

"Es importante tener buenos descendientes, pero la gloria pertenece a nuestros antepasados"

Plutarco

9.1 INTRODUCCIÓN

Toda mujer sabe, cuando es madre, que el hijo es suyo porque ha salido de su propio cuerpo. El hombre primitivo tardó algún tiempo en darse cuenta de que él desempeñaba un papel importante en la creación de un hijo. Una vez que se comprendió el concepto de la paternidad, la familia adquirió un nuevo significado. Un niño ya no era algo que le llegaba inexplicablemente a una mujer; también formaba parte del hombre, era el fruto vivo y rejuvenecido de su cuerpo.

Muchos hijos se parecían visiblemente al padre, señal inequívoca de que el marido de la madre era el padre de la criatura. De este reconocimiento a pensar que el hijo debía heredar también las cualidades del padre, no hubo más que un paso. Era lógico que la dignidad real pasara de padre a hijo.

Esta noción dio origen a fenómenos tales como el culto a los antepasados, aristocracias, sistemas de castas y hasta racismo.

La noción de herencia, la transmisión de cualidades de padres a hijos y todo aquello que pudiera explicar razonablemente la ma-

ñera en que se produce esta transmisión de características, fue forzosamente del mayor interés e importancia.

Hasta la década de los 60 del siglo pasado fue cuando empezaron a hacerse observaciones exactas, minuciosamente anotadas y estudiadas. El hombre que las realizó era un monje agustino, Gregorio Mendel. De aquellos experimentos se sacaron unas conclusiones simples que ahora se conocen como las *leyes mendelianas de la herencia*.

Cuando estas leyes, obtenidas en chícharos, se aplicaron al género humano, se dedujo que ambos progenitores, hombre y mujer, contribuían a la herencia en partes iguales. Cada uno contribuía con *un factor* para cada característica física (color de ojos, forma de la nariz, estatura, etc.)

A principios del siglo XX se dio a esos factores el nombre de *genes*, y a la ciencia que trata de la manera en que se heredan los genes se le llamó *genética*.

En 1946, la obra del célebre físico teórico Erwin Schrodinger, *¿Qué es la vida?* proponía, de una manera muy elegante que los genes eran los componentes clave de las células vivas. Cuando Schrodinger escribió

- La numeración de los átomos de carbono del azúcar, lleva una corcheta para diferenciarlo de la numeración de los carbonos de la base.
- El enlace base-azúcar se lleva a cabo entre el N9 de la purina, o el N1 de la pirimidina, con el C1 del azúcar; el enlace es P-glucosídico.
- Los desoxirribonucleósidos se estructuran de la misma manera que los ribonucleósidos, sólo que el azúcar es la 2-desoxirribosa.
- El nombre de los ribonucleósidos está dado por el nombre de la base que lo forma y la terminación "osina", si la base es purínica, o la terminación "idina" si la base es pirimidínica (tabla 9.1). Si es un desoxirribonucleósido, al nombre del nucleósido se antepone el prefijo "desoxi" o "2-desoxi" o simplemente la letra d-, por ejemplo, desoxiadenosina, desoxicitidina, d-citidina.

Tabla 9.1

Nomenclatura de los nucleósidos.

Adenina	Adenosina
Guanina	Guanosina
Hipoxantina	Inosina
Citosina	Citidina
Uracilo	Uridina
Timina	Timidina

- Existen análogos de nucleósidos en los cuales el azúcar es arabinosa en lugar de ribosa. Se conocen la arabinosil adenina (ara A) y arabinosil citosina (Ara C). Ambos se utilizan como anti-neoplásicos y anti virales.

Nucleótidos

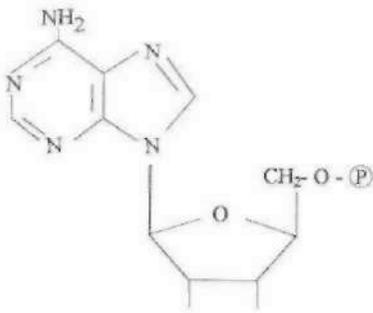
Si se hace reaccionar un nucleósido con ácido fosfórico, se forma un *nucleótido*. Si

el fosfato reacciona con un ribonucleósido, se formará un *ribonucleótido*; si reacciona con un desoxirribonucleósido, dará origen a un *desoxirribonucleótido* (Figura 9.11).

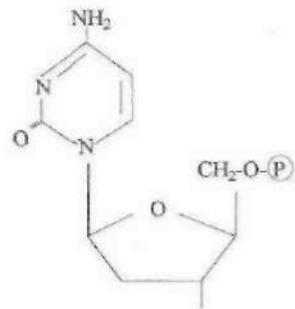
Sobre la estructura de los nucleótidos que forman parte de los ácidos nucleicos, hay que hacer notar lo siguiente:

- La relación que existe entre base nitrogenada y azúcar es la misma que se da en los nucleósidos.
- El fosfato reacciona con el hidroxilo (-OH) del C5 del azúcar a través de un enlace tipo éster. El fosfato puede reaccionar con otros hidroxilos del azúcar.
- Los dos hidrógenos restantes del fosfato quedan libres, pueden disociarse ya que su pKa son 1.0 y 6.2 respectivamente, confiriéndole dos cargas negativas a la molécula.
- Como el nucleótido tiene carácter ácido por el fosfato, su nombre está dado por el nucleósido del que proviene y la terminación "ico", anteponiendo la palabra ácido, por ejemplo, ácido adenílico, ácido guanílico, etc.
- Otro nombre que frecuentemente se les da, es aquel que adquieren del nucleósido del cual proviene y la terminación monofosfato, ya que son nucleósidos fosfatados, por ejemplo, adenosín monofosfato (AMP), guanósín monofosfato (GMP), etc.
- Al nombre del nucleótido se le antepone el prefijo desoxi, a la letra d, si es un desoxicitidín monofosfato (dCMP).
- Los niveles de desoxirribonucleótidos fluctúan mucho durante el ciclo celular, en contraste con los ribonucleótidos cuyos niveles permanecen constantes.

En ocasiones, uno o dos fosfatos más pueden reaccionar con el fosfato de un nucleótido, a través de sus hidroxilos ácidos por



Ribonucleótido de adenina
(Acido adenílico)



Desoxirribonucleótido de citosina
(Acido citidílico)

Figura 9.11. Estructura de nucleótidos de adenina y citosina.

medio de enlaces anhídrido de alta energía (~) (Figura 9.12).

Sobre estos compuestos hay que hacer notar lo siguiente:

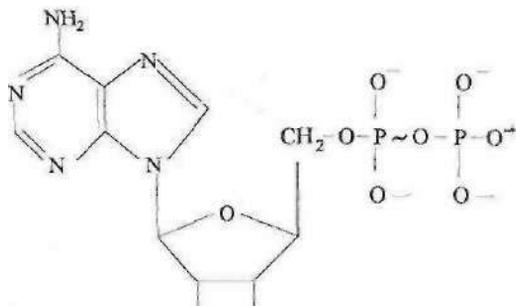
- Los fosfatos se nombran con letras del alfabeto griego para diferenciarlos: alfa, beta y gama. Alfa es el más cercano al azúcar, gama el distal.
- Estos compuestos se consideran nucleótidos mono o difosfato o bien, nucleósidos di o trifosfato, respectivamente.
- Los hidrógenos de los nucleósidos di o trifosfato pueden estar disociados y dan a la molécula una gran densidad de carga negativa.
- Estos nucleósidos di y trifosfato toman su nombre del nucleósido del cual provienen agregando la palabra difosfato o trifosfato, respectivamente, por ejemplo, citidín difosfato (CDP), guanosín trifosfato (GTP), etc.
- Al nombre anterior se antepone el prefijo "desoxi" si se trata de un desoxirribonucleósido di o trifosfato, por ejemplo, desoxiadenosín trifosfato (dATP), etc. Aunque el timidín trifosfato (TTP) generalmente se asocia con

desoxirribosa al integrar el DNA, puede encontrarse como ribonucleósido en el RNA.

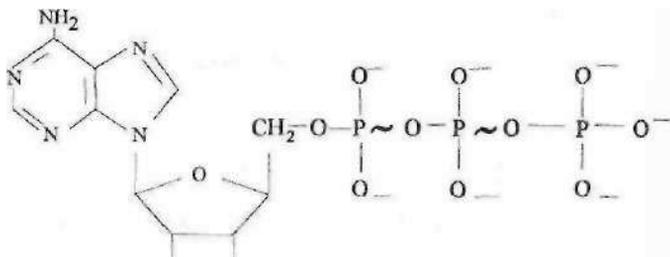
9.2.2 Nucleótidos de importancia biológica

No obstante que una de las funciones más significativas de los nucleótidos es su papel estructural en los ácidos nucleicos, puesto que son las unidades monoméricas tanto del DNA como del RNA, no es menos importante su intervención en el metabolismo celular.

El ATP es sin duda el nucleótido más abundante en las células y representa la reserva energética del organismo. El CTP y UTP actúan como portadores de intermediarios metabólicos; por ejemplo, el CDP-colina y el UDP-glucosa. El AMPc y GMPc actúan como segundos mensajeros hormonales y nerviosos. El NAD, FAD y la coenzima A funcionan como coenzimas de reacciones enzimáticas importantes. En la tabla 9.2 se muestran las acciones metabólicas de algunos nucleótidos.



Adenosín difosfato (ADP)



Adenosín trifosfato (ATP)

Figura 9.12. Estructura de nucleótidos mono y difosfato.

De lo anterior se puede concluir que:

- Con excepción de los nucleótidos cíclicos: AMPc y GMPc, que transportan información, todos los demás transportan grupos químicos o moléculas completas.
- Los nucleótidos más versátiles en su función son los de adenina.
- Los nucleótidos de citosina están relacionados con procesos biosintéticos de fosfolípidos y los de uracilo para carbohidratos.
- La coenzima A (CoA-SH) transporta grupos acilo, tanto en procesos degradativos (beta-oxidación) como biosintéticos (ácidos grasos, colesterol, acetilcolina, etc.)
- Existen enzimas que activan moléculas, anexándoles un radical químico, como es el caso del fosfato por ATP o GTP, aunque hay algunas excepciones.
- Otras coenzimas activan moléculas uniéndose a ellas, como es el caso de la coenzima, A, UTP y CTP; esta unión puede requerir energía, como es el caso de la coenzima A pero no en el de UTP.

El ATP es el donador universal de energía. Esto significa que funciona como donador de energía tanto para organismos unicelulares como pluricelulares, animales o vegetales. El GTP se utiliza en forma más limitada en reacciones muy específicas como son:

Tabla 9.2
Función metabólica de algunos nucleótidos

Nucleótido	Función
ATP (Adenosín trifosfato)	Transporta y cede fosfatos y energía.
AMPc (Adenosín monofosfato cíclico)	Segundo mensajero en señales hormonales y nerviosas.
S- Adenosil metionina	Transporta y cede grupos metilo
Coenzimas A (CoA-SH)	Transporta y cede grupos acilo
FAD, NAD, NADP	Transporta hidrógenos
GTP (Guanosín trifosfato)	Transporta y cede fosfatos y energía.
GMPc (Guanosín monofosfato cíclico)	Segundo mensajero hormonal y nervioso
CTP (Citidín trifosfato)	Transporta moléculas necesarias para la síntesis de fosfolípidos
UTP (Uridín trifosfato)	Transporta moléculas para la síntesis de oligo y polisacáridos
ADP (Adenosín difosfato)	Agregación plaquetaria

- a) La conversión de piruvato a fosfoenolpiruvato en la gluconeogénesis. Esta reacción no se lleva a cabo directamente sino a través de la conversión previa de piruvato en oxalacetato y éste en fosfoenolpiruvato con gasto de energía del GTP.
- b) En mitocondrias existe una tiocinasa (acil-CoA sintetasa) que utiliza GTP para activar ácidos grasos.
- c) En la biosíntesis de proteínas se utiliza el GTP para formar el complejo ribosomal de iniciación 70s para la entrada del aminoacil al sitio A del ribosoma y para la translocación del peptidil del sitio A al P.

El AMPc y el GMPc (Figura 9.13) que se forman por efecto de la adenilato ciclasa y la guanilato ciclasa, sobre los respectivos nucleósidos trifosfato, actúan como segundos mensajeros de la actividad hormonal y nerviosa. Estos nucleótidos cíclicos son inactivados por fosfodiesterasas (PDE). Las metilxantinas teofilina y cafeína inhiben a estas enzimas por lo que actúan en forma si-

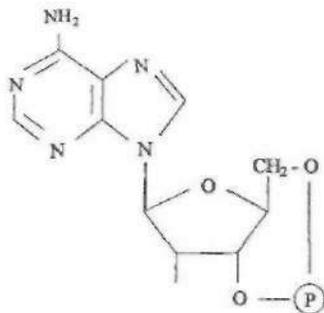
nérgica con algunas hormonas o con neurotransmisores. El AMPc es el segundo mensajero de las siguientes hormonas: adrenalina, glucagón, antidiurética, tiroxina, tirotrófica, estimulante de melanocitos y luteinizante.

La toxina del cólera producida por el *Vibrio cholerae* estimula la adenilato ciclasa intestinal, y el aumento de AMPc afecta el transporte de los iones por las células del epitelio intestinal.

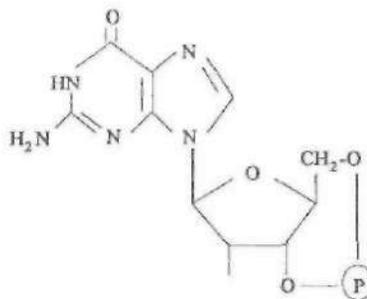
La coenzima A activa a los grupos acilo que son conducidos a rutas biosintéticas o bien a rutas degradativas.

El FAD, NAD⁺ y NADP⁺ son dinucleótidos y en todos ellos participa un nucleótido de adenina (Figura 9.14). En el NAD⁺ y NADP⁺ el otro nucleótido es de nicotinamida; el NADP⁺ tiene, además, un grupo fosfato en 2' de nucleótido de adenina. En el FAD, el otro nucleótido es de riboflavina.

El FAD y el NAD⁺ intervienen generalmente en procesos de oxidorreducción degradativos; el NADP⁺ en procesos de oxidorreducción biosintéticos (síntesis de colesterol, esteroides, ácidos grasos, etc.). El FAD interviene generalmente cuando la



Adenosin monofosfato
3',5'-cíclico (AMPc)



Guanosin monofosfato
3',5'-cíclico (GMPC)

Fig. 9.13 Estructura de AMP y GMPC.

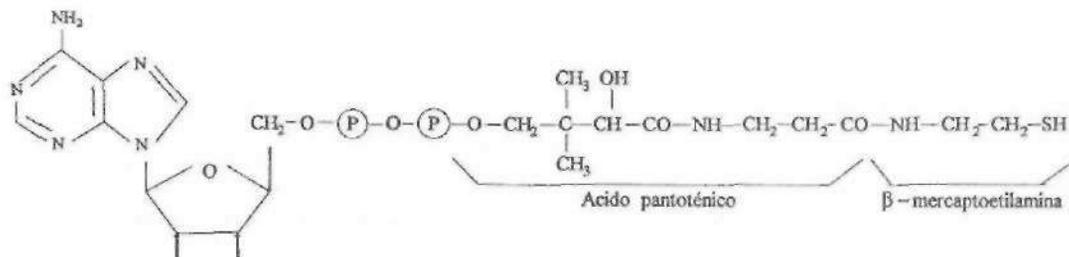


Fig. s/n. Estructura de la coenzima A.

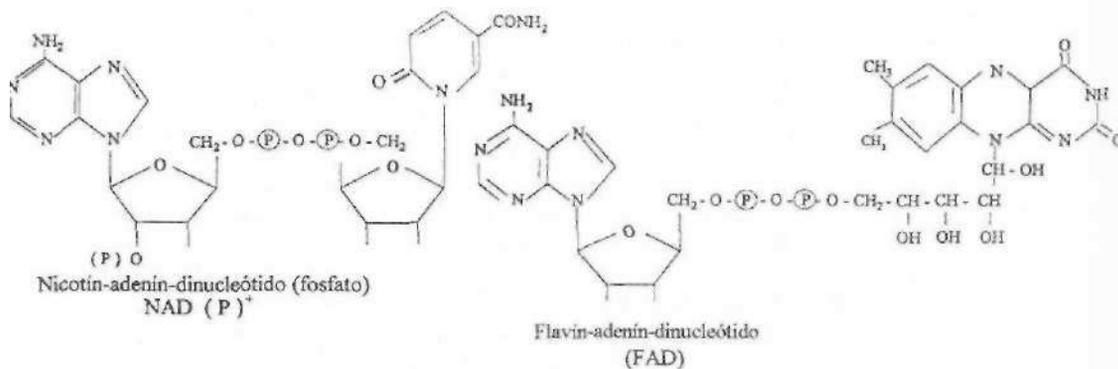


Figura 9.14. Estructura de NAD (P) y FAD.

molécula que se oxida forma doble enlace (P-oxidación, ciclo de Krebs). El NAD^+ interviene en reacciones redox donde un grupo hidroxilo se convierte en cetónico.

La S-adenosil-metionina (Figura 9.15) se forma a partir de ATP y metionina. Participa en reacciones de metilación para síntesis de colina, adrenalina, metilación del RNA y otras.

El CTP participa en la unión de moléculas para formar fosfolípidos (fosfoglicéridos). Cuando el CTP reacciona con la molécula a la que va a activar y que está fosforilada, se forma CDP-molécula más pirofosfato. Cuando el CDP-molécula reacciona con la otra molécula para formar el fosfolípido se produce CMP, pues un fosfato se queda unido al fosfolípido.

Cualquier carbohidrato o derivado de carbohidrato que se una con cualquier otra molécula, ya sea otro carbohidrato para formar un disacárido (lactosa) o polisacárido (glucógeno), o bien un lípido para formar cerebrosidos o gangliósidos, o bien una proteína para formar glicoproteínas, deberá reaccionar previamente con UTP, para lo cual deben estar previamente fosforilados. Cuando el UDP-azúcar o el UDP derivado resultante de la reacción se condensa, se libera UDP

pues en la molécula recién formada no se queda ningún fosfato. Las moléculas que se activan con UTP son: glucosa, glucosamina, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido glucurónico entre otras.

El ácido N-acetilneuramínico (NANA) o ácido siálico que forma parte de los gangliósidos, para unirse a ellos lo hace en forma diferente a los otros carbohidratos. Se une a CTP y no a UDP, y lo hace sin estar fosforilado; se forma CMP-NANA y se libera pirofosfato como producto de la reacción.

9.3 METABOLISMO DE BASES PÚRICAS Y PIRIMIDÍNICAS

Una vez que los ácidos nucleicos en forma de nucleoproteínas llegan al tracto intestinal, son degradados por acción de proteasas. Los polinucleótidos resultantes son luego degradados por nucleasas (DNAsas y RNAsas) del intestino delgado en sus correspondientes nucleótidos. Estos últimos son hidrolizados por nucleotidasas para dar fosfato y nucleósidos de purina y pirimidina. Estos nucleósidos se absorben como tal y luego se degradan en las correspondientes bases y azúcar.

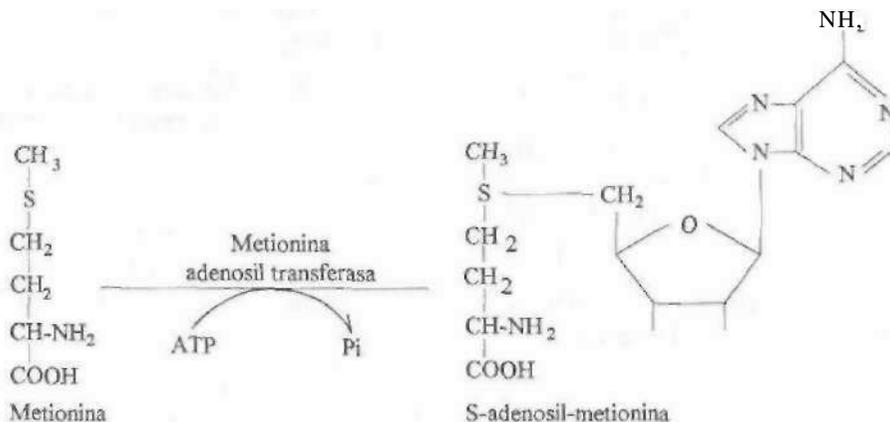


Figura 9.15. Estructura y formación de la S-adenosil-metionina.

A pesar de la existencia en la célula de mecanismos para utilizar purinas y pirimidinas preformadas, la mayoría de las bases usadas para síntesis de ácidos nucleicos son sintetizadas *de novo*. Las purinas de la dieta se excretan como ácido úrico, mientras que las pirimidinas se degradan hasta CO₂ y agua vía beta-alanina y beta-aminoisobutírico. Sin embargo, los nucleótidos o nucleósidos se utilizan más bien para formar ácidos nucleicos (ver Figura 9.16).

9.3.1 Biosíntesis y degradación de nucleótidos de purina

9.3.1.1 Síntesis de purinas

Es evidente que los aminoácidos juegan un papel importante en el metabolismo de

los nucleótidos. Los niveles de glutamina y de aspartato pueden influir en la velocidad de síntesis de nucleótidos purínicos en las células tumorales. El conjunto de reacciones de síntesis de un nucleótido purínico es caro en términos del ATP requerido.

Todas las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de los nucleótidos purínicos se encuentran en el citoplasma celular. No obstante, no todas las células son capaces de realizar la síntesis *de novo* de los nucleótidos purínicos.

Las etapas de formación de purinas comprenden:

- Condensación de ribosa -5-fosfato para dar fosforribosilpirofosfato (PRPP).
- Incorporación del grupo amino del ácido glutámico al PRPP y liberación de pirofosfato. Esta reacción es catali-

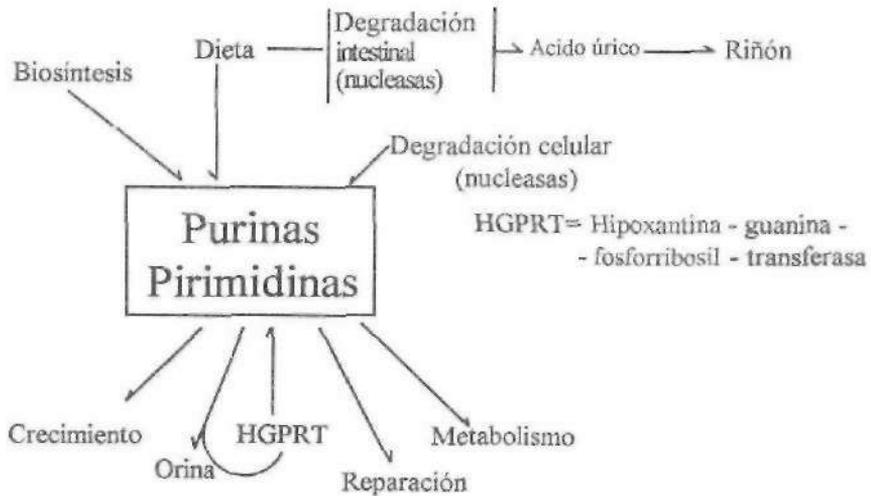


Figura 9.16. Utilización y fuentes de bases púricas y pirimidinas.

zada por la PRPP amidotransferasa y es susceptible de control alosterico por retroalimentación negativa por nucleótidos de purina; la enzima puede faltar en la gota primaria,

- c) Incorporación de glicina y otras sustancias hasta obtener nucleótidos de purina (Figura 9.17).

De la ruta metabólica resumida en la figura 9.17 hay que hacer notar lo siguiente:

- a) La ribosa-5-fosfato es un sustrato importante que proviene del ciclo de las pentosas (ver unidad VI)
- b) La base nitrogenada (púrica) se va conformando a partir de un enlace inicial al carbono 1 de la ribosa-5-fosfato.
- c) El tetrahidrofolato (FH4) cede los átomos de carbono con los cuales se completan los dos anillos que forman el esqueleto de la purina.
- d) El estado de oxidación del tetrahidrofolato no se modifica durante su participación en las reacciones.
- e) Cuando se completa la base púrica, lo que se genera es un nucleótido, ya que la ribosa-5-fosfato está unida desde el principio; no se forman bases púricas libres.
- f) El inosín monofosfato (IMP) es precursor común de AMP y GMP.
- g) La enzima PRPP sintetasa es regulable y sobre ella ejercen efecto inhibitorio AMP, ADP, GMP y GDP.
- h) La enzima PRPP amidotransferasa cataliza la reacción limitante de la vía y también es inhibida alostéricamente por ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, GMP, y además por alopurinol-ribo-sa-fosfato.

Esta ruta resulta bastante larga debido a que, con excepción de la glicina que aporta todos sus átomos, los demás se adicionan uno a uno (Figura 9.18).

En la reacción final de la síntesis de nucleótidos purínicos se forma IMP, el cual se convierte en su casi totalidad en AMP y GMP. Sin embargo, la conversión de IMP en AMP y GMP no tiene lugar al azar. La conversión de IMP a GMP requiere ATP como fuente de energía, mientras que la conversión de IMP a AMP requiere GTP (Figura 9.19).

Por lo tanto, cuando hay suficiente ATP en la célula el IMP se convertirá en GMP y viceversa, cuando hay suficiente GTP el IMP se convierte en AMP. Es conveniente señalar que los mononucleótidos AMP y GMP son fosforilados posteriormente a ATP y GTP respectivamente. La adenilato cinasa cataliza el paso de AMP a ADP con hidrólisis de ATP, pero el ADP formado se fosforila a ATP a través de la *glucólisis* o en la *cadena respiratoria*. Por su parte, el GMP se fosforila a GDP y GTP hidrolizándose una molécula de ATP en cada paso.

Las purinas que resultan de síntesis *de novo*, las que provienen de la dieta y las liberadas por degradación endógena de ácidos nucleicos, pueden seguir cualquiera de estos caminos:

- a) Utilizarse en la síntesis de ácidos nucleicos (ver adelante)
- b) Oxidarse hasta ácido úrico (ver figura 9.21).
- c) Participar en la síntesis de coenzimas

Regulación de la síntesis de purinas

Dado el papel fundamental de los nucleótidos purínicos en la síntesis de ácidos nucleicos, es evidente que su producción debe estar sometida a una fina regulación. Los mononucleótidos IMP, AMP y GMP ejercen una inhibición alostérica (retroinhibición) sobre la *PRPP sintetasa* y sobre la *PRPP amidotransferasa*. La ramificación de la vía a partir de IMP es otra zona de retroinhibición, en la que el AMP inhibe la

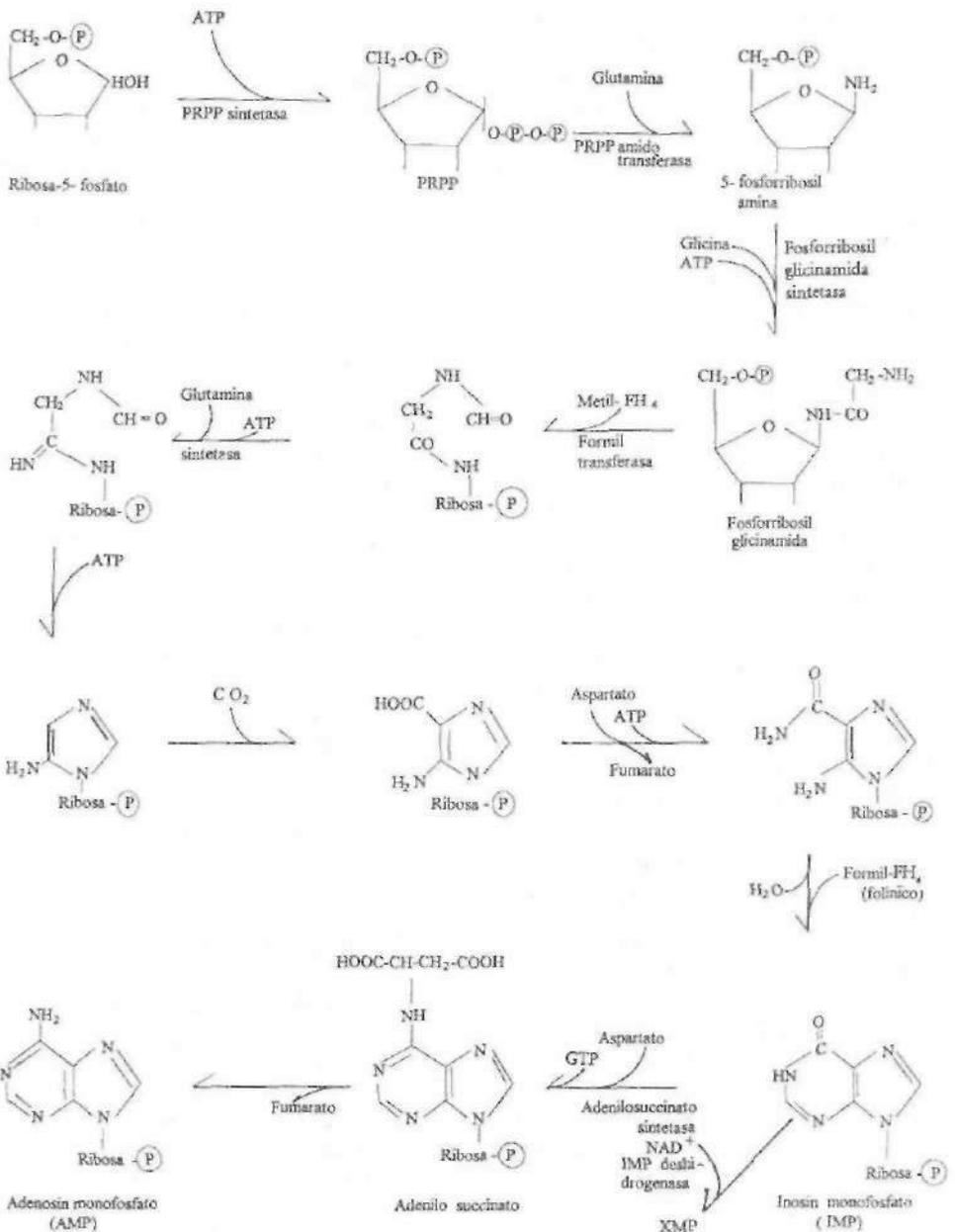


Figura 9.17. Biosíntesis de nucleótidos de purina. FH₄ = tetrahidrofólico; XMP = xantósina monofosfato; PRPP = fosforribosil pirofosfato.

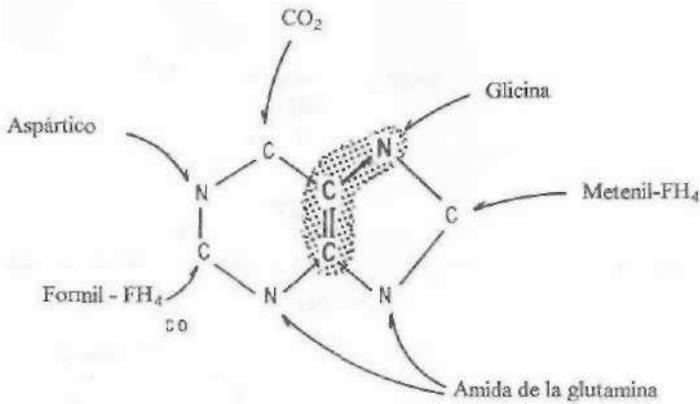


Figura 9.18. Origen de carbonos y nitrógeno del núcleo purínico.

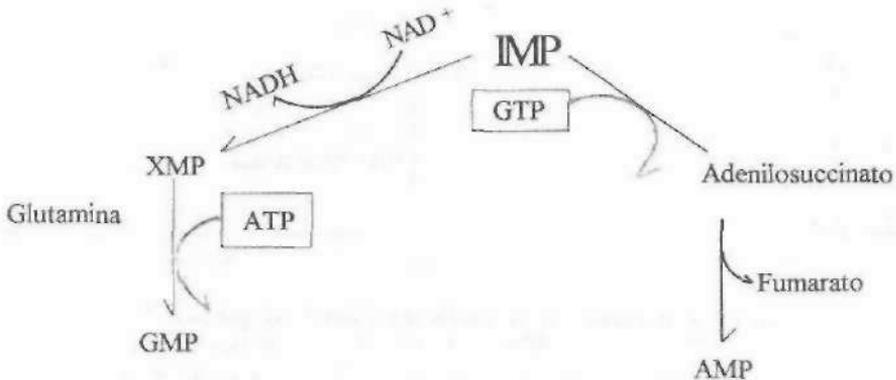


Figura 9.19. Formación de AMP y GMP a partir de IMP.

adenilosuccinato sintetasa y el GMP inhibe la *IMP deshidrogenasa* (Figura 9.20)

9.3.1.2 Degradación y recuperación de purinas

Aún no está claro el modo en que los ácidos nucleicos se descomponen intracelular-

mente. No obstante, los datos disponibles indican que los ácidos nucleicos pueden ser hidrolizados por *endonucleasas* y *exonucleasas*. Los oligo y mononucleótidos son luego degradados a nucleósidos por acción de *fosfomonoesterasas*; los productos son adenosina y guanosina. La adenosina puede ser desaminada a inosina pero no la adenina a hipoxantina; la enzima es la *adenosina de-*

su libro se aceptaba de un modo general que los genes eran moléculas de proteínas.

Durante la segunda mitad del siglo XIX, los biólogos entraron en el "juego" al dedicarse al estudio minucioso de las células. La célula es la unidad de la vida; consta de un protoplasma rodeado de una fina membrana y un cuerpo central llamado *núcleo*. Si una persona sufre de diabetes es porque ciertas células del páncreas dejan de producir una sustancia determinada. Si se comprendiera cómo se transmiten las propiedades y características de las células, se sabría cómo se transmiten las propiedades y características de los organismos.

Hacia 1880, un biólogo alemán, Walther Flemming, descubrió que el núcleo contiene un material que se tiñe de rojo al que llamó *cromatina* (del griego que significa *color*). Durante la división de la célula, la cromatina se aglomera en pares de filamentos llamados *cromosomas*. Cuando la división ha terminado, cada nueva célula tiene un número igual de cromosomas; cada cromosoma forma una réplica de sí mismo y cada nueva célula posee un juego completo de pares de cromosomas, idéntico al que tenía la célula madre.

Parece lógico suponer que las características y funciones de las células están gobernadas por estos cromosomas. ¿Será que los cromosomas pueden también configurar las características de todo un organismo? Después de todo, por grandes y complejos que sean los organismos empiezan su vida siendo una célula. Se inicia el ser humano con una célula fertilizada, unión del óvulo materno y del espermatozoide paterno. La célula espermática consta casi únicamente de cromosomas, veintitrés en total. El óvulo también tiene veintitrés cromosomas. Las células ovulares y espermáticas tienen, por lo tanto, "medios juegos" de cromosomas. Cuando se funden para formar el óvulo fecundado contiene éste veintitrés pares de cromosomas, uno materno y uno paterno de cada par.

Cada cromosoma se compone de una serie de genes, cada uno determina una característica diferente; se calcula que cada cromosoma humano contiene más de 3000 genes.

De esta manera, los progenitores transfieren a su descendencia toda la información (que a su vez recibieron de sus padres) para que dichos descendientes sigan los mismos patrones morfológicos, fisiológicos y moleculares del organismo del cual provienen. De hecho, el organismo recién generado no necesita "aprender" a elaborar todos los sistemas, estructuras o moléculas que han de constituirse, sino que de sus progenitores recibe un cúmulo de información de cómo ha de hacerlos. Esta gigantesca cantidad de información es el mejor legado que los descendientes reciben de sus progenitores y por ello se le conoce como *herencia biológica* o *herencia genética*.

La necesidad de que exista *algo* en lo que se pueda conservar esta información biológica para que luego sea transferida a la nueva generación se entiende si aceptamos que en el pasado remoto del planeta, seres más capaces para sobrevivir surgían por mejoras de organismos predecesores. Es evidente que dichas mejoras deberían conservarse en alguna parte para luego ser transferidas a los descendientes y no se tuviera que comenzar de nuevo a intentar conseguir dichas mejoras en cada generación. De esta manera, las características ventajosas se seleccionan e incrementan, ya que las recién adquiridas, se suman a las ya existentes.

Con esta herencia biológica, los descendientes reciben pues, prácticamente todos los éxitos de millones de años de evolución; millones de años de esfuerzo que la naturaleza ha llevado a cabo, gracias a lo cual, no se necesita volver a andar el largo camino de la escala biológica.

Antecedentes históricos

Hipócrates identificó la intervención de un componente hereditario en distintas en-

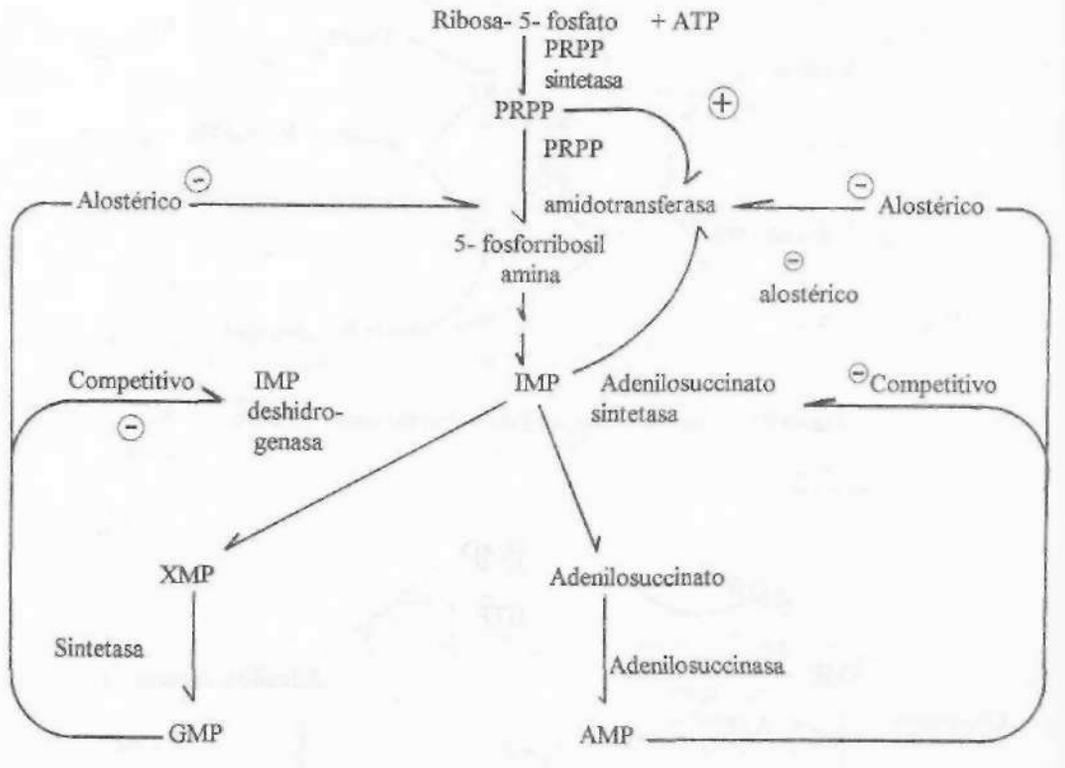


Figura 9.20. Regulación de la síntesis de nucleótidos de purinas.

saminasa. La guanosina y la inosina son degradadas por *nucleósido fosforriasas* liberando las bases y ribosa-1-P o desoxirribosa-1-P. La guanina y la hipoxantina resultantes de la reacción pueden seguir dos caminos: 1) convertirse en sus ribonucleótidos o 2) convertirse en xantina. La oxidación de la hipoxantina a xantina y la oxidación de xantina en ácido úrico están catalizadas por la xantino oxidasa (Figura 9.21), metaloflavoproteína que contiene FAD, molibdeno y también hierro no hemo.

Se han descrito dos *enfermedades inmunodeficientes* con defectos en la adenosina

desaminasa y nucleósido fosforriasas. La deficiencia de adenosina desaminasa implica disfunción de células T y B. No se conoce aun el mecanismo pero hay una acumulación extraordinaria de desoxidenosín trifosfato (dATP) en eritrocitos y linfocitos T y B: de hecho, supera a la concentración de ATP. Se sabe que el dATP es inhibidor de la ribonucleótido reductasa; por tanto, se ve afectada la síntesis de DNA (replicación celular). Se cree que esto es lo que conduce a deficiencias en el sistema inmune. Quizá si se aplicaran los concomitantes obtenidos en esta enfermedad, se tendría más éxito en el tratamiento de leucemia linfoblás-

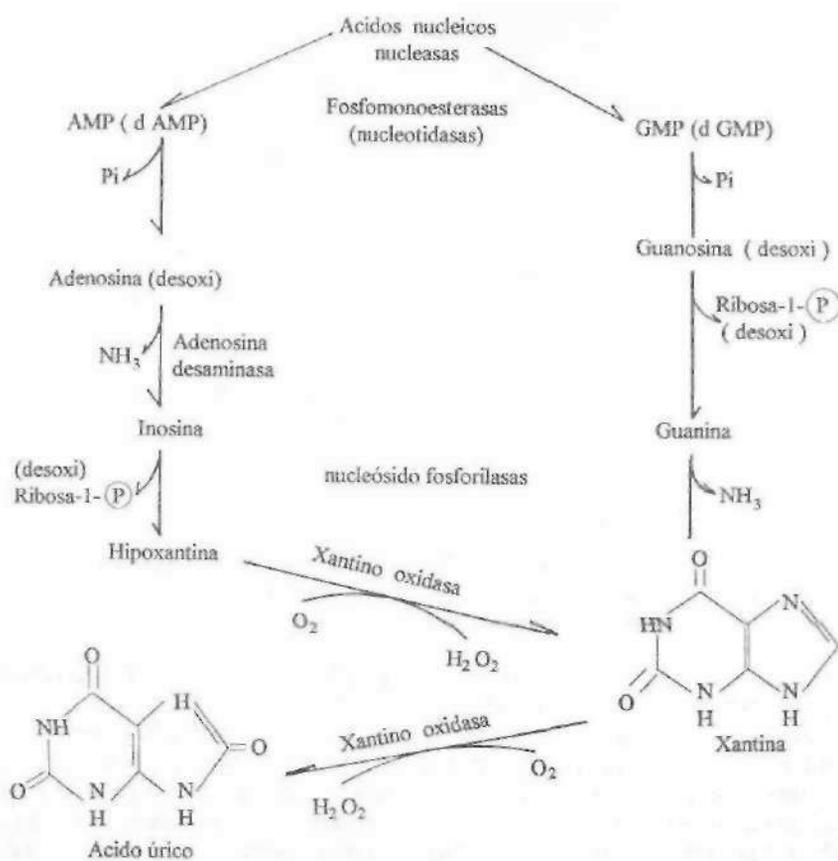


Figura 9.21. Catabolismo de ácidos nucleicos y purinas.

tica aguda, cuyo origen está en las células T. Esta leucemia podría responder a la *desoxicoformicina*, un inhibidor de la adenosina desaminasa.

La deficiencia de nucleósido fosforilasas afecta a las células T sin efecto aparente sobre células B. Hay un descenso marcado de ácido úrico y elevación de guanosina, desoxiguanosina, inosina y desoxiinosina. Al incubar linfocitos T normales con estos nucleósidos se observa que la desoxiguanosina es el más tóxico. En los eritrocitos el

dGTP es el que más se acumula y actúa como inhibidor de la GDP reductasa.

Recuperación de purinas

La reconversión de guanina e hipoxantina en sus correspondientes nucleótidos se lleva a cabo por medio de la enzima *hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT)*. En esta reacción tiene un papel fundamental el PRPP como donador de ribosa-5-fosfato (Figura 9.22). Cuando el PRPP reacciona

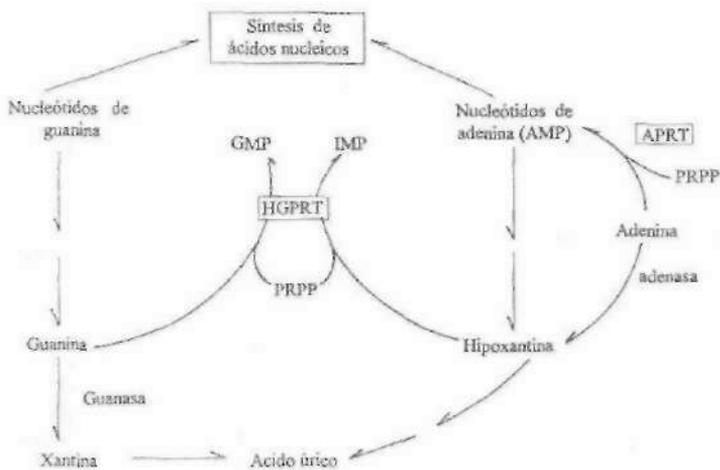


Figura 9.22. Vías de recuperación de purinas. HGPRT = hipoxantina - guanina - fosforribosil - transferasa; APRT = adenina- fosforribosil- transferasa; PRPP = fosforribosil pirofosfato.

con adenina, se forma AMP por acción de la *adenina fosforribosil transferasa* (APRT). Ambas enzimas son fosforribosil transferasas, y actúan especialmente en el sistema nervioso central, donde la capacidad para la biosíntesis de purina es baja.

El IMP y GMP son inhibidores competitivos de la HGPRT; el AMP es inhibidor competitivo de la APRT. El eritrocito no tiene PRPP amidotransferasa y requiere de las fosforribosil transferasas (HGPRT y APRT) para la síntesis de nucleótidos.

En virtud de la gran cantidad de energía, en forma de ATP, que se requiere para sintetizar los nucleótidos purínicos, la reutilización de bases preformadas (exógenas o endógenas) representa un ahorro considerable de energía para la célula.

Excreción de ácido úrico

El ácido úrico es el producto final de la degradación de las purinas en el hombre y es excretado como urato en la orina junto con

pequeñas cantidades de hipoxantina y xantina (Figura 9.23).

El ácido úrico filtra por el glomérulo (6 mg/min), pero existe una extraordinaria reabsorción en el túbulo proximal. Sin embargo hay también una secreción tubular muy activa que permite la excreción de ácido úrico sin que precipite en el túbulo. En la orina humana se elimina a diario 0.4 - 0.8 g de urato, dependiendo de la dieta y determinadas hormonas (ACTH o esferoides).

El 75 % del urato que se elimina es excretado por la orina y el 25% por intestino, donde es degradado por las bacterias intestinales (uricólisis).

La excreción renal de uratos es inhibida por oxoácidos como el láctico. En cambio, los agentes uricosúricos bloquean la resorción tubular de ácido úrico y aumentan su excreción por orina.

El urato plasmático se encuentra como sal monosódica (monourato sódico). La forma predominante está determinada por el pH del medio; de acuerdo al pKa a pH inferior a

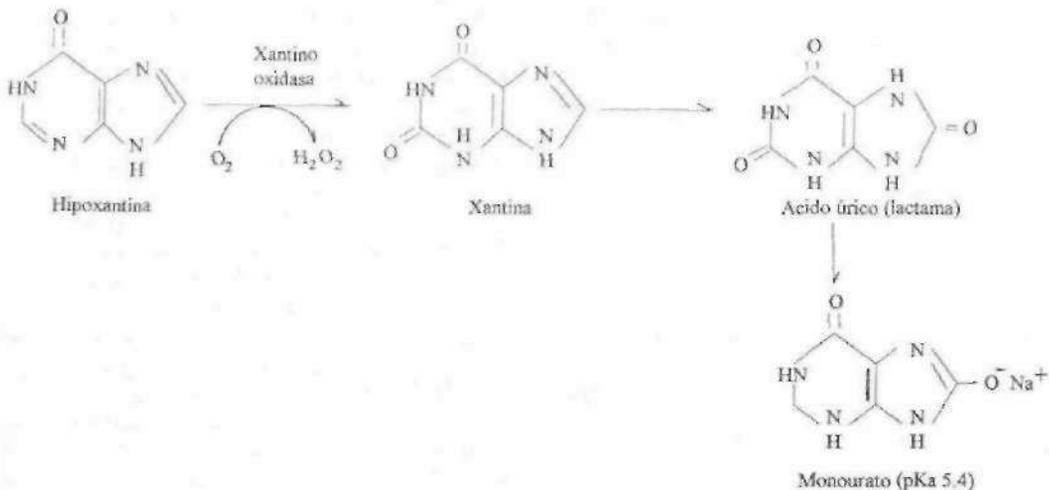


Figura 9.23. Formación de ácido úrico.

5.4, predomina el ácido úrico y a pH superior a 5.4 predomina el monourato. De aquí que al pH fisiológico predomine la sal monosódica.

En agua, el ácido úrico es 17 veces menos soluble que el urato de sodio. Debido a que el pH normal de la orina es inferior al pKa del ácido úrico, la forma predominante (ácido) es la altamente insoluble. La precipitación de cristales de ácido úrico puede aumentar por una excreción excesiva provocada por agentes uricosúricos, pero puede evitarse alcalinizando la orina.

Fisiopatológicamente, el ácido úrico puede provocar dos tipos de trastornos:

1. Hiperuricemia, que es la alteración más frecuente, o hipouricemia, sin significado patológico.

2. Precipitación de sus sales en órganos o tejidos del organismo.

Aunque puede haber hiperuricemia asintomática, la relativa insolubilidad del ácido úrico significa que puede precipitar en túbulos y provocar insuficiencia renal, por lo que toda hiperuricemia por arriba de 8 mg% debe ser tratada (normal 2.0 - 6 mg% en la mujer y 2.6 - 7.5 mg% en el hombre*).

Causas de hiperuricemia

La hiperuricemia puede deberse a numerosos procesos patológicos: eclampsia, insuficiencia renal, leucemia (sobre todo tratada con quimio o radioterapia), saturnismo, diabetes mellitus, hiperfunción de adenohipófisis y corteza suprarrenal (acromegalia, síndrome de Cushing), hiperfunción gonadal masculina,

* Manual de procedimientos. Laboratorio clínico IMSS, 1974.

enfermedades infecciosas, convalecencia, medicaciones como la clorotiazida y otras.

Los mecanismos por los cuales puede elevarse el ácido úrico en sangre pueden ser:

1. Aumento en la ingestión de purinas. Las fuentes alimenticias ricas en nucleoproteínas son hígado, riñon, páncreas, sardinas, anchoas, sesos, bacalao, carnes rojas, chícharos y frijoles.

2. Disminución de la excreción urinaria. En la insuficiencia renal se eleva el nitrógeno total incluyendo el que proviene del ácido úrico.

3. Aumento en la formación de ácido úrico. Es la patogenia más admisible, ya que en el síndrome gotoso coexisten hiperuricemia y menor eliminación úrica por riñon. Además, existen defectos enzimáticos responsables de la sobreproducción como las que afectan la PRPP sintetasa, HGPRT, adenosil desaminasa, etc.

Las alteraciones que más frecuentemente se acompañan de hiperuricemia son la gota, el artritisismo y la litiasis úrica.

Gota

Es una enfermedad clásica que ha dado lugar a numerosas anécdotas de la Medicina y la Historia Universal; en el año 460 A.C., Hipócrates describió el clásico cuadro de gota; Lukian en el siglo III hablaba de la "tragopodagra y ocypos". La primera descripción microscópica de los cristales de urato monosódico la realizó Van Leuwenhock en material drenado de un tofo. La historia moderna de la gota empieza en 1683 cuando T. Sydenham, quien sufría de ella, describió detalladamente los síntomas. En 1848, Garrod estableció la relación entre hiperuricemia y gota.

La gota se ha asociado a personas ricas y de talento. Afectados de ella fueron los Medid, Carlos IV, Samuel Johnson, Benjamín Franklin, Isaac Newton y Charles Darwin entre otros.

El nombre de la enfermedad proviene del latín *gutta*, porque se creía que la enfermedad era causada por una toxina que caía "gota a gota" en las articulaciones.

Según la opinión tradicional, la gota se asocia a comidas copiosas y a un alto nivel de vida. No obstante, las dietas ricas en proteínas las consume hoy un gran porcentaje de la población, que lo que era un factor causal importante en el pasado ha perdido significación en el siglo XX:

La gota se caracteriza por niveles elevados de ácido úrico en sangre (hiperuricemia), ataques agudos de artritis que ceden específicamente con colchicina, cambios degenerativos y destructivos en las articulaciones y tendencia con los años a la formación de depósitos calcáreos de monourato de sodio en cartílagos y tejidos periarticulares, difusos o nodulares, que son los típicos *tofós* o "piedras de yeso" de especial predilección por los dedos y el pabellón auditivo.

La gota se clasifica en dos tipos: *primaria* y *secundaria*:

Gota primaria. Es un trastorno genético que se presenta generalmente en hombres y mujeres posmenopáusicas. Se debe a un trastorno metabólico por deficiencia de enzimas (o de su control) involucradas en la síntesis *de novo* de nucleótidos purínicos que conduce a su sobreproducción.

Entre los defectos descritos en el hombre se encuentran los siguientes:

1. Mutantes de PRPP sintetasa que no responden a la inhibición alostérica (retroinhibición) por fosfato inorgánico, ADP o GDP. En estas condiciones se eleva la concentración intracelular de PRPP lo que conlleva a producción aumentada de 5-fosforribosilamina.

2. Deficiencia parcial de HGPRT que conduce a elevación de PRPP que no puede ser utilizado por la vía de recuperación. El PRPP es un activador de la PRPP amido-transferasa con lo que se acelera la síntesis de purinas. Además, la falta de recuperación

de hipoxantina o guanina conduce a disminución de IMP y GMP que ya no pueden retroinhibir a la PRPP amidotransferasa.

En ambos casos, el rasgo común es la elevación de PRPP intracelular.

Uno de los mecanismos propuestos para explicar los episodios de inflamación asociada a la artritis gotosa aguda es que pequeñas cantidades de urato sódico precipitan y cristalizan. Esto activa el factor Hageman (zimógeno proteasa) que causa infiltración leucocitaria y fagocitosis de los cristales de urato. Los cristales fagocitados producen destrucción de lisosomas con la consiguiente liberación de enzimas hidrolíticas que producen destrucción hística e inflamación. Los leucocitos acumulados en el área inflamada producen ácido láctico, baja el pH lo que reduce la solubilidad de los uratos y se establece el círculo vicioso. Se tienen informes de que el 17-p-estradiol, que no existe en hombres y mujeres posmenopáusicas, confiere gran estabilidad a la membrana lisosomal, lo cual no ocurre con la testosterona.

La gota primaria se observa con mayor frecuencia en varones mayores de 30 años y mujeres posmenopáusicas.

Gota secundaria. La gota secundaria está producida por una variedad de alteraciones como leucemia (aumento de los leucocitos), policitemia (aumento de eritrocitos), nefritis crónica, enfermedad de Von Gierke (deficiencia de glucosa-6-fosfatasa), o por anti-metabolitos utilizados en el tratamiento del cáncer.

La gota secundaria aparece en ambos sexos y a edades más tempranas.

La deficiencia de glucosa-6-fosfatasa hace que este compuesto (glucosa-6-fosfato) se desvíe al ciclo de las pentosas y produzca elevaciones de n-bosa-rT-F, sustrato inicial de la biosíntesis, que favorece la formación de PRPP. Además, la enfermedad cursa con hipoglucemia que provoca elevación de cuerpos cetónicos (acidosis); se inhibe la secreción tubular de urato y aparecen hiperuricemia y gota.

Cualquiera que sea la causa, la gota se asocia a hiperuricemia (aunque la hiperuricemia no siempre se asocia con gota).

Los ataques agudos de gota, generalmente en articulaciones de los dedos del pie (sobre todo del dedo grueso del pie derecho) son extremadamente dolorosos y pueden dejar deformidad permanente. Los tofos son desfigurantes, pero indoloros.

Factores predisponentes y precipitantes

La clásica imagen del gotoso es la de un obeso rubicundo, buena vida, gran bebedor y amigo del placer descrito en las novelas. Dos factores explican la alta incidencia de gota en estos sujetos:

1. El alcohol disminuye la excreción renal de uratos, ya que se metaboliza a lactato, el cual inhibe dicha excreción.

2. Una dieta rica en carnes (proteínas) contiene gran proporción de ácidos nucleicos.

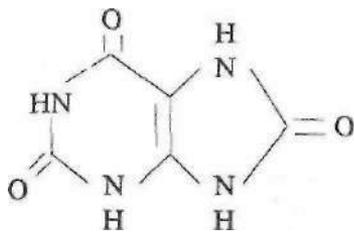
Ninguno de estos factores provoca gota en individuos normales, pero sí en individuos predispuestos.

La coexistencia de diabetes y gota se ha podido explicar en virtud del parentesco químico entre ácido úrico y aloxana (Figura 9.24), sustancia de conocidos efectos diabetogénicos. Por otro lado, en la diabetes se producen cuerpos cetónicos (ácidos) que interfieren con la excreción de úrico.

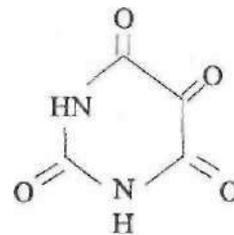
Síndrome de Lesch-Nyhan

El síndrome fue descrito por sus autores en 1964. Esta grave enfermedad ligada al cromosoma X (la padecen sólo los varones) se inicia a temprana edad con una enorme sobreproducción de purinas y con ello un exceso de ácido úrico no sólo en sangre y tejidos, sino también en orina. Uno de los signos más precoces es el síndrome de Lesch-Nyhan, pasado por alto, es la aparición de cristales de color naranja (uratos) en los pañales.

El síndrome de Lesch-Nyhan se asocia con alteraciones neurológicas con espasticidad y coreoatetosis, alteraciones mentales,



Acido úrico



Aloxana

Figura 9.24. Estructura de ácido úrico y aloxana. Esta última sustancia destruye los islotes pancreáticos.

desarrollo motor lento y compulsión por morderse los dedos y los labios (automutilación). Es notable también el comportamiento agresivo de estos pacientes.

El defecto en el síndrome de Lesch-Nyan se localiza en el gene para la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT) que participa en la recuperación de nucleótidos de purina los cuales se derivan hacia la formación de ácido úrico. Los niveles de GMP y de IMP descienden con lo que la PRPP amidotransferasa no sería controlada por retroinhibición, produciendo cantidad excesivas de 5-fosforribosil-amina. Además, la HGPRT defectuosa haría que se acumulada PRPP el cual quedaría disponible para que la PRPP amidotransferasa lo transforme en 5-fosforribosil-amina; los datos disponibles parecen apoyar esta segunda interpretación.

La distribución normal de HGPRT quizá permita explicar la sintomatología neurológica. Cerebro y cerebelo tienen 10 a 20 veces más actividad de la enzima respecto a hígado, bazo y riñon, y 4-8 veces más respecto a eritrocitos. Los productos de degradación de las purinas (hipoxantina, xantina y ácido úrico) no son tóxicos para el cerebro maduro, pero sí para el cerebro en desarrollo. Por otro lado, la falta de la enzima puede conducir a un desequilibrio en las concentraciones de nucleótidos purínicos en momentos críticos del desarrollo.

Principios terapéuticos de la gota y el síndrome de Lesch-Nyhan.

El tratamiento puede estar basado en:

a) Una dieta suficiente, pero no rica, en proteínas. Las proteínas contribuyen a la síntesis de purinas ya que participan varios aminoácidos en su síntesis.

b) Deberá evitarse la obesidad y la deshidratación. La deshidratación puede producir cristalización de urato. El alcohol produce diuresis, que conduce a deshidratación, y contribuye a la acidosis láctica que produciría precipitación de cristales de urato sódico en las articulaciones.

c) Aumentar la excreción renal de uratos. Esto se logra con uricosúricos como probenecid y salicilatos. El tratamiento es útil si la función renal es normal; no obstante debe alcalinizarse la orina para evitar la precipitación de ácido úrico y la formación de cálculos.

d) Reducir la producción de ácido úrico. El medicamento que inhibe la formación de urato con mayor eficacia es el alopurinol, inhibidor competitivo de la xantina oxidasa (Figura 9.8). El alopurinol puede convertirse en su ribonucleótido mediante la fosforribosil transferasa; el ribonucleótido análogo inhibe la PRPP amidotransferasa.

La reducción de ácido úrico mediante la administración de alopurinol alivia los síntomas y disminuye la formación de cálculos renales de urato. No obstante, debe utilizar-

se con precaución en pacientes leucémicos sometidos a tratamiento con análogos purínicos. Esto puede ocasionar que estos análogos no sean degradados por la xantina oxidasa y aumente su concentración en sangre, generalmente, los antimetabolitos se utilizan a niveles elevados, un poco por debajo de sus concentraciones tóxicas.

e) Uso de antiinflamatorios. Entre estos se encuentra el medicamento de elección para el ataque agudo de gota, la colchicina. Este medicamento es un alcaloide de *Colchicum autumnale* que se usa desde hace siglos en las artralgias de origen gotoso. Al parecer se une a las subunidades proteicas que forman parte de los microtúbulos de leucocitos polimorfonucleares; esto provoca disgregación de los microtúbulos lo cual inhibe la locomoción de los leucocitos y su adherencia durante la fagocitosis. Aunque mejora los ataques agudos de gota, la colchicina no afecta los niveles sanguíneos de urato.

Otros antiinflamatorios utilizados incluyen ACTH, glucocorticoides, fenil-butazotia, etc., algunos de los cuales son además, uricosúricos.

Pseudogota

Es un cuadro clínico de falso reumatismo gotoso que se presenta en algunos casos de

hiperparatiroidismo. El pirofosfato de calcio precipita en cavidades articulares y da un cuadro parecido a la gota. El urato sérico es normal.

Xantinuria.

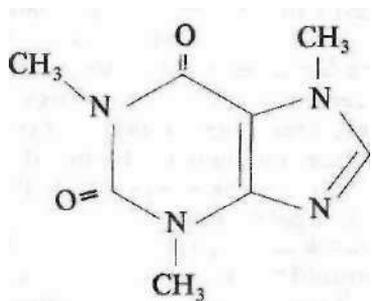
Se trata de un síndrome que publicaron en 1954 Dent y Philpot, que se caracteriza por la presencia de cálculos de xantina e hipouricemia. El síndrome se debe a deficiencia total de xantina oxidasa con el consiguiente aumento de hipoxantina y xantina.

Metilxantinas.

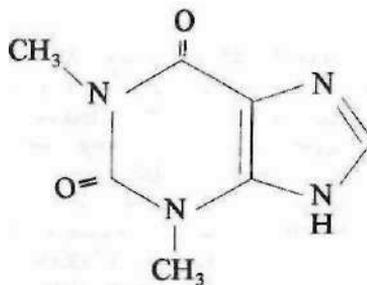
Es un fenómeno sociológico notable que las tres bebidas más comúnmente usadas por la civilización moderna; café, té y chocolate, descubiertas independientemente por gentes primitivas en diferentes partes del mundo, contienen como ingrediente principal metilxantinas de estructura química y propiedades farmacológicas relacionadas (Figura 9.25).

Estas metilxantinas son la cafeína del café, la teofilina del té y la teobromina del cacao. Los refrescos de cola contienen cantidades considerables de cafeína.

Las tres metilxantinas son estimulantes del sistema nervioso central, diuréticas e inhibidoras de la fosfodiesterasa del AMPc; además, estimulan el centro respiratorio me-

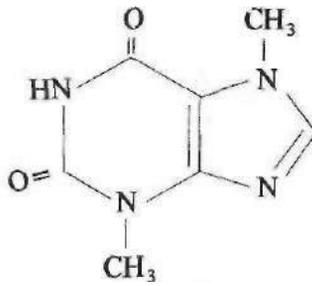


Cafeína



Teofilina

Figura 9.25. Estructura de metilxantinas.



Theobromina

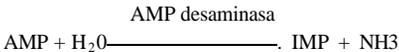
Figura 9.25. Estructura de metilxantinas.

dular. La de mayor actividad diurética e inhibidora de la fosfodiesterasa es la teofilina, y más aún la teofilina-etilendiamina (aminofilina), que es un vasodilatador coronario y eficaz broncodilatador.

Ninguna de las metilxantinas mencionadas se transforma en ácido úrico por lo que es injustificada la prohibición de café, té o chocolate en enfermos de gota.

Ciclo de purín nucleótido.

Desde hace años se sabe que el trabajo muscular se acompaña de producción de NH_3 , a través de la reacción:



Sin embargo, la desaminación del AMP no está directamente implicada en la contracción muscular. Esto llevó a Lowenstein en 1971 a proponer una vía de regeneración de AMP a partir de IMP, llamado ciclo del purín nucleótido (Figura 9.26).

Este ciclo es importante en músculo y cerebro; aunque el hígado posee las enzimas del ciclo, no produce niveles significativos de NH_3 por esta vía.

La acción de la AMP desaminasa en tejido muscular coincide con una baja actividad de la glutamato deshidrogenasa, enzima clave de la desaminación de aminoácidos y

producción de NH_3 . Para compensar la baja actividad glutamato deshidrogenasa, la AMP desaminasa desempeña el papel de deshidrogenasa (desaminación oxidativa). El IMP resultante de la desaminación del AMP reacciona con el aspartato para regenerar AMP.

9.3.2 Biosíntesis y degradación de nucleótidos de pirimidina

9.3.2.1 Síntesis de pirimidinas

A diferencia de los nucleótidos de purina, el anillo pirimídico se forma antes de la unión de ribosa-5-fosfato. Sin embargo, en ambas biosíntesis la reacción inicial controla la secuencia de las siguientes reacciones. Los precursores de los nucleótidos pirimídicos son también relativamente simples: aspartato, carbamilsfosfato y PRPP; tetrahidrofolato para timidina.

El *carbamilsfosfato* utilizado en la síntesis de pirimidinas es sintetizado por una *carbamilsfosfato sintetasa* //diferente de la que participa en la síntesis de carbamilsfosfato en el ciclo de la urea que tiene lugar en las mitocondrias hepáticas. La biosíntesis de pirimidinas se realiza prácticamente en el citoplasma de todos los tejidos. Además,

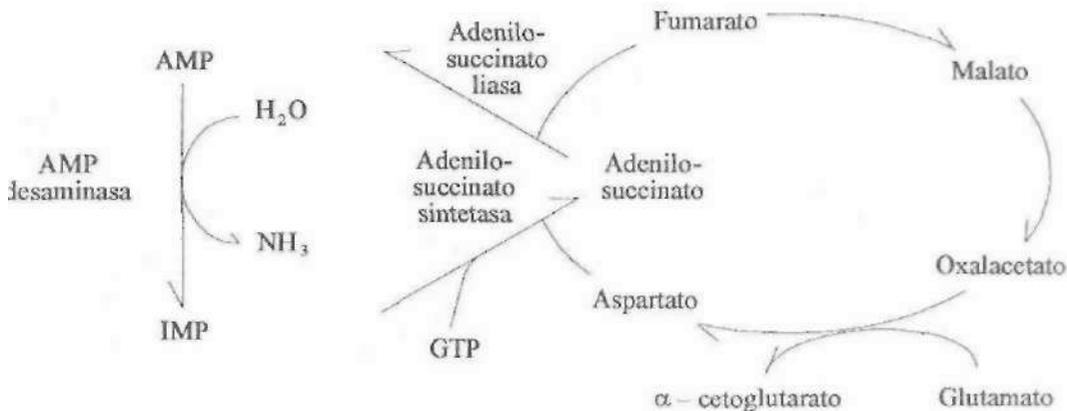


Figura 9.26. Ciclo del purín nucleótido.

el nitrógeno del carbamilsulfato citosólico proviene del grupo amida de la glutamina. La reacción requiere HCO_3^- y dos moléculas de ATP. El UTP es un inhibidor alostérico de la enzima, mientras que el PRPP se comporta como activador.

La siguiente reacción es la unión de aspartato con carbomilsulfato catalizada por la *aspartato carbamil transferasa* (antes *aspartato transcarbamilasa*). El *carbamil aspartato* formado se cicliza por acción de la *dihidroorotasa* y se transforma en *dihidroorotato*. En el hombre, estas tres primeras enzimas de la vía (carbamil sulfato sintetasa II, aspartato carbamil transferasa y dihidroorotasa) se encuentran en una sola enzima multifuncional; la actividad transcarbamilasa es inhibida alostéricamente por el producto final, el CTP, mientras que el ATP se comporta como activador.

El ácido dihidroorótico se transforma en *orótico* por acción de una enzima mitocondrial dependiente de NAD^+ , la *dihidroorotato deshidrogenasa*. El ácido orótico se convierte en el correspondiente ribonucleó-

tido, *orotidina-5-fosfato* por acción de la *orotato fosforribosil transferasa*, seguida por una descarboxilación irreversible hasta *uridín monofosfato* (UMP), primer precursor común del cual derivan todos los demás (Figura 9.27). Las actividades fosforribosil transferasa y orotidina-5-fosfato descarboxilasa radican en una misma proteína. El agente antineoplásico 6-azauridina, en forma de ácido 6-azauridílico es un inhibidor competitivo de la actividad descarboxilasa,

Biosíntesis de desoxirribonucleótidos

Para la síntesis de DNA se precisan desoxirribonucleótidos. La reducción de ribonucleótidos difosfato se lleva a cabo por reacciones análogas a los nucleótidos de purina mediante la acción de *ribonucleótido reductasa* o *nucleósido difosfato reductasas*, que utilizan NADPH como fuente reductora y *tioredoxina* (Figura 9.28). La ribonucleótido reductasa reduce los cuatronicleótidos, ADP, GDP; CDP y UDP, a sus correspondientes desoxirribonucleótidos, los cuales son luego transformados en dATP, dGTP y dCTP para la síntesis de DNA. El dUTP es

fermedades, desde el año 400 A.C. Consideró que el material reproductivo del hombre procede de todas las partes del cuerpo, esto es, que las características para órganos como hígado, cerebro, corazón, etc., se heredan en forma directa de los mismos.

Aristóteles, 350 años A.C, observó el parecido que tienen los nietos con los abuelos y concluyó que la mujer aporta el material de la herencia, el hombre lo define y el embrión lo asume.

Ya en nuestra era, en base al conocimiento de que para generar un nuevo organismo los progenitores contribuyen con una célula cada uno (espermatozoides y óvulo), se trató de explicar cómo a través de dichas células se podía transferir la herencia a la descendencia. Se hicieron muchas elucubraciones al respecto. Se pensaba que en el espermatozoide viajaba un pequeño hombrecillo (*homúnculo*) que se alimentaba, en sus estadios iniciales, del vitelo del óvulo y que al llegar a la matriz lo único que hacía era crecer. Es decir, la herencia viajaba en forma de un homúnculo (Figura 9.1).

De sobra está decir que a la luz de los hallazgos científicos, esta suposición fue insostenible; nunca se observó tal hombrecillo. Si la herencia no viajaba de esta forma, ¿cómo lo hacía entonces?. Ya sin hombrecillo, el espermatozoide y el óvulo quedaban reducidos sólo a moléculas; algún tipo de molécula debería transportar pues, esta información.

Llegó el momento de investigar a mayor profundidad, es decir, entrar en los dominios de la química. Ya en 1807, a las sustancias aisladas de tejidos vivos se les llamó *sustancias orgánicas*; a las obtenidas del mundo inanimado, *sustancias inorgánicas*. Hacia 1820 ya era habitual dividir las sustancias orgánicas en tres grupos: *carbohidratos*, *lípidos* y *proteínas*. A mediados del siglo XIX, parecía indudable que, de las tres, las proteínas eran las de estructura más complicada y función más importante (*proteína*, del griego: *primordial*).



Figura 9.1. Homúnculo en espermatozoide humano (tomado de Hartsoeker, *Essai de dioptrique*. París, 1694. pág. 230).

La complejidad de las proteínas se refleja en la fragilidad de la sustancia; los carbohidratos y los lípidos resisten tratamientos que las proteínas no soportan. En realidad, las proteínas parecen ser la materia misma de la vida ¡tan frágiles y delicadas como un ser viviente!

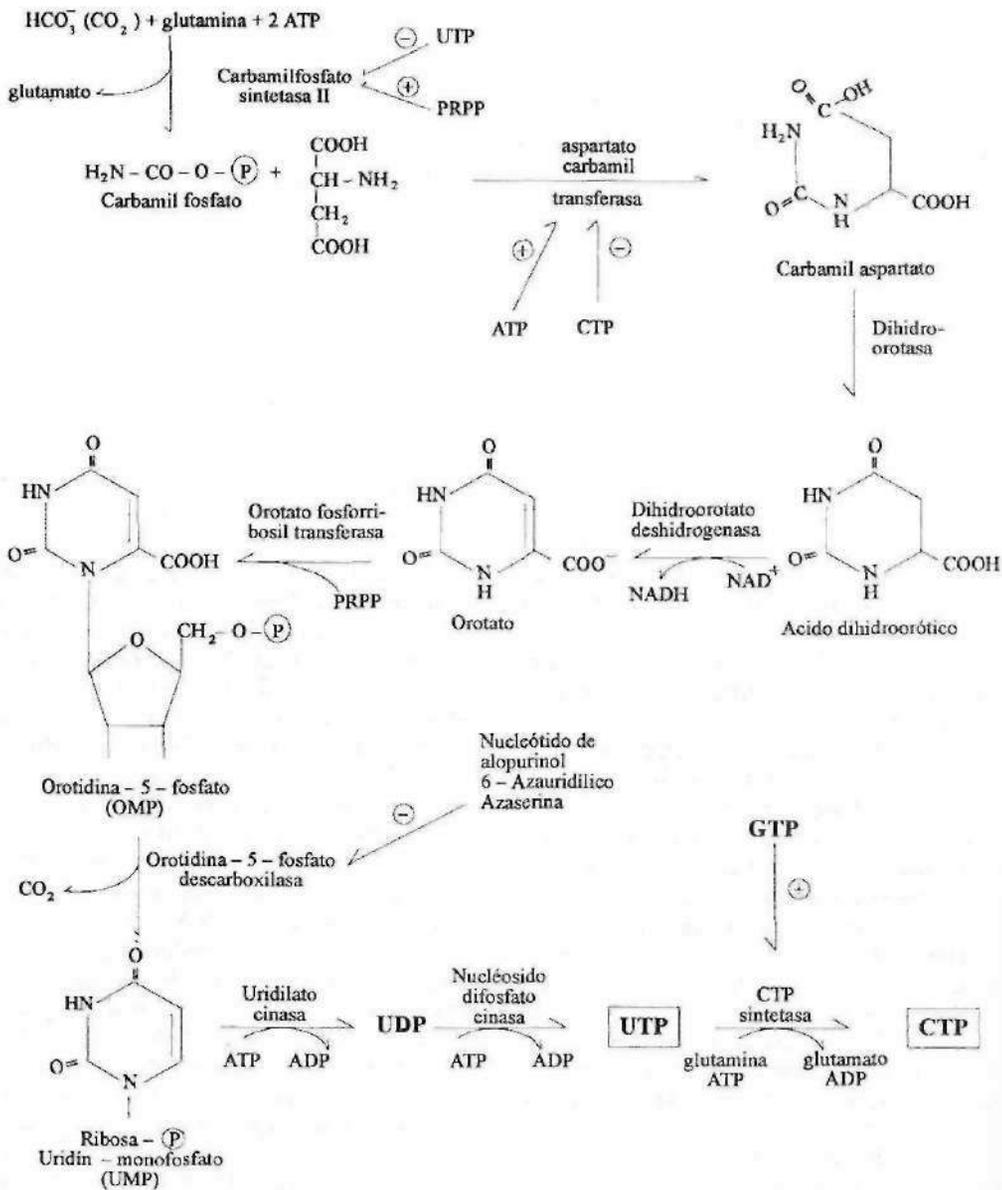


Figura 9.27. Biosíntesis de bases y nucleótidos de pirimidina.

hidrolizado a dUMP para evitar que el dUTP participe en la síntesis de DNA.

El dTTP, necesario también para la síntesis de DNA, proviene del dUTP mediante una reacción catalizada por la *timidilato sintetasa* y la participación de metilén-FH4 como donador coenzimático de metilos. El dihidrofolato (FH2) resultante se reduce nuevamente a tetrahidrofolato (FH4 por acción de la *dihidrofolato reductasa* (Figura 9.29). Esta última reacción requiere NADPH y es inhibida por análogos de ácido fólico como aminopterina y ametoptenna (metotrexato), en tanto que fluorodesoxiuridina inhiben la timidilato sintetasa.

Orótico aciduria.

La única enfermedad del metabolismo de pirimidinas bien descritas hasta la fecha es la *aciduria orótico* u *orótico aciduria*. Es una alteración genética debida a deficiencia severa de orotato fosforribosil transferasa (también llamada orotidilato pirofosforilasa) y orotidina-5-fosfato descarboxilasa.

La forma *primaria* de la enfermedad se acompaña de enanismo, astenia, anemia hipocrómica megaloblástica que no mejora con Fe, piridoxina, B12, ácido fólico, o ácido ascórbico; además se presenta leucopenia y retraso mental. Los niños afectados no pue-

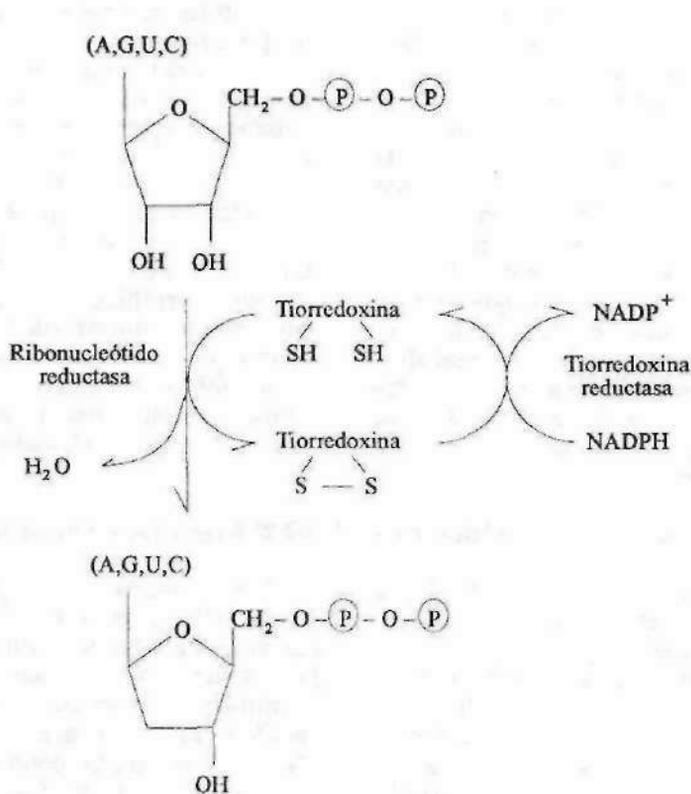


Figura 9.28. Biosíntesis de desoxirribonucleótidos.

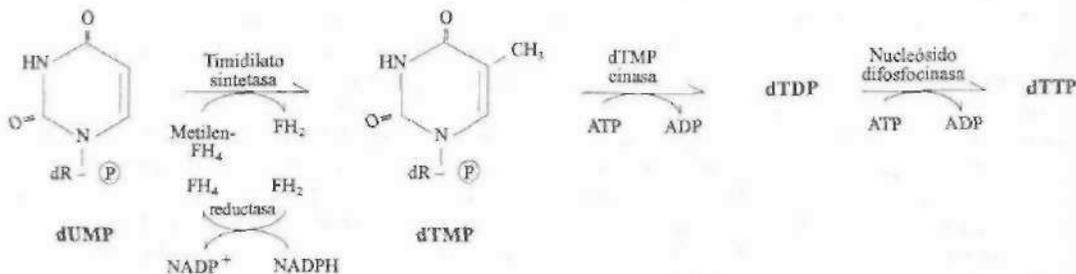


Figura 9.29. Biotransformación de dUMP a dTTP.

den sintetizar nucleótidos de pirimidina y excretan grandes cantidades de orotato por la orina. La administración de uridina (2-4 g/día) mejora la cantidad de hemoglobina, cura la anemia y aumenta el crecimiento corporal. Para los individuos afectados la uridina viene a convertirse en una vitamina que hay que administrar de por vida.

La forma secundaria de aciduria orótica puede presentarse en pacientes tratados con el antineoplásico 6-azauridina, que se convierte en ácido 6-azauridílico el cual es un inhibidor competitivo de la actividad descarboxilasa. El ribótido de alopurinol, proveniente del alopurinol usado en la gota, también inhibe competitivamente la actividad descarboxilasa.

Modelo clínico: aciduria orótica primaria

Un niño tuvo nacimiento normal y a término, pero a los 5 meses de edad presentó diarrea pastosa, pálida y de olor fétido que obligó a llevarlo al hospital. Se le encontró anemia grave (eritrocitos: 2.5 millones/ml y hemoglobina: 6 g/100 ml). Fue tratado con gluconato de hierro, ácido ascórbico, ácido fólico, B₁₂ y concentrado de hígado, diariamente. Mejoró durante dos meses, pero recayó por afección

respiratoria de vías superiores y fue rehospitalizado.

A pesar del tratamiento, la anemia empeoró, la médula era hipercelular e indicaba anemia perniciosa pero no respondía a B₁₂, ácido fólico ni piridoxina.

Se detectó la presencia de un sedimento cristalino en orina que fue identificado como ácido orótico (1.5 g/día). Al ser tratado con extracto de levadura conteniendo ácido uridílico y citidílico presentó una notable reducción de la oroturia; los eritrocitos circulantes aumentaron y la hemoglobina se elevó a 14 g/100 ml. Otros pacientes han respondido mejor con uridina que con levadura.

9.3.2.2 Degradación de pirimidinas

En la ruta degradativa los nucleótidos se convierten primero en nucleósidos y éstos en la base libre uracilo o timina. La citidina y la desoxicitidina se desaminan a uridina y desoxiuridina respectivamente por medio de un nucleósido desaminasa.

El uracilo y la timina continúan degradándose hasta los productos finales que se indican en la figura 9.30. El uracilo se degrada hasta P-alanina, CO₂ y NH₃; la degradación

de la timina conduce a ácido P-aminoisobutírico, NH_3 y CO_2 . El ácido P-aminoisobutírico se excreta en la orina; la excreción puede aumentar en leucemias y después de exposición a quimioterapia o radioterapia antineoplásica. Se puede estimar el recambio de DNA o de timina midiendo la producción de p-aminoisobutirato. ALrededor de 25 % de personas con ancestros chinos o japoneses excretan en forma constante cantidades excesivas de P-aminoisobutirato.

A diferencia de los metabolitos de purina, los productos del catabolismo de pirimidinas son muy solubles en agua.

Dado que ninguna enzima humana cataliza la hidrólisis de pseudouridina, este nucleósido proveniente del RNA se excreta sin cambio en la orina normalmente.

9.4 ESTRUCTURA DE DNA y RNA

En un principio, las observaciones de Levene sugerían que el grupo prostético de las nucleoproteínas eran tetranucleótidos. Durante los años 40 se obtuvieron cadenas más y más largas; en los 50 se obtenían muestras de RNA hasta de mil nucleótidos y muestras de DNA que contenían veinte mil nucleótidos. Poco a poco, se puso de manifiesto que la teoría de la estructura tetranucleótida del ácido nucleico era errónea.

Con el tiempo se apreciaron ciertas regularidades de carácter general que parecían comunes a todas las especies, desde el hombre hasta los virus:

1. Los estudios de Erwin Chargaff en los que establecía la equivalencia de adenina con timina y guanina con citosina. Además, el total de purinas (adenina más guanina) era igual al total de pirimidinas (timina más citosina). Eran estas regularidades importantes pistas para descubrir la estructura del ácido nucleico.

2. La aportación crucial llegó en 1953, cuando el físico inglés Maurice Wilkins y su

colaboradora Rosalind Franklin estudiaron fibras de DNA por difracción de rayos X. Ellos encontraron una estructura que era congruente con una hélice en forma de escalera de caracol mal llamada "de espiral". Ya en 1951, los químicos norteamericanos Linus Pauling y R.B. Corey habían demostrado que las cadenas polipeptídicas de una proteína estaban dispuestas en hélices estabilizadas por puentes de hidrógeno. (Por este trabajo, Pauling recibió el Premio Nobel de Química en 1954).

Estos y otros hallazgos permitieron al inglés Francis Crick y al norteamericano James Watson presentar el modelo de DNA que conocemos actualmente. (Por su labor en este campo, Wilkins, Watson y Crick compartieron el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1962).

El descubrimiento de que el DNA es una doble hélice ha sido uno de los mayores acontecimientos de la biología molecular. Los aspectos más importantes del modelo planteado por Watson y Crick son:

1. Dos cadenas helicoidales antiparalelas de polinucleótidos enrolladas a lo largo de un eje común (Figura 9.31).

2. Las bases de purina y piridimina están ubicadas en el interior de la hélice, mientras que las unidades de fosfato y desoxirribosa se encuentran en el exterior. Los planos que forman las bases son perpendiculares al eje de la hélice. Las desoxirribosas se encuentran formando ángulos casi rectos con los de las bases (Figura 9.32).

3. Las dos cadenas permanecen unidas por puentes de hidrógeno entre ambas bases. La adenina forma pareja con timina a través de dos puentes de hidrógeno. La guanina con citosina a través de 3 puentes de hidrógeno.

4. La secuencia precisa de bases constituye la información genética.

Todo lo anterior explica el fenómeno hipercrómico a 260 nm cuando se desnaturaliza el DNA; es decir, cuando sus dos cadenas

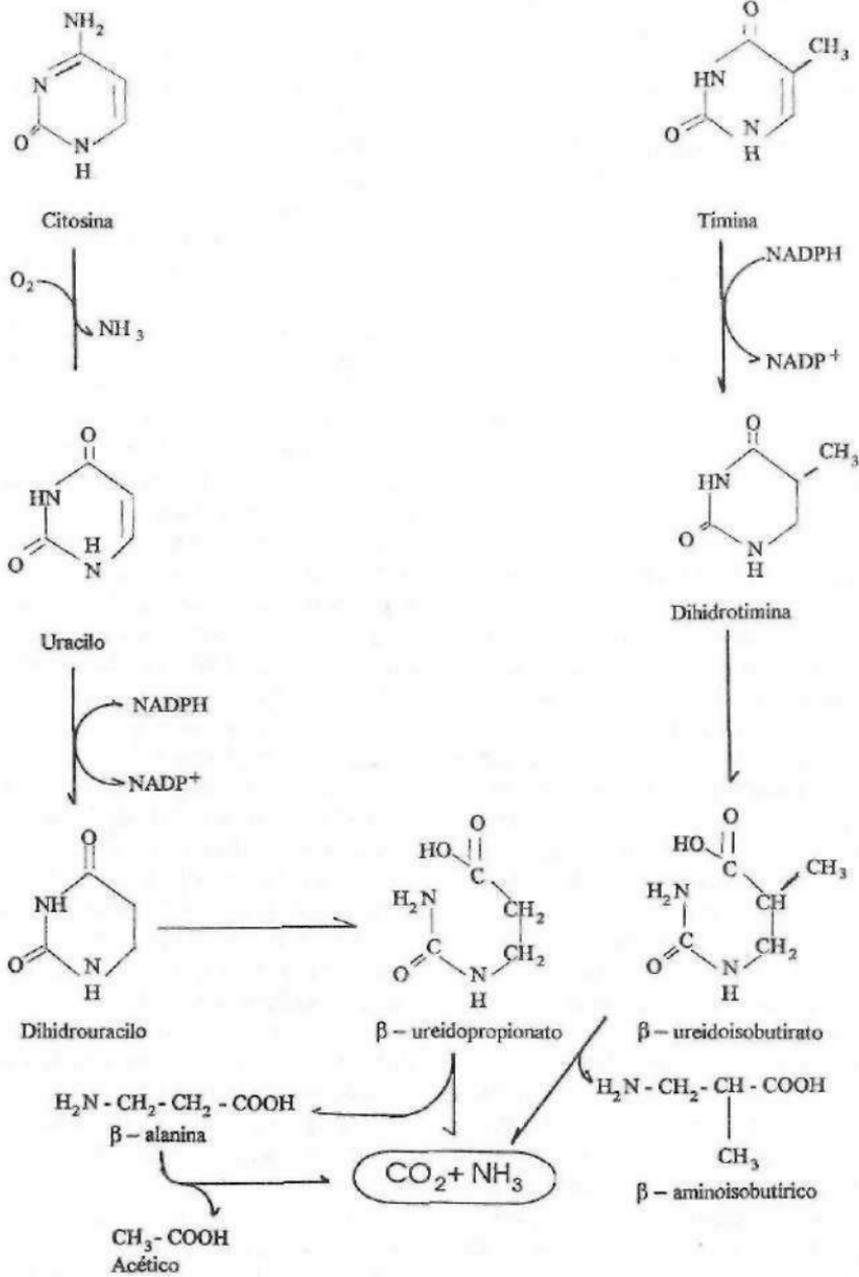


Figura 9.30. Degradación de pirimidinas.

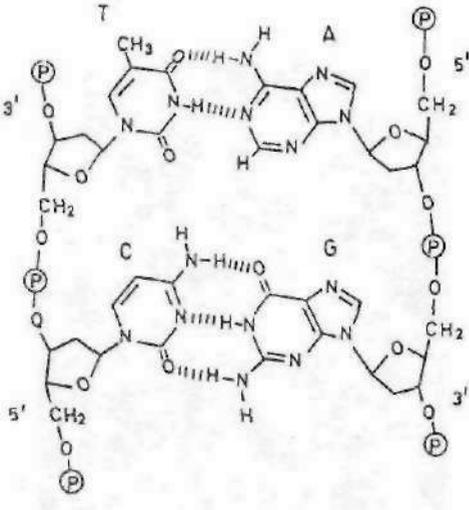


Figura 9.31. Cadenas antiparalelas en el DNA. Reproducción modificada con autorización de: R. Montgomery y cois., Biochemistry. A case oriented approach, 4a. edición, pág. C. V. Mosby, Co., St.Louis,1985.

se separan por el calor (ruptura de los enlaces por puente de hidrógeno). La temperatura a la cual ocurre esto se denomina punto de fusión. También, el modelo explica la mayor estabilidad al calor de un DNA rico en pares C-G y el proceso de hibridización (DNA-RNA).

En la actualidad se han encontrado otras conformaciones del DNA llamadas A, B, C, D, E y Z (tabla 9.3).

El modelo de Watson y Crick se basa en el estudio de difracción de rayos X del DNA-B, que constituye la mayor proporción del DNA. No obstante, el DNA puede adoptar las conformaciones DNA-A y DNA-Z (Figura 9.33); las otras conformaciones (C, D y E) no se han encontrado en la naturaleza y sólo se han producido experimentalmente.

La hélice del DNA-A es más ancha y corta que la del DNA-B. Esta forma de DNA-A es biológicamente interesante ya que es

probable que sea la adoptada por los híbridos DNA-RNA. La conformación DNA-Z produce una secuencia alterna donde los grupos fosfato externos forman zig-zag, de ahí el nombre. El significado biológico del DNA-Z aún no está claro; pudiera tener función reguladora ya que proteínas que se unen al DNA-B no se unen al DNA-Z.

El DNA tiene 2 grandes funciones: la replicación y la expresión. La expresión tiene lugar a través de intermediarios de RNA, es decir, el RNA es un intermediario entre el DNA y la síntesis de proteínas. Los tres tipos de RNA son el RNA de transferencia (RNAt o RNAs), el RNA mensajero (RNAm) y el RNA ribosomal (RNAr). Todos están comprometidos en la síntesis de proteínas. El RNAt (15% del total) transporta los aminoácidos a un sitio del ribosoma, partícula compuesta por RNAr (80% del total) y proteína. El RNAm (5% del total) copia la información contenida en el DNA del núcleo y la lleva al citoplasma para ser traducida en términos de secuencia polipeptídica.

9.4.1 Localización intracelular

La mayor proporción del DNA de las células de un organismo se localiza en los *chromosomas* del núcleo. En contraste, la mayor parte del RNA se localiza en el citoplasma. En términos aproximados, la cantidad de DNA del genoma de un organismo es proporcional a la complejidad de ese organismo.

El DNA de los cromosomas se encuentra empaquetado y asociado con proteínas histonas y no histonas. El cromosoma está constituido por fibras de *nucleoproteína* que reciben el nombre de *chromatina*. La chromatina contiene casi el doble de proteínas que de DNA. La parte proteica de los cromosomas corresponde a 5 grupos de histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) que forman un octámero que se pone en contacto con el DNA en la siguiente secuencia:

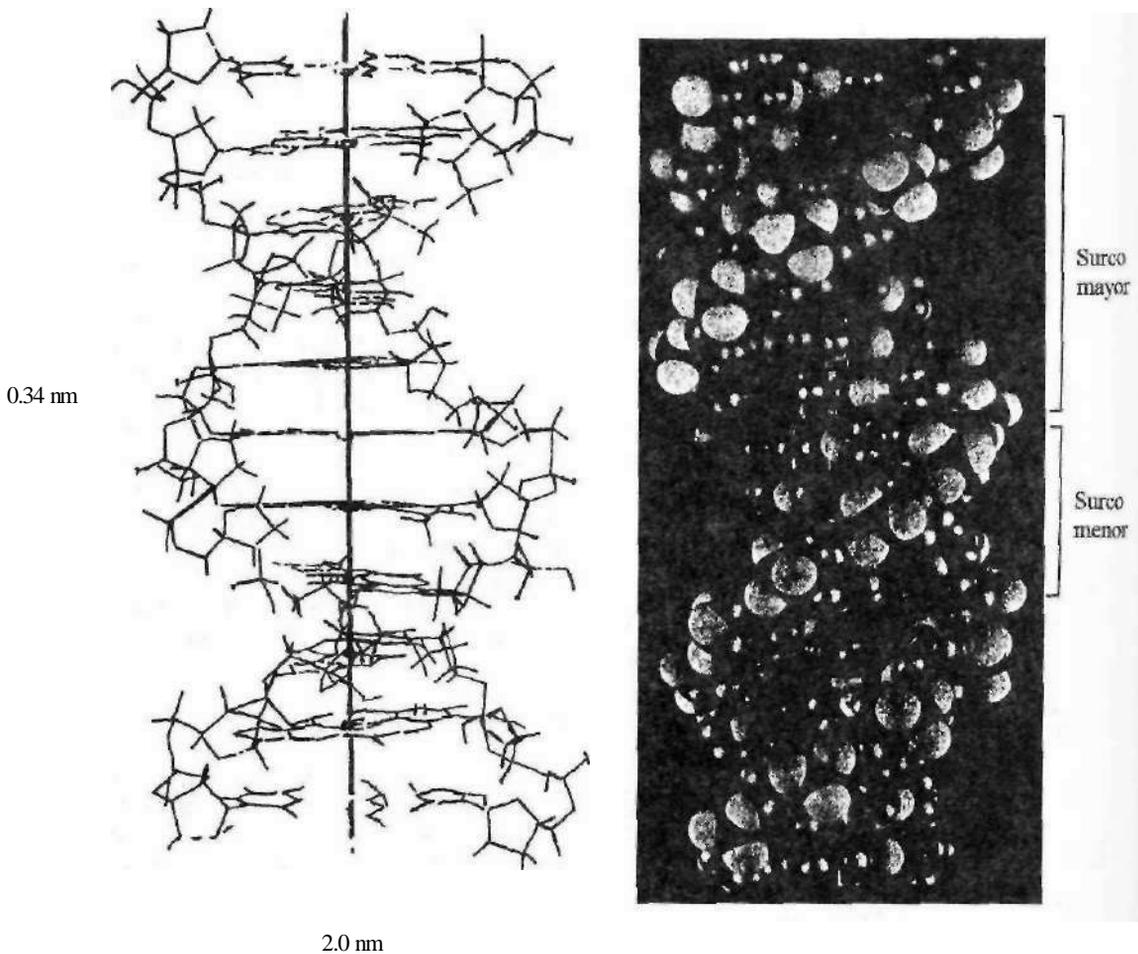


Figura 9.32. Estructura helicoidal del DNA. (M.H.F. Wilkins, Medical Research Council, Biophysics Unit, King's College, London.).

H2A-H2B-H4-H3-H3-H4-H2B-H2A

Este complejo DNA-histonas se denomina *nucleosoma*. La histona H1 se une al DNA y sella una sección de dos vueltas (161 pares de bases) generando el nucleosoma de forma discoide (Figura 9.34). La histona H4

es idéntica en plantas y animales y representa un caso de conservación evolutiva.

La organización del nucleosoma (subunidad básica) es universal en todas las células eucarióticas.

No todo el DNA celular se encuentra en el núcleo; una parte se localiza en mitocon-

* La forma más abundante.

drias. Curiosamente, el RNA y DNA mitocondrial guardan un mayor parecido con el ácido nucleico de las células bacterianas. El DNA mitocondrial es circular y no forma nucleosomas. Se ha llegado a postular que en la célula primitiva las bacterias invasoras coexistieron en simbiosis hasta transformarse evolutivamente en mitocondrias.

El DNA mitocondrial codifica la síntesis de todos los componentes de la cadena respiratoria y del sistema de fosforilación oxidativa. No obstante, la mayor parte de las proteínas mitocondriales están codificadas por genes del núcleo.

Debido a que las mitocondrias se heredan del citoplasma, un individuo no recibe DNA mitocondrial en la misma proporción de cada progenitor. De hecho, las mitocondrias se heredan por herencia materna.

Miopatía óptica hereditaria de Leber.

Esta enfermedad es producida por defectos en el genoma mitocondrial (miopatía mitocondrial). Produce ceguera en varones jóvenes. Consiste en la mutación de una sola base que modifica un codón de arginina por histidina en la NADH-coenzima Q oxidoreductasa del complejo I de la cadena respiratoria.

A excepción del RNAm que se sintetiza en el núcleo y luego llega al citoplasma donde, en conjunto con el RNAr y los RNA de transferencia, desempeña la función de sín-

tesis de proteínas, la localización de la mayor parte de los RNAs es citoplásmica. Los componentes del RNAr se sintetizan en el *nucléolo* y se concentran en el *sistema retículo endoplásmico*, asociados al RNAm en forma *depolisomas*.

9.5 REPLICACIÓN, TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA

Las relaciones del DNA con el RNA y con las proteínas pronto condujo al "dogma central" de la genética molecular. Este concepto fue propuesto por Crick en 1958 y establece el flujo de la información genética en el sentido DNA → RNA → proteínas, y no puede invertirse. Sin embargo, el descubrimiento de DNA polimerasas RNA dependientes (*transcripiosas inversas*) obligaron a revisar en 1970 el dogma central y adaptarlo a la forma:

DNA - RNA———. Proteínas

Los tres procesos que establecen la conservación y transmisión de la información genética son (1) *replicación* o copiado del DNA para formar moléculas hijas idénticas (2) *transcripción*, proceso por el cual el mensaje genético contenido en el DNA se

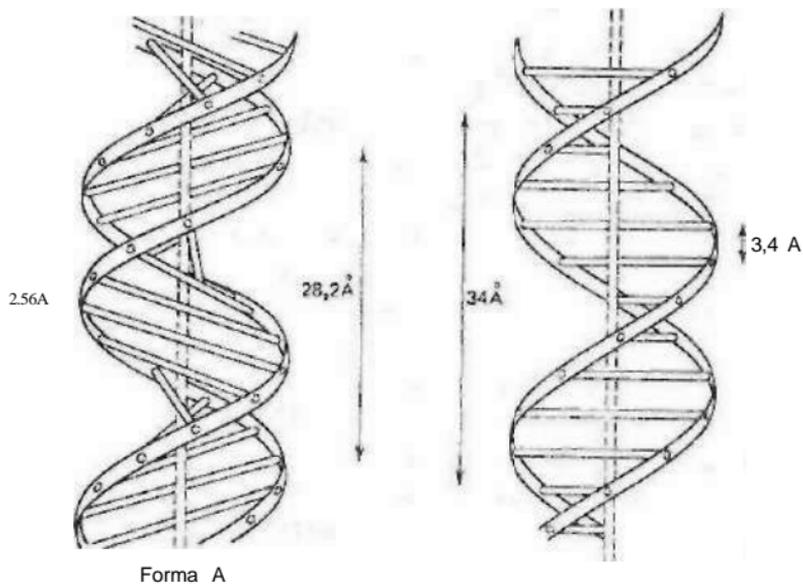
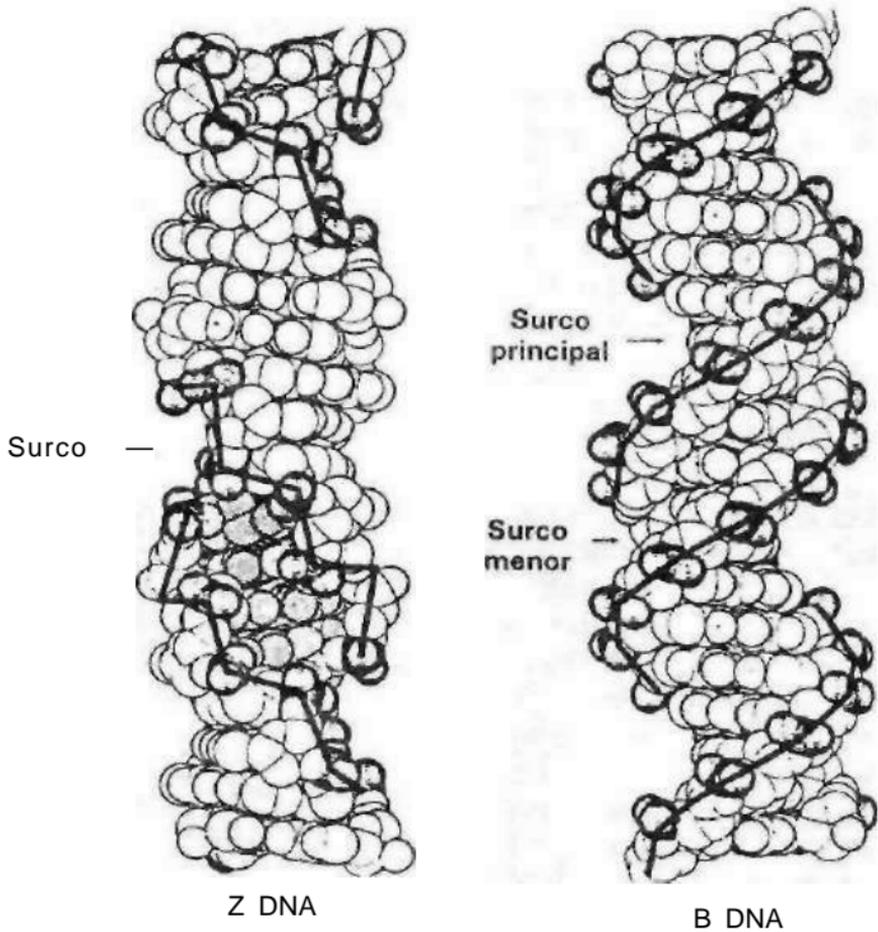


Figura 9.33. Diversas geometrías de la doble hélice del DNA.

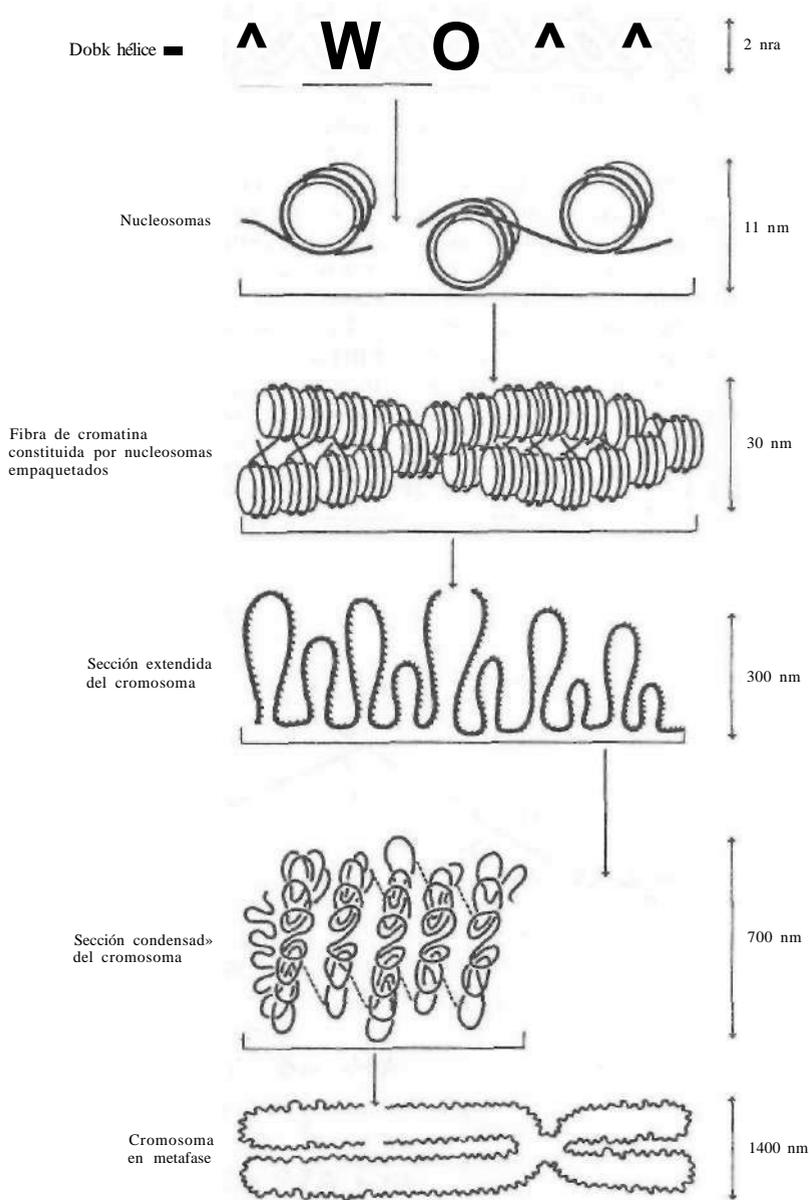


Figura 9.34 Distintos niveles de empaquetamiento de la cromatina, que constituye un cromosoma en metafase.

Por lo tanto, no fue una sorpresa para los bioquímicos descubrir que la naturaleza de los cromosomas es eminentemente proteica. ¿Qué otra cosa que no fuera el compuesto de "importancia primordial lo que determina la herencia del organismo? por la naturaleza del mensaje que habría de transportar, la molécula portadora del mismo debería ser grande, compleja y con gran posibilidad de variación. De esta manera, parecía lógico pensar que esta función de ser portadoras de la herencia biológica, residiera en las proteínas.

La proteína de los cromosomas es una proteína conjugada. En 1869, un joven químico alemán llamado Friedrich Miescher aisló de las células de pus una sustancia que, por haberla obtenido de células nucleadas, la llamó *nucleína*. Luego se demostró que poseía propiedades ácidas, y se le denominó *ácido nucleico*. Esta sustancia estaba unida a la proteína (conjugada) de los cromosomas, por lo que se le dio el nombre de *nucleoproteína*.

En 1935, el bioquímico norteamericano Wendell M. Stanley aisló el virus del mosaico del tabaco en forma de cristales de naturaleza proteica (Stanley compartió, por este descubrimiento, el Premio Nobel de Fisiología y Medicina de 1946). Luego resultó que este virus no era solo proteína, sino también contenía ácido nucleico, era una nucleoproteína.

En 1940, se habían descubierto dos entidades que se reproducían: los cromosomas y los virus. ¡Y las dos eran nucleoproteínas!

Sin embargo, para los químicos de 1940 la proteína tenía precedencia sobre la nucleoproteína. Bastaba considerar la gran variabilidad de las proteínas como integrantes de las *enzimas* y *anticuerpos*. Cada especie tiene miles de enzimas todas diferentes y al parecer, no existe límite para el número de anticuerpos que pueden producirse.

Por esto, muchos científicos, más que buscar a la molécula portadora de la información genética, se dieron a la tarea de demostrar que las proteínas eran dichas moléculas; sin embargo, ningún bioquímico

pudo conseguir que una proteína corriente produjera un duplicado de sí misma.

Por el contrario, empezaron a surgir hallazgos que sugerían que el *ácido desoxirribonucleico (DNA)* podía ser el responsable de esta importante función. Estos hallazgos fueron los siguientes:

a) La cantidad de DNA en las células de un organismo es constante y no se altera por circunstancias ambientales, cambios en la nutrición, en el metabolismo, o en el estado de salud del mismo.

b) Los gametos femenino (óvulo) y el masculino (espermatozoide) poseen sólo la mitad de la cantidad de DNA presente en las células somáticas.

c) Aunque en forma aproximada, el contenido de DNA de las células de una especie, coincide con el grado de complejidad de la misma.

d) Se observó que las longitudes de onda de la luz ultravioleta que producen más mutaciones, son las que más se absorben completamente por los ácidos nucleicos.

Las anteriores, si bien eran evidencias, no probaban de manera directa que el DNA era el portador de la herencia biológica.

Los primeros estudios que apoyaron esta idea, fueron realizados por el investigador inglés Fred Griffith en 1928. Griffith trabajó con dos cepas de neumococo; una patógena que poseía cápsula (cepa S) y otra, no patógena, incapaz de formar cápsula (cepa R).

Griffith observó que la adición de células S virulentas, muertas por calor, a células R no virulentas vivas, provocaba que algunas células R se transformaran de manera permanente en células S con cápsula. Esto significaba que las células incapaces de formar cápsula, recibían la información para sintetizar la enzima necesaria para elaborar dicha cápsula.

Era claro que, si toda la información de lo que es capaz de hacer a nivel molecular una célula se encuentra en su material hereditario, la cepa R estaba recibiendo de la cepa S, una porción de dicho material. Saber qué era

transcribe al RNA mensajero y (3) *traducción*, proceso por el que el mensaje genético es llevado a los ribosomas donde el RNA mensajero, actuando como plantilla o molde, dirige la secuencia específica de aminoácidos durante la biosíntesis de proteínas (Figura 9.35).

La mayor parte de las bases moleculares de la transmisión de la información genética se obtuvieron en procariotes, principalmente *Escherichia coli* y bacteriófagos cuyo ciclo vital asexual, con un solo cromosoma, ocurre en estado haploide. Así, la genética bacteriana se puede estudiar sin las complicaciones de dominancia y recesividad mendeliana de las células eucarióticas diploides.

Aunque los patrones moleculares de la replicación, transcripción y traducción parecen ser idénticos en procariotes y eucariotes, en estos últimos se superponen complicaciones especiales. Los organismos eucariotes contienen más información genética, se reproducen por conjugación sexual durante la cual hay *recombinación*, es decir, intercambio de genes que se incorporan en el genoma de la progenie. *Genoma* es un término que indica el patrimonio genético de una célula de un organismo o una célula de vida libre.

Los procariotes también muestran recombinación, pero no es un proceso normal. Además, los eucariotes contienen DNA no sólo en el núcleo, sino también en mitocon-

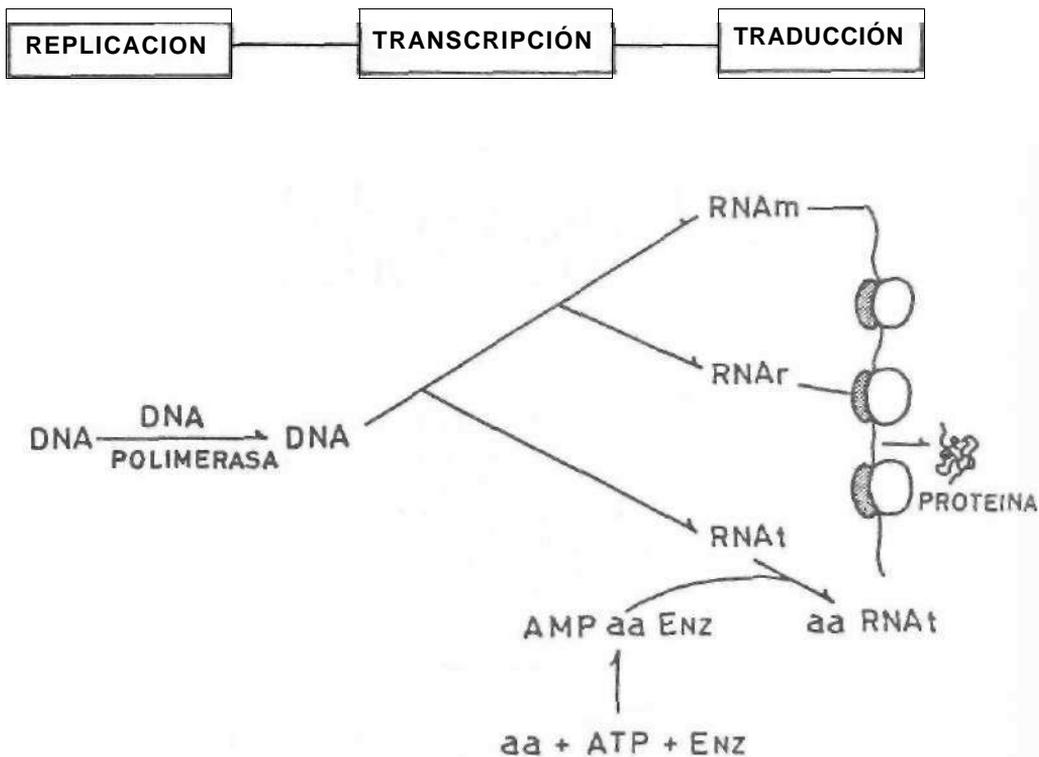


Figura 9.35. Resumen de eventos en la transmisión y expresión genética.

drías y otros organelos. (cloroplastos). Este DNA extranuclear está implicado en la herencia citoplásmica o extracromosómica, proceso aún poco conocido.

9.5.1 Replicación del DNA

El aspecto más notable del modelo de Watson y Crick desde el punto de vista genético es que los dos filamentos del DNA son complementarios y que cada uno de los DNA de doble filamento resultantes son copia fiel y exacta del original.

Cuando una célula o un organismo se reproduce, la información contenida en el DNA debe pasar íntegra a la nueva célula u organismo generado. La forma de lograr esto, es produciendo copias exactas del DNA progenitor. Se plantearon tres hipótesis para explicar como se llevaba a cabo la replicación:

1. Hipótesis de la réplica conservativa del DNA en la cual, una doble hélice precursora "original" da origen a una nueva, quedando íntegra la original.

2. Hipótesis de la réplica semiconservativa en la cual la doble cadena precursora da origen a dos cadenas dobles teniendo cada una de ellas un filamento nuevo y uno original.

3. Hipótesis de la réplica dispersora según ésta, la doble cadena precursora se rompe en fragmentos a determinados intervalos y los segmentos replicados nuevos se combinan en una misma fibra con la progenitora (Figura 9.36).

Las experiencias de Messleson y Stahl en 1958, demostraron que la hipótesis semiconservativa era la correcta. Para ello cultivaron bacterias (*E. coli*) en un medio conteniendo nitrógeno pesado (^{15}N) en lugar del nitrógeno corriente (^{14}N). Después de un cierto tiempo cada molécula de ácido nucleico contenía dos filamentos 15-15. Estas bacterias con DNA 15-15 fueron trasladadas

a un medio con ^{14}N y se las mantuvo durante dos generaciones. En la primera generación todo el DNA resultó con una densidad desde luego intermedia (15-14), lo que indica que el modelo semiconservativo es el correcto (Figura 9.37).

La replicación del DNA es más compleja de lo que se creyó en un principio. Uno de los problemas planteados es ¿cómo se separan las cadenas de doble hélice? En una célula de crecimiento rápido, se ha calculado que durante el desenrollamiento, la molécula debería girar a 10,000 rpm, velocidad muy improbable. El problema lo solucionan tres tipos de proteínas que actúan antes de las polimerasa y que se encargan de desenrollar y mantener separadas las dos cadenas del DNA original. Estas proteínas son las DNA *topoisomerasas* que rompen un enlace éster de una cadena y permiten el giro de la cadena que permaneció intacto; las *helicadas* desenrollan el DNA y las *proteínas fijadoras, o desestabilizantes del DNA* (pubs) se unen a una cadena del DNA e impiden que se una con la complementaria, de esta manera mantienen las dos cadenas del DNA separadas en llamado horquilla o *tenedor de replicación*, lugar donde la replicación se está llevando a cabo por la DNA polimerasa (Figura 9.38).

Una vez separadas las dos cadenas del DNA, la DNA polimerasa catalizará la incorporación de los desoxirribonucleósidos trifosfato usando como *molde* una de las cadenas. Todas las DNA polimerasas añaden nucleótidos al extremo 3' de un *cebador* existente. En este punto es necesario distinguir entre molde y cebador. El término *molde* se refiere a una secuencia estructural que proporciona el patrón para la síntesis de otra molécula de secuencia complementaria. El término *cebador* se refiere a una molécula que determina el punto de crecimiento para la ulterior adición de unidades monoméricas. Un buen ejemplo de cebador es el glucógeno al que se añaden unidades de glucosa; sin

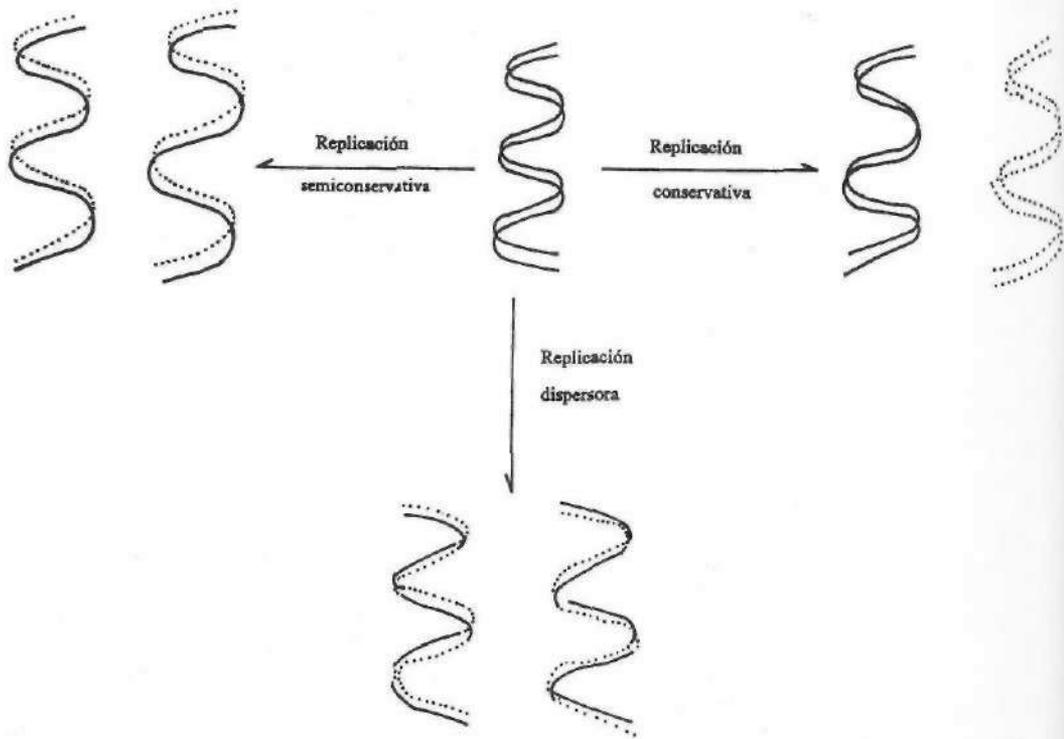


Figura 9.36. Hipótesis planteadas para explicar la replicación del DNA

—————cadenas originales

.....cadenas hijas

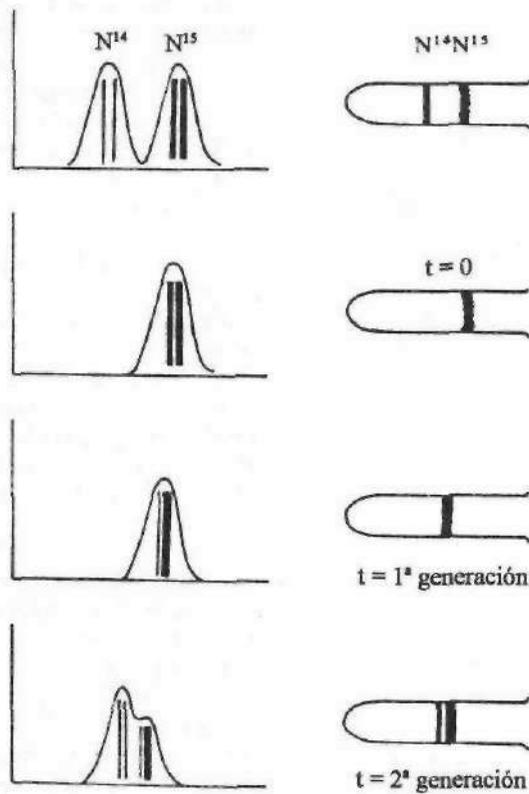


Figura 9.37. Resultados obtenidos por Messelson y DNA 15-15 y la línea fina el DNA 14-14.

a distintos tiempos. La línea gruesa representa el

embargo, el glucógeno carece de actividad de molde. El DNA posee ambas actividades, molde y cebador. Los bioquímicos han buscado infructuosamente una enzima capaz de agregar desoxirribonucleótidos al extremo 5' de un DNA cebador, lo cual plantea otro de los problemas: ¿cómo se sintetizan simultáneamente ambas cadenas de DNA?

En 1968, Reiji Okazaki demuestra que en *E. coli* el DNA sintetizado lo hace en fragmentos que luego se unen en un *modelo de replicación discontinua*. La cadena, llamada *conductora* o *líder*, se duplica en un *modelo*

continuo, en dirección 3' -* 5'; la cadena llamada *retardada*, duplicada en fragmentos llamados *fragmentos de Okazaki*, sigue la dirección contraria al tenedor de replicación.

Tanto la cadena continua (líder) como la discontinua (retardada) utilizan un *RNA cebador* para iniciar la síntesis de DNA. el RNA cebador es eliminado del DNA después de su síntesis por acción de la *DNA polimerasa I*, que posee actividad de nucleasa (para degradar el RNA) y actividad polimerasa (que sintetiza el DNA complementa-

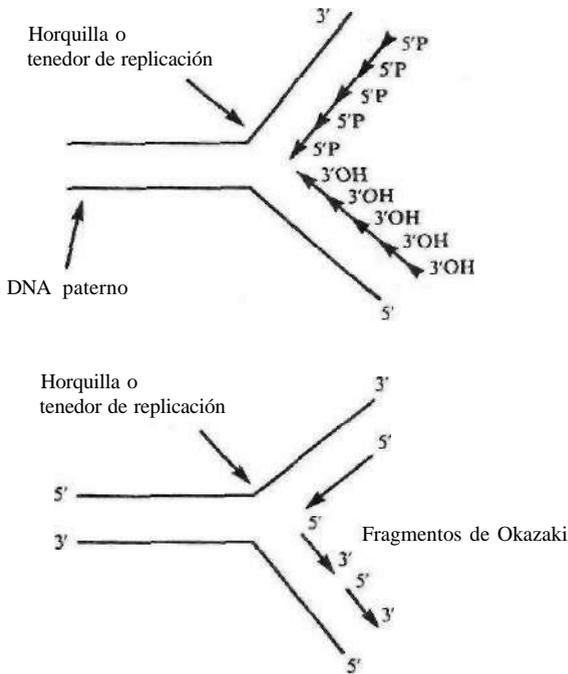


Figura 9.38. Replicación del DNA.

rio). La unión de los fragmentos de DNA lo lleva a cabo una *DNA ligasa* (Figura 9.39).

La enzima que sintetiza el corto segmento de **RNA** es la *primasa*, en rigor una RNA polimerasa.

La velocidad de duplicación del DNA en mamíferos es 10 veces más lenta que en bacterias, los fragmentos de Okazaki son más pequeños. Las **DNA** polimerasas de células animales son la **DNA** polimerasa **a**, **p**, y **y**. La **DNA** polimerasa **a** es la más importante, su concentración es mayor que la de las otras dos y una de sus subunidades posee actividad de primasa, pero carece de actividad de nucleasa. Esta enzima comparte muchas propiedades funcionales con la DNA polimerasa **III** de *E. coli*. La síntesis de DNA

polimerasa **a** aumenta enormemente en el hígado en regeneración y otras células de división rápida.

La polimerasa **P** es más pequeña y es indudablemente una enzima de reparación. La DNA polimerasa *gamma* es la responsable de la síntesis de DNA mitocondrial y del DNA de algunos virus.

Mecanismos de reparación del DNA

En raras ocasiones se puede cambiar o modificar una base en la secuencia del DNA, es decir, se puede producir una *mutación*. Las mutaciones son las responsables de las enfermedades genéticas conocidas. Estas pueden ser producidas por agentes físicos o químicos. Entre los agentes físicos se encuentran las *radiaciones ionizantes*. La acción de los rayos X es indirecta ya que produce *radicales libres* los cuales producen mutaciones, al reaccionar con el DNA, o roturas cromosómicas.

Grandes dosis de luz ultravioleta pueden lesionar al DNA. La lesión química consiste en la formación de dímeros de timina en la misma cadena de DNA (Figura 9.40).

De no corregirse o eliminarse, estos dímeros de timina interfieren con la síntesis de DNA. Como la mayoría de las mutaciones son muy dañinas, hasta los organismos más sencillos poseen sistemas enzimáticos que reparan el DNA lesionado.

Los mecanismos de reparación pueden ser: (1) la *fotorreactivación enzimática*, según la cual una enzima es activada por luz visible (azul) que rompe el ciclobutano del dímero de timina; (2) la *reparación en la oscuridad* que consiste en un mecanismo de "corte-parche-corte-sello" llevada a cabo por: una *endonucleasa* (corte) que rompe por el extremo 5' de los dímeros; una actividad *DNA polimerasa* que sustituye la porción de la cadena de DNA que contenía el dímero (parche); una *exonucleasa* que elimina después el fragmento de DNA con el

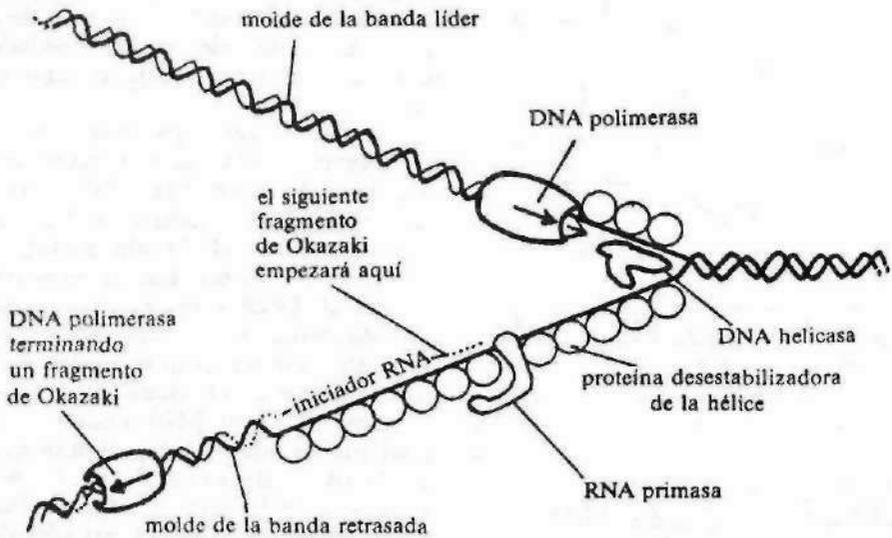


Figura 9.39. Fragmentos de Okazaki durante la replicación del DNA.

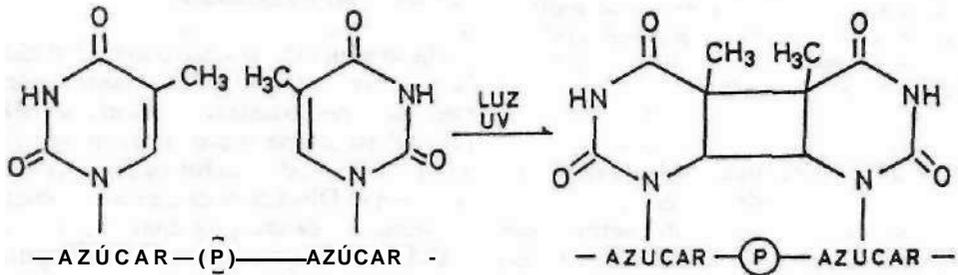


Figura 9.40. Formación de dímeros de timina.

dímero (corte) y, finalmente, una *DNA ligasa* (sello) vuelve a unir la cadena reparada (Figura 9.41).

Estos sistemas de reparación son importantes ya que defectos genéticos en las enzimas de reparación pueden ocasionar enfermedades en el ser humano como son, el xeroderma pigmentosum, la enfermedad de

Bloom, la anemia de Fanconi, la progeria y la ataxia telangiectasia entre otras.

El *xeroderma pigmentosum* es una enfermedad genética autosómica recesiva que se caracteriza porque la piel es anormalmente sensible a los rayos ultravioleta de la luz solar y por la tendencia a desarrollar múltiples neoplasias de la piel. El defecto molecular



Figura 9.41. Reparación del DNA que ha sido inactivado por dímeros de timina producidos por luz ultravioleta. Reproducción autorizada con modificaciones de: R. Montgomery y cois., *Biochemistry. A case-oriented approach*, 4a. edición, pág. 616, C. V. Mosby, Col., St. Louis, 1983.

radica en la falta de la endonucleasa que participa en la reparación del DNA.

Se presenta con una frecuencia de 1:250,000 nacimientos, sobre todo en parejas consanguíneas. Pueden presentarse también manifestaciones neurológicas como deficiencia mental, sordera progresiva, ataxia y retraso del crecimiento. Los cánceres más frecuentes en el xeroderma son el carcinoma de células basales y el de células escamosas, así como melanomas malignos. Es frecuente la presencia de una excesiva cantidad de pecas en pacientes con xeroderma pigmentosum.

Un defecto en la DNA ligasa parece ser responsable de la enfermedad de Bloom que

se caracteriza por fotosensibilidad y lesiones faciales. No se ha aislado ninguno de los genes responsables de las enfermedades por defectos genéticos en la reparación del DNA.

Se conocen virus que causan cáncer en animales como el virus del sarcoma de Rous en pollos, el virus de la mieloblastosis aviaria y el virus que produce cáncer mamario en roedores, H. M. Temin postuló que el RNA de estos virus debía ser transcrito bajo la forma de DNA a fin de incorporarse en el genoma celular del huésped. En efecto, estas partículas virales contienen las llamadas *transcriptasas inversas*, es decir, DNA polimerasas que usan RNA como molde. Al igual que las otras DNA polimerasas, fabrican DNA en dirección 5' - 3', requiere nucleósidos trifosfato y RNA plantilla-cebador. Estas enzimas han sido aisladas de células malignas de animales y pacientes con leucemia.

9.5.1.1 Código genético

Hasta aquí hemos visto como se almacena la información en el DNA y cómo se transmite ese cúmulo de información a las células hijas. Pero ¿cómo se pasa del ácido nucleico a la proteína? ¿de qué forma la secuencia de bases en el DNA se traduce en secuencia de aminoácidos de una proteína?

Para dar respuesta, hagámonos primero este planteamiento: con raras excepciones, podemos afirmar que todos los eventos metabólicos están mediados directa o indirectamente por proteínas en sus diferentes formas: acarreadores, enzimas, hormonas, etc. Por lo tanto, podemos afirmar somos lo que nuestras proteínas son, por lo que el DNA deberá poseer la información para la síntesis de las mismas. Hoy sabemos que así es.

Los diferentes segmentos de DNA codifican para diferentes proteínas. La forma en que se consigue esto radica en el hecho de

que debe existir un código o clave diferente para cada uno de los 21 aminoácidos que forman parte de las proteínas. De esta manera, si tenemos una proteína de 120 aminoácidos que comience con Gli-Glu-Ser..., en el DNA estará al principio de la información la clave para glicina, luego la clave para glutámico y posteriormente la de serina.

Como vemos, si se tiene un código inequívoco para cada uno de los 21 aminoácidos, podemos tener la clave para elaborar cualquier proteína. El orden del código cambiará según el orden de los aminoácidos de la proteína. Pero, ¿cómo es posible que la información suministrada por cuatro elementos baste para explicar lo que han de hacer veintinueve? Estamos acostumbrados a códigos en los que cada letra representa otra letra como en los criptogramas. No obstante, los códigos más usuales no se rigen por este principio. El idioma español consta de 28 letras, que son suficientes para formar más de 400,000 palabras. Es más, bastarían dos símbolos, 1 y 0, para el mismo fin como ocurre en las computadoras. En el RNA mensajero (o en el DNA del gene) hay sólo 4 nucleótidos diferentes; pero existen $4 \times 4 = 16$ combinaciones dinucleotídicas y $4 \times 4 \times 4 = 64$ combinaciones trinucleotídicas (triple), lo que plantea inmediatamente un nuevo problema. Hay pocos diptetes para los 21 aminoácidos y sobran tripletes.

Con este planteamiento quedan dos posibilidades: que 33 tripletes sean "formularios en blanco" o que quizá dos o incluso tres tripletes diferentes correspondan a un mismo aminoácido. Los experimentos realizados apoyan la segunda alternativa.

De un código en el que dos o más combinaciones correspondan a una misma cosa se dice que es *degenerado*. El código genético pertenece a esta clase. Esta situación da las siguientes ventajas.

a) Una mutación que cambie un triplete por otro, cambiará la información del aminoácido que va en ese sitio, pero es preferi-

ble que se cambie un aminoácido por otro a que se cambie un aminoácido por nada, como ocurriría si los 33 tripletes sobrantes no codificaran para nada y el triplete cambiando fuera uno de ellos.

b) Frecuentemente las mutaciones afectan una sola de las bases de un triplete, por lo que se pasa de una clave a otra pero del mismo aminoácido. De hecho, la degeneración no se establece al azar. Para especificar un aminoácido, las bases más importantes del triplete son la primera y la segunda; si la tercera base es una pirimidina, el resultado es el mismo y los codones resultantes se denominan *codones sinónimos*. Un codón es un triplete del RNAm que codifica para un aminoácido particular.

Si consideramos una proteína de 120 aminoácidos, la información de la misma estará contenida en 120 tripletes, es decir, $120 * 3 = 360$ bases.

Actualmente se conoce la clave que codifica para los 21 aminoácidos. Además, se identificaron tripletes "sin sentido" (UGA) y tripletes que interrumpen la síntesis de proteínas y significan "punto y aparte" (UAA, UAG). Se identificaron también tripletes de "inicio" de síntesis (AUG, GUG) (Tabla 9.4)

Un aspecto notable del código genético es su universalidad, es decir, que rige para todos los organismos desde el pino más alto o el mamífero más grande hasta el más pequeño de los virus. La prueba más clara de esto es que numerosos virus que infectan células de otro organismo, utilizando cada uno su propio RNA mensajero, se reproducen codificando sus propias proteínas en el sistema informático de la célula. Al parecer, la célula "entiende" el lenguaje de los distintos virus.

Con excepción de los codones mitocondriales, el código genético es universal. Por razones no conocidas, las mitocondrias usan ciertos codones de modo diferente (tabla 9-5)

Tabla 9.4

Código genético. Reproducción con autorización de J. M. Orten y O.W. Neuhaus, Human Biochemistry, 10a, edición, pág. 197, C. V. Mosby, Co. St. Louis, 1982

Tripleta de iniciación.

9.5.2 *Transcripción del DNA*

El proceso de elaboración de cadenas de RNA a partir de un molde de DNA se denomina *transcripción*; las enzimas que participan se denominan RNA polimerasas. Si

bien el proceso bioquímico de síntesis de DNA y RNA son muy similares, el significado biológico es bastante diferente. La replicación del DNA representa la duplicación de todo el genoma, la transcripción se limita a determinadas regiones de éste. Una *unidad*

de transcripción es la porción de DNA que codifica la síntesis de un RNAm.

Los tres tipos de RNA que se sintetizan son el RNA mensajero (RNAm), el RNA de transferencia (RNAt) y el RNA ribosomal (RNAr), todos comprometidos en la síntesis de proteínas.

La RNA polimerasa dependiente de DNA se parece a la DNA polimerasa en que la adición se inicia en el extremo 3' y se requiere el DNA como molde y los cuatro ribonucleósidos trifosfato (excepto que es UTP en lugar de TTP). En este caso no se requiere de RNA cebador.

En los procariotes, los RNAm tienen una vida media muy corta (unos pocos minutos) y son sintetizados sólo cuando la célula necesita las proteínas. Después de algunos ciclos de traducción, los RNAm son degradados por nucleasas celulares. En eucariotes, el perfil, de los RNAm es más constante, son mucho más estables y poseen vidas medias que van desde varias horas a varios días.

En los cromosomas de procariotes los genes se transcriben en un solo *RNAm policistrónico*, que comprende varios genes. En eucariotes, las proteínas están codificadas por *RNAm monocistrónicos* que contienen información para un único polipéptido.

En procariotes, la síntesis de todos los RNA (RNAm, RNAr y RNAt) está catalizada por una sola RNA polimerasa. En orga-

nismos eucariotes, la transcripción del DNA ocurre en el núcleo y la traducción se realiza en el citoplasma; los RNAm son sintetizados en forma de precursores, modificados antes de su transporte al citoplasma. Otra diferencia notable es que en eucariotes la síntesis de RNA se lleva a cabo por tres polimerasas distintas. La RNA polimerasa I (del nucléolo) transcribe los RNA ribosómicos 28S, 18S y 5.8S; la RNA polimerasa II sintetiza los precursores del RNAm y la RNA polimerasa III sintetiza los RNAt y el RNAr 5S (Figura 9,42).

RNA mensajero.

El DNA es un "prototipo nuclear", equivalente al prototipo internacional del sistema métrico, que se conserva como una barra de platino iridiado en una cámara acorazada con aire acondicionado, en París, así se guarda, bien protegido, el DNA en el núcleo.

Debido a los riesgos de daño que implica el que la información (DNA) salga al citoplasma, se toma lo que equivaldría a una fotocopia de esta información (RNAm) la que sale al citoplasma con el mensaje, mientras el original permanece en el núcleo sin riesgo a daños.

Hasta se puede invocar una razón para explicar que el DNA lleve timina donde el RNA lleva uracilo. Podría ser que el uracilo sirva simplemente para identificar al RNA.

lo que la cepa R recibía de la cepa S era de importancia crucial, pues equivalía a saber cuál era la molécula que transportaba la información genética.

En 1944, tres bioquímicos del Instituto Rockefeller, Oswald Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty consiguieron transformar bacterias R en S utilizando una solución de ácido nucleico, sin proteína alguna; cuando el ácido nucleico era tratado con DNasa, no era capaz de inducir la transformación. Con esto consiguieron demostrar que el gene era ácido nucleico. Imposible seguir dudando: la información genética sólo podía transmitirla el ácido nucleico.

Aunque al principio no fueron aceptadas estas evidencias como definitivas, abrumadores hallazgos posteriores no dejaron duda de que el DNA era el portador de la información genética. Una de las evidencias más importantes fue dada por Alfred Hershey y Martha Chase en sus trabajos con bacteriófagos marcados.

Ahora bien, una cosa era saber cuál era la molécula responsable de transmitir la información genética y otra muy diferente era saber en qué forma lo hace. Es decir, ¿cómo funciona el DNA?. Difícil era saber cómo funcionaba esta molécula si se desconocía su estructura.

En casi todo sistema molecular, conocer la estructura es un requisito previo que ayuda mucho a aclarar la función. Esta asevera-

ción reviste una especial validez en el caso del DNA ya que en cuanto se aclaró su estructura, su función y mecanismo de acción se explicaron correctamente.

9.2 ESTRUCTURA DE LOS COMPONENTES QUÍMICOS DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Cuando, en 1944, el ácido desoxirribonucleico entró en su apogeo, ya hacía tres cuartos de siglos que se había descubierto.

Poco después de ser descubierto, se averiguó que el DNA contenía fósforo. Se sabía que algunas proteínas contenían fósforo en pequeña cantidad: la caseína de la leche, uno por ciento; la lecitina de la yema de huevo, 3 por ciento. Pero el ácido nucleico es más rico en este elemento; contiene 9 por ciento de fósforo.

El fósforo se combina con 4 átomos de oxígeno, tres de los cuales se combinan con hidrógenos fácilmente dissociables, para formar la molécula de *ácido fosfórico* (H₃PO₄). Para simplificar se puede adoptar una forma convencional para indicar, no ya el fósforo sino el radical fosforilo por un P rodeada de un círculo (Figura 9.2).

En 1910, el bioquímico norteamericano de origen ruso Phoebus Levene identificó la *ribosa* como uno de los componentes del ácido nucleico; antes se ignoraba que exis-

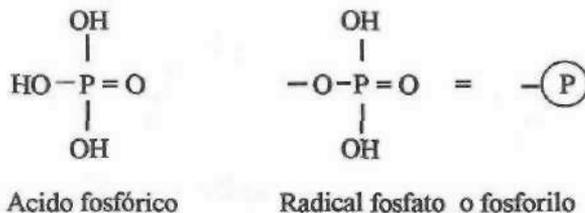


Figura 9.2. Estructura del fosfato (molécula y radical).

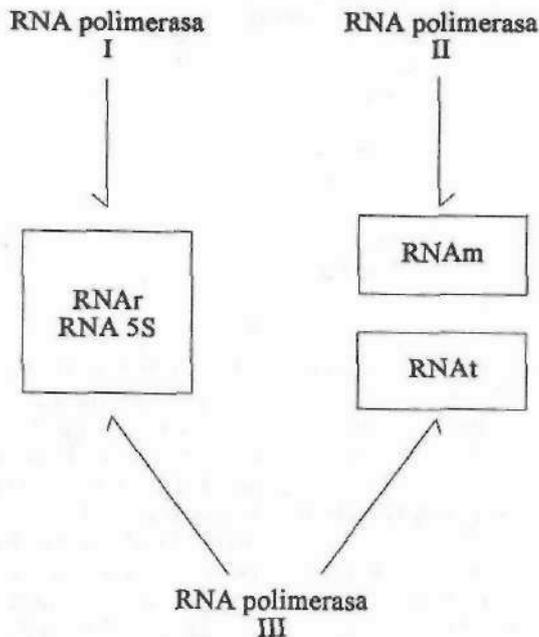


Fig. 9.42. Síntesis de RNAr, RNAt y RNAm.

Después de todo, el DNA permanece en los cromosomas mientras el RNAm sale. Cualquiera que sea el mecanismo que permite salir del núcleo al RNA y mantener aquí al DNA, tiene que poder distinguirlos. ¿Por qué no utilizar, como identificación, la carencia en el RNA de un insignificante grupo methV que se encuentra en el DNA?

En 1960, se habían reunido ya pruebas concluyentes de la existencia del RNA mensajero, en el Instituto Pasteur de París. En 1962 se aisló por primera vez RNAm de células de mamífero. Alfred Mirsky y Vincent Allfrey lo obtuvieron de timo de ternera.

Síntesis de RNA mensajero

La RNA polimerasa de procariotes consta de 5 subunidades (dos subunidades **a** idénticas y tres subunidades diferentes **p**, **p'** y **a**).

La subunidad **o** sólo forma parte de la RNA polimerasa en el momento de iniciar la transcripción, disociándose cuando empieza el proceso de elongación. Para iniciar la transcripción la RNA polimerasa debe interaccionar primero con secuencias específicas, del DNA llamadas *promotores*. En este punto la enzima queda firmemente unida al DNA para iniciar la síntesis de RNA.

Los promotores bacterianos están constituidos por dos secuencias de seis nucleótidos situadas a 10 y 35 bases del punto de inicio de la transcripción, las cuales se conocen como *caja Pribnow* (TATAAT) y *consenso* (TTGACA).

A continuación se produce el desenrollamiento de 12 a 17 pares de bases a partir de la caja Pribnow de manera que el DNA molde queda expuesto para ser transcrito. Una vez iniciado el proceso de transcripción, se

va desplazando la RNA polimerasa hasta encontrar determinadas secuencias denominadas *terminadores*. En algunos casos, la

terminación requiere de una proteína llamada factor p (rho) (Figura 9.43).

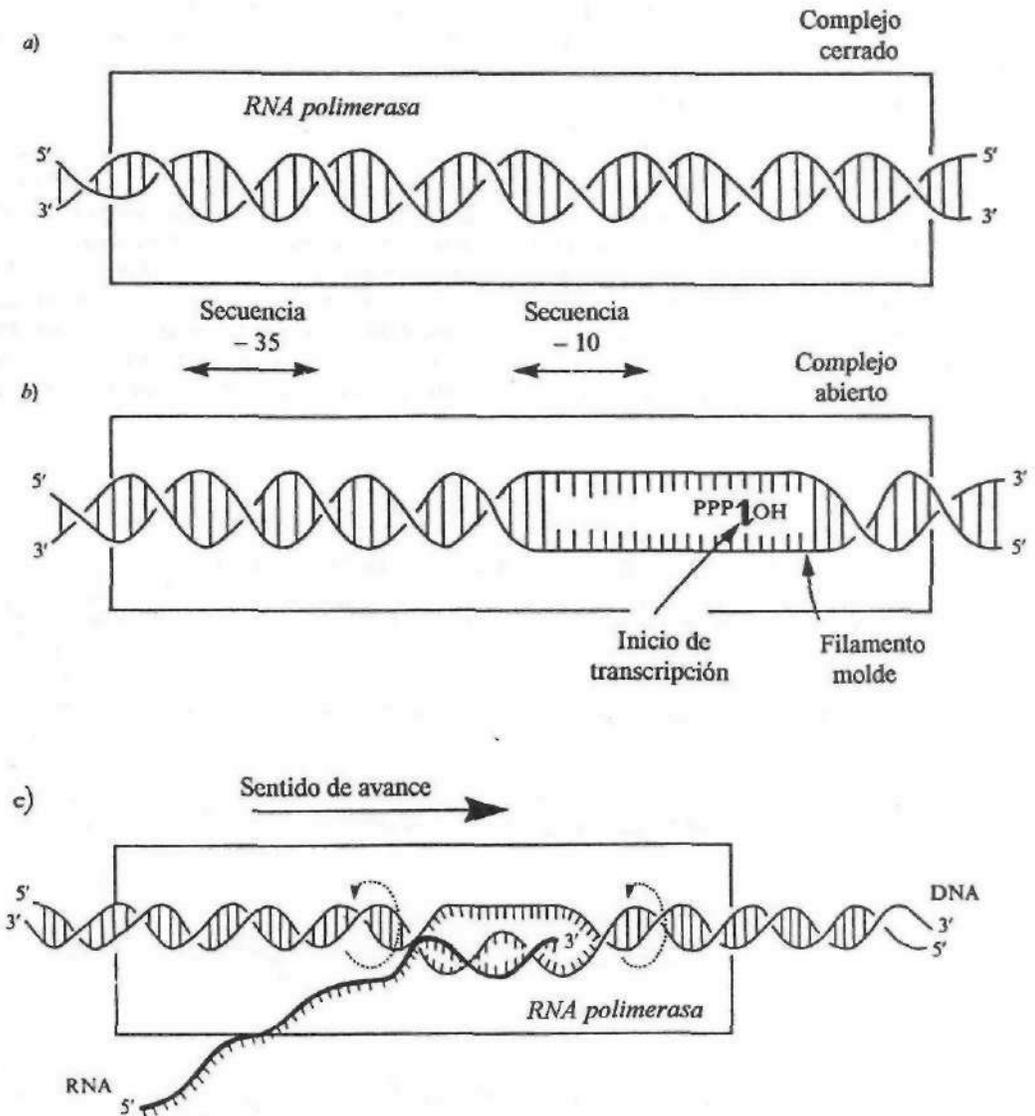


Fig. 9.43. Síntesis de RNA mensajero en procariotes.

La rifamicina y derivados semisintéticos (rifampicina) inhiben la RNA polimerasa de procariotes y mitocondrias uniéndose a la subunidad P de la RNA polimerasa. La subunidad P está involucrada en la formación del primer enlace intranucleotídico. La rifampicina es útil en el tratamiento de la tuberculosis y es también uno de los pocos agentes antivirales. Las RNA polimerasas eucarióticas no son sensibles a la rifampicina.

En los procariotes las modificaciones post-transcripcionales afectan únicamente a los RNAr y RNAt; en eucariotes todos los RNA funcionales son sujetos a modificaciones.

Los RNAm eucariotes se sintetizan en el núcleo a partir del *RNA heterogéneo nuclear* (RNAhn). Estos últimos presentan una modificación que consiste en la adición al ex-

tremo 5' de un residuo 7-metilguanosina trifosfato llamado *cap* (caperuza) mediante un enlace trifosfato, el cual parece estar involucrado en la protección del RNAm del ataque de nucleasas como en su unión a los ribosomas. En el extremo 3' se une una cola de poli A de unos 100 a 200 residuos. Excepcionalmente, algunos RNAm no poseen cola de poli A, como los que codifican para las histonas.

Otra característica de los precursores de RNAm es que contienen *intrones* (secuencias intermedias) que separan genes estructurales llamados *exones*. Los intrones son eliminados por corte y empalme (fig. 9.44). Es evidente que el proceso de eliminación de intrones debe ser preciso ya que un error de una base en el punto de corte y empalme destruiría por completo la lectura del

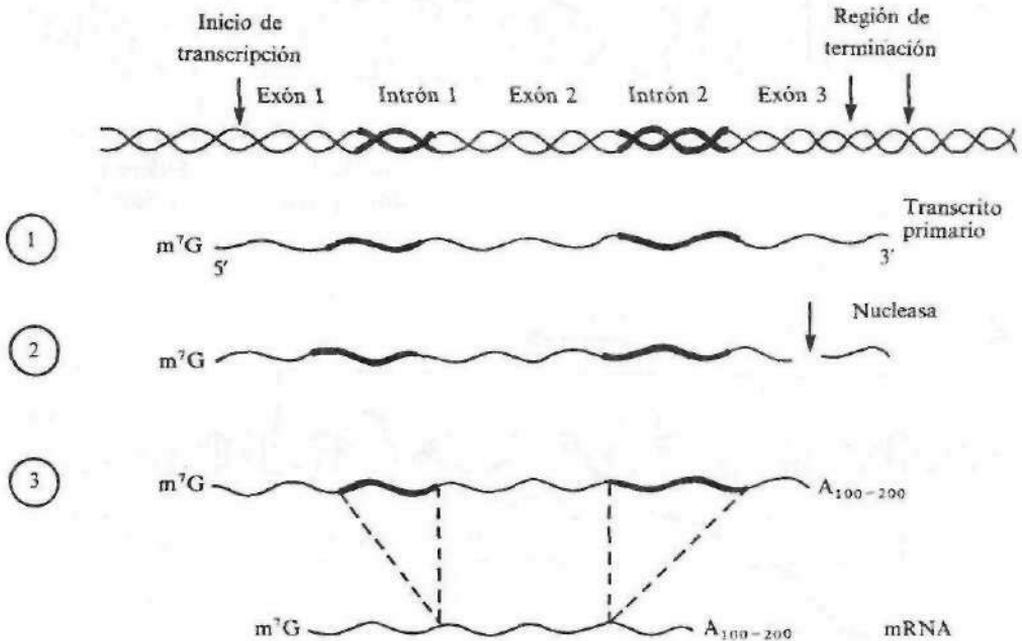


Fig. 9.44. Formación de RNAm en eucariotes.

RNAm. Los intrones son eliminados de forma secuencial, de manera que la escisión de un intrón no se produce hasta que el anterior ya ha sido eliminado.

Muchas setas (hongos) son tóxicas. Una de las más peligrosas son las de género *Amanita phalloides*, cuya ingestión produce espasmos abdominales, vómitos y diarrea en 12 a 24 horas. La toxina a-amanitina, que no se elimina por cocción, es un potente inhibidor de la RNA polimerasa II; la polimerasa III es menos sensible y la polimerasa I no se inhibe en absoluto.

El quimioterapéutico anticanceroso actinomiana D inhibe el alargamiento de la cadena de RNA de eucariotes por unión a un DNA molde y de esta manera inhibe la transcripción pero no la traducción.

Los promotores de la RNA polimerasa II presentan una secuencia en la posición 30 conocida como *caja TATA* o *caja Hogness*, similar en secuencia a la caja Pribnow procarionota. Otros promotores son la *caja CAAT* y la *caja GC*.

La P-talasemia proviene de un defecto hereditario de la síntesis de hemoglobina producida por una mutación de la caja ATA del promotor de la p-globina (ATAAAA muta a ATGAAA); esto da como resultado una disminución del 80% del RNAm de p-globina.

9.5.3 Traducción del RNA mensajero

Se denomina traducción al proceso por el cual la información genética contenida en el RNAm se expresa en una proteína; se denomina *traducción* porque la información tiene que ser transferida del lenguaje de cuatro letras de los ácidos nucleicos al idioma de 20 letras de los aminoácidos que constituyen las proteínas.

Dentro de la misma analogía con el lenguaje, las secuencias de bases se escriben, por convención, de izquierda a derecha, desde el extremo 5' al 3', mientras que las se-

cuencias de aminoácidos se escriben, también por convención, de izquierda a derecha desde el amino-terminal del aminoácido inicial al carboxilo-terminal. Ya veremos que existe una correspondencia en esta direccionalidad entre el RNAm y las proteínas.

Biosíntesis de proteínas

La síntesis de proteínas implica la convergencia de información secuencial del RNAm, aminoácidos, RNAt, energía en forma de GTP y diversos factores proteicos. El proceso tiene lugar en la superficie de los ribosomas (complejos nucleoproteicos) con la participación de enzimas.

En virtud de que los aminoácidos no tienen especial afinidad por los ácidos nucleicos, el verdadero elemento *traductor* es aquel que transporta cada aminoácido específico y lo hace coincidir con su respectivo *codón* en el RNAm. Este elemento es el RNAt. El hecho de que haya 61 codones hizo pensar en un principio que serían necesarios 61 RNAt, uno para cada codón. Sin embargo, pronto se descubrió que un aminoacil-RNAt, por ejemplo, el Ala-RNAt podía reconocer varios codones diferentes, lo cual es posible gracias a que el *anticodón* del RNAt posee inosina, que establece puentes de hidrógeno con más de una base del codón. Así, el apareamiento de bases entre el último nucleótido del codón y el nucleótido correspondiente al anticodón no es estricto. Este fenómeno se denomina *bamboleo o balanceo*, propuesto por Crick en 1966. Por ejemplo, los codones para la glicina, GGU, GGC y GGA pueden acoplarse al anticodón CCI. Este hecho no sólo se ha observado con inosina, sino también con guanina y uracilo. Existen así al menos tres RNAt para los seis codones de la serina: UCU, UCC, UCA, UCG, AGU y AGC. De acuerdo con la hipótesis del balanceo se necesitaría un mínimo de 32 RNAt para traducir los 61 codones con sentido del código genético.

Estructura del RNA de transferencia.

Los RNAt son los RNA celulares más pequeños; constituyen alrededor del 15% del RNA total. Es característico su alto porcentaje de *bases no usuales* producto de modificaciones postranscripcionales. En la actualidad se conoce la secuencia de RNAt de orígenes muy variados pero el primero en ser caracterizado fue el Ala-RNAt de levadura (fig. 9.45).

Llama la atención la semejanza de estructuras secundarias como consecuencia de apareamiento de bases dentro de la misma

molécula de RNAt. Esto permite la existencia de *brazos* en regiones no apareadas que le dan al RNAt el aspecto bidimensional de "hoja de trébol". En el "tallo" del trébol se encontrarían los extremos 3' y 5' de la cadena única; el nucleótido 5' es casi siempre G y el extremo 3' es siempre CCA-OH. El aminoácido transportado por el RNAt se une a la adenosina terminal 3' por lo que dicha secuencia CCA es un requerimiento absoluto para su funcionalidad.

Otro es el brazo T^ψFC (ribotimina-pseudouridina-citidina) que interviene en la unión del aminoacil-RNAt a la superficie ri-

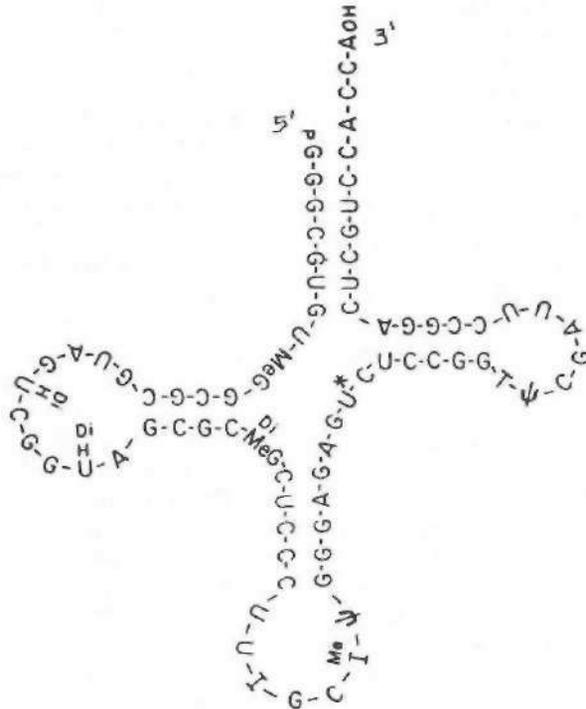


Fig. 9.45. Estructura bidimensional del RNAt de alanina. (De Helley R. y cois. Science, 147: 1462, 1965. Copyright 1965 American Association for Advance of Science).

bosómica durante la síntesis de proteínas. El brazo D contiene 8-12 bases no apareadas donde una o dos son dihidrouridina (Dh). El brazo D es el sitio de reconocimiento de un RNAt por la aminoacil-RNA sintetasa correspondiente.

El brazo correspondiente al anticodón presenta 7 bases no apareadas y está ubicado a la mitad de la molécula. Es una región que aparece con el codón del RNAm de manera antiparalela. El anticodón del Ala-RNAt es IGC, de modo que el codón GCG en un RNAm especificaría la alanina.

Al igual que el trébol de la buena suerte, se encuentra en algunos RNAt un brazo extra, de tamaño variable, entre el brazo T^ψC y el brazo anticodón.

Existen otras interacciones además del apareamiento intramolecular que pliegan la estructura de hoja de trébol a otra más compacta en forma de L (fig. 9.46). El grupo aceptor del aminoácido CCA queda en un extremo de la L, mientras que el anticodón queda en el opuesto.

Estructura del RNA ribosomal

Los ribosomas son estructuras nucleoproteicas que posibilitan la interacción de los RNAm con los distintos aminoacil-RNAt con lo cual la información genética se traduce en la correspondiente proteica.

El lugar de síntesis del RNAr es el nucléolo; cada nucléolo contiene DNA circular

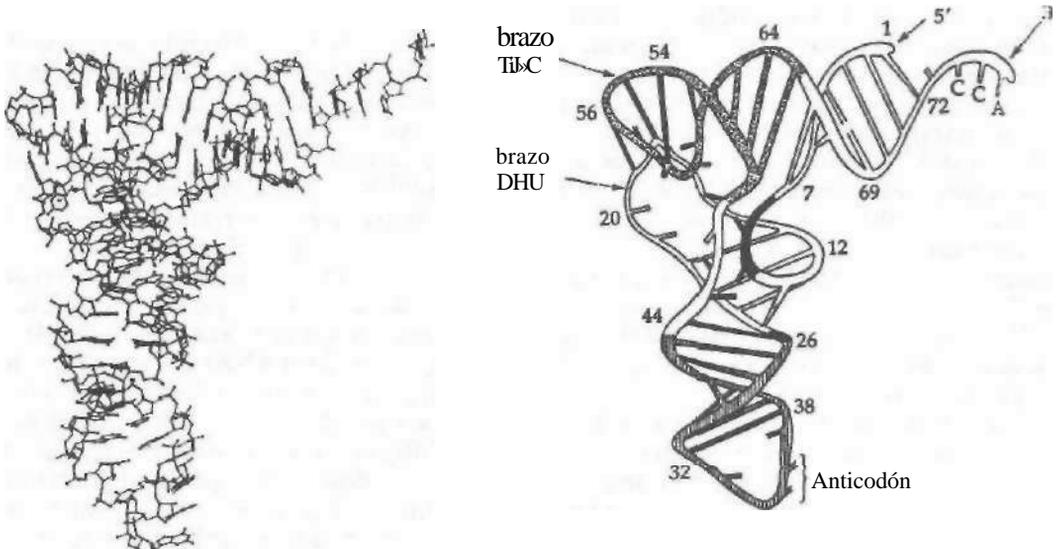
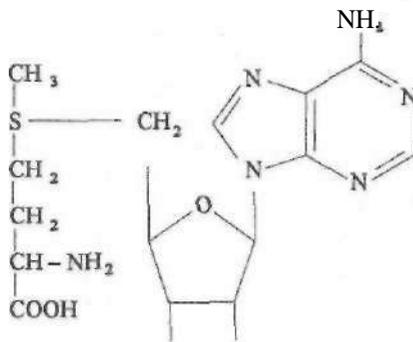


Fig. 9.46. Estructura tridimensional del RNAt demostrada por cristalografía de rayos X

simple. En células eucarióticas el RNAr tiene como precursor un filamento de 45S, el cual debe ser metilado, igual que el RNAt. La metilación requiere S-adenosilmetionina.

nes del nucleoplasma. La falta de RNAr 5S en un ribosoma hace que éste sea inactivo. El RNAr 5.8S no se encuentra en procariotes.

La síntesis de cadenas polipeptídicas se lleva a cabo en cuatro etapas: activación,



S-adenosilmetionina.

Con la metilación, el precursor 45 S del RNAr se convierte en sustrato de nucleasas nucleolares que escinden la molécula en fragmentos de 23S, 18S y 5.8S.

Los ribosomas de eucariotes y procariotes están compuestos por dos subunidades. El ribosoma de *E. coli* (uno de los mejores estudiados) y el de mitocondria, tiene un tamaño de 200 A y un coeficiente de sedimentación de 70S. Consta de 2 subunidades, una grande de 50S y una pequeña de 30S. La subunidad 50S está compuesta de RNAr 23S y 5.8S, y 31 proteínas, mientras que la subunidad 30S contiene RNAr 16S y 23 proteínas diferentes.

Los ribosomas de eucariotes son ligeramente más grandes y presentan mayor complejidad estructural. Su coeficiente de sedimentación es de 80S y sus dos subunidades contienen RNAr 28S, 5.8S y 5S (subunidad grande, 60S) más 50 proteínas y RNAr 18S más 30 proteínas (subunidad pequeña, 40S) (fig. 9.47). El RNAr 5S no se transcribe en el nucléolo sino a partir de ge-

iniciación, alargamiento y terminación.

Activación. Esta etapa ocurre en el citosol y consiste en la unión del aminoácido con su correspondiente RNAt. Cada uno de los 20 aminoácidos codificados tiene una aminoacil-RNAt sintetasa específica pero, de acuerdo a la hipótesis del bamboleo, cada aminoacil-RNAt sintetasa reconoce uno o varios RNAt que poseen anticodones afines para un aminoácido específico.

La sintetasa posee un sitio específico para el aminoácido y un sitio para el RNAt. Existe un tercer sitio común para el ATP (Figura 9.48).

Una vez unido el RNAt, el aminoácido no participa en el reconocimiento del codón y la colocación de éste en la proteína es responsabilidad absoluta de la interacción codón-anticodón. Esto quedó demostrado mediante un elegante experimento que consistió en tratar cisteína-RNAt con hidrógeno, con lo que se transformó en alanina-RNAt. De esta manera, se incorporó alanina al polipéptido en el lugar donde debería estar cisteína.

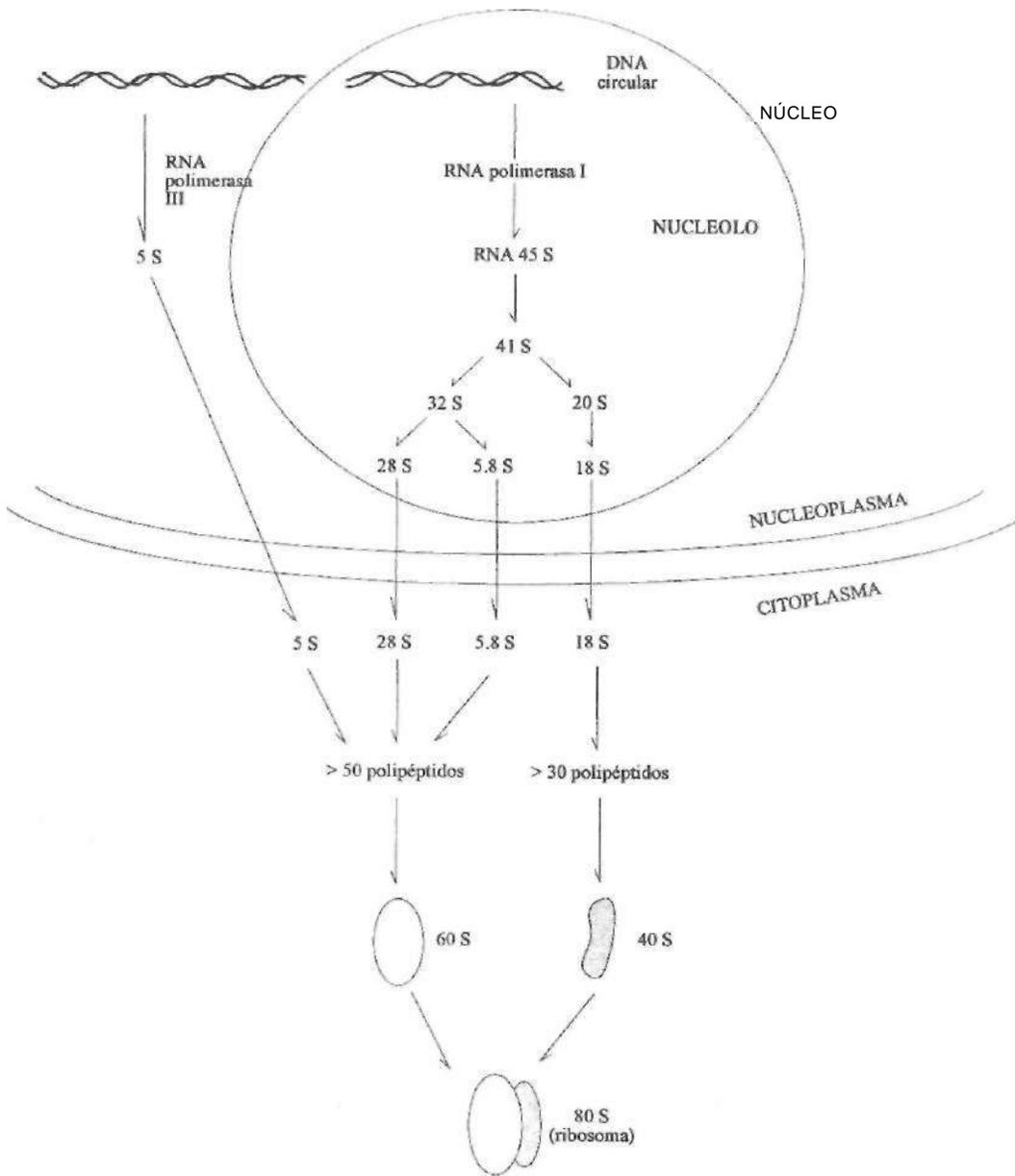


Figura 9.47. Formación del ribosoma 80 S eucariotes.

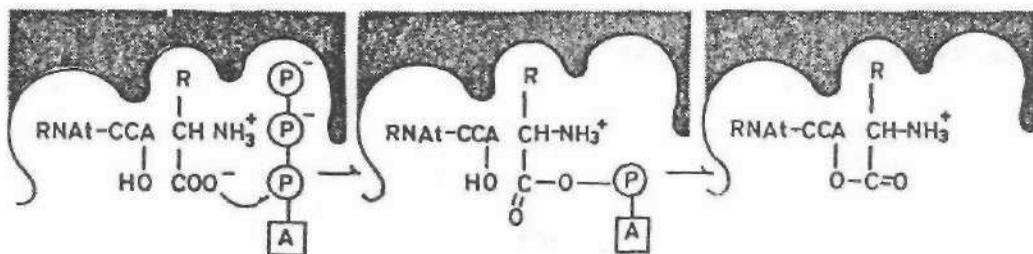
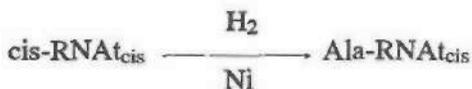


Figura 9.48. Formación de aminoacil-RNAt. Modificada con autorización de J. M. Orten y O. W. Neuhaus, Human Biochemistry, 10a. edición, pág. 200, C. V. Mosby Co., St. Louis, 1982.



Así, las aminoacil-RNAt sintetasa tienen que ser muy específicas. Sólo reconocen L-aminoácidos, no los D-isómeros, y con grupos amino en posición α . Las sintetetas también tienen elevada especificidad para el ATP.

(1) Aminoácido + enzima + ATP \rightarrow enz-aminoacil adenilato + PPi

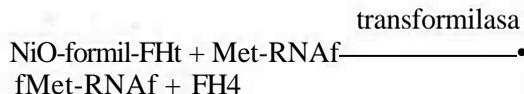
(2) Enz-aminoacil adenilato + RNAt \rightarrow aminoacil-RNAt + enz "aa activado"

Iniciación. Los aminoacil-RNAt se unen a los ribosomas. El ensamble de ribosomas y RNAm ocurre en etapas. El RNAm y el aminoacil-RNAt iniciador no se pueden unir directamente al ribosoma. Se requiere para ello de proteínas denominadas *factores de iniciación* (FI). Estas no son proteínas estructurales del ribosoma. La unión del RNAm a la subunidad ribosómica 40S requiere del factor de iniciación 3 (FI-3). Para ello se requiere que el ribosoma se encuentre disociado lo cual se logra por unión de la fracción 40S (o 30S en procariotes) con el factor de iniciación 1 (FI-1). Este *complejo de preiniciación*: 30S.FI-1.FI-3 requiere del factor de iniciación 2 (FI-2) para unirse al

RNAt y al RNAm. El FI-2 unido al complejo permite la unión de GTP, así como la unión simultánea del codón de iniciación y del aminoacil-RNAt (Figura 9.49).

El RNAm es traducido en la misma dirección en que es transcrito; es decir, el extremo 5' del RNAm corresponde al extremo amino de la proteína codificada por dicho RNAm. El codón o triplete de iniciación es el AUG del RNAm, que corresponde a *metionina*.

En procariotes, es absolutamente imprescindible que la metionina se encuentre *formilada*; en eucariotes, sin embargo, la síntesis de proteínas se inicia con metionina no formilada. En procariotes, la metionina puede activarse con dos tipos de RNAt-RNA^M y RNA^f. Después de unida la metionina a estos RNAt, el segundo es formilado después de activado, nunca antes:



Las células eucarióticas no poseen transformilasa y no es posible formilar la Met-RNAt para iniciar la síntesis de proteínas. Sin embargo, todas las cadenas polipeptídicas

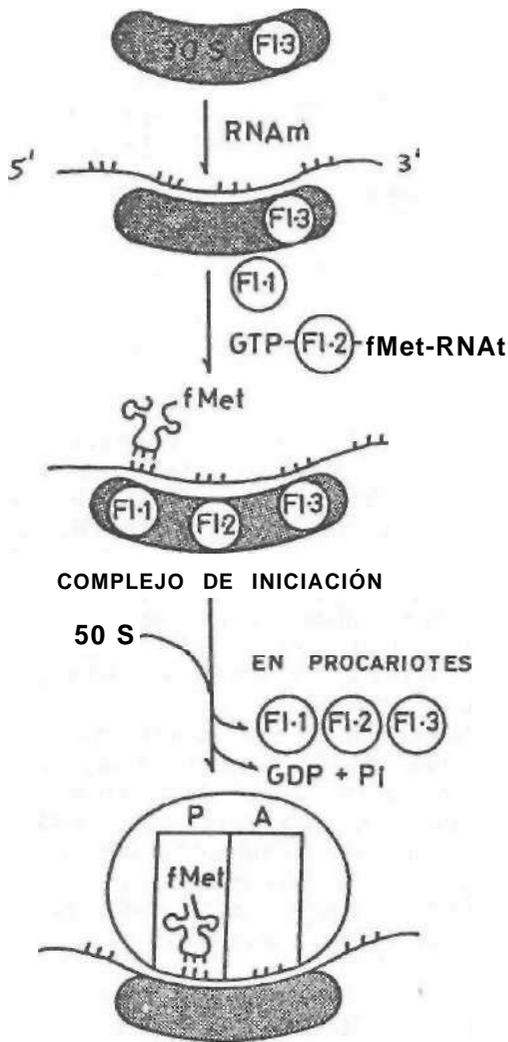


Figura 9.49. Inicio de la biosíntesis de proteínas.

cas empiezan con metionina. Este residuo de metionina es escindido después de crecer un poco la cadena polipeptídica y las proteínas aisladas de las células contienen aminoáci-

dos distintos de la metionina en sus extremos amino terminales.

El Met-RNA^F de procariontes sólo actúa en la iniciación. Por el contrario, el Met-RNA^M es necesario para el alargamiento y no coloca metionina en posición inicial (el Met-RNA^M no es reconocido por el FI-2).

El codón AUG más cercano al casquete 5' (7 metil-GTP) es siempre el codón de iniciación. Los codones AUG siguientes codifican metioninas durante el proceso de alargamiento.

En la figura 9.49 puede observarse que el Met-RNA se fija en el sitio P del 80S (o 70S en procariontes). El sitio A es el lugar de entrada para los nuevos aminoacil-RNAt.

Alargamiento. El alargamiento comienza cuando los factores de iniciación se disocian del complejo y el ribosoma se encuentra con sus dos subunidades integradas. En este momento el aminoacil-RNAt (o el peptidil RNAt) está unido al sitio P y el sitio A está libre (Figura 9.50).

En un principio se pensó que se requería un ribosoma para codificar cada una de las proteínas existentes en un organismo. En realidad, el RNAr es un "formulario en blanco"; es decir, es capaz de sintetizar cualquier proteína de la especie en que se encuentra.

De cada ribosoma sólo crece una cadena polipeptídica, aunque una cadena de RNAm puede acomodar varios ribosomas formado los *polirribosomas* o, simplemente, *polisomas*. Cada ribosoma sostiene una cadena proteica en crecimiento (Figura 9.51). Estos polisomas pueden verse con el microscopio electrónico y es posible contar su número. Este número es proporcional al tamaño de la proteína que está siendo sintetizado. Por ejemplo, una cadena mayor de miosina contiene 1800 restos de aminoácidos y su poli-

tierra en la naturaleza. Emil Fischer la obtuvo por síntesis pero se consideraba una curiosidad científica, carente de valor práctico. De hecho, su nombre fue inventado por Fischer sin otorgarle un significado especial.

Más adelante, Levene descubrió que no todas las moléculas de ácido nucleico contienen ribosa; algunas contienen *desoxirribosa*. La desoxirribosa (Figura 9.3), al igual que la ribosa, había sido sintetizada por Fischer años antes de que se descubriera su existencia en la naturaleza. (Emil Fischer, por sus estudios sobre la estructura peptídica y la

química de los carbohidratos y las purinas recibió el Premio Nobel de Química en 1902).

Los ácidos nucleicos contienen además de fosfato y azúcares, dos tipos de bases introgenadas: *púricasy pirimidicas* (Figura 9.4).

Las bases púricas son la *adenina* (6-aminopurina) y la *guanina* (2-amino- 6-oxopurina) (Figura 9.5).

Las bases pirimidínicas son *citocina* (2-oxo-4-aminopirimidina), *uracilo* (2,4-dioxopirimidina) y *timina* (2,4-dioxo-metilpirimidina). Se puede considerar a la timina como un uracilo metilado. (Figura 9.6).

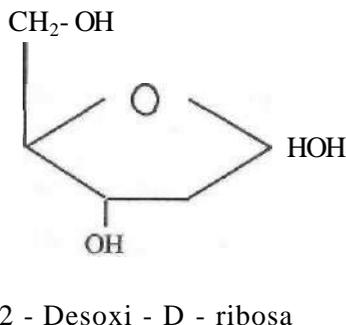
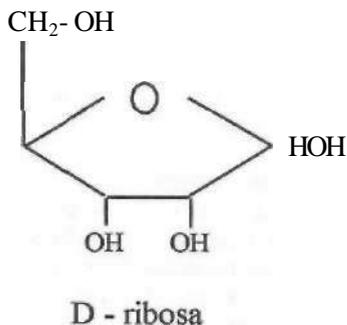


Figura 9.3. Estructura de ribosa y desoxirribosa

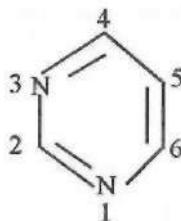
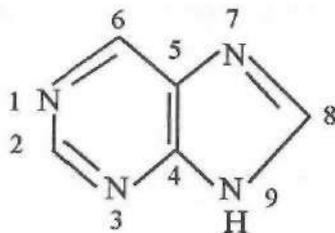


Figura 9.4. Estructura de purina y pirimidina.

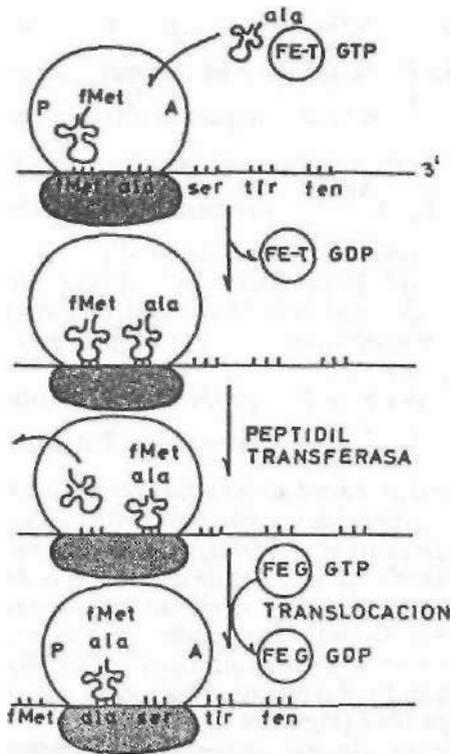


Figura 9.50. Elongación de una cadena polipeptídica.

ribosoma contiene más de 100 ribosomas monoméricos.

Los polirribosomas pueden existir como partículas libres en el citoplasma o pueden estar adheridos a las membranas del *sistema retículo endoplásmico*. La adherencia de ribosomas al retículo endoplásmico le dan el aspecto "rugoso" que se observa por microscopía electrónica.

La unión del nuevo aminoacil-RNAt requiere de los llamados *factores de alargamiento* (FE-T) que contienen dos subunidades FE-Ti (inestable) y FE-Te (estable). El FE-T se une a GTP y al aminoacil-RNAt para for-

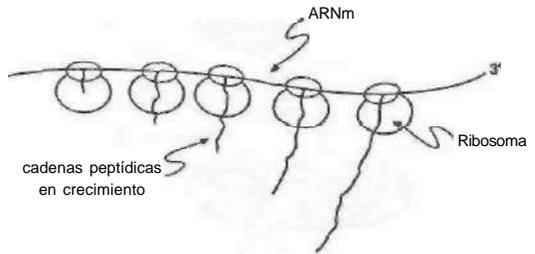
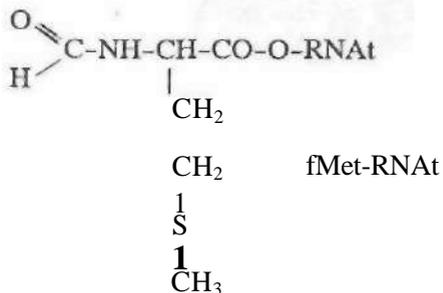


Figura 9.51. Elongación de proteínas en polisomas.

mar un complejo terciario que se une al sitio A (lugar del aminoácido) de la fracción 50S (o 60S). A continuación, una GTPasa hidroliza el nucleótido y libera el FE-Ti-GDP, liberación que es necesaria para que se forme el enlace peptídico que ocurrirá más adelante.

El primer enlace peptídico se forma por ataque del grupo amino (-NH₂) del aminoacil-RNAt del sitio A al carbonilo del fMet-RNAt (Figura 9.52).

Esta reacción está catalizada por una enzima peptidil transferasa, que no se ha podido aislar y purificar todavía. Parece ser que se encuentra formada por 10 proteínas ribosómicas distintas de la subunidad grande. La energía para el enlace peptídico al parecer está dado por la ruptura de la unión metionina o formilmetionina a su RNAt.



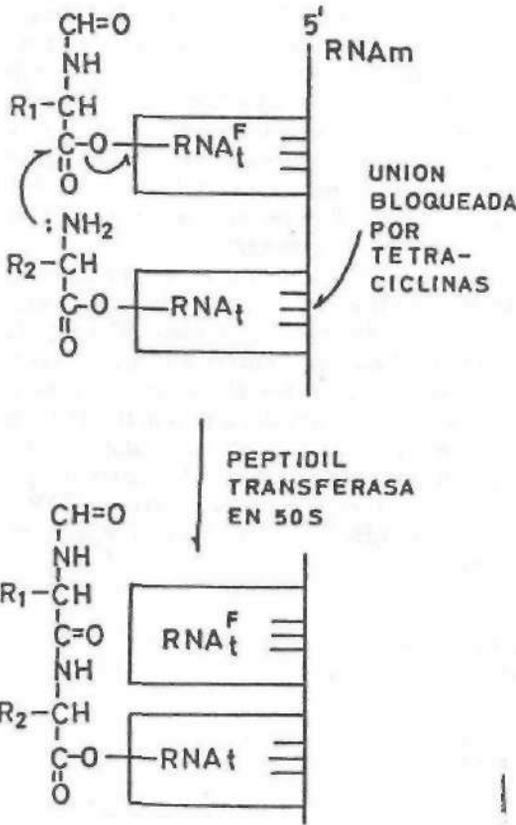


Figura 9.52. Formación del enlace peptídico.

Una vez formado el enlace peptídico el RNA_t libre se separa del sitio P y una translocasa desliza el peptidil-RNA_t y su codón al sitio P. Este paso requiere hidrólisis de GTP. La translocación se lleva a cabo por un factor proteico citoplásmico FE-G. El RNA_m se desliza a través de un túnel en el ribosoma y de esta manera queda protegido del ataque de ribonucleasas. "Los ciclos de

alargamiento se sucederán hasta que un codón de terminación impida la colocación de un aminoácido RNA_t

Terminación. En el código genético para los tres codones de terminación: UAA, UAG y UGA, no hay RNA_t con el correspondiente anticodón y la elongación se detiene. Sin embargo, el peptidil-RNA_t permanece unido al ribosoma y son necesarios factores de liberación para liberar el péptido sintetizado. Los factores de liberación reconocen los codones de terminación; el FR-1 reconoce los codones UAA y UAG, y el FR-2 los UAA y UGA. El enlace éster final es hidrolizado por una peptidil transferasa cuya actividad está influida por los factores de liberación. En la reacción se requiere de hidrólisis de GTP.

Muchas de las proteínas recién elaboradas poseen un fragmento próximo al extremo N-terminal con alto contenido en aminoácidos hidrofóbicos conocido como péptido líder o señal. Al parecer estos péptidos señalan a las proteínas que van a ser exportadas después de su síntesis por el sistema retículo endoplásmico. Las proteínas que no han de ser exportadas, por ejemplo las globinas y (3 de la hemoglobina, no tienen péptidos señal. Los polisomas libres en el citosol son los que elaboran las proteínas requeridas para funciones intracelulares.

Síntesis no ribosómica

Algunos polipéptidos, sobre todo los de función antibiótica producidos por diversos microorganismos se sintetizan en un proceso independiente de la traducción ribosómica. Ciertas cepas de *Bacillus brevis* poseen dos enzimas E_i y E_n capaces de dirigir la síntesis del pentapéptido Fen-Pro-Val-Orn-Leu que constituye parte del antibiótico *gramicidina S*. Luego, dos pentapéptidos formados reaccionan por sus extremos y forman un decapeptido cíclico que constituye el antimotéico.

Inhibidores de la síntesis de proteínas

Entre los inhibidores de la síntesis proteica, algunos actúan en procariotes, otros en eucariotes y, finalmente, otros actúan sobre los dos (tabla 9.6).

Esta diferencia de acción de los inhibidores ha sido utilizada para propósitos clínicos, debido a que muchos antibióticos inhiben específicamente la síntesis de proteínas en procariotes con la consecuente detención del crecimiento o la muerte de la bacteria. Ejemplos de esta clase de inhibidores son los antibióticos tetraciclinas, eritromicina, estreptomycin y cloranfenicol.

Las *tetraciclinas* actúan fijándose al ribosoma procariótico impidiendo la fijación del aminoacil-RNAt al sitio A. La *estreptomycin* y otros aminoglucósidos interaccionan con la subunidad 30S del ribosoma procariótico produciendo errores de lectura de los tripletes. La *neomicina* y la *kanamicina* son

antibióticos análogos a la estreptomycin. El *cloranfenicol* inhibe específicamente la peptidiltransferasa de ribosomas 70S procariótica y de ribosomas mitocondriales pero no los citoplásmicos. Esto nos indica reminiscencias del origen bacteriano de las mitocondrias. La *eritromicina*, del grupo de los macrólidos, interfiere con la subunidad 50S impidiendo la formación del ribosoma 70S pero no con el ribosoma ya formado y en proceso de traducción (Figura 9.53).

La *cicloheximida* inhibe la peptidiltransferasa de eucariotes pero no de procariotes; por ello, se ha usado más bien en la terapia anticancerosa que como antimicrobiano. Las toxinas vegetales *abrina* y *ricina* interfieren con la unión del aminoacil-RNAt de eucariotes. La *toxina diftérica* cataliza la reacción entre NAD^+ y FE-2 de eucariotes para dar un complejo inactivo ADP - ribosoma-FE-2, bloqueando la translocación.

Puromicina	Sí	Sí	Terminación prematura del polipéptido al actuar como análogo del aminoacil-tRNA.
Estreptomycin	Sí	No	Inhibe la formación del complejo de iniciación al impedir la unión de fMet-tRNA. También causa errores de lectura.
Cloranfenicol	Sí	Sí	Inhibe a la <i>peptidil transferasa</i> .
Tetraeiclina	Sí	No	Inhibe la unión del aminoacil-tRNA a la subunidad 30S.
Eritromicina	Sí	No	Impide la formación de ribosoma funcional por unión a la subunidad 50S.
Acido fusídico	Sí	Sí	Inactiva el factor de alargamiento EFG.
Cicloheximida	No	Sí	Inhibe la <i>peptidil transferasa</i> .
Abrina, ricina	No	Sí	Inhibe la unión del aminoacil-tRNA.
Toxina diftérica	No	Sí	Inactiva el factor de elongación EF2.

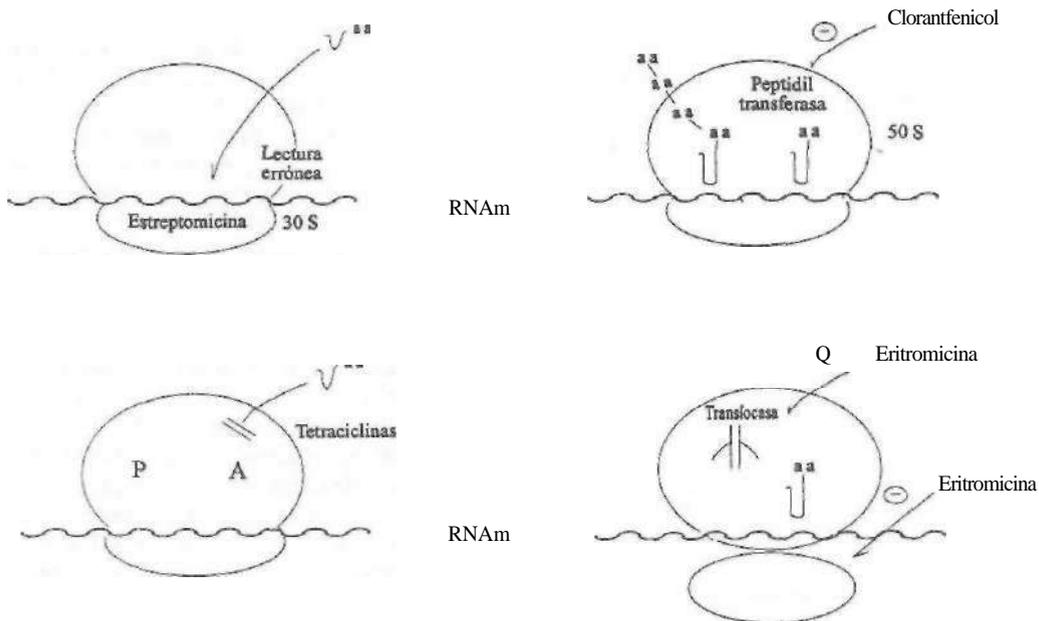
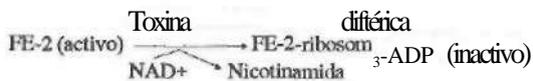


Figura 9.53. Mecanismo de acción de algunos antibióticos.



La toxina diftérica no inhibe la síntesis de proteínas bacteriana. Es una toxina enzimática extraordinariamente mortífera, incluso en dosis muy pequeñas.

La puromicina tiene una estructura que se parece mucho al extremo 3' de un aminoacil-RNAt (Figura 9.54). Es análogo estructural del tirosinil RNAt e inhibe la síntesis de proteínas tanto en procariotes como en eucariotes.

Como este antibiótico semeja un aminoacil-RNAt, reacciona con el peptidil-RNAt y

forma peptidü-puromicina que se desprende del ribosoma y se produce una terminación prematura del polipéptido naciente.

9.6 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

Una célula debe ser capaz de responder a los cambios ambientales para poder sobrevivir. Una de las maneras en que las células se adaptan a estos cambios es mediante el control de la expresión genética. El control de la expresión genética protege a la célula de malgastar una cantidad importante de energía ya que la producción de RNA y de pro-

metabólicos no siempre están presentes ya sea porque no existe el sustrato o éste se encuentra en exceso. Sintetizar siempre las enzimas para estas rutas innecesarias, no resulta práctico. La célula sólo sintetiza estas enzimas cuando son requeridas y se conocen como *enzimas inducibles*.

En el caso de las enzimas inducibles, ¿cómo sabe la célula en qué momento debe sintetizarlas? La respuesta a esta pregunta la dieron en 1961 Francois Jacob y Jacques Monod quienes experimentaron sobre el mecanismo de regulación de la expresión genética en bacterias. La conclusión de su trabajo fueron los siguientes:

1) Cuando *E. coli* crece en un medio que contiene glucosa como fuente de carbono, no necesita p-galactosidasa. Cuando este microorganismo se transfiere a un medio cuya única fuente de carbono es lactosa, después de un corto tiempo empiezan a aparecer cantidades apreciables de P-galactosidasa (fig. 9.55)

Si se elimina la lactosa del medio y se proporciona glucosa, la síntesis de esta enzima se detiene tan rápido como empezó.

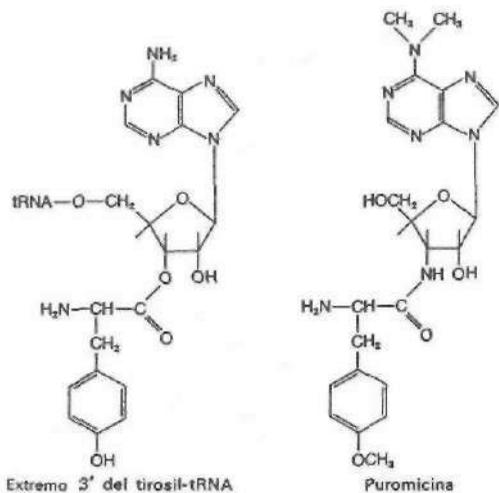


Figura 9.54. Estructura de tirosil-RNAt y puromicina.

teínas consume grandes cantidades de ATP. Mutantes con defectos en estos mecanismos de control gastan energía innecesariamente y son desplazados de la población normal de la que derivan.

En este subcapítulo se revisarán los mecanismos moleculares que determinan cuándo y hasta qué punto se expresa un determinado gene.

9.6.1 Concepto y función de gene estructural, gene operador, operón y represor

La célula posee rutas metabólicas que siempre deben estar presentes, como el ciclo de Krebs, por lo que las enzimas para catalizar dichas rutas también deberán estar presentes. Dichas enzimas reciben el nombre de *enzimas constitutivas*. Otras rutas o pasos

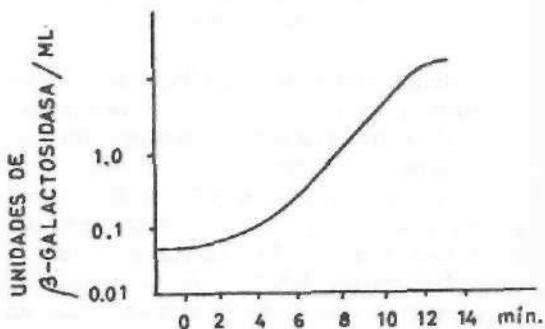


Figura 9.55. Velocidad de crecimiento de *E. coli* en presencia de lactosa.

2) Se encontró que cuando se inducía la síntesis de p-ealactosidasa, también se inducían en cantidades equimoleculares otras enzimas: galactósido permeasa y tiogalactósido transacetilasa los genes correspondientes se denominan Z, para la p-ealactosidasa: B, para la permeasa y A, para la transacetilasa.

Se dedujo que estos genes se regulaban juntos y deberían estar contiguos en forma policistrónica. El *cistrón* es la unidad más pequeña de expresión genética. Esto significa que el concepto "un gene, una enzima" no es necesariamente válido para enzimas que constan de dos o más subunidades. Este concepto debe ser considerado más exactamente como "un cistrón, una subunidad polipeptídica".

Jacob y Monod describieron en 1961 su modelo de *operón* en un trabajo clásico por el cual recibieron el Premio Nobel de medicina en 1965. De acuerdo a su teoría del operón, la regulación de las enzimas involucradas tiene lugar a nivel de la transcripción. Los genes que transcriben un RNAm policistrónico que a su vez codifica para enzimas *coordinadamente* inducidas o reprimidas se denominan *genes estructurales*. El modelo presupone que la transcripción de genes estructurales está controlado por un *gene operador* y un *sitio promotor* (donde se une la RNA polimerasa) formando la unidad llamada operón. Un *operón* puede definirse como la región genética constituida por uno o varios genes y las secuencias asociadas responsables de su regulación. Otro gene, llamado *regulador*, codifica para una proteína represora del gene operador, la cual puede estar localizada en un sitio distante del operador.

Los operones *catabólicos* son, en general, *inducibles*, en tanto que los sistemas *anabólicos* son *reprimibles*. El operón lactosa (operón LAC) y el operón triptófano (operón TRI) son ejemplos de operón catabólico y anabólico, respectivamente. No existe lo que podría llamarse el "operón general".

Cabe señalar que los sistemas de control descritos han sido establecidos en sistemas bacterianos (en particular, *E. coli*). No se conocen aún los que operan en animales superiores.

El operón LAC de *E. coli* es uno de los más estudiados y consta de las tres enzimas ya mencionadas. La síntesis del RNAm transcurre desde el operador a través del operón entero. La proteína represora que actúa sobre el operador, evita la formación del RNAm de todo el operón LAC. Cuando se dan inductores como la lactosa o análogos, se deforma el represor y el operón LAC se transcribe y traduce (Figura 9.56).

El control del operón LAC tiene otro elemento efector positivo, el AMPc. Células con glucosa en el medio tienen bajos niveles de AMPc. Al inducir con lactosa, el AMPc se une a una *proteína catabólica activadora del gene* (CAP) y este complejo se une al sitio promotor del DNA de tal manera que la RNA polimerasa puede iniciar la síntesis de RNA. Así, la expresión del operón LAC requiere del inductor y de AMPc. La región reguladora del operón LAC funciona muy pobremente como promotor. Esta ineficacia se corrige por la potenciación del promotor que lleva a cabo el complejo CAP-AMPc. Puesto que las concentraciones de AMPc son bajas en presencia de glucosa y puesto que CAP requiere del nucleótido cíclico para ser funcional, las enzimas LAC se expresan a velocidad reducida en un medio con glucosa. A esto se le llama *represión por catabolitos*, aunque parece más correcto llamarla *control por catabolitos*.

Otro sistema de control por producto final, contrario al mecanismo anterior, se ejemplifica con el operón triptófano (operón TRI). En éste, las enzimas involucradas en la vía biosintética de triptófano siempre se están produciendo y el producto final, triptófano, frena la síntesis de dichas enzimas, en lugar de inducir las como en el caso del operón LAC.

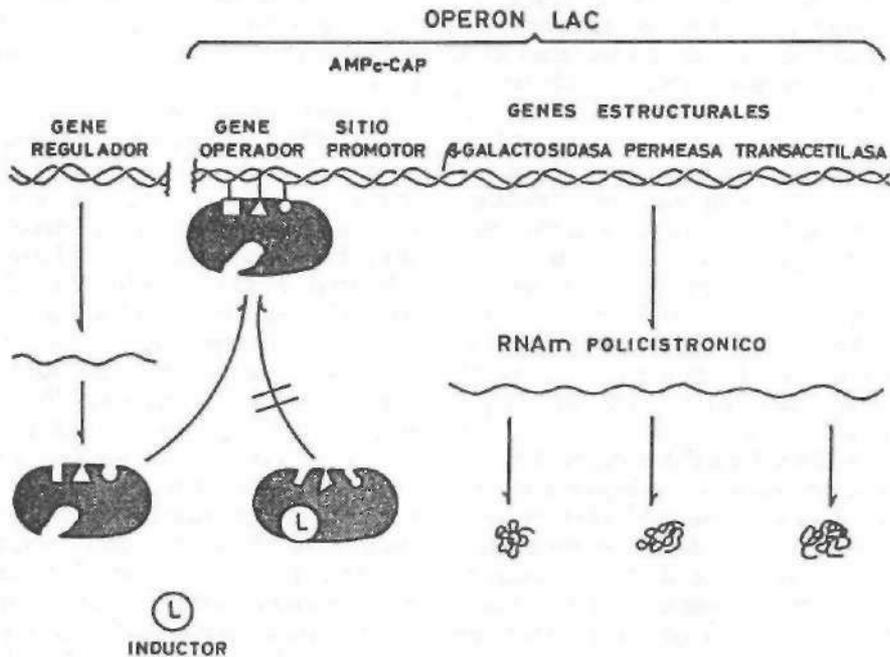


Figura 9.56. Inducción enzimática en el operón LAC de *E. coli*, L = lactosa; CAP = proteína catabólica activadora del gene.

La síntesis de triptófano a partir de corimato se lleva a cabo por cinco enzimas codificadas por cinco genes ligados a una transcripción policistrónica. En base al modelo del operón, el apo-represor, un homotetrámero, que se está produciendo no se puede unir al gene operador y sólo lo hace cuando se une al *correpresor*, en este caso, el triptófano (Figura 9.57).

El control de la transcripción es un eficaz sistema de regulación de la expresión genética. Sin embargo, son mecanismos que no responden con rapidez a las señales fisiológicas. Por ello, otros procesos que intervienen en la formación de RNA son objetivos interesantes para la regulación. Hay muy po-

cos ejemplos de control de la expresión genética por medio de la regulación en la traducción, si acaso, en sistemas genéticos muy sencillos como los bacteriófagos.

9.6.2 Regulación genética en eucariotes

Al ser la transcripción y la traducción más complejas en eucariotes, ofrecen mayor número de mecanismos reguladores que en procariones. La maduración del RNAm y su transporte desde el núcleo, así como la vida media del RNAm están sujetos a múltiples mecanismos reguladores. Los RNAm que codifican proteínas requeridas en gran canti-

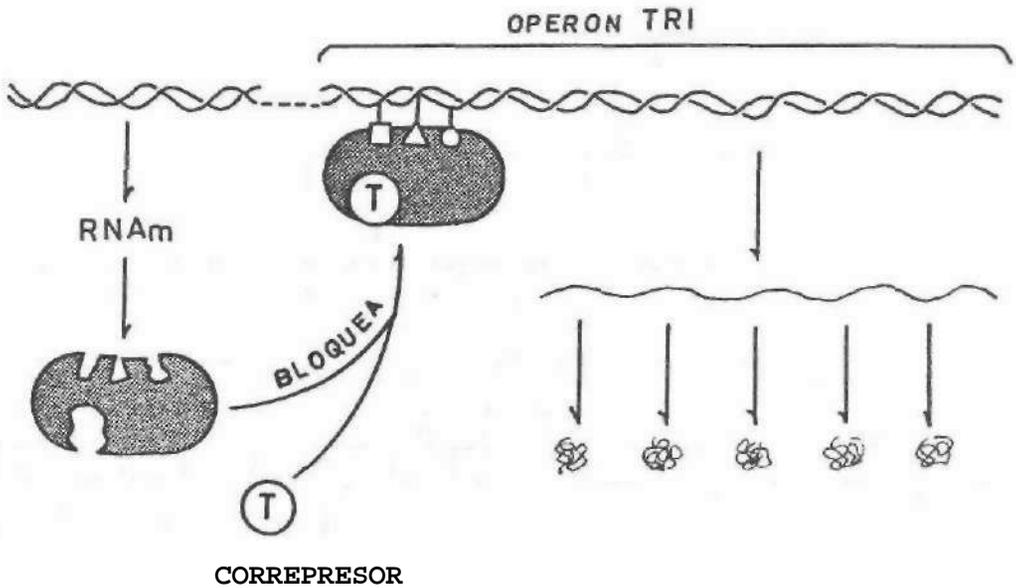


Figura 9.57. Represión de síntesis enzimática en el operón TRI.

dad poseen vidas medias muy largas y promotores muy eficientes.

En años recientes se ha demostrado la *amplificación* de regiones genéticas específicas en células cultivadas eucariótica inducida por medicamentos. EL modelo aceptado actualmente propone la síntesis de un elemento regulador intermediario, llamado *activador*, capaz de activar la transcripción de conjuntos de genes. Según este modelo, por acción de un efector (hormonal, por ejemplo) se estimula la síntesis de diversos activadores que pueden actuar sobre conjuntos de genes (Figura 9.58).

En pacientes que están recibiendo metotrexato para el tratamiento del cáncer, se ha demostrado que las células malignas pueden desarrollar *resistencia al medicamento* incrementando genes para la dihidrofolato reductasa, blanco del metotrexato.

Aunque el control de la expresión génica a nivel de la transcripción es la forma más frecuente de regulación, la síntesis proteica puede estar regulada a nivel de la traducción. Uno de estos tipos de regulación en la fase inicial de la traducción es la biosíntesis de hemoglobina, que requiere que las subunidades proteicas y el grupo hemo se encuentren en cantidades estequiométricas. Cuando la concentración del hemo disminuye, la velocidad de síntesis de la hemoglobina lo hace de forma paralela.

9.7 BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

La comprensión de los fenómenos biológicos a nivel molecular es lo que se conoce como *biología molecular*. Esto incluye la base

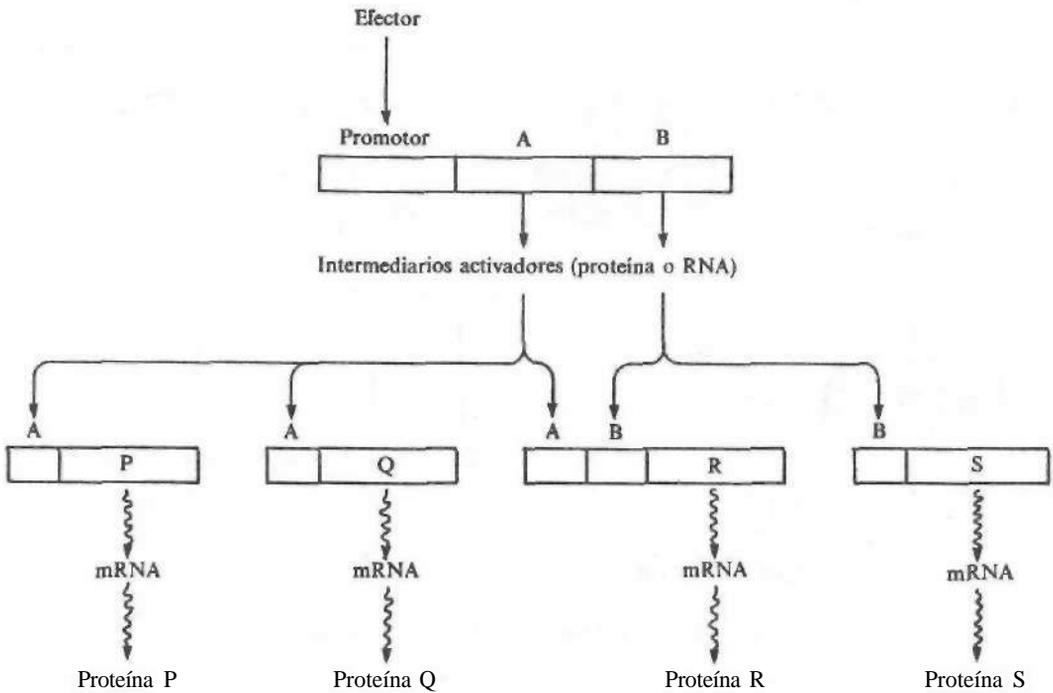


Figura 9.58. Regulación de la síntesis de proteínas en eucariotes por activadores intermedios.

molecular de las mutaciones, de la herencia, de las enfermedades, etc. La *bioquímica* tiene como objetivo describir y explicar, en términos moleculares, todos los procesos químicos de las *células vivas*. Con esta definición, la bioquímica abarca extensas áreas de la biología celular y toda la biología molecular.

Los fundamentos de la *genética molecular* descansan en la bioquímica de los ácidos nucleicos. Como beneficio de la investigación básica descrita en este capítulo se tuvo la *tecnología del DNA recombinante*. La recombinación del DNA es un fenómeno general durante el cual se entremezclan dos moléculas de DNA "paternas", dando lugar a un nuevo DNA que contiene información

genética de ambos filamentos. En la actualidad es posible aislar un gene, reproducirlo e insertarlo *in vitro* en fragmentos de DNA de otro origen, de manera que ese gene extraño se exprese en otra célula. A esto se le conoce como *tecnología del DNA recombinante*, popularmente llamada *ingeniería genética*.

El potencial de esta nueva tecnología es enorme. Muy pronto podrán llevarse a cabo experimentos de terapia génica en el hombre, donde algunas enfermedades moleculares se curarán por transferencia del DNA normal para sustituir la función de un gene dañado; las proteínas humanas podrán producirse en abundancia con fines terapéuticos; podrán obtenerse proteínas puras para vacunas y para pruebas de diagnóstico; se

podrán diagnosticar enfermedades existentes y predecir su desarrollo.

9.7.1 Tecnología de recombinación del DNA

El gran descubrimiento de una *enzima* de *Haemophylus influenzae* denominada *de restricción* y *modificación* (DNAsa) que corta el DNA en sitios específicos fue uno de los hallazgos decisivos en el desarrollo de la ingeniería genética. En la naturaleza las bacterias usan dichas enzimas como un mecanismo de defensa para degradar el DNA extraño que llega a su interior. El sitio específico donde ocurre el rompimiento de los dos filamentos de DNA, por acción de las endonucleasas de restricción, debe ser *capicúa* o *palindrómico* (que se lee igual en ambos sentidos). De esta manera, el fragmento resultante ofrecerá dos extremos ensamblables. Por ejemplo, la enzima EcoRI corta en las porciones indicadas por las flechas en la figura 9.59.

Las enzimas de restricción más útiles son aquellas que den *extremos cohesivos* o *adherentes*, los cuales pueden emparejar las bases y mantener el DNA unido mientras la DNA Úgasa las une covalentemente. Si la misma endonucleasa de restricción que ha roto un DNA circular de un plásmido, es usada para fragmentar un DNA humano que contiene un gene, los dos extremos del fragmento se ensamblan con los extremos del plásmido, se unen con una ligasa, y tendremos entonces un gene humano incorporado en el plásmido bacteriano. Los bacteriófagos o los plásmidos que contienen DNA extraño incorporado de esta manera, se denominan *vectores*.

A veces el gene puede obtenerse a partir de DNA, pero en otros casos se tiene el RNAm originado del gene; en estas circunstancias se sintetiza el gene en el laboratorio por medio de la transcriptasa inversa. El DNA obtenido se llama *DNA copia* (DNAc).

El gene introducido en un vector puede reproducirse millones de veces, proceso conocido como *clonación* del DNA. De esta manera, ese vector puede utilizarse para obtener grandes cantidades de una proteína. Esto es posible porque las células bacterianas contienen muchas copias del gene recombinante y porque la síntesis de RNAm y proteínas en las bacterias se hace muy rápidamente.

Así, pues, un gene eucariótico (para la insulina, por ejemplo) puede aislarse y clonarse en un vector procariótico (una bacteria) que proporcionará grandes cantidades del gene eucariótico ya sea para su análisis molecular (secuenciación), ya sea por su producto (insulina) o bien para insertarlo en un individuo con defecto en ese gene (diabético tipo I).

Si lo que se pretende por ingeniería genética es obtener grandes cantidades de una proteína particular, lo mejor es empezar con el RNAm y no con el DNA del que procede, puesto que éste puede contener *intrones* que agrandan su tamaño y dificultan su clonación.

Actualmente se producen grandes cantidades de varios productos génicos terapéuticos (insulina, interleucinas, interferones, hormonas del crecimiento) a partir de genes clonados.

Análisis molecular de la enfermedad

La localización de genes puede definir un *mapa del genoma humano*. Los biólogos moleculares de todo el mundo se han propuesto como objetivo obtener la secuencia de todos los genes de todos los cromosomas humanos. Esto se conoce como Proyecto *Genoma Humano* que se propone secuenciar los 23 cromosomas (2,400 millones de pares de bases) y estuvo a cargo del prof. James Watson. El proyecto es estimable, ya que permitirá analizar todas las enfermedades genéticas humanas. Las secuencias proporcionarán también la información necesaria para el tratamiento genético.

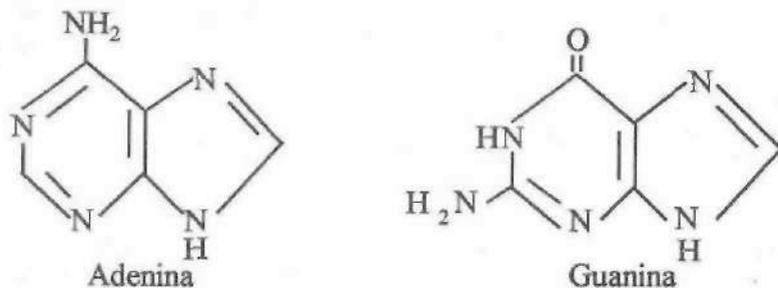


Figura 9.5. Estructura de adenina y guanina.



Fig. 9.6. Estructura de citosina, uracilo y timina.

Las bases púricas pueden formar parte del DNA y del RNA. De las pirimidinas, sólo la citosina forma parte de ambos ácidos nucleicos; la timina generalmente sólo forma parte del DNA (aunque se la puede encontrar en ciertos tipos de RNA) y el uracilo sólo del RNA.

En algunos tipos de ácidos ribonucleicos se pueden encontrar bases nitrogenadas mo-

dificadas como son 2-metiladenina, 1-metilguanina, 5-metilcitosina, seudouridina, etc.

Además, existen otras 3 purinas que, aunque solo una de ellas forma parte de algunos ácidos nucleicos y las otras son productos de excreción es importante recordarlas por su relación con dichos ácidos. Estos purinas son: hipoxantina, xantina y ácido úrico (Figura 9.7).

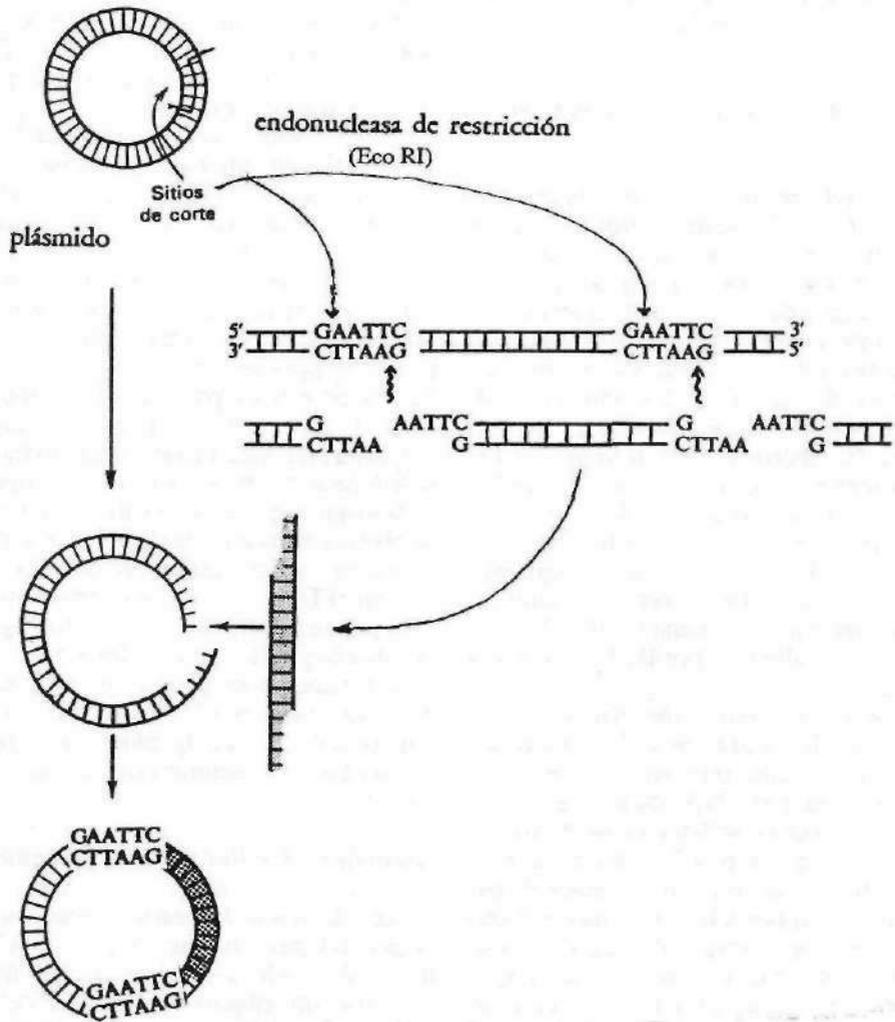


Figura 9.59. Ruptura de un fragmento de DNA por una endonucleasa de restricción (Eco RI) y ensamble del fragmento en un plásmido.

El ejemplo clásico de una enfermedad causada por una mutación en una base (T por A) del sexto codón del gene de la β -globina que afecta toda la hemoglobina. Otras

mutaciones en el mismo gene disminuyen o incluso anulan la producción de P-globina, como es el caso de las talasemias.

Diagnóstico prenatal

El DNA de células colectadas de cantidades pequeñas de líquido amniótico puede analizarse por una variante de la tecnología de DNA recombinante llamada *polimorfismo de longitud del fragmento restrictivo* (PLFR). Cuando el DNA de un paciente con anemia de células falciformes se digiere con la enzima de restricción MSt II, los fragmentos se separan y se hibridizan con DNA normal de globina humana radiactivo, se encuentra un fragmento de 376 pares de bases, en vez del normal con 175 pares de bases. Esto indica que hay un punto que no es reconocido por la enzima de restricción por haber un cambio en la secuencia (Figura 9.60).

Este análisis puede detectar prenatalmente la enfermedad de células falciformes, ya que el DNA de todas las células, incluyendo las amnióticas, llevan el DNA defectuoso.

En genética humana, el término *genética inversa* se utiliza actualmente para determi-

nar la causa de una enfermedad genética, comenzando con el gene responsable hasta encontrar la enzima defectuosa. Anteriormente los genetistas reconocían primero la enzima defectuosa y luego localizaban el gene responsable. Esta técnica se ha utilizado para enfermedades como la distrofia muscular de Duchesne, la corea de Huntington y la enfermedad poliquística renal.

Terapia génica

Gracias a la información obtenida a partir del clonaje de genes, se han desarrollado nuevos métodos para diagnosticar enfermedades genéticas. En el momento actual se conocen más de 3000 enfermedades genéticas (errores congénitos del metabolismo). El clonaje de genes ha permitido identificar las mutaciones de los factores de coagulación IX y VIII, que causan varios tipos de hemofilias, las de la hipoxantina-guanina-fosfo-

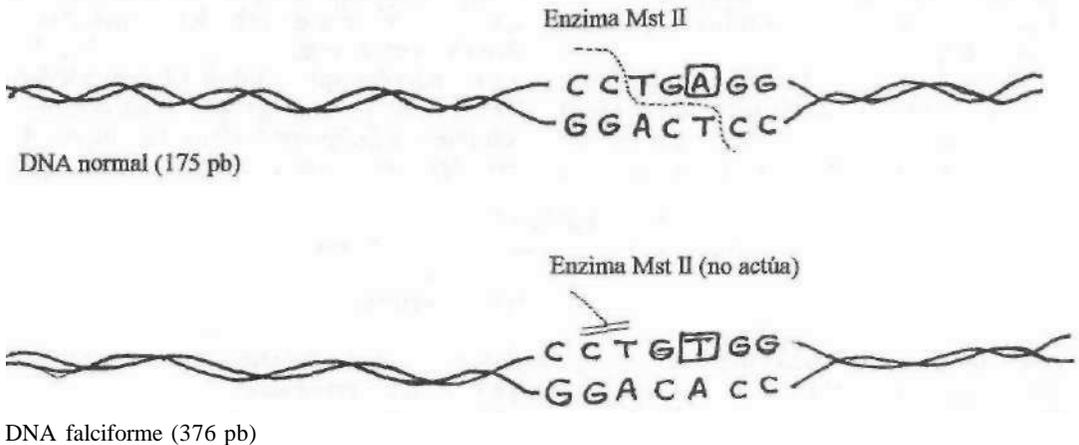


Figura 9.60. Análisis por enzima de restricción Mst II de la anemia de células falciformes. Para mayor explicación, ver el texto.

ribosiltransferasa (HGPRT) asociadas al síndrome de Lesch-Nyhan y las mutaciones de las hemoglobinas que causan la anemia de células falciformes y varios tipos de talasemia.

Muchas enfermedades genéticas podrán curarse durante el transcurso de la vida de un individuo mediante la sustitución del gene defectuoso por este proceso denominado *terapia génica*. La estrategia consiste en clonar un gene en un vector que pueda captarlo con facilidad y ser incorporado en el genoma de células del paciente. El gene introducido empezará a expresarse en la proteína faltante o defectuosa y se corregirá el defecto.

Es obvio que esta restitución no podría ser heredada a la descendencia. Para ello se han ideado otras estrategias que han resultado exitosas en animales de laboratorio. El método más empleado consiste en la microinyección de DNA dentro del núcleo de un huevo fertilizado que posteriormente es implantado en una hembra receptora. De esta manera, el gene introducido puede heredarse de forma estable. Un organismo en el que se produce la integración estable (heredable) de genes extraños se denomina organismo *transgénico*.

En la actualidad, se han logrado producir animales transgénicos. *Drosophila* y ratón han sido los experimentos más exitosos y se está probando el producir cerdos, cabras,

pollos y peces transgénicos. El método transgénico se ha empleado recientemente para corregir una deficiencia genética (hipogonadismo) en ratones.

9.7.2 *Oncogenesy cáncer*

El descubrimiento de los mecanismos moleculares causantes de la transformación tumoral ha sido uno de los grandes logros de la biología molecular en los últimos años.

El crecimiento celular es un proceso muy regulado. Cuando el control que regula la multiplicación celular se rompe, las células se multiplican y origina una masa de células clonales llamada *tumor* o *cáncer*.

El cáncer es la segunda causa de muerte en muchos países, después de las enfermedades cardiovasculares, y su frecuencia aumenta con la edad. Muchos cánceres se relacionan con la producción anormal de enzimas, proteínas y hormonas, moléculas que se conocen como *marcadores tumorales* (tabla 9.7). Sin embargo, ningún marcador por sí solo es útil para todos los tipos de cáncer y, desafortunadamente, se identifican con mayor frecuencia en estadios avanzados y no en los tempranos.

Los agentes que causan cáncer pueden clasificarse en tres grupos: radiaciones, compuestos químicos y virus. Los rayos ultravioleta, los rayos X y los rayos *gamma* (ga-

ma) son mutágenos y carcinógenos (cancerígenos). La lesión del DNA parece ser el mecanismo básico de la carcinogénesis. Aparte de los efectos directos sobre el DNA, los rayos X y los γ provocan la formación de *radicales libres* que contribuyen a los efectos carcinógenos.

Los compuestos químicos ambientales son responsables hasta del 80% de los cánceres humanos. Estos compuestos pueden ser contaminantes alimenticios como el hidrocarburo cíclico *aflatoxina*, producido por *Aspergillus flavus*, o el benzantraceno, presente en el humo del cigarro y en los alimentos asados al carbón (Figura 9.61).

Generalmente los productos químicos que producen mutaciones mutágenos, son cancerígenos y viceversa. Las moléculas inorgánicas también pueden ser carcinógenos. Algunas, como la mostaza nitrogenada, interactúan directamente con las moléculas blanco (*carcinógenos directos*), otros requieren ser metabolizados primero (*procarcinógenos*) para ser carcinógenos, por un proceso llamado *activación metabólica*. El carcinógeno final es con frecuencia altamente reactivo. Estos son generalmente *electrófilos* (deficientes en electrones) que atacan grupos nucleófilos (ricos en electrones) como el DNA, RNA y proteínas.

La prueba de que en un compuesto químico es carcinógeno es demostrando que causa

tumores en animales, proceso técnico lento y costoso. Sin embargo, un análisis que se basa en la mutagenicidad bacteriana, *el análisis de Ames*, ha probado ser útil en identificar carcinógenos potenciales. Este análisis identifica al 90% de los carcinógenos conocidos y se está convirtiendo en prueba de rutina para compuestos recién sintetizados que van a ser utilizados en la industria farmacéutica y otras.

La carcinogénesis química puede dividirse en dos etapas en la piel u el hígado. Primero, un agente *iniciador*, por ejemplo benzopireno, seguido de la aplicación de un agente *promotor*, por ejemplo aceite de croton, dan origen en unos meses al proceso de carcinogénesis. Ambos compuestos aplicados por separado no producen tumores. Fenobarbital y sacarina pueden actuar como promotores en varios órganos.

Existe una variedad de *virus* llamados *oncogénicos*, como los de la leucemia, sarcoma de Rous, poliomavirus, SV40 y papiloma, que son capaces de inducir cáncer en el huésped. La infección de células con estos virus pueden causar *transformación maligna*. La característica general de células transformadas es que continúan creciendo cuando las células normales dejan de hacerlo. La cuestión es ¿qué genes son responsables de la transformación de células normales en células cancerosas?. Estos virus oncogénicos son



Figura 9.61. Estructura de algunos carcinógenos químicos.

portadores de genes inductores de cáncer, u *oncogenes*, en su genoma; pueden ser tanto virus DNA como virus RNA (retrovirus). Los oncogenes de retrovirus son genes de origen celular que por recombinación se han integrado en el genoma viral. El suceso de recombinación implica la participación de elementos genéticos móviles llamados *transposones*, que codifican las enzimas que catalizan el proceso de transposición (transposasas).

El *oncogene* se define como un fragmento de DNA capaz de provocar la transformación tumoral. Los genes celulares no oncogénicos, protooncogenes u *oncogenes celulares* (onc-c) representan la versión normal del oncogene. La activación de un protooncogene lo convierte en un gene canceroso. Un protooncogene puede ser capturado y modificado por un retrovirus para crear un *oncogene viral* (onc-v).

Hasta el momento hay descritos unos 30 protooncogenes, la mayoría relacionados con oncogenes asociados a virus. Los protooncogenes tienen un papel muy importante en el crecimiento y proliferación celulares; es posible que algunos oncogenes transformen la célula desestabilizando los controles de la división celular.

Los oncogenes codifican proteínas con actividad enzimática que podrían explicar la forma en que un virus tumoral puede causar los efectos de la transformación cancerosa. La clase I de oncogenes engloba proteincinasas, la mayoría de las cuales fosforila restos de tirosina de otras proteínas celulares. Los oncogenes de la clase II codifican para proteínas de unión al GTP (proteínas G) con un probable papel en muchos tumores humanos. La clase III codifica productos oncogénicos localizados en el núcleo. La clase IV está integrada por proteínas oncogénicas que son factores del crecimiento.

En época reciente, se han reconocido genes diferentes a los oncogenes. Estos son los genes supresores del crecimiento; la pérdida de éstos anula ciertos mecanismos de control

de la proliferación. Estos genes supresores de la proliferación se designan también *antioncogenes* o *genes supresores del tumor*. Ha sido demostrada ya la importancia de la pérdida de antioncogenes en la génesis de un tipo de cáncer mamario, del tumor de Wilms del riñón y del carcinoma de células pequeñas del pulmón. La investigación de antioncogenes y la identificación de sus modos de acción son un reto en los estudios actuales sobre cáncer.

Una vez que una célula se convierte en célula tumoral, tiene tendencia al aumento de su malignidad, aumento de la proliferación e incremento de la tendencia a invadir y formar metástasis. El perfil bioquímico de las células malignas puede ser muy diferente del de las células normales. Las células de crecimiento rápido tienden a optimizar los procesos anabólicos implicados en la proliferación (síntesis de DNA y RNA) y economía de las funciones catabólicas (catabolismo de pirimidinas). También muestran cambios bioquímicos que reflejan una alteración de la regulación de genes, como la síntesis de ciertas proteínas fetales (marcadores tumorales, como el antígeno carcinoembrionario).

La *metástasis* es la diseminación de las células cancerosas, desde su origen primario a otros tejidos donde proliferan como tumores secundarios. Gran parte de los estudios actuales se ha enfocado a comparar los cambios bioquímicos de las superficies membranales de células normales y de las malignas, cambios que se relacionan en formas directas con el problema de la metástasis.

La posible *terapia molecular* que elimine los efectos moleculares del proceso tumoral y de la transformación celular puede lograrse a través de una fructífera combinación entre ingeniería genética e inmunología con los llamados *anticuerpos quimera*.

Las nuevas posibilidades de los anticuerpos monoclonales han hecho revivir el interés de la *inmunoterapia*. No es difícil imaginar que se pueden producir anticuer-

pos específicos contra tumores inyectando proteínas de membrana de un tumor humano en ratones. Estos anticuerpos antitumorales podrían usarse como terapia en humanos si fuéramos capaces de eliminar los problemas de hipersensibilidad (alergia) y rechazo a dichos anticuerpos.

La ingeniería genética propone la elaboración de un anticuerpo híbrido entre ratón y humano (anticuerpo quimera) que lleve la parte variable (especificidad) de ratón y el resto humano, como una manera de eliminar la hipersensibilidad.

Puede irse todavía más lejos. Sustituyendo la región constante del anticuerpo por algo tan dispar como la *nucleasa* de estafilococos. Estos anticuerpos *bifuncionales* pueden reconocer células tumorales, y al llegar a ellas descargar su actividad nucleasa y destruir la célula. La posibilidad de usar estos anticuerpos quimera contra células tumorales abre nuevos horizontes en la terapia del cáncer.

Mutágenos y carcinógenos

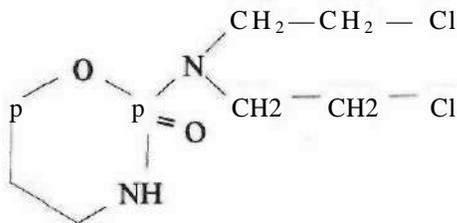
Puede definirse una *mutación* como un cambio estable en la estructura del DNA de un gene, el cual se expresa en forma de un cambio fenotípico en un organismo. Las mutaciones son fundamentalmente sucesos aleatorios; ninguna mutación es selectiva en el sentido de que pueda mutar específicamente un gene y no otro. Durante el proceso de la evolución, mutaciones beneficiosas proporcionaron a los organismos primitivos una ventaja de supervivencia sobre los competidores, hasta la aparición final de seres inteligentes. Por tanto, en una especie tan evolucionada como la especie humana, la mayoría de las mutaciones sólo producen efectos nocivos.

Las mutaciones pueden clasificarse en transiciones, transversiones y desplazamiento de marco de lectura. Cuando se sustituye

una purina por otra o una pirimidina por otra, el cambio se denomina *transición*. Una *transversión* consiste en el cambio de una purina por una pirimidina o de una pirimidina por una purina. Las mutaciones de *desplazamiento de marco de lectura*, las más radicales, son resultado de inserción de un nuevo par de bases o la eliminación de un par o de un grupo de pares de bases de la secuencia de bases del DNA del gene.

La irradiación y ciertos compuestos químicos son los principales mutágenos. Tanto la radiación ultravioleta como los rayos X son medios muy efectivos para producir mutaciones. Los rayos ultravioleta forman dímeros entre restos adyacentes de tirmina en la misma cadena de DNA (ver "mecanismos de reparación del DNA"). La acción de los rayos X es indirecta. Produce radicales libres que reaccionan con el DNA y se provocan mutaciones puntuales o roturas cromosómicas.

Muchas de las mutaciones causadas por análogos de bases producidos artificialmente son transiciones. Los análogos también pueden inhibir la síntesis de DNA y la multiplicación celular. Análogos usados en la quimioterapia del cáncer y que también son mutágenos, son las 6-mercaptapurina y la 2-aminopurina. Los agentes alquilantes que han sido utilizados en el tratamiento quimioterapéutico del cáncer, como la ciclofosfamida y el bisulfán, también son mutágenos.



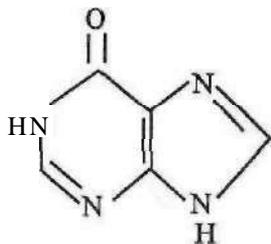
Ciclofosfamida



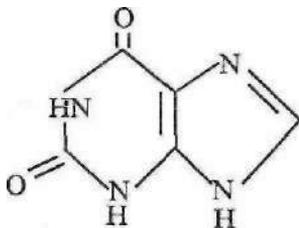
Bisulfán

Las mostazas nitrogenadas o de azufre producen principalmente transversiones. Los

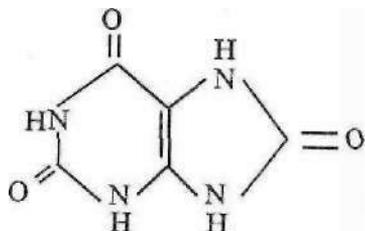
colorantes de acridina, como el antipalúdico quinacrina, se intercalan o insertan entre las bases apiladas de la hélice del DNA. La quinacrina resulta útil en citogenética humana, ya que se intercala en la heterocromatina del cromosoma Y, haciéndolo fluorescer (determinación prenatal del sexo).



Hipoxantina
(forma parte del RNAt)



Xantina

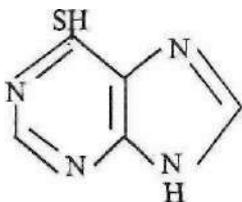


Ácido úrico
(forma de excreción de purinas)

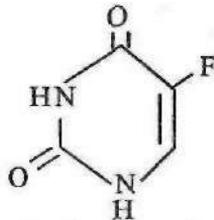
Figura 9.7. Estructura de hipoxantina, xantina y ácido úrico.

Existen también bases nitrogenadas *análogas* a las anteriores, las cuales se utilizan para inhibir enzimas involucradas en las síntesis de ácidos nucleicos y, de esta forma, impedir la división celular. Estas sustancias se usan como drogas antineoplásicas que, desafortunadamente, también inhiben la división de las células normales, sobre todo

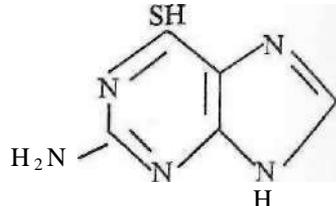
aquellas que se reproducen rápidamente: células sanguíneas, de la piel y mucosas, etc. Entre estas tenemos a la 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, 5-fluorouracilo, azaguanina y alopurinol (Figura 9.8), este último no se emplea como antineoplástico sino en el tratamiento de la gota (ver adelante).



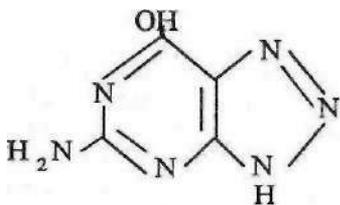
6-mercaptopurina



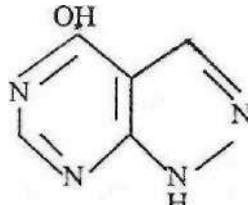
5 - fluorouracilo



6 - tioguanina



8 - Azaguanina



Alopurinol

Figura 9.8. Estructura de algunos análogos de bases nitrogenadas.

Por otro lado, existen bases no usuales en el RNA (de transferencia) como son: seudouracilo (γ), dihidrouracilo (Dh), hipoxantina (inosina), metilguanina y otras (fig. 9.9). Estas bases raras llegan a constituir casi el 5% del total de bases RNA,.

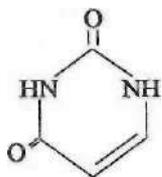
9.2.1 Nucleósidos y nucleótidos

La unión de una base nitrogenada con la pentosa, forma un *nucleósido*. Si la pentosa

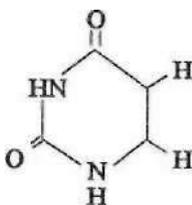
es la ribosa, recibirán el nombre de *ribonucleósidos*; si la pentosa es la desoxirribosa, se formarán los *desoxirribonucleósidos*.

La base que forman parte de los ribonucleósidos, son aquellas que integran el RNA y las que forma parte de los desoxirribonucleósidos son las que integran el DNA. En la figura 9.10, se muestra la estructura de un ribonucleósido de una base púrica y un desoxirribonucleósido de base pirimídica.

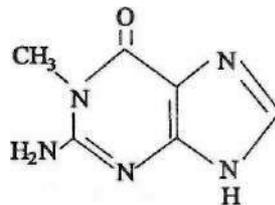
De estas estructuras hay que hacer notar lo siguiente:



Seudouracilo

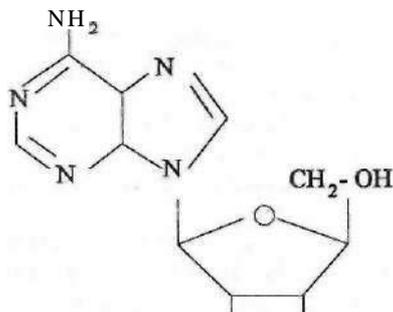


Dihidrouracilo

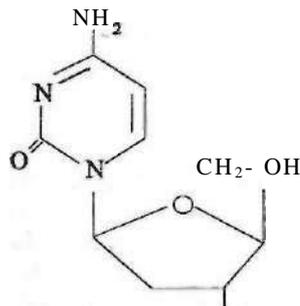


Metilguanina

Fig. 9.9 Estructura de algunas bases raras.



Adenosina



Desoxicitidina

Figura 9.10. Estructura de un ribonucleósido y un desoxirribonucleósido.