



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:**

***FOSFATO DE PIRIDOXAL: MECANISMO DE  
INHIBICIÓN, SISTEMAS ENZIMÁTICOS CON LOS  
QUE ACTUA Y SÍNTESIS***

Autor: Carmen Haro López

D.N.I.: 52908434Q

Tutor: María Fernández Fernández

Convocatoria: Junio 2016

## RESUMEN

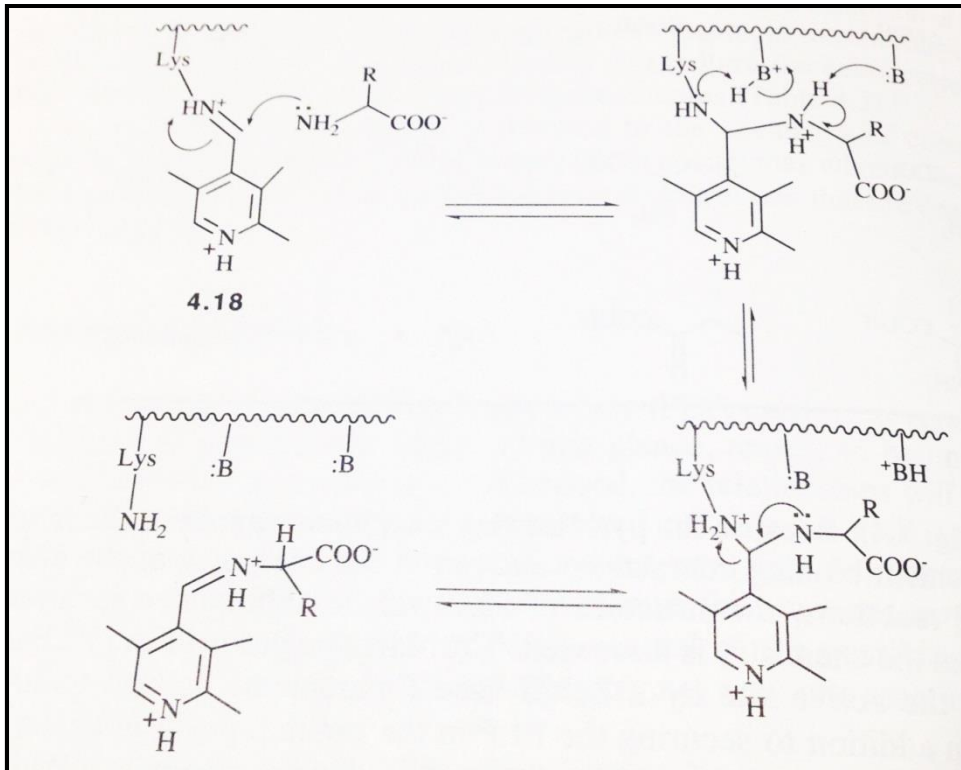
El piridoxal fosfato (PLP) es una de las moléculas más ubicuas del organismo. Participa en muchos y diversos sistemas enzimáticos como cofactor, interviniendo en reacciones como transaminación, descarboxilación o racemización, estando así implicado en varias patologías. Algunos papeles bien estudiados del PLP son, por ejemplo, su acción como cofactor en la reacción de la GABA transaminasa o de la alanina racemasa. Otros más recientemente conocidos son el de su implicación en el metabolismo de la homocisteína y su posible relación con la aparición de carcinoma hepatocelular. Por todas estas razones, su estudio y la síntesis de inhibidores es de alto interés ya que puede suponer el tratamiento de muchas enfermedades.

## INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El piridoxal-5'-fosfato (PLP), la principal forma bioactiva de la vitamina B6, es probablemente el coenzima más versátil de la naturaleza, dado que participa en el funcionamiento de más de 140 enzimas<sup>1</sup>. A principios de 1940 fue identificado por Snell como coenzima para transaminasas y, posteriormente, se supo de su actividad esencial como cofactor en la síntesis, degradación e interconversión de aminoácidos<sup>2</sup>. La racemización, transaminación, descarboxilación o la eliminación son ejemplos de la amplia variedad de reacciones que catalizan las enzimas PLP dependientes<sup>3</sup>. La profundización, durante los últimos años, en el estudio del mecanismo químico por el que actúan estos enzimas y la búsqueda de nuevos inhibidores con potencial farmacéutico radica en la importancia biológica de algunos de estos aminoácidos.

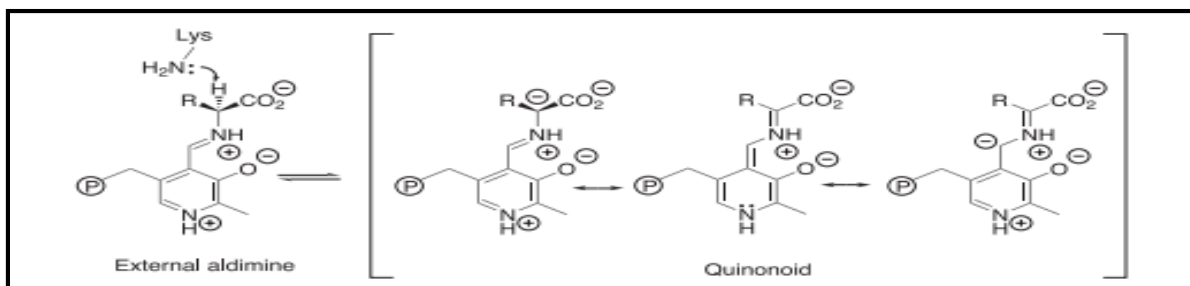
La **reactividad** del PLP se basa en la formación de una imina o base de Schiff. Esta imina (también denominada aldimina interna) es el resultado de la unión del grupo aldehído del PLP con el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys, propio de la enzima PLP dependiente. Esta interacción es de tipo covalente y, aunque sea la más importante, existen otras de tipo no covalente para asegurar la posición correcta (anclaje) en el sitio activo de la enzima<sup>4, 5, 6, 7</sup>.

Todos los sistemas enzimáticos dependientes de PLP (a excepción de algunas enzimas como la glucógeno fosforilasa) tienen en común una reacción de transaminación, donde un aminoácido sustrato ataca al carbonilo activado de la base de Schiff, formando una diamina geminal. A continuación, la Lys se libera de forma que se crea una nueva base de Schiff con el grupo  $\alpha$ -amino del aminoácido, denominada aldimina externa [Figura 1]. Es a partir de esta aldimina externa de donde parten (y, por tanto, están relacionadas) las diversas reacciones PLP dependientes<sup>2</sup>.



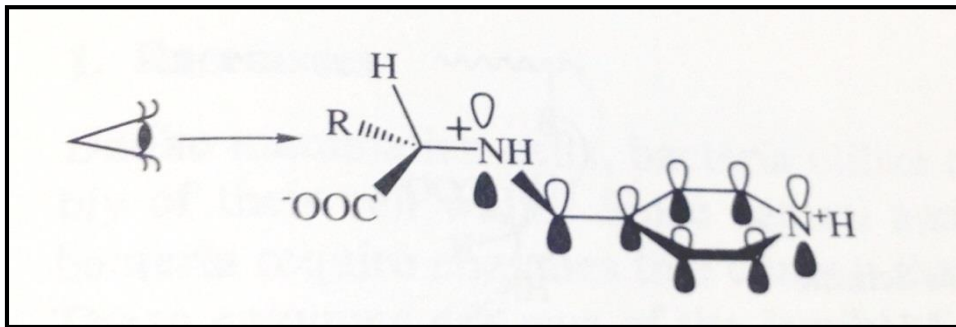
**Figura 1.** Primer paso en todas las reacciones de las enzimas PLP dependientes.

La propiedad más interesante de la aldimina externa es que el grupo piridinio actúa como un sumidero de electrones (*electron sink*) y es capaz de estabilizar los electrones de los diferentes enlaces (C-H, C-COO<sup>-</sup>, C-R) por resonancia en el sistema  $\pi$  conjugado, siendo ésta la explicación de por qué estos enlaces pueden romperse de una manera no enzimática<sup>2</sup>. Gracias a esto se produce la escisión heterolítica de cualquier enlace con el C $\alpha$  (excepto C $\alpha$ -N). Así, a partir de la aldimina externa se forman carbaniones perfectamente estabilizados. Las tres formas de resonancia más significativas se muestran en la Figura 2. La estructura de resonancia situada en el medio se denomina “quinonoide”, puesto que su estructura se asemeja a la de una quinona. Este quinonoide se considera el principal responsable del poder catalítico de PLP, ya que los electrones de C $\alpha$  se neutralizan con el N de la piridina protonada.



**Figura 2.** Formas de resonancia del PLP

La escisión se produce cuando el enlace a romper se dispone en un plano perpendicular al plano del sistema de electrones  $\pi$  de PLP-imina. Es en esta posición donde se produce un solapamiento máximo de los electrones  $\pi$  y se reduce al mínimo la energía del estado de transición de dicho enlace, produciéndose así la rotura de éste [Figura 3]. Por tanto, las enzimas PLP dependientes, controlando la conformación del enlace  $C_{\alpha}$ -N, serán las encargadas de disponer el enlace a romper en la posición descrita <sup>6,7,8</sup>.

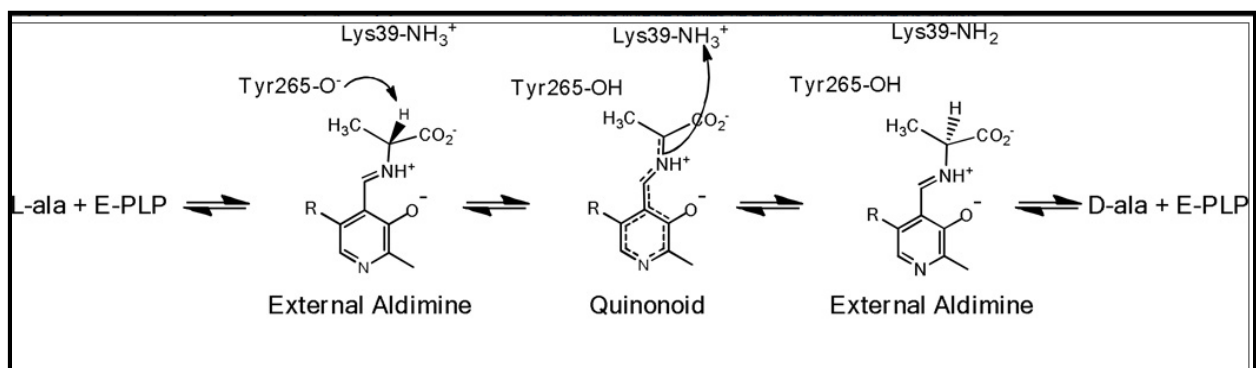


**Figura 3.** Sistema  $\pi$ -electrón de la PLP-imina.

Dependiendo de cómo sea la estructura del sitio activo de la enzima PLP dependiente y de los sustratos se darán diversas reacciones.

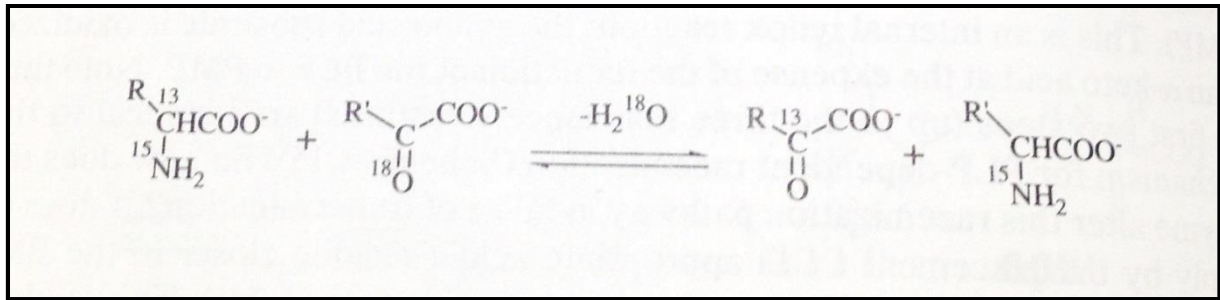
En la **racemización** tiene lugar la conversión de un L-aminoácido en D-aminoácido y al contrario, ya que las racemasas tienen una constante de equilibrio igual a 1, por lo que independientemente de que el sustrato sea un enantiómero u otro, la racemización se produce.

Como se muestra en la Figura 4, una base de la enzima abstrae el protón en alfa de la aldimina externa generando un carbanión muy deslocalizado y, por tanto, estable. Este intermedio reactivo sufre la reprotonación por la cara opuesta en la misma posición.



**Figura 4.** Reacción de racemización.

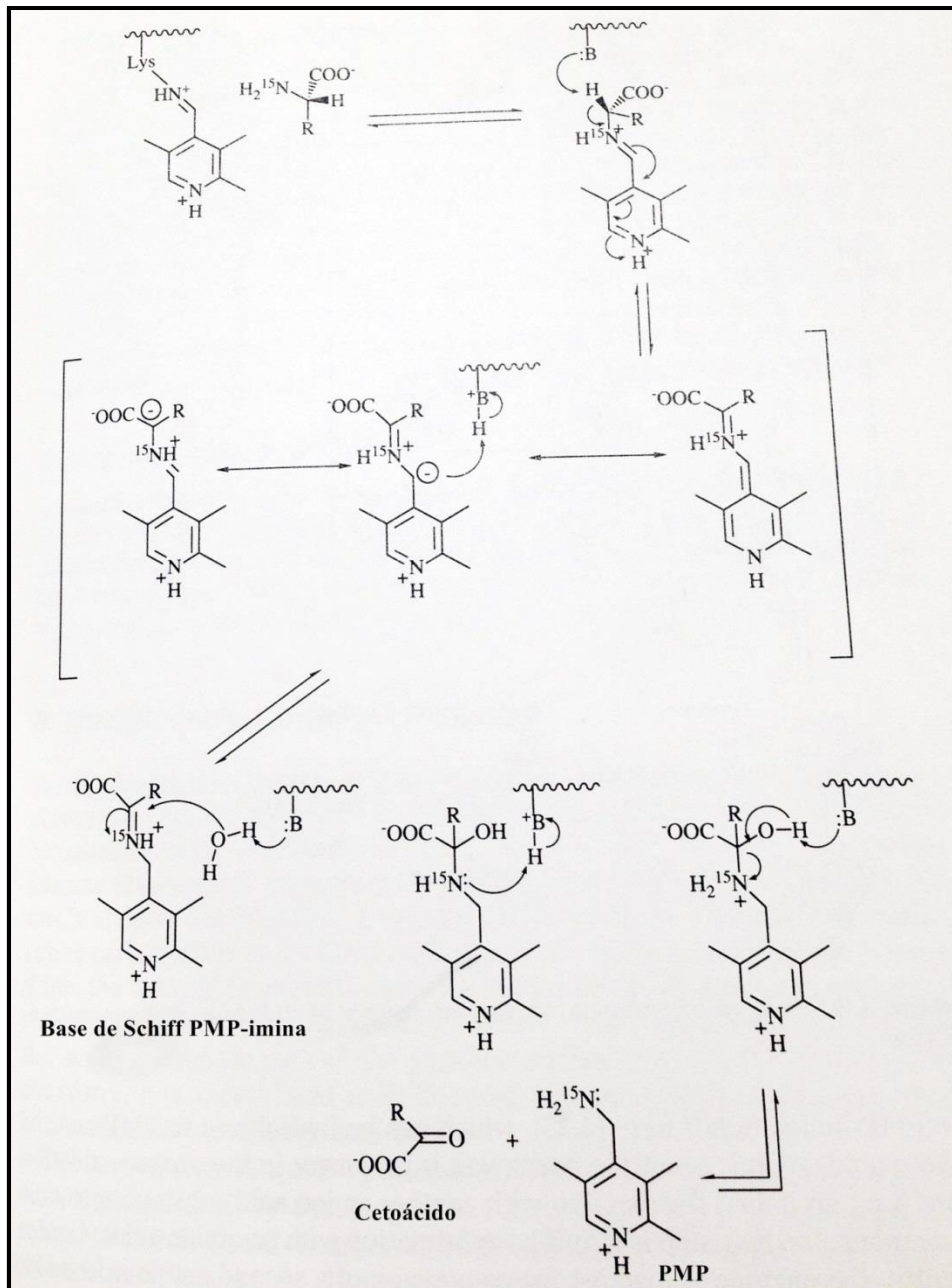
La **transaminación** es una de las reacciones PLP dependientes más complejas. Las transaminasas catalizan la transferencia del grupo amino de un aminoácido a un  $\alpha$ -cetoácido, siguiendo el siguiente patrón:



**Figura 5.** Reacción general de las aminotransferasas.

Como se puede observar, el aminoácido inicial se convierte en un  $\alpha$ -cetoácido y viceversa.

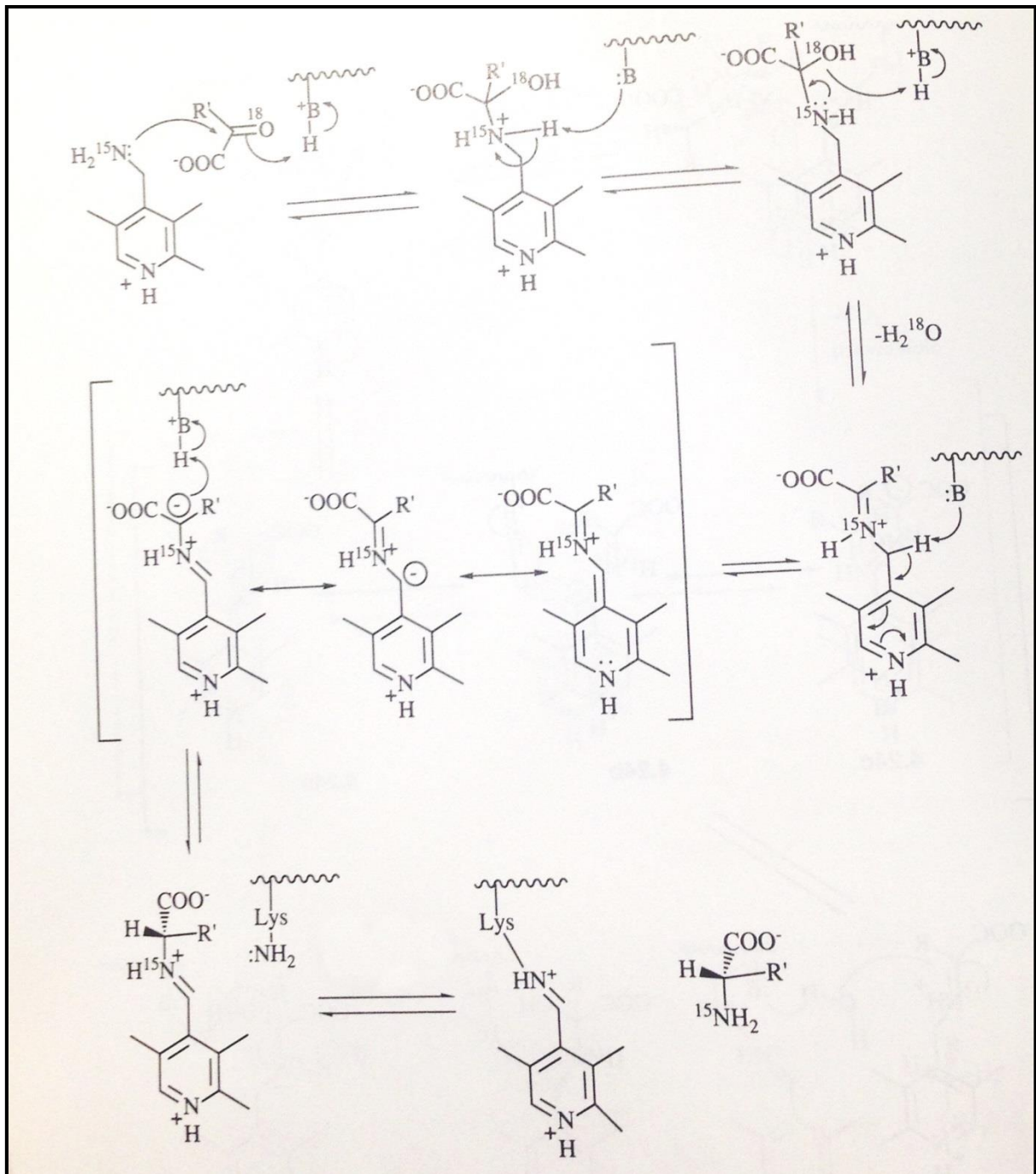
A partir de la aldimina externa, la transaminación consta de dos fases: la transaminación como tal y la regeneración del coenzima. En la Figura 6 se muestra la primera etapa, donde se puede apreciar que es similar a la reacción de racemización, donde una base propia de la enzima elimina un protón de la aldimina externa y se crea una carga negativa sobre el  $\text{C}_\alpha$  que estará estabilizada a través del sistema  $\pi$  del PLP, generando el intermedio quinonoide. La diferencia radica en la posición de un residuo ácido, que se sitúa más cerca del C de la piridoxamina 5'-fosfato (PMP) que del  $\text{C}_\alpha$  del sustrato. Así pues, se forma la base de Schiff PMP-imina cuya hidrólisis dará PMP y el  $\alpha$ -cetoácido<sup>6,9</sup>.



**Figura 6.** Primera parte del mecanismo de las aminotransferasas PLP dependientes.

Llegados a este punto nos encontramos con la segunda parte de la reacción, donde el coenzima tiene que ser regenerado puesto que su estado de oxidación no es el adecuado para reaccionar con otro aminoácido sustrato.

Para ello entra en juego otra cetona que suele ser un  $\alpha$ -cetoácido (diferente al  $\alpha$ -cetoácido producto de la primera parte de la reacción). Este segundo sustrato se une al sitio activo de la enzima, que tendrá una conformación diferente a la inicial y dará lugar a la reacción representada en la Figura 7:



**Figura 7.** Segunda parte del mecanismo de las aminotransferasas PLP dependientes.

En este proceso se regenera el PLP y se produce un nuevo aminoácido debido a la transferencia del grupo amino (que procede del aminoácido sustrato) al segundo sustrato, el  $\alpha$ -cetoácido. El objetivo de esta segunda parte de la reacción es regenerar la enzima a la forma activa. Sin embargo, existe el caso de algunas aminotransferasas donde la primera parte de la reacción ocurre con el fin de obtener la enzima en su forma PMP para luego convertir el sustrato deseado en el aminoácido producto.

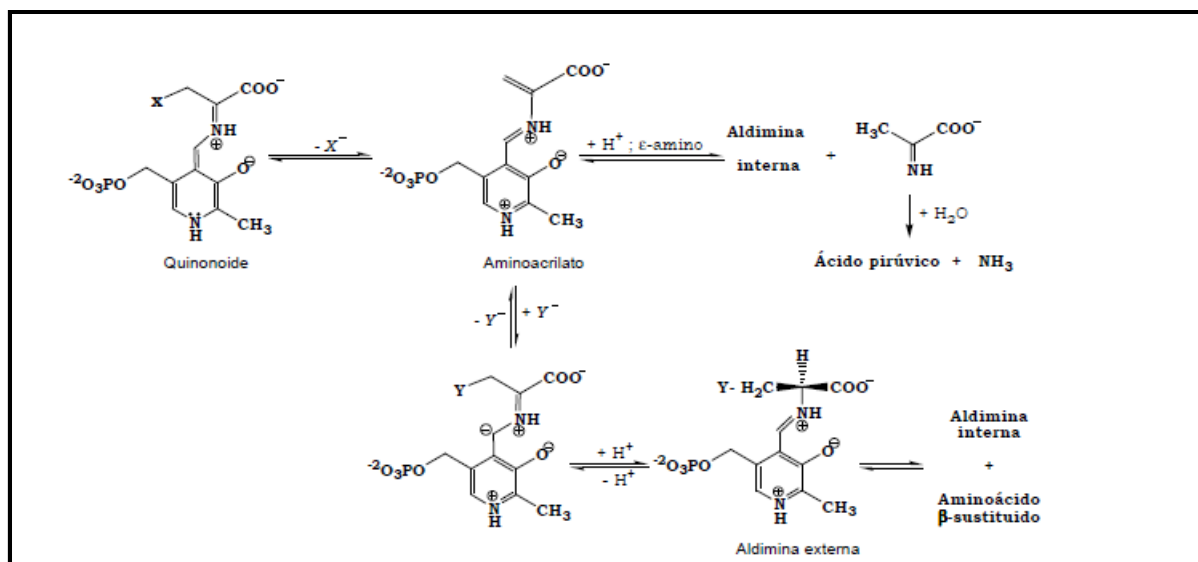
La transformación de los aminoácidos en aminas se lleva a cabo por las descaboxilasas mediante la **descarboxilación**. Este proceso está favorecido al orientarse perpendicularmente el grupo carboxílico respecto a la imina, produciéndose la pérdida de CO<sub>2</sub> de la ya nombrada aldimina externa de donde parten todas las reacciones. Se forma así el intermedio quinonoide y una posterior protonación genera una nueva aldimina externa que, por hidrólisis, libera la amina primaria y regenera el PLP-enzima<sup>10, 11</sup>.

**Alfa eliminación y alfa sustitución:** en este proceso, que es una variante de la reacción retro-aldólica, se produce la rotura del enlace C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub> catalizada por enzimas como la serina hidroximetiltransferasa, que convierte reversiblemente serina en glicina<sup>12</sup>.

Como podemos observar, todas las reacciones comentadas hasta ahora se dan en la posición α de los aminoácidos. A parte de éstas, en las posiciones β y γ se dan reacciones de eliminación y sustitución.

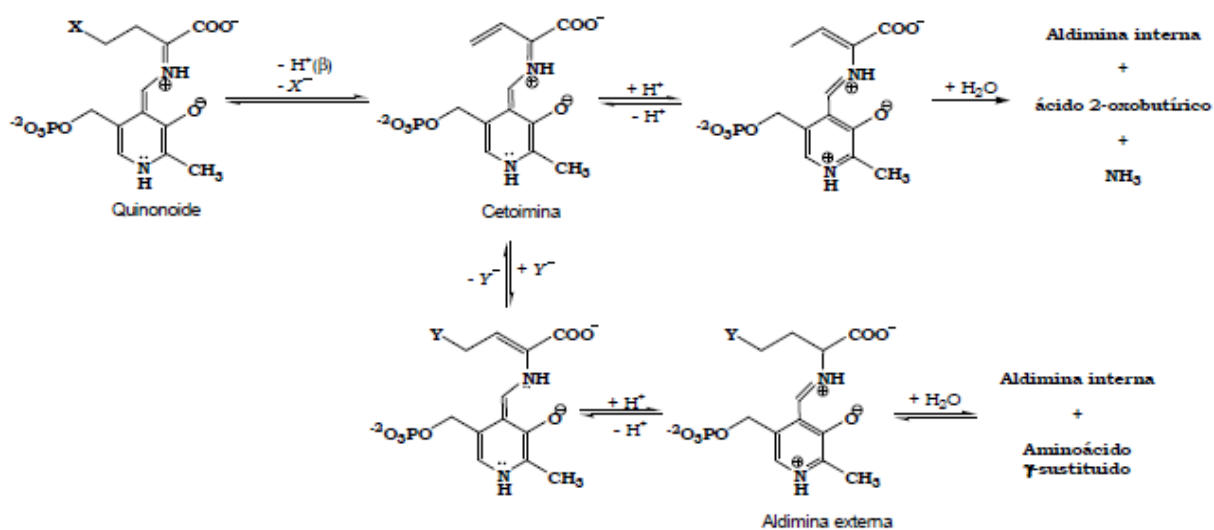
Algunos enzimas que catalizan la **β-eliminación y la β-sustitución** son por ejemplo la tirosina fenol liasa, la triptofanasa o la cisteína sintasa. Ambas reacciones (ilustradas en la Figura 8) empiezan con la estabilización del intermedio quinonoide mediante la eliminación del grupo electronegativo en β, con lo que se obtiene un aminoacrilato. En la β-sustitución un grupo nucleófilo (Y) se añade sobre el C<sub>β</sub> del aminoacrilato. A continuación se forma una aldimina externa gracias a la protonación y se concluye la reacción con la hidrólisis de la aldimina generándose el aminoácido β-sustituido y la recuperación de la aldimina interna<sup>13, 14, 15</sup>.

En la β-eliminación, en cambio, se adiciona el grupo ε-amino de la Lys al C(4') del aminoacrilato, con lo que se recupera la aldimina interna y se forma un aminoácido insaturado que, al degradarse, produce amoníaco y ácido pirúvico.



**Figura 8.** Mecanismo de  $\beta$ -eliminación y  $\beta$ -sustitución.

Existe un pequeño grupo de enzimas PLP dependientes que llevan a cabo las reacciones de  $\gamma$ -eliminación y  $\gamma$ -sustitución, como es el caso de la  $\gamma$ -cistationasa. Los dos procesos empiezan con la eliminación del H en  $\alpha$  de la aldimina externa y, a continuación, se tautomeriza dando lugar al intermedio quinonoide que se muestra en el esquema de la Figura 9. Seguidamente, el  $H_\beta$  se elimina junto con el grupo saliente en  $\gamma$ , formando así un compuesto vinílico intermedio. En la  $\gamma$ -eliminación se da la protonación e hidrólisis con lo que se recupera la aldimina interna y se produce el ácido 2-oxobutírico y amoníaco. En la  $\gamma$ -sustitución se produce la adición de un nucleófilo diferente  $Y$  (adición de Michael) con la consecutiva transferencia de protones hasta obtener la aldimina interna y un aminoácido  $\gamma$ -sustituido<sup>16</sup>.



**Figura 9.** Mecanismo de  $\gamma$ -eliminación y  $\gamma$ -sustitución.

Además de las vías relacionadas con los aminoácidos, el PLP juega un papel importante en otros procesos como la **glucogenolisis**, ya que actúa como grupo prostético de la glucógeno fosforilasa, enzima clave en esta reacción. Este enzima cataliza la fosforólisis de los enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  glicosídicos, liberando glucosa-1-fosfato. El PLP ejerce su acción debido a que, como en las reacciones relacionadas con los aminoácidos, se ancla al sitio activo del enzima a través de un enlace formado por la condensación del aldehído y el  $\epsilon$ -amino de una lisina, formando la base de Schiff<sup>17</sup>.

## **OBJETIVOS**

El objetivo principal de este trabajo es proporcionar un conocimiento extenso acerca del piridoxal fosfato y los principales sistemas enzimáticos en los que está implicado así como el modo de inhibición de los diferentes inhibidores, y mostrar la implicación del PLP en diferentes patologías y en los posibles tratamientos para éstas.

## **METODOLOGIA**

Se realizó una revisión bibliográfica, manejándose un total de 50 artículos en inglés, 16 páginas web y 3 libros, seleccionándose finalmente 41 referencias que se reflejan en la bibliografía. Los buscadores empleados fueron PubMed, Scielo y la página web del NCI (National Cancer Institute). Las palabras clave de la búsqueda fueron: pyridoxal phosphate, transamination, racemization, enzymes, PLP, Enzymology, Dialkylglycine decarboxylase, hyperhomocysteinemia.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

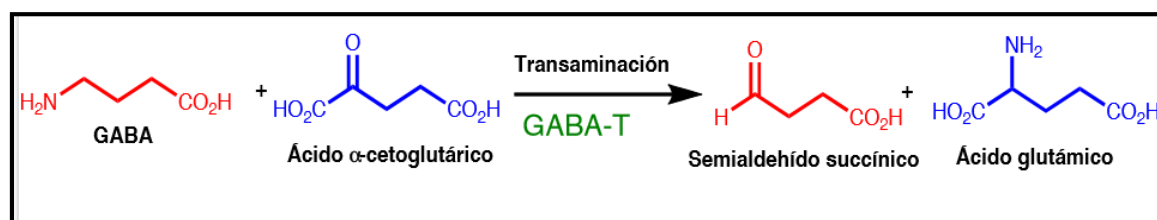
La importancia del PLP como cofactor para la salud humana se ha establecido a través de más de 70 años de investigación bioquímica que ha revelado sus papeles fundamentales en el metabolismo<sup>18</sup>. Además de la función clásica de transaminación, muchas de las enzimas con las que actúa el PLP participan en el metabolismo de neurotransmisores como la dopamina, serotonina o ácido butírico  $\gamma$ -amino, entre otros<sup>19</sup>.

El PLP interviene en diversas vías metabólicas y actúa con sistemas enzimáticos bastantes conocidos.

Uno de los ejemplos más importantes es su implicación en la ruta del ácido gamma-aminobutírico (GABA), ya que participa en su síntesis y en su metabolismo. El GABA es un neurotransmisor inhibitor que está relacionado con trastornos neurológicos debido a la variabilidad en su concentración. Cuando la concentración del GABA disminuye

significativamente en el cerebro se producen convulsiones. La síntesis del GABA se produce a partir del ácido glutámico mediante la acción de la ácido-glutámico-descarboxilasa (GAD), un sistema enzimático dependiente de PLP, y su degradación enzimática la lleva a cabo la GABA transaminasa (GABA-T), que también tiene como cofactor al PLP y degrada el GABA a semialdehído succínico, mediante el mecanismo general de las transaminasas.

La reacción catalizada por GABA-T es la siguiente:



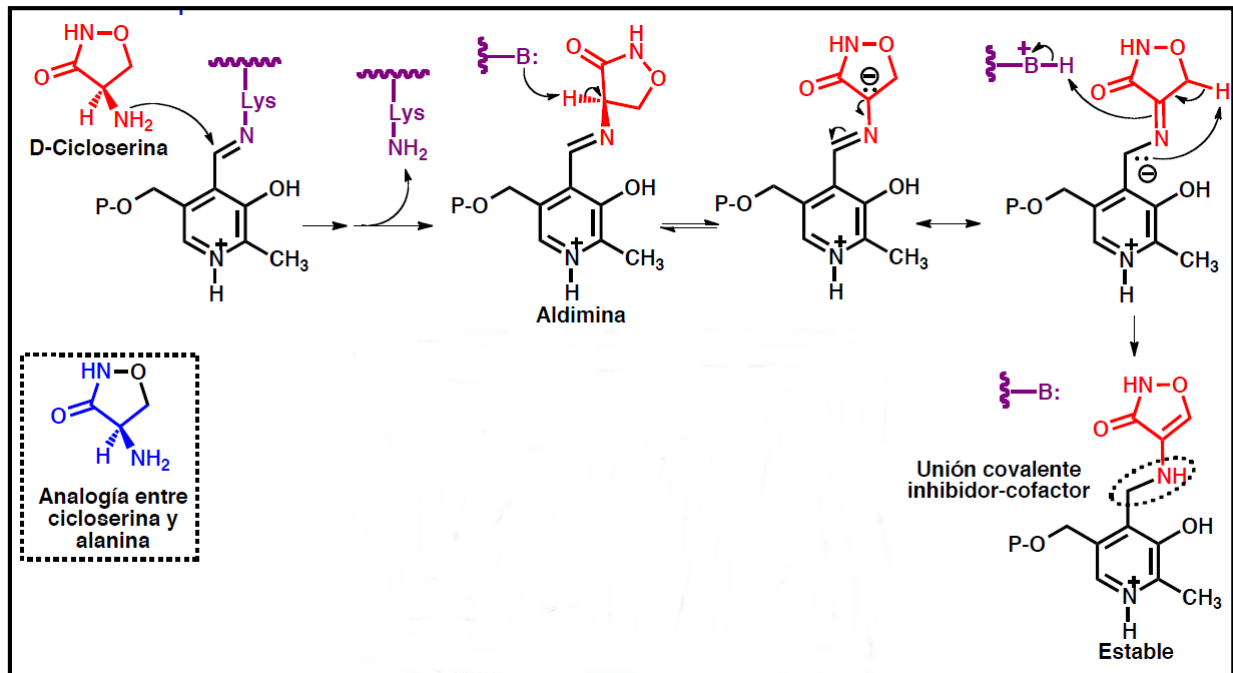
El aumento de la concentración del GABA es útil en el tratamiento de la epilepsia. Por ello, y ante la ineffectividad de la administración periférica de GABA, el diseño de inhibidores de la GABA-T capaces de atravesar la barrera hematoencefálica es de relevante importancia. La **vigabatrina** (ácido 4-amino-5-hexenoico) es un inhibidor suicida de la GABA-T cuyo mecanismo de acción se puede apreciar en la Figura 10. Es un compuesto no reactivo que, mediante el mecanismo catalítico normal de la enzima diana, se convierte en un compuesto reactivo. Si lo comparamos con el mecanismo de la GABA-T (Figura 6) con el sustrato habitual vemos que la hidrólisis de la base de Schiff PMP-imina formada en la primera parte de la reacción de transaminación produce PMP y el cetoácido. Esto mismo podría ocurrir con la hidrólisis de A (Figura 10) para dar los productos PMP y B. Sin embargo, A es un aceptor de Michael, un potente electrófilo que será atacado por un nucleófilo propio del sitio activo de la enzima, produciendo así su inactivación. Esta vía supone el 70% de las vías de inactivación. El otro 30% de la inactivación de produce por una isomerización alílica y un reordenamiento de la enamina que conduce a C (vía b).

El vinilgaba es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica gracias al sustituyente de vinilo. Éste aumenta la lipofilia de la molécula y, al ser un aceptor de electrones, reduce el pKa del grupo amino, desplazando el equilibrio a la forma no zwitterion, que no está cargada, es más lipófila y atraviesa mejor la barrera<sup>20</sup>.



contra la tuberculosis. Actualmente, DCS se recomienda sólo como tratamiento en segunda línea para las cepas resistentes a otros fármacos debido a la alta prevalencia de efectos neurológicos secundarios asociados con el uso de DCS<sup>22</sup>.

DCS inhibe a la Ala-racemasa de manera competitiva, impidiendo la adhesión de la D-alanina al pentapéptido<sup>23</sup>, como podemos ver en la Figura 11:



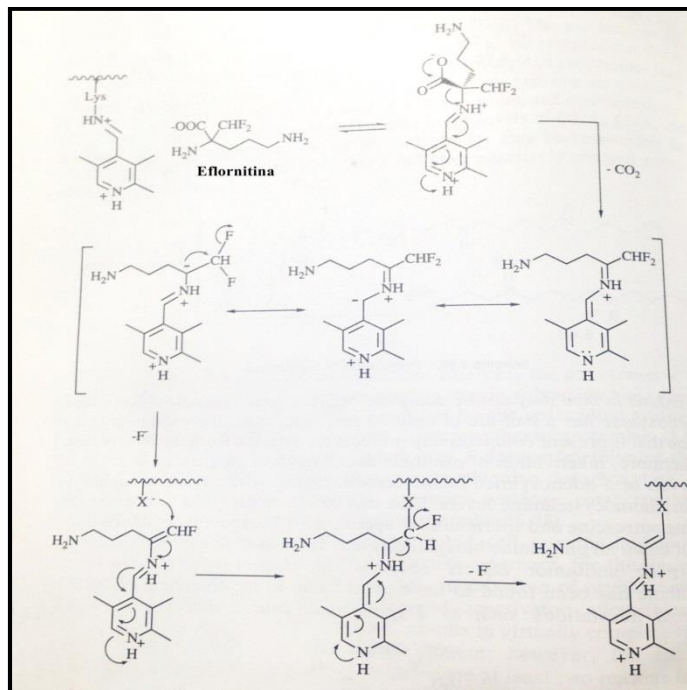
**Figura 11.** Inhibición de Ala-racemasa por D-cicloserina.

La **ornitina descarboxilasa** es una enzima que participa en la biosíntesis de las poliaminas, espermidina y espermina y su precursor, putrescina, las cuales son importantes reguladoras del crecimiento de las células, su división y diferenciación. Aunque el mecanismo no está claramente establecido, parece que son necesarias para la síntesis de ADN. Además, las células de crecimiento rápido tienen niveles mucho más altos de poliaminas y de ornitina descarboxilasa que las de crecimiento lento.

Dentro de la biosíntesis de poliaminas, la ornitina descarboxilasa participa catalizando la conversión de ornitina a putrescina, que constituye el paso limitante en esta vía. El resto de poliaminas se sintetizan gracias a otras enzimas como la espermidina sintetasa o espermina sintetasa. La inhibición de la síntesis de poliaminas es objeto de estudio, pues si las poliaminas son importantes para el crecimiento rápido de las células, los agentes inhibidores de esta síntesis deberían ser eficaces como antitumorales y antimicrobianos.

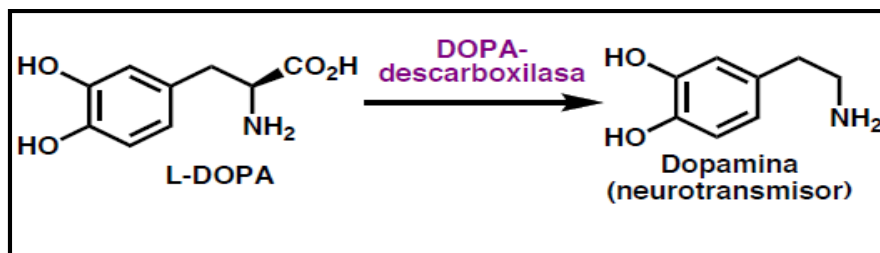
La eflornitina ( $\alpha$ -difluorometilornitina) es un potente inhibidor de la ornitina descarboxilasa y su empleo resulta en la reducción casi completa del contenido de putrescina y espermidina. Sin embargo, la concentración de espermina sólo se reduce ligeramente. El problema que tiene la eflornitina es que presenta una vida media de sólo 30 minutos y, además, se junta con el hecho de que la ornitina endógena protege competitivamente al enzima del inhibidor. Puede ser debido a esta incapacidad de intervenir en todo el sistema de biosíntesis de poliamina por lo que en ensayos clínicos los efectos antitumorales de la eflornitina observados hayan sido muy pobres. En cambio, se ha encontrado que para el tratamiento contra protozoos como *Trypanosoma brucei rhodesiense* o *Pneumocystis carinii* puede ser muy eficaz. Desafortunadamente, se necesitan grandes cantidades (150 mg / kg) cada 4-6 horas, lo que hace que sea muy caro. Otra indicación que se ha descubierto más recientemente para la eflornitina es su utilización por vía tópica para la reducción de vello facial en mujeres que no lo desean. El mecanismo de acción podría deberse a la inhibición de la biosíntesis de poliaminas que es importante para el crecimiento del cabello, aunque no está claramente establecido.

El eflornitina inhibe irreversiblemente a la ornitina descarboxilasa, gracias a que ésta cataliza la descarboxilación de la eflornitina, produciendo un producto reactivo que inactiva a la enzima. En la Figura 12 se muestra un posible mecanismo de inactivación<sup>20</sup>.



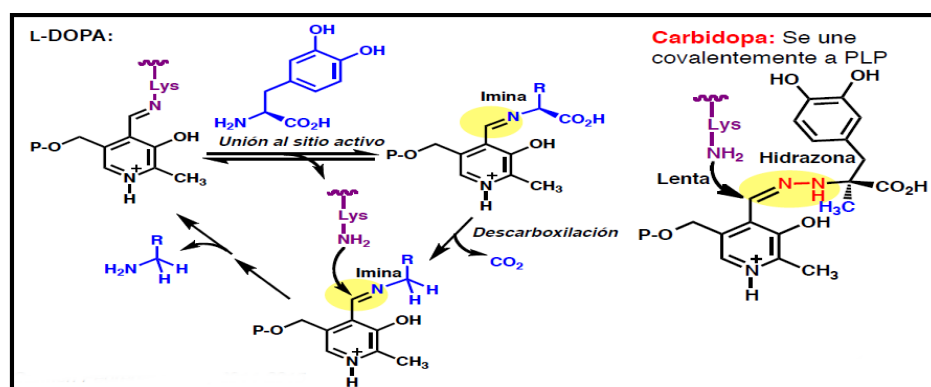
**Figura 12.** Hipotético mecanismo de inactivación de la ornitina descarboxilasa por la eflornitina.

La dopamina es un neurotransmisor inhibitor en el sistema nervioso central (SNC) cuyos niveles suelen estar en equilibrio con los niveles colinérgicos. Una falta de dopamina anula este equilibrio y el exceso de actividad colinérgica conlleva a los síntomas de la enfermedad del Parkinson. Para contrarrestar esos síntomas, se tienen que aumentar los niveles de dopamina en el SNC. Para ello no basta con la administración de dopamina, ya que ésta no atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) pero, en cambio, la L-DOPA, que es el precursor biosintético de la dopamina, sí que la atraviesa. La L-DOPA se transforma en dopamina gracias a la acción de la L-aminoácido aromático descarboxilasa (**DOPA-descarboxilasa, DDC**).



Esta DCC existe a nivel central y a nivel periférico, por lo que para emplear la L-DOPA en el tratamiento del Parkinson, es necesario inhibir la DDC periférica, consiguiendo así que una mayor cantidad de L-DOPA pase al SNC. Además, el aumento de dopamina a nivel periférico produce la aparición de efectos secundarios. Los inhibidores de la DDC más estudiados y conocidos son la carbidopa, la benserazida, el  $\alpha$ -fluorometildopa y el  $\alpha$ -difluorometildopa.

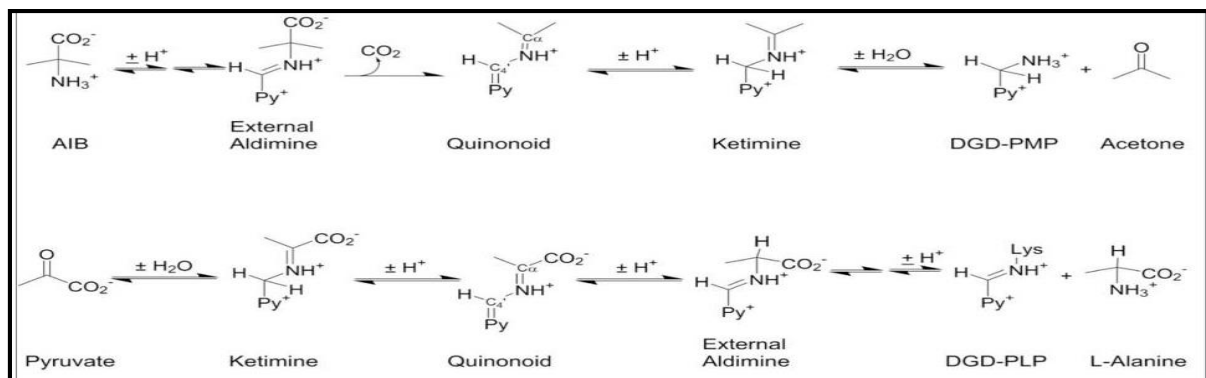
Cogiendo como ejemplo a la carbidopa, observamos en la Figura 13 cómo se une covalentemente al PLP originando una hidrazona que es más estable que la imina que forma el sustrato natural<sup>24,25</sup>.



**Figura 13.** Inhibición de DOPA-descarboxilasa por Carbidopa.

Una enzima PLP dependiente bastante interesante es la **Dialkylglycina descarboxilasa (DGD)**, debido a su inusual especificidad de la reacción dual, pues en una primera parte de la

reacción se lleva a cabo una descarboxilación y, en la segunda mitad, una transaminación. El sustrato es el ácido aminoisobutírico, el cual pierde una molécula de CO<sub>2</sub> en la descarboxilación. Este CO<sub>2</sub> perdido de C<sub>α</sub> no se reemplaza, sino que se añade un protón a C<sub>4'</sub> para producir una cetimina intermedia que, por hidrólisis, da lugar a la forma fosfato de piridoxamina (PMP) de la enzima. En la segunda parte de la reacción se produce una transaminación clásica donde la forma PMP se convierte de nuevo en la forma PLP y se obtiene L-alanina, gracias a la reacción de PMP con piruvato ( $\alpha$ -cetoácido) [Figura 14]. Por lo tanto, la DGD cataliza la rotura de un enlace C-C en la primera mitad de la reacción y la transferencia de protones en la segunda parte<sup>7, 26, 27</sup>.

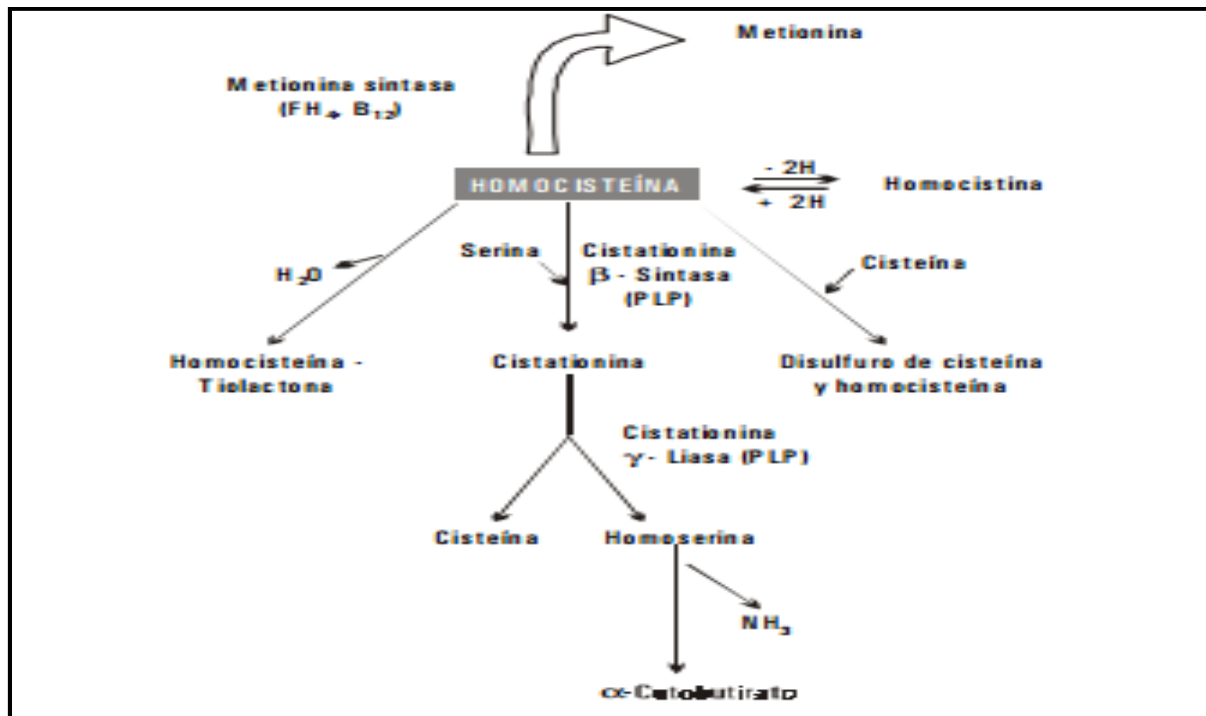


**Figura 14.** Reacción de descarboxilación y transaminación catalizada por la Dialkylglycina descarboxilasa.

Para este enzima se sintetizó una serie de inhibidores de los cuales dos resultaron ser de unión lenta [(R) -1-amino-1-metilpropanofosfonato y (S) -1-aminoetanofosfonato]. Su capacidad de inhibición radica en que estos inhibidores cuentan con un grupo fosfonato, mimético del grupo carboxilato del sustrato original, que se une al sitio activo compitiendo con éste último<sup>7</sup>.

Respecto a los *descubrimientos más novedosos* del PLP nos encontramos con su relación con el metabolismo de la homocisteína y su implicación en el carcinoma hepatocelular (HCC). La homocisteína es un aminoácido azufrado caracterizado por la presencia de un grupo tiol libre que metabólicamente se origina a partir de la metionina exclusivamente. Es por tanto, la única vía de obtención pues no está presente en la proteínas de la dieta. La homocisteína se metaboliza fundamentalmente a través de 2 vías: la remetilación y la transulfuración. Es en esta última en la que más implicación tiene el PLP. La vía de transulfuración<sup>28</sup> es una alternativa en el caso de que no se necesite recuperar metionina porque esté en alta concentración en el organismo, que permite la síntesis del aminoácido cisteína. La secuencia de reacciones de esta vía se representa en la Figura 15<sup>29</sup>. La reacción catalizada por la

cistationina  $\beta$ -sintetasa (CBS) requiere como cofactor al PLP y se encarga de formar cistationina a partir de la condensación de homocisteína con serina. Posteriormente, por la acción de la cistationina- $\gamma$ - liasa (sistema PLP dependiente), la cistationina se escinde en cisteína y homoserina, y ésta en  $\alpha$ - cetobutirato<sup>30</sup>.



**Figura 15.** Vía de transulfuración de la homocisteína.

Por tanto, debido a la participación del PLP en esta vía de transulfuración se asocia una deficiencia en vitamina B<sub>6</sub>, y en consecuencia, una reducción de la disponibilidad de PLP con un acúmulo de homocisteína en plasma y una menor generación de cisteína. Además, una concentración baja de PLP en plasma implicaría una reducción del papel antioxidante indirecto del propio PLP. La cisteína es un sustrato importante en la síntesis de glutatión (GSH), el cual es un regulador clave en las reacciones antioxidantes y, como ya se ha explicado anteriormente, la cantidad de cisteína se reduciría con una concentración de PLP baja. En cambio, la concentración de homocisteína aumentaría y su oxidación puede producir radicales libres de oxígeno que pueden dañar al ADN.

A raíz de estos acontecimientos, se ha sugerido el déficit de PLP como factor de riesgo de desarrollo de carcinoma hepatocelular en lugar de una consecuencia, aunque el mecanismo por el cual el bajo nivel de vitamina B<sub>6</sub> afecta a la progresión del tumor y a la oncogénesis del HCC no se ha establecido claramente. En un estudio donde se compararon sujetos con HCC y sujetos sanos se observó que en los primeros los niveles de indicadores de estrés oxidativo fueron mayores que en los segundos y, en cambio, la actividad de las enzimas antioxidantes

en plasma fueron menores en los pacientes con HCC. Se observó también que los pacientes con HCC tenían menor nivel de PLP en plasma por lo que se llegó a la hipótesis de que si estos pacientes con HCC tienen un mayor nivel de homocisteína plasmática y de estrés oxidativo y su capacidad antioxidante está disminuída esto podría agotar el uso y el movimiento metabólico de PLP en plasma y disminuir las reservas hepáticas de PLP. En este estudio se vio que la administración de 50 mg / d de un suplemento de vitamina B<sub>6</sub> redujo significativamente la concentración de homocisteína plasmática, lo que mejora la capacidad antioxidante total en pacientes con HCC que acaban de sufrir una resección tumoral<sup>31,32</sup>.

### **La deficiencia de PLP es considerada un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares.**

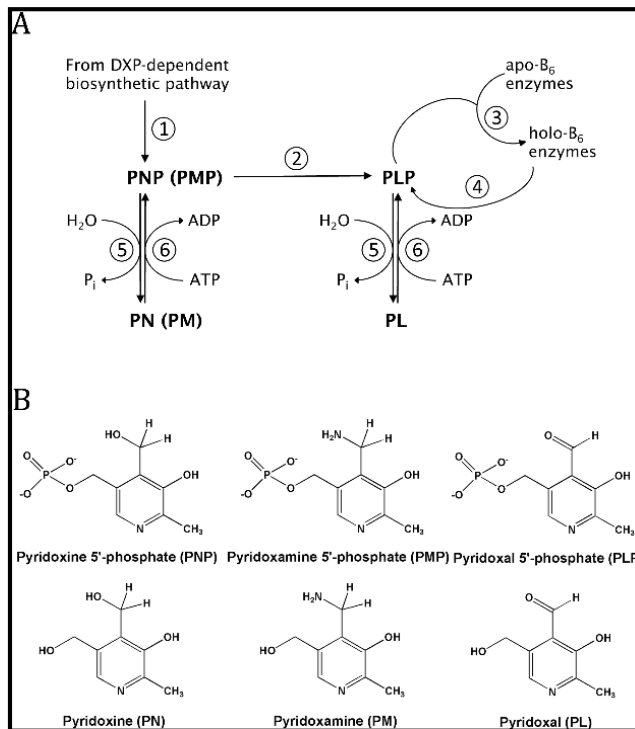
El estrés, la inflamación y demás factores clínicos influyentes pueden aumentar la utilización y el metabolismo del PLP disminuyendo las reservas corporales. En pacientes crónicos y críticamente enfermos (los cuales tienen mayor riesgo de estrés y de inflamación), una lesión o aparición de complicaciones puede conducir a una producción exacerbada de radicales libres, iniciando el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS). En un estudio se observó que en personas con SRIS existe una deficiencia de PLP que se correlaciona con la hiperhomocisteinemia (recordemos que la hiperhomocisteinemia es causada por una baja disponibilidad de PLP), independientemente del estado antioxidante (que también se encuentra bajo). Esta hiperhomocisteinemia constituye un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular. Como resultado de este estudio, donde se comparó un grupo de pacientes críticos con SRIS con un grupo de personas sanas, se obtuvo que los pacientes con deficiencia de PLP presentar unas seis veces más riesgo de enfermedades cardiovasculares que los que no tienen deficiencias<sup>33</sup>.

### **Síntesis de PLP**

En los sistemas vivos hay tres enzimas conocidas que catalizan la producción de PLP: PNP oxidasa<sup>37,38</sup>, PL quinasa y la sintasa de PLP. La primera está presente en procariotas y eucariotas; la segunda también está ampliamente distribuida en la naturaleza<sup>37, 39</sup> y la sintasa de PLP se encuentra en plantas y muchos microorganismos<sup>40, 41</sup>.

En la Figura 16 se muestran las reacciones clave para mantener los niveles de PLP en la célula. En la Reacción 1 se obtiene piridoxina 5'fosfato (PNP) gracias a las enzimas implicadas en su novobiosíntesis; en la Reacción 2, PNP se convierte en PLP por la enzima PNP flavina oxidasa. Este PLP se suma al apoenzima B-<sub>6</sub>, pasando a formar el holoenzima B-

6 (Reacción 3), que tiene actividad catalítica. Este holoenzima se degrada en aminoácidos y PLP (Reacción 4), y este último se convierte en piridoxal (PL) por medio de fosfatasa celulares (Reacción 5). El PL formado es fosforilado nuevamente a PLP por la quinasa de piridoxal (PL quinasa) (Reacción 6). Para esa PL quinasa, la piridoxina y piridoxamina también son sustratos (Reacción 6). La ruta de recuperación la constituyen PL quinasa, PNP oxidasa y la PLP fosfatasa.



**Figura 16.** Reacciones de síntesis y mantenimiento de PLP en la célula.

## CONCLUSIONES

El piridoxal fosfato es una molécula clave a la hora de intentar intervenir en los procesos bioquímicos. La importancia de su investigación radica en la gran ubicuidad que posee y la gran participación en los diversos sistemas enzimáticos. Con este trabajo se demuestra la gran relevancia que tiene en reacciones fundamentales y más estudiadas como es la transaminación, así como su potencial importancia en estudios más novedosos como lo es su correlación con la hiperhomocisteinemia. Su implicación en algunas enfermedades como el carcinoma hepatocelular ha supuesto la necesidad de control de sus niveles y su acción, así como de las enzimas con las que coopera. Esto a su vez convierte a sus inhibidores en piezas clave, y por tanto, no hay que descartar que futuros inhibidores jugarán un papel primordial a la hora de tratar enfermedades tan complejas como son las relacionadas con el sistema neurológico o el sistema cardiovascular.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Kennedy DO. B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy - A Review. *Nutrients*. [Internet]. 2016 (Citado 11 Abr 2016); 8 (2): 68. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4772032/#B15-nutrients-08-00068>
2. Lab Toney [Sede Web]. California: Michael D Toney; [acceso 11 de Abril de 2016]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/mdtoneylab/research/pyridoxal-phosphate-enzymes>
3. Toney MD. Controlling reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Biochim Biophys Acta*. [Internet]. 2011 (Citado 11 Abr 2016); 1814 (11): 1407-18. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3359020/>
4. Jansonius, J. N. Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Curr Opin Struct Biol*. [Internet]. 1998 (Citado 11 Abr 2016); 8 (6): 759-69. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9914259>
5. David L. Nelson, Michael M. Cox. *Lehninger. Principios de Bioquímica*. 5ª ed. Barcelona: Ediciones Omega, S.A; 2009, 676.
6. Richard B. Silverman. *The Organic Chemistry of drug Design and Drug Action*. 3ª ed. California: Academic Press; 2014, 178.
7. Toney MD. Controlling reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Biochim Biophys Acta – Proteins and Proteomics*. [Internet]. 2011 (Citado 12 Abr 2016); 1814 (11): 1407-18. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3359020/>
8. Banks MA, Persily GL. Campus perspective on the National Institutes of Health public access policy: University of California, San Francisco, library experience. *J Med Libr Assoc*. [Internet]. 2010. (Citado 12 Abr 2016); 98 (3): 256-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3359020/>
9. Eliot AC, Kirsch JF. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu Rev Biochem*. 2004; 73: 383-514.
10. Palcic, M. M.; Floss, H. G. Conformation and stereochemistry of free and bound pyridoxal phosphate and its derivatives. In: *Vitamin B6 pyridoxal phosphate, chemical, biochemical, and medicinal aspects. Part A*. Ed. Wiley-Interscience, New York, **1986**.
11. Martell AE. Vitamin B6 catalyzed reaction of  $\alpha$ -amino and  $\alpha$ -keto acids: model systems. *Acc Chem Res*. 1989; 22 (4): 115-24.
12. Rao NA, Talwar R, Savithri HS. Molecular organization, catalytic mechanism and function of serine hydroxymethyltransferase - a potential target for cancer chemotherapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000; 32 (4): 405-16.
13. Phillips AT, Wood WS. The mechanism of action of 5'-adenylic acid-activated threonine dehydrase. *J Biol Chem*. [Internet]. 1965 (Citado 14 Abr 2016); 240 (12): 4703-9. Disponible en: <http://www.jbc.org/content/240/12/4703.full.pdf>
14. [Dolphin, D.; Poulson, R.; Avramovic, O. In: *Vitamin B6 pyridoxal phosphate, chemical, biochemical, and medicinal aspects. Part A and B*. Ed. Wiley-Interscience, New York, **1986**.
15. Cook PF. Alpha,beta-elimination reaction of O-acetylserine sulfhydrylase. Is the pyridine ring required? *Biochim Biophys Acta*. 2003; 11; 1647 (1-2): 66-9.

16. Palcic, M. M.; Floss, H. G. Conformation and stereochemistry of free and bound pyridoxal phosphate and its derivatives. In: *Vitamin B6 pyridoxal phosphate, chemical, biochemical, and medicinal aspects. Part.* Ed. Wiley-Interscience, New York, **1986**.
17. Werner Müller-Esterl. Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida. Barcelona: Reverté, S.A; 2008.
18. Freeman M. Reconsidering the effects of monosodium glutamate: a literature review. *J Am Acad Nurse Pract.* 2006; 1 (10): 482-6. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986115301028>
19. Milano T, Paiardini A, Grgurina I, Pascarella S. Type I pyridoxal 5'-phosphate dependent enzymatic domains embedded within multimodular nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase assembly lines. *BMC Struct Biol.* [Internet]. 2013. (Citado 15 Abr 2016); 13:26. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3870968/>
20. Richard B. Silverman. *The Organic Chemistry of drug Design and Drug Action.* Londres: Academic Press Limited; 1992, 190-196
21. Afzal Azam M, Jayaram U. Inhibitors of alanine racemase enzyme: a review. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016; 31 (4): 517-26.
22. Prosser GA, de Carvalho LPS. Kinetic mechanism and inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* D-alanine: D-alanine ligase by the antibiotic D-cycloserine. *FEBS Journal.* [Internet] 2013. (Citado 16 Abr 2016); 280 (4): 1150-66. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.12108/full>
23. Calvo J, Martínez-Martínez L. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* [Internet] 2009 (Citado 16 Abr 2016); 27 (1): 44-52. Disponible en: [http://apps.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet? f=10&pident\\_articulo=13132723&pident\\_usuario=0&pcontactid=&pident\\_revista=28&ty=94&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=28v27n01a13132723pdf001.pdf](http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet? f=10&pident_articulo=13132723&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=28&ty=94&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=28v27n01a13132723pdf001.pdf)
24. Hinz M, Stein A, Cole T, McDougall B, Westaway M. Parkinson's disease managing reversible neurodegeneration. *Neuropsychiatr Dis Treat.* [Internet]. 2016 (Citado 16 Abr 2016); 12: 763-75. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4827589/>
25. Montioli R, Voltattorni CB, Bertoldi M. Parkinson's Disease: Recent Updates in the Identification of Human Dopa Decarboxylase Inhibitors. *Curr Drug Metab.* [Internet] 2016. (Citado 18 Abr 2016); 17 (5): 513-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27025882>
26. Taylor JL, Price JE, Toney MD. Directed evolution of the substrate specificity of dialkylglycine decarboxylase. *Biochim Biophys Acta.* [Internet]. 2015 (Citado 18 Abr 2016); 1854 (2):146-55. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4334570/>
27. Milano T, Paiardini A, Grgurina I, Pascarella S. Type I pyridoxal 5'-phosphate dependent enzymatic domains embedded within multimodular nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase assembly lines. *BMC Struct Biol.* [Internet]. 2013 (Citado 18 Abr 2016); 13:26. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3870968/>
28. De Luis DA, Fernández N, Aller R. Homocisteína, metabolismo y determinantes higienicodietéticos. *Endocrinol Nutr.* [Internet]. 2004 (Citado 19 Abr 2016); 51 (8): 458-63. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-articulo-homocisteina-metabolismo-determinantes-higienicodieteticos-13067693>

29. Menéndez Cabezas A, Fernández- Britto Rodríguez JE. Metabolismo de la Homocisteína y su Relación con la Aterosclerosis. *Rev Cubana Invest Biomed.* [Internet]. 1999 (Citado 19 Abr 2016); 18 (3): 155-68. Disponible en:  
[http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol18\\_3\\_99/ibi01399.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol18_3_99/ibi01399.pdf)
30. Gregory JF, De Ratt BN, Rios-Avila L, Ralat M, Stacpoole PW. Vitamin B6 nutritional status and cellular availability of pyridoxal 5'-phosphate govern the function of the transsulfuration pathway's canonical reactions and hydrogen sulfide production via side reactions. *Biochimie.* [Internet]. 2016 (Citado 20 Abr 2016); 4. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030090841600002X>
31. Cheng S-B, Lin P-T, Liu H-T, Peng Y-S, Huang S-C, Huang Y-C. Vitamin B-6 Supplementation Could Mediate Antioxidant Capacity by Reducing Plasma Homocysteine Concentration in Patients with Hepatocellular Carcinoma after Tumor Resection. *BioMed Res Int.* [Internet]. 2016. (Citado 20 Abr 2016); 2016:7658981. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4804082/>
32. Whittaker JW. Intracellular trafficking of the pyridoxal cofactor. Implications for health and metabolic disease. *Arch Biochem Biophys.* [Internet]. 2016. (Citado 20 Abr 2016); 2016; 15 (592): 20-6.  
Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986115301028>
33. [Molina López J](#), [Florea D](#), [Quintero Osso B](#), [de la Cruz AP](#), [Rodríguez Elvira M](#), [Del Pozo EP](#). Pyridoxal-5'-phosphate deficiency is associated with hyperhomocysteinemia regardless of antioxidant, thiamine, riboflavin, cobalamine, and folate status in critically ill patients. *Clin Nutr.* [Internet]. 2016. (Citado 21 Abr 2016); 2016; 35 (3): 706-12.  
Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261561415001363>
34. Nematollahi A, Sun G, Harrop SJ, Hanrahan JR, Church WB. Structure of the PLP-Form of the Human Kynurenine Aminotransferase II in a Novel Spacegroup at 1.83 Å Resolution. *Int J Mol Sci.* [Internet]. 2016 (Citado 21 Abr 2016); 17 (4): 446. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848902/>
35. [Szalardy L](#), [Zadori D](#), [Toldi J](#), [Fulop F](#), [Klivenyi P](#), [Vecsei L](#). Manipulating kynurenic acid levels in the brain - on the edge between neuroprotection and cognitive dysfunction. *Curr Top Med Chem.* 2012; 12 (16): 1797-806.
36. Reyes Ocampo J, Lugo Huitrón R, González-Esquivel D, et al. Kynurenines with Neuroactive and Redox Properties: Relevance to Aging and Brain Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* [Internet]. 2014 (Citado 22 Abr 2016); 2014: 646909. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3945746/>
37. McCormick DB, Chen H (1999) Update on interconversions of vitamin B-6 with its coenzyme. *J Nutr.* [Internet]. 1999 (Citado 30 Abr 2016); 129 (2): 325-7. Disponible en:  
<http://jn.nutrition.org/content/129/2/325.long>
38. Safo MK, Mathews I, Musayev FN, di Salvo ML, Thiel DJ, et al. X-ray structure of Escherichia coli pyridoxine 5'-phosphate oxidase complexed with FMN at 1.8 Å resolution. *Structure.* 2000; 15; 8 (7): 751-62.
39. Safo MK, Musayev FN, di Salvo ML, Hunt S, Claude JB, et al. Crystal structure of pyridoxal kinase from the Escherichia coli pdxK gene: Implications for the classification of pyridoxal kinases. *J Bacteriol.* [Internet]. 2006 (Citado 1 May 2016); 188 (12): 4542-52. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1482971/>
40. Fitzpatrick TB, Moccand C, Roux C. Vitamin B6 biosynthesis: Charting the mechanistic landscape. *Chembiochem.* 2010; 14; 11 (9): 1185-93.
41. Ghatge MS, Contestabile R, di Salvo ML, Desai JV, Gandhi AK, et al. Pyridoxal 5'-Phosphate Is a Slow Tight Binding Inhibitor of E. coli Pyridoxal Kinase. *PLoS ONE.* [Internet]. 2012 (Citado 2 May 2016); 7(7): e41680. Disponible en:  
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0041680>

