Esta reacción se considera la **principal vía de entrada de Carbono** al ciclo, pues la Acetil-CoA se produce en grandes cantidades durante el catabolismo de Glucidos, Lípidos y Aminoácidos, y su oxidación en el ciclo, produce la mayor parte de la energía metabólica. **Citrato Sintetasa**, **Citrato Oxalacetato Liasa**, **Citrogenasa** y **Enzima Condensante**, son nombres que a recibido esta enzima a través de los años, todos hacen referencia a la formación del citrato, pero en la nomenclatura enzimática moderna, ya no se aconseja su empleo. La enzima es grande y estable.

La reacción es una condensación aldólica entre el metilo de la Acetil-CoA y el doble enlace Carbono Oxígeno del Oxalacetato.

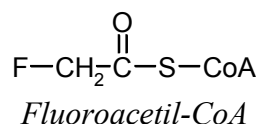
Ciclo del Ácido Cítrico



La condensación se lleva a cabo mediante la catálisis ácido-base del carboxilo de un resto de Aspartato y dos de Histidina, para formar **Citril-CoA**, intermediario que permanece unido a la enzima. En el segundo paso, la enzima hidroliza el Citril-CoA liberando Citrato y CoA-SH.

Cuando se une el Oxalacetato, la enzima sufre un cambio de conformación que coloca el Oxalacetato en una cavidad inaccesible al agua y al mismo tiempo, se forma el sitio de unión de la Acetil-CoA. La reacción es espontánea debido a la hidrólisis de enlace Tioéster y colabora para determinar la dirección del ciclo de Krebs.

La enzima tiene especificidad absoluta para Oxalacetato y Acetil-CoA. Sólo el veneno de origen vegetal Fluoroacetil-CoA, puede sustituir a la Acetil-CoA.



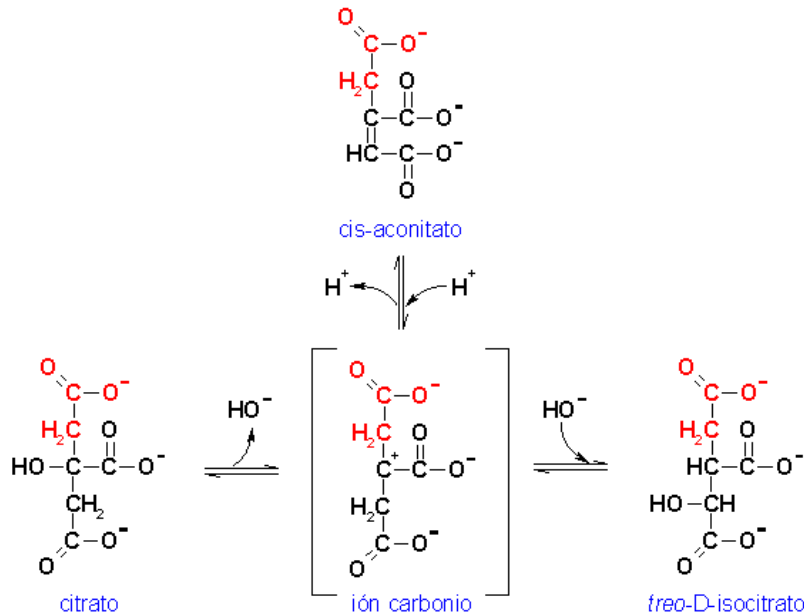
Fuera de la mitocondria, se encuentra una isoenzima denominada **Citrato Liasa**, que participa en la síntesis de ácidos grasos.

El ATP es inhibidor alostérico de la Citrato Sintasa. La actividad de la enzima también responde a los niveles de Oxalacetato y Acetil-CoA. Con frecuencia el Oxalacetato es el reactivo limitante, porque participa en la Gluconeogénesis. Cuando falta Oxalacetato, se acumula la Acetil-CoA que es activador de la enzima **Piruvato Carboxilasa**, la cual convierte el Piruvato en Oxalacetato. El exceso de Acetil-CoA también inhibe a la enzima **Piruvato Deshidrogenasa** que convierte el Piruvato en Acetil-CoA.

Aconitasa (E.C. 4.2.1.3)

Esta enzima, también conocida como **Aconitato Hidratasa**, cataliza la transposición de un grupo OH del citrato, para convertirlo en Isocitrato. Pertenece al grupo de las **Liasas**, porque se considera que la isomerización reversible, se lleva a cabo a través de reacciones de deshidratación (eliminación) e hidratación (adición) sucesivas, a través del *cis*-Aconitato, que sería un intermediario unido a la enzima. Sin embargo, evidencias espectroscópicas sugieren que el intermediario de la reacción es un **ión carbonio**, capaz convertirse en Isocitrato, Citrato o *cis*-Aconitato. A pesar de ello, en muchos textos se incluye el *cis*-Aconitato como intermediario.

Ciclo del Ácido Cítrico



En equilibrio, la enzima forma una mezcla de 58% Isocitrato, 39% Citrato y 3% *cis*-Aconitato. Contiene Hierro no hemo y Azufre ácido lábil en una agrupación denominada centro *hierro-azufre*.

Es inhibida competitivamente por Fluoroacetato, cuando se convierte en Fluorocitrato. También es inhibida por el *trans*-Aconitato.

Es una enzima notable por la especificidad de la reacción que cataliza, convirtiendo el Citrato no quiral, únicamente en uno de los cuatro isómeros posibles quirales del Isocitrato, el 2R,3S-Isocitrato o *trans*-D-Isocitrato, al transponer el Grupo OH del Carbono 3 del Citrato hacia el Carbono 2, proveniente del Oxalacetato, y jamás al que proviene de la Acetil-CoA. Los grupos encargados de eliminar y añadir el H₂O en forma de H⁺ y OH⁻ se encuentran colocados en el sitio activo en las posiciones adecuadas para asegurar la estereoespecificidad.

El complejo de Hierro y Azufre de la Aconitasa tiene una función diferente al de otras proteínas con Hierro y Azufre. En la mayoría de las proteínas, el complejo de Hierro y Azufre participa en reacciones de oxido reducción. En la Aconitasa, el complejo tiene la forma de un cubo, con átomos de Hierro y Azufre alternados en los vértices. El Hierro en uno de los vértices se coordina con los átomos de Oxígeno del carboxilo y el hidroxilo del carbono 3 del Citrato.

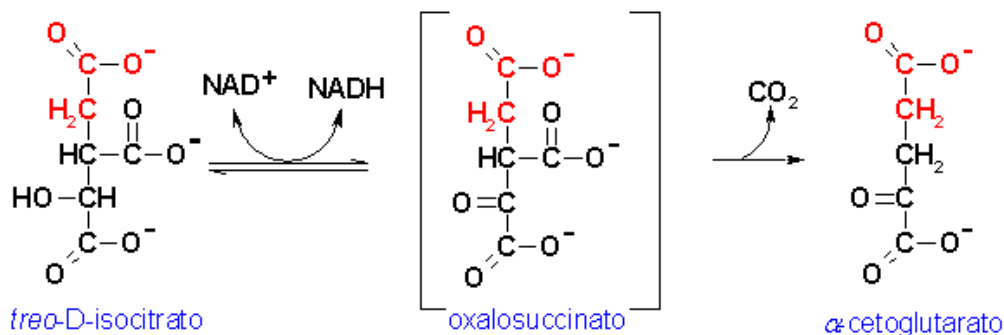
La reacción tiene un ΔG^0 positivo, pero en las condiciones intracelulares, el consumo rápido del Isocitrato, mantiene el ΔG casi en cero.

Hay una isoenzima que se encuentra fuera de la mitocondria.

Isocitrato Deshidrogenasa (EC 1.1.1.41)

Es una **Oxido-reductasa** de especificidad absoluta, que cataliza la reacción de descarboxilación oxidativa del 2R,3S-Isocitrato producido por la Aconitasa.

Ciclo del Ácido Cítrico



El anillo de Nicotinamida del NAD⁺ (o NADP⁺ en algunos organismos) oxida al grupo -OH del Isocitrato convirtiéndolo en **Oxalosuccinato**, intermediario unido a la enzima. En el Oxalosuccinato, el grupo ceto en 2 se encuentra en posición β respecto del carboxilo en 3, situación que hace al carboxilo inestable y fácil de eliminar. La eliminación, forma α-Cetoglutarato y es favorecida por la interacción entre Mg²⁺ (o Mn²⁺) y el grupo cetona. El carbono eliminado como CO₂, proviene del carboxilo 1 del Oxalacetato.

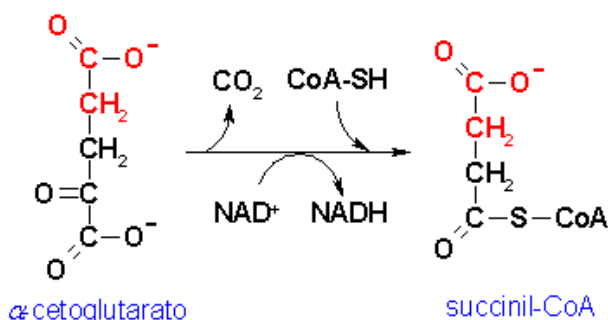
Esta enzima se considera el **punto principal de regulación** del ciclo. La forma de regulación más importante de la Isocitrato Deshidrogenasa es la **activación alostérica por ADP** (antagonizada por ATP) mediante la cual se acelera la actividad del ciclo cuando la relación ATP/ADP es baja. También es **activada por NAD⁺** (antagonizado por NADH) y Ca²⁺.

La reacción de la Isocitrato Deshidrogenasa tiene un ΔG⁰ negativo grande debido a que involucra una oxidación y una descarboxilación, ambos procesos exergónicos. Además, el CO₂ producido en la descarboxilación, se elimina fácilmente haciendo que la reacción sea irreversible, lo que la convierte en una de las reacciones que da dirección al ciclo de Krebs.

Se han descrito 3 isoenzimas. Una que es específica de NAD⁺ y se encuentra sólo en mitocondria. Las otras dos enzimas son específicas de NADP⁺, una se encuentran en mitocondria y otra en citoplasma.

α-Cetoglutarato Deshidrogenasa (EC 1.2.4.2)

El complejo de la α-Cetoglutarato Deshidrogenasa, cataliza una reacción de descarboxilación oxidativa, mediante la cual el α-Cetoglutarato se convierte en Succinil-CoA. Tiene un mecanismo idéntico al del complejo de la **Piruvato Deshidrogenasa**.



El complejo está formado por varias copias de:

- **α -Cetoglutarato Deshidrogenasa (E.C. 1.2.4.1)** con **TPP** como grupo prostético, que cataliza la reacción de **descarboxilación oxidativa** del α -Cetoglutarato para transformarlo en **Succinil-semialdehído-TPP**.
- **Lipoamida Succiniltransferasa (E.C.2.3.1.12)** que tiene como grupo prostético el Ácido Lipoico, unido a un resto de lisina en forma de lipoamida, y completa la oxidación mediante la **transferencia de Semialdehído Succínico** del TPP al Lipoato para formar la **Succinil-lipoamida**, y después la **transferencia del Succinato a la Coenzima A**, para formar la **Succinil-CoA**.
- **Dihidrolipoamida Deshidrogenasa (E.C.1.6.4.3)** idéntica a la del complejo de Piruvato Deshidrogenasa, con FAD como grupo prostético, que cataliza la **oxidación de la Dihidrolipoamida** a **Lipoamida**, con NAD^+ como aceptor final de electrones, a través del FAD y una proteína con hierro y azufre.

El CO_2 que se elimina en esta reacción, es del carboxilo 4 del Oxalacetato original, de manera que se eliminan dos Carbonos, equivalentes a los de la Acetil-CoA que entró al ciclo, pero provenientes del Oxalacetato.

Al igual que la Isocitrato Deshidrogenasa, la reacción de la α -Cetoglutarato Deshidrogenasa implica un paso de oxidación y otro de descarboxilación lo que hace que la reacción total sea espontánea e irreversible, por lo que contribuye a dar dirección al ciclo de Krebs. Parte de la energía liberada en la oxidación, se conserva en el enlace tioéster de la **Succinil-CoA**.

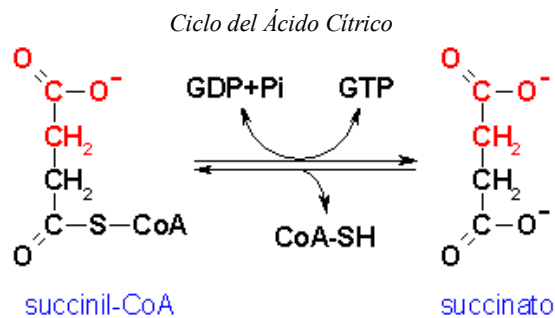
La principal regulación del complejo es la inhibición por producto, cuando se acumulan Succinil-CoA y NADH, disminuye la actividad de la enzima y la velocidad del ciclo. El complejo también es inhibido por **Arsenito** y **para-Hidroxifenilpiruvato** (inhibidor competitivo).

Succinil-CoA Sintetasa (EC 6.2.1.4)

Cataliza la hidrólisis del enlace tioéster de la **Succinil-CoA**, conservando parte de la energía de hidrólisis en forma de **GTP** (**ATP** en procariotes) mediante una **fosforilación a nivel de sustrato**. La enzima también se conoce como **Succinato Tiocinasa** ó **Succinil-CoA Tiocinasa**, nombres que no son compatibles con las reglas de nomenclatura moderna y no deben emplearse.

El mecanismo de la reacción se ha descrito como de "*la papa caliente*" porque el fosfato va pasando de un compuesto a otro.

- La energía liberada en la hidrólisis del enlace tioéster de Succinil-CoA, se usa para formar un enlace anhídrido entre el grupo carboxilo del Succinato y el fosfato inorgánico (Pi). Este enlace tiene alta energía de hidrólisis.
- A continuación, el fosfato del grupo anhídrido, se transfiere a un resto de Histidina de la enzima, formando **fosfohistidina** que también es un compuesto de alta energía de hidrólisis.
- En el último paso, el fosfato se transfiere de la Histidina al **GDP** para formar **GTP**.



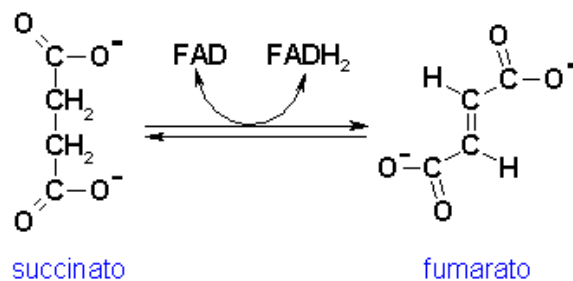
El ΔG° de la reacción es casi cero porque se hidroliza un enlace de alta energía, pero a cambio se sintetiza otro, por lo tanto la **reacción es reversible**, pero en las condiciones intracelulares sólo procede hacia Succinato, porque las reacciones anteriores son irreversibles El fosfato que ha sido activado a GTP, se mantiene en equilibrio con todos los nucleótidos a través de la enzima **Nucleótido Difosfato Cinasa**.

La enzima no tiene ningún otro mecanismo de regulación importante, pero es inhibida por NH_2OH (actúa formando el ácido hidroxiamínico derivado del sustrato Succinil-CoA).

Esta es la última reacción en la que hay diferencias entre el metabolismo de los carbonos de Acetil-CoA y Oxalacetato.

Succinato Deshidrogenasa (EC 1.3.99.1)

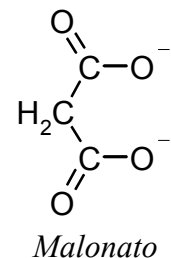
Esta **Óxido-reductasa** cataliza la oxidación del **Succinato** mediante la eliminación estereoespecífica de dos átomos de Hidrógeno, en forma de hidruro H^- y protón H^+ , para formar el enlace *trans* del fumarato. La enzima es un complejo formado por cuatro subunidades, con **FAD** y un **Hemo** tipo b como grupos prostéticos, además de tres núcleos con **Hierro** y **Azufre**.



La oxidación de Succinato reduce el FAD a FADH_2 .

El FADH_2 se oxida transfiriendo los electrones, a través de los complejos de hierro y azufre, hasta la **Coenzima Q** componente de la cadena respiratoria.

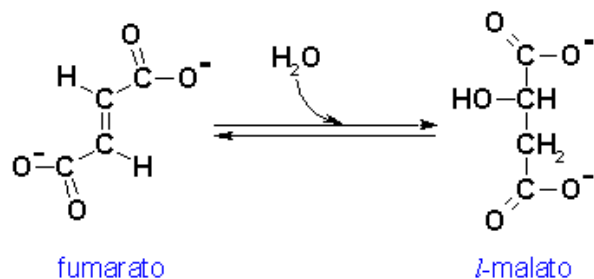
La Succinato Deshidrogenasa es inhibida por el Malonato, con estructura semejante al Succinato, pero que únicamente tiene un metenilo ($-\text{CH}_2-$) y no se puede oxidar por deshidrogenación. También la inhibe el Oxalacetato, que tampoco se puede deshidrogenar.



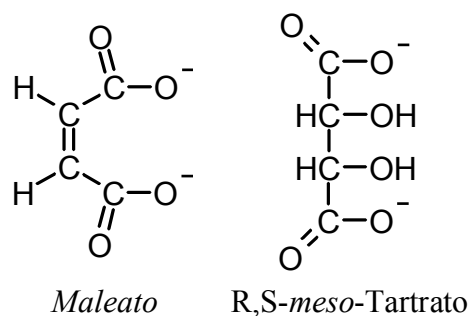
La Succinato Deshidrogenasa está incluida en la membrana interna de la mitocondria, **formando parte del Complejo II de la Cadena Respiratoria**. El resto de las enzimas del ciclo de Krebs, están libres en la matriz mitocondrial.

Fumarasa (EC 4.2.1.2)

Esta enzima pertenece al grupo de las **Liasas** y cataliza la hidratación esteroespecífica del Fumarato para formar el *l*-Malato. No requiere cofactores y tiene una isoenzima que se encuentra en el citoplasma.



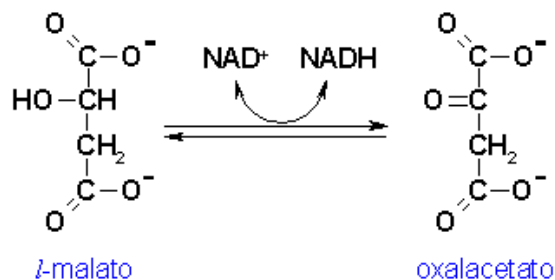
El mecanismo consiste en la adición anti de los equivalentes de una molécula de agua, para generar *l*-Malato a partir del Fumarato (*trans*) y *d*-Malato a partir del Maleato (*cis*). La forma activa de la enzima es un homotetrámero. El sitio activo está formado con restos de 3 unidades, e incluye ambos extremos de las cadenas.



La enzima no presente una regulación importante pero es inhibida competitivamente por *meso*-Tartrato y tiene un ΔG° casi igual a cero.

Malato Deshidrogenasa (EC 1.1.1.37)

Es la última enzima del ciclo y cataliza la oxidación del grupo -OH del Malato al ceto (u oxo) del Oxalacetato, mediante la transferencia de un hidruro ($2e^- + H^+$) al NAD^+ . La enzima es específica del *l*-Malato. La interacción entre el sustrato negativo, y restos de Arginina del sitio activo, promueve el cambio a la conformación activa de la enzima.



La reacción tiene ΔG° positivo, sin embargo, el cambio no estándar es casi cero porque la concentración del Oxalacetato se mantiene baja, debido a que se consume en la reacción de la Citrato

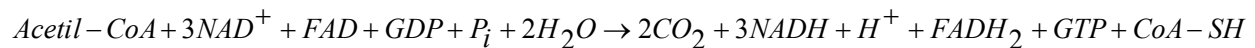
Ciclo del Ácido Cítrico

Sintasa que tiene un ΔG muy negativo. El Oxalacetato también se consume para la síntesis de Glucosa en la Gluconeogénesis, y por ello con frecuencia es el reactivo limitante del ciclo de Krebs.

Esta enzima no es un punto de regulación importante y es inhibida competitivamente por α -Fluoroxalacetato y el Fluoromalato.

Hay una isoenzima Malato Deshidrogenasa citoplásmica, que participa en el intercambio de equivalentes reductores entre citoplasma y mitocondria y en la salida de la Acetil-CoA de mitocondria.

Mediante la secuencia de reacciones descrita, se oxidan dos átomos de carbono, que se consideran equivalentes a los de la Acetil-CoA. Sin embargo, como se muestra en las reacciones individuales, los átomos del grupo Acetilo que entran al ciclo no se oxidan y permanecen en él, al menos después de la primera vuelta. Los átomos que se oxidan y se eliminan como CO_2 , son los dos grupos carboxilo del Oxalacetato. La estequiometría global del ciclo es la siguiente:



Considerando la cantidad estándar de ATP, producida por cada coenzima reducida, que se oxida en la Cadena Respiratoria, la oxidación de un Acetil-CoA en Ciclo del Ácido Cítrico, y la oxidación de las coenzimas reducidas en la Cadena Respiratoria equivale a 12 moléculas de ATP, 11 por fosforilación oxidativa (9 de 3 NADH y 2 de 1 FADH₂) más una por fosforilación a nivel de sustrato (GTP).

Otras Funciones Catabólicas del Ciclo del Ácido Cítrico

Además de la oxidación de Acetil-CoA del catabolismo de Glúcidos y Lípidos, el ciclo también oxida esqueletos de carbono provenientes del catabolismo de Aminoácidos y de la degradación de las bases Pírimídicas de los ácidos nucleicos.

Los esqueletos de carbono de los aminoácidos se incorporan al ciclo del ácido cítrico en forma de varios intermediarios.

- α -Cetoglutarato. Así se incorporan Glutamato, Glutamina, Arginina, Prolina e Histidina.
- Succinil-CoA. Es la entrada del carbono de Valina, Metionina, Treonina y parte de Isoleucina, Fenilalanina y Tirosina. También es el punto de entrada de los carbonos del esqueleto de Timina.
- Fumarato. Una parte del esqueleto de Fenilalanina y Tirosina entran al ciclo en este punto.
- Oxalacetato. Esta es la forma de incorporación del Aspartato y la Asparagina.
- Piruvato. Los aminoácidos Alanina, Glicina, Serina, Cisteina y Triptofano producen Piruvato puede entrar al ciclo.
- Acetoacetil-CoA o Acetil-CoA. Lisina y Leucina, junto con algunos carbonos provenientes de la degradación de Isoleucina, Fenilalanina, Tirosina y Triptofano entran así al ciclo, lo mismo que los carbonos de Uracilo y Citosina.

Funciones Anabólicas del Ciclo del Ácido Cítrico.

Además de participación en el catabolismo, el Ciclo de Krebs también participa en el anabolismo ya que varios de sus intermediarios sirven como precursores para la síntesis de todo tipo de moléculas.

El Citrato, cuando se acumula en la mitocondria, sale al citoplasma donde se rompe liberando Acetil-CoA para la síntesis de Ácido Grasos. También en el citoplasma actúa como modulador de la Glicólisis.

El α -Cetoglutarato es precursor para la síntesis de Glutamato y Glutamina.

La Succinil-CoA es la materia prima para la síntesis del grupo Hemo de las hemoproteínas.

El Oxalacetato es precursor para la síntesis de Glucosa en el citoplasma y también para la síntesis de Aspartato y Asparagina, Por esta razón con frecuencia es el reactivo limitante del Ciclo del Ácido Cítrico.