85
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CINETICA DE LA DESCOMPOSICION DE LA RIBOSA Y OTROS AZUCARES: IMPLICACIONES EN LA EVOLUCION QUIMICA Y EL ORIGEN DE LA VIDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ROSA LARRALDE RIDAURA

MEXICO, D. F. 1995

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

VNIVERSIDAD NACIONAL
AVPNOMA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: CINETICA DE LA DESCOMPOSICION DE LA RIBOSA Y OTROS AZUCARES: IMPLICACIONES EN LA EVOLUCION QUIMICA Y EL ORIGEN DE LA VIDA.

realizado por ROSA LARRALDE RIDAURA

con número de cuenta 8955242-3 **, pasante de la carrera de** BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

BIOL. ANTONIO EUSEBIO LAZCANO-ARAUJO REYES
Director de Tesis
Propietario

DRA. ALICIA NEGRON MENDOZA
Propietario

DRA. MARIA GUADALUPE ALBARRAN SANCHEZ
Propietario

M. en C. VICTOR MANUEL VALDES LOPEZ
Suplente

DR. JESUS MANUEL LEON C
Suplente

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo [illegible] de Biología

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

Este trabajo de tesis no pudiera haber sido realizado sin la asesoría y continua ayuda del Profesor Stanley L. Miller, quien prestara su laboratorio, su tiempo y su inmensa presencia a esta feliz irresponsable. No puedo agradecer de forma suficiente todo lo que he aprendido de él y su grupo de trabajo.

Quisiera dar las gracias también al Profesor Antonio Lazcano-Araujo, director de la tesis, y a los sinodales, Profesores Alicia Negrón, Guadalupe Albarrán, Víctor Valdés y Jesús Manuel León, por la amabilidad, diligencia y comprensión que los caracterizaron en la revisión de este trabajo.

A Mamá y Pepe

A Papá y Edda

A Hernán y Maité, Ana, Marcos, Florencia, Virgilio y Nan.
(Edi y Juan)

A toooooda mi familia y mi FAMilia.

A todos los excelentes maestros que he tenido
(y a todos los malos, que hicieron tan evidente la calidad de los antes mencionados)

A Tony, Lalo, María, Tomás, Guadalupe S. B., Lin, Andrés, Fer, Roberto, Adrián,Toño, Parchís, Ricardo, Mike, La Rata, Carlos Ruano, Luis, Javier, Oscar, Sara, Armando, Chris, Carlitos Aguirre, Ganso, Alberto, Robin, Fernando Ugarte, Jason, Cristina, Tere, Manuel, Matt, Dana, y tantos y tantos otros a los que tengo que agradecerles el haberse reído, alguna vez, de mis chistes y el haber hecho mi vida tan feliz.
(a las burbujitas del regulador también).

"¡Qué suerte tienen los irresponsables!"

(Tía Ceci, Marzo, 1995)

Indice

Resumen	2
Introducción	3
Desarrollo experimental y resultados	7
Discusión	29
Conclusiones	41
Bibliografía	42

Resumen:

Este trabajo pretende brindar un argumento en contra de la hipótesis de que la ribosa haya jugado un papel determinante en la constitución de los primeros polímeros genéticos, idea relacionada a la postulación del mundo de RNA como paso inicial en el origen y evolución de los sistemas biológicos. El argumento, que se extiende para el resto de los azúcares, está fundamentado en la relativamente alta inestabilidad química de esta familia de compuestos.

El tema central de la parte experimental, se basa en el estudio de la descomposición de la ribosa. Se ha construido para esta reacción un perfil de respuesta al pH, en el intervalo de 4.4 a 8.4, y a la temperatura, entre 60 y 118°C. El tiempo de vida media en condiciones de acidez cercanas a las fisiológicas y a las presentes en el océano contemporáneo (73 minutos a 100°C, 44 años a 0°C) parecen indicar que difícilmente puede considerarse a la ribosa como eficiente reactivo prebiótico.

También se investigaron las constantes de reacción para la descomposición del resto de las aldosas (alosa, arabinosa, altrosa, galactosa, glucosa, gulosa, idosa, lixosa, manosa, talosa y xilosa) y de algunos derivados de la ribosa (2-desoxirribosa, ribosa-5-fosfato, y ribosa-2,4-difosfato). Estos resultados parecen llevar hacia conclusiones semejantes a las obtenidas con los experimentos realizados sobre la ribosa.

Este estudio ha considerado únicamente la descomposición debida al simple paso del tiempo, dejando de lado otras múltiples vías degradativas existentes (por radiación, por combinación con otros compuestos orgánicos, etc).

Merced a este tipo de resultados, parece necesario orientar estudios hacia la búsqueda de alternativas estructurales para las primeras macromoléculas informativas, quizás de esqueletos más plausibles o bases diferentes, con capacidades catalíticas mayores o conformaciones novedosas.

Introducción

Desde que en 1953 Miller (1) publicara su ya clásico trabajo de generación de compuestos orgánicos por descargas eléctricas sobre atmósferas supuestamente prebióticas, el carácter más bien especulativo del estudio de la evolución química y el origen de la vida dio paso a la experimentación y el "caldo primigenio" que Darwin (2) y Oparin (3) propusieran, se impuso como la hipótesis más aceptada para explicar el eventual surgimiento de seres vivos en el planeta.

La teoría estaba armada: la materia inorgánica, a partir de reacciones simples del tipo de las ejemplificadas en el experimento de Miller, daría lugar a una enorme colección de diversas moléculas orgánicas. Con el paso del tiempo y reacciones apenas más complejas, este conjunto de compuestos generaría los monómeros de las macromoléculas biológicas que, tras polimerizar en ambientes propicios, establecerían en sí mismos una etapa pre-celular. Los coacervados de Oparin (3), las microesferas de Fox (4) o sistemas semejantes, permitirían que pequeñas cantidades de esta heterogénea mezcla de moléculas se segregaran, haciendo distintas las diversas capacidades catalíticas y/o de replicación de cada estructura. Estos sistemas podrían ser considerados como las primeras células o, al menos, como los ancestros de éllas . . . el resto se daría por evolución.

Aunque la descripción del contenido orgánico del meteorito Murchinson (5), extremadamente semejante en composición a los resultados de Miller, validara este marco teórico en tanto a la universalidad del fenómeno, aún era necesario establecer las rutas generativas de otros compuestos orgánicos fundamentales en la construcción de los monómeros biológicos. La síntesis prebiótica de la adenina (6), la descripción de la síntesis de prácticamente todos los aminoácidos protéicos a partir de los más simples y el redescubrir la conocida reacción de la formosa (7) como posible mecanismo prebiológico de síntesis de azúcares, permitieron, entre muchas otras series de reacciones, completar y redondear el primer eslabón de la cadena de eventos propuesta. El segundo paso, la formación concreta

de monómeros, se probaría mucho más difícil de estructurar, el tercero, la polimerización, casi imposible.

Desde su cuarto nivel, la caracterización de los sistemas más simples que pudieran llamarse vivos, la teoría empezó a crecer hacia el otro extremo, tratando de conectar los niveles celulares de la biología contemporánea, con las etapas de evolución química que delineaba el estudio de las síntesis prebióticas. Del análisis producto de este esfuerzo por regresar en el tiempo, surge una importante paradoja bioquímica: si el DNA, portador de la información genética, juega un papel indispensable en la síntesis de proteínas pero no puede duplicarse sin la existencia de éstas, ¿quién existió primero, el informante o el efector de la información, el DNA o las proteínas?. Como respuesta a esta pregunta, tres autores, Orgel, Crick y Woese (8-10), proponen lo que se daría en llamar "el mundo de RNA". El RNA, siendo un ácido nucléico, cumple con los requisitos estructurales para el almacenamiento y traspaso de información y es, al mismo tiempo, el patrón inmediato en la formación de las proteínas . . . ¿por qué no pensar en una etapa en que el RNA funcionara a la vez como recipiente de información y como agente catalizador de las reacciones que dicho almacén requiere para duplicarse? fenómenos de selección dictarían eventualmente el cambio hacia un mejor sistema para guardar la información, el DNA, e impondría a las enzimas, sorprendentemente eficientes, como catalizadores. Con el descubrimiento de las propiedades catalíticas de ciertas secuencias de RNA presentes en organismos actuales (11-12), el mundo de RNA cambió de ser una magnífica idea a estructurarse en una hipótesis con apoyo experimental. No sólo el RNA, en efecto, puede jugar los dos papeles que le fueran conferidos, si no que, además, la etapa de evolución posterior se revela como algo más que posible, tras los asombrosos resultados en adquisición de información y propiedades catalíticas novedosas que se han obtenido a partir de sistemas de evolución *in vitro* de secuencias de RNA (13).

Sin embargo, aunque la noción del mundo de RNA simplifica enormemente el panorama para aquéllos que buscan la conexión histórica entre los fenómenos biológicos actuales y las rutas químicas de síntesis prebiótica de moléculas complejas, el RNA sigue siendo un polímero extremadamente elaborado, al cual es difícil acceder desde el abanico de reacciones simples que parece ofreciera la Tierra

primitiva, reacciones que requieren de funcionar rápida y eficientemente bajo condiciones generalmente desfavorables, sin demasiadas materias primas a la mano.

El incluir ribosa como componente esencial, resulta en una importante debilidad del RNA. Las mezclas de azúcares y bases nitrogenadas no dan fácilmente lugar a nucleósidos (14-15) y, cuando la reacción se fuerza, el gran número de estructuras isoméricas resultantes es desalentador, sobre todo si se piensa en que sólo una entre las numerosas orientaciones posibles entre la base y el carbohidrato, resulta biológicamente relevante (16). Por otro lado, el pensar en un mundo poblado por numerosas secuencias de RNA de distintas capacidades catalíticas y oportunidades evolutivas, significa, necesariamente, la existencia de una vasta fuente de los constituyentes del polímero, entre ellos, la ribosa. Dicha fuente parece prácticamente imposible de conseguir, dadas las características supuestas para el planeta en aquel entonces.

Ya desde 1861 Butlerow (7) había descrito la polimerización autocatalítica del formaldehído, en medio fuertemente básico, para generar un producto de carácter dulce, al que llamara formosa. Mucho más tarde, se describiría la compleja mezcla de carbohidratos a la que da lugar la ahora conocida como reacción de la formosa (17). Apartando un poco los ojos del hecho de que las condiciones para la reacción son un tanto extremas, se cayó en la tentación de dar por hecho el hallazgo de una síntesis prebiótica confiable para los azúcares importantes, sin sopesar convenientemente la observación de Shapiro (18) de la absoluta falta de especificidad en la síntesis de ribosa, o algún otro azúcar en especial, entre los numerosos productos. Algunos trabajos intentaron, no muy exitosamente, llevar a cabo la reacción bajo condiciones de concentración de reactivos y pH más cercanas a lo aceptable (19-20), pero el problema de la especificidad quedó un tanto relegado. Albert Eschenmoser y su grupo (21) han propuesto una ruta alternativa de síntesis, relativamente selectiva, reportando un rendimiento de alrededor del 17.5% para ribosa-2,4-difosfato, a partir de la reacción entre formaldehído y glicoaldehído fosfatado. No esta claro que este último reactivo pueda confiablemente considerarse como prebiótico, pero aún dejando este aspecto de lado y suponiendo el caso de la selectividad como quizás resuelto, queda todavía enfrentar otro grave

problema: la estabilidad de la ribosa y los azúcares en general, tema sobre el cual gira el presente trabajo.

El tiempo geológico generalmente se mide en millones de años, incluso tomando intervalos temporales más bien pequeños. Aún aceptando la posibilidad de una verdadera explosión de cambios, de un proceso acelerado, es necesario pensar que los compuestos que resultarían evolutivamente importantes tuvieron que permanecer de alguna forma inalterados por un tiempo, resistentes a la ruptura, a ciertas reacciones, hasta que las condiciones que permitieran la estructuración del siguiente paso evolutivo tomaran forma. Compuestos altamente inestables que no se encuentren protegidos y substancias prácticamente inertes, resultan pobres candidatos para volverse imprescindibles en procesos de tipo evolutivo. Así, considerando su importancia en el marco del mundo de RNA y el surgimiento de las primeras macromoléculas informacionales, se decidió estudiar la velocidad de descomposición de la ribosa y algunos compuestos afines, intentando aportar elementos que permitan juzgar la plausibilidad de que este tipo de substancias jugaran, en efecto, tan importante papel en la historia de la vida en este planeta, como se ha supuesto.

Los azúcares han sido considerados generalmente inestables desde hace ya mucho tiempo, como demuestra la tradición de no esterilizar por calor aquellos medios de cultivo que contienen monosacáridos. Incluso, la reacción de la formosa, reconocida como vía sintética, debe ser rápidamente detenida, puesto que pocos minutos después del momento de máxima concentración de azúcares, conocido como "punto de amarillamiento", los carbohidratos recién sintetizados comienzan a descomponerse (17).

Numerosos estudios se han realizado acerca de la estabilidad de los azúcares en condiciones extremas de acidez o alcalinidad (22-28), sobre todo de los fosfatados, por su importancia en los metabolismos contemporáneos. Sorpresivamente, parecen existir muy pocos datos sobre la degradación bajo niveles de acidez más cercanos a la neutralidad (29-30).

La descomposición de los azúcares es un proceso realmente complejo, en el que entran en juego varios factores para influir en

numerosas reacciones que tienen lugar simultáneamente. La lista de productos conocidos de la descomposición de los azúcares incluye a los ácidos láctico, oxálico, fórmico, levulínico y acético, además de sacarinas, acetona, derivados fenólicos, furfural, etc, y queda aún un gran número de compuestos, sobre todo poliméricos, por identificar. La composición de la mezcla final depende fuertemente de la temperatura de la reacción y del pH al que ésta se lleve a cabo, amén de la identidad del azúcar o azúcares iniciales (22,25,31). Por todo esto, la descomposición fue seguida únicamente a partir de la desaparición del azúcar inicial, en vez de usar la aparición neta de los productos como medida de control del gasto de los reactivos. Así mismo, no se realizaron estudios sistemáticos acerca de la identidad de los numerosos productos de las reacciones que se llevaron a cabo y se reportan en el presente trabajo.

Desarrollo experimental y resultados

Los datos que sustentan los resultados del presente trabajo, fueron obtenidos con un aparato de resonancia magnética nuclear (General Electric QE 300 MHz) utilizando principalmente resonancia de protones (^{1}H-RMN), aunque algunos resultados dependen de espectros de resonancia de núcleos de fósforo (^{31}P-RMN).

La técnica de resonancia magnética nuclear se fundamenta en el hecho de que los núcleos que contienen un número impar de protones o neutrones, poseen propiedades magnéticas derivadas de su espín. Al aplicar un fuerte campo magnético homogéneo alrededor de una muestra, todos los núcleos susceptibles tienden a alinearse respecto a éste, tomando alguna de sus orientaciones permitidas, generalmente la de menor energía. Siendo éste un fenómeno de tipo cuántico, la absorción de energía de únicamente cierta longitud de onda, permite el cambio de una orientación a otra, efecto conocido como resonancia magnética nuclear. Las distintas orientaciones de los núcleos magnéticamente activos, representan niveles de energía muy cercanos entre sí, así que el salto entre

orientaciones requiere de ondas de baja frecuencia (de 1 a 500 MHz, ondas de radio).

Las características del campo magnético que se establece en las inmediaciones de cada núcleo, son función no sólo del campo externo que se aplique, sino del entorno en que se encuentre, de manera que los núcleos de un mismo elemento pueden poseer energías de resonancia distintas, dependiendo del tipo de átomos que tengan como vecinos.

Un espectro de resonancia magnética indica, en una serie de picos diversos, las energías de resonancia que poseen los núcleos excitables de una muestra (32). En general, estos picos son descritos (en unidades arbitrarias nombradas "ppm") por su distancia relativa a la señal de cierto compuesto patrón o cero, generalmente tetrametilsilano (TMS), que es el utilizado en este trabajo. El área de cada pico depende del número de núcleos con la misma energía de resonancia existentes en la muestra. La localización de los picos es constante, siempre que se trabaje con la misma substancia y en condiciones similares, pero la estructura del espectro puede alterarse severamente debido a cambios en variables tales como el pH, la temperatura, la fuerza iónica, etc.

Dado que la identificación y ciertas relaciones de posición de los grupos funcionales se simplifica enormemente con su utilización, las aplicaciones de la resonancia magnética nuclear abundan, resultando ser de enorme utilidad en el ámbito de la síntesis de moléculas orgánicas e inorgánicas, en la identificación de productos de reacción y, muy especialmente, como herramienta en la elucidación de estructuras moleculares. A la vez, esta técnica genera, de manera no destructiva, espectros distintivos para cada substancia, resultando en extremo cómoda para seguir la suerte de diversos compuestos a lo largo de una reacción. Por esta característica, dicha técnica se ha convertido en un arma inapreciable en el estudio de la fisiología general, vías metabólicas, reacciones en serie y mapeo de compuestos, entre otros, dado que puede aplicarse incluso sobre sistemas vivos, sin daño para la muestra.

Para el principal objetivo experimental de este trabajo --un estudio cinético de la descomposición de la ribosa y otros azúcares--

el seguimiento de picos de espectros de resonancia magnética se sugirió como una forma sencilla de registrar la cantidad de azúcar remanente. Así pues, la velocidad de degradación de los diversos carbohidratos fue determinada mediante ^{1}H-RMN, midiendo, en el tiempo, la disminución del área de ciertos picos del azúcar respecto a un pico de referencia de un compuesto de concentración constante. En el caso de la ribosa, los picos utilizados fueron los correspondientes a las formas alfa y beta furanosa. En la tabla I, se encuentran enlistados los demas azúcares estudiados en este trabajo, junto con las señales de las formas anoméricas que se utilizaron en las mediciones. Los picos fueron escogidos, en todos los casos, por su conveniente distancia respecto a la señal del agua y a los picos correspondientes a productos de la reacción, a fin de evitar sobreposiciones que enmascararan la determinación de concentraciones. La figura 1 muestra una serie de espectros ejemplo, donde puede apreciarse el cambio en la composición de la muestra con respecto al tiempo.

Las referencias a las que se ha hecho alusión, llamadas internas o externas, son substancias que se introducen a la muestra a fin de obtener, en el espectro, un pico de localización e intensidad conocidas. Por internas, se conoce a aquéllas en que la substancia que se desea como indicador, es añadida libremente a la muestra, mezclándose homogéneamente con ella. Las externas, en cambio, se mantienen segregadas, generalmente selladas dentro de un capilar vítreo que se coloca en el interior del tubo de muestra. La presencia del capilar introduce imperfecciones en el campo magnético, debido a la heterogeneidad de la muestra, pero aún así, en el presente trabajo se prefirió utilizar referencias externas, por las razones que se dan a continuación. Como se ha descrito en el marco teórico de este estudio, la reacción con la que se trabaja es considerablemente compleja y aún hace falta entender de ella numerosas cuestiones, por lo que vertir la referencia en la muestra implicaría el grave riesgo de modificar de algún modo la reacción que se estudia. Aislada, en cambio, en un contenedor propio, es poco probable que la referencia juegue papel alguno en la reacción. En los experimentos expuestos, se utilizaron referencias de cloroformo en tetracloruro de carbono como señal de concentración constante en el seguimiento de la pérdida de los azúcares, en concentraciones varias entre 0.025 y 0.2%, dependiendo del tamaño de los picos del carbohidrato a utilizar.

Señales de ^{1}H-RMN utilizadas para la medición de la concentración de los azúcares.

	señal 1	señal 2	señal 3	señal 4
Alosa	αF (5.34)	βF (5.21)	αP (5.13)	-----
Altrosa	βF (5.27)	αF (5.23)	βP (5.09)	αP (4.97)
Arabinosa	βP (5.34)	αF (5.26) βF (5.27)	-----	-----
Galactosa	αP (5.23)	αF (5.21)*	-----	-----
Glucosa	αP (5.22)	-----	-----	-----
Gulosa	αF (5.29)*	αP (5.16)	-----	-----
Idosa	βF (5.40)	αF (5.18)	αP (5.03)	-----
Lixosa	αP (5.08)	-----	-----	-----
Manosa	αP (5.17)	-----	-----	-----
Ribosa	αF (5.34)	βF (5.21)	-----	-----
Talosa	αP (5.26) βF (5.35)	αF (5.22)	βP (4.79)	-----
Xilosa	αP (5.26)	-----	-----	-----
Ribosa-2,4-difosfato	αP (5.07)**	βP (4.88)**	-----	-----
Ribosa-5-fosfato	αF (5.34)	βF (5.21)	-----	-----

Tabla I.- Bajo "señal" se denotan las estructuras cuyos picos se usaron en este estudio, ya sea como conspicuidad única o como conjunto, dada la proximidad entre las señales (F y P denotan furanosa y piranosa, respectivamente). Entre paréntesis se dan los valores de localización de cada pico, en ppm respecto a TMS (Angyal & Pickles, 1972, citados en **48**, salvo ** encontrados en **21**). En los casos marcados con * , es posible que se tomaran, inadvertidamente, ambas furanosas como una sola señal.

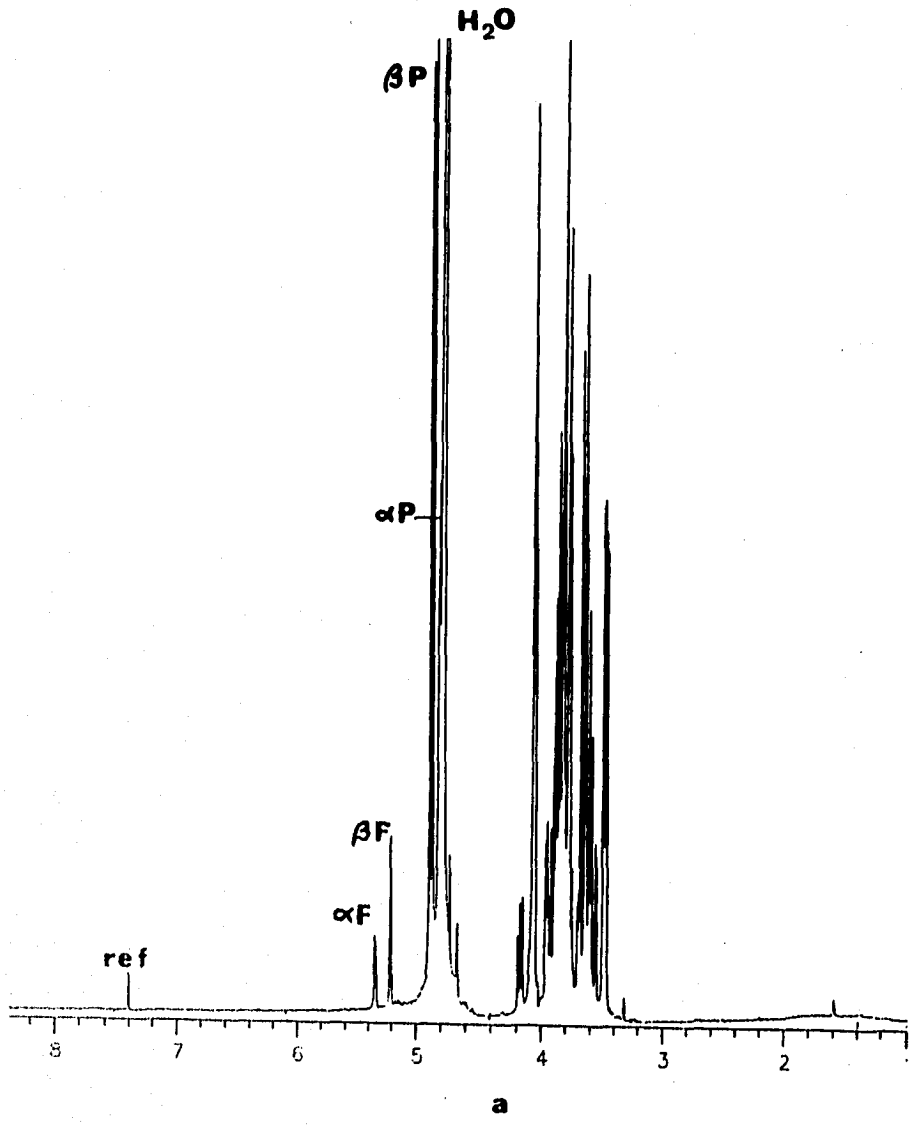


Figura 1.- En **a** se muestra un espectro de ^{1}H-RMN de ribosa, en donde puede apreciarse la conveniencia de utilizar las furanosas como señales a estudiar. También se encuentran marcados los picos correspondientes a las piranosas, el agua y la referencia de cloroformo.

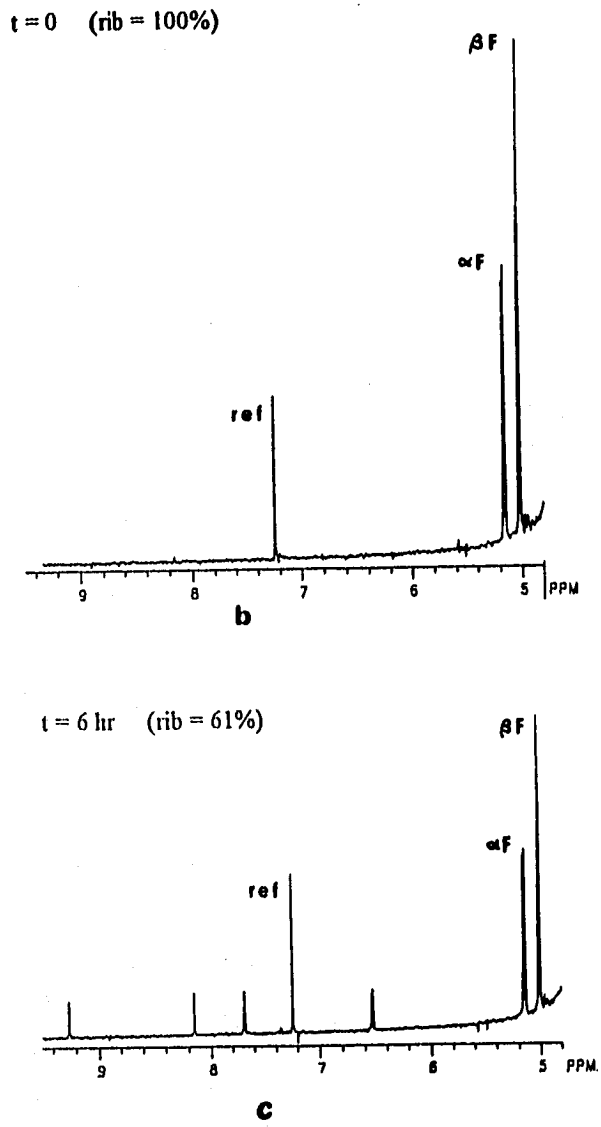
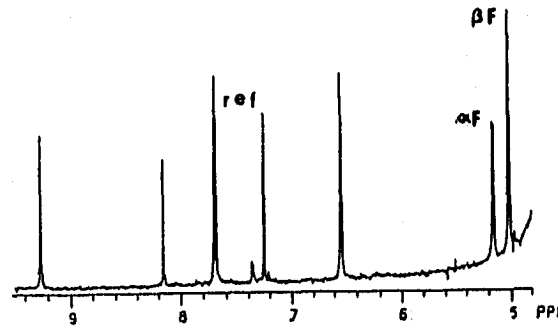


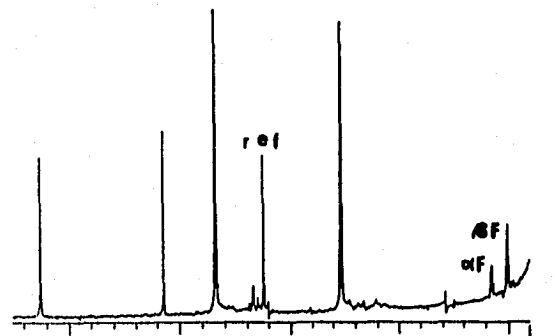
Figura 1 (cont.).- Donde se ejemplifica, de **b** a **e** el cambio en el espectro de ^{1}H-RMN de la ribosa debido a la descomposición, hecho en que se basa la metodología de este trabajo. Puede observarse cómo la relación entre el área de los picos del azúcar y el de la referencia de cloroformo cambia sustancialmente con el paso del tiempo, mientras la concentración de la ribosa disminuye y aparecen nuevas señales, correspondientes a productos de la descomposición.

t = 14 hr (rib = 49%)



d

t = 50 hr (rib = 13%)



e

Figura 1 (cont.).- Donde se ejemplifica, de **b** a **e** el cambio en el espectro de ^{1}H-RMN de la ribosa debido a la descomposición, hecho en que se basa la metodología de este trabajo. Puede observarse cómo la relación entre el área de los picos del azúcar y el de la referencia de cloroformo cambia sustancialmente con el paso del tiempo, mientras la concentración de la ribosa disminuye y aparecen nuevas señales, correspondientes a productos de la descomposición.

Puesto que prácticamente todos los datos se recogieron a partir de ^{1}H-RMN, se requirió de la preparación de muestras que aseguraran que la cantidad de agua presente fuera mínima, a fin de evitar que su pico cubriera los picos de los azúcares a estudiar. El solvente utilizado, pues, fue óxido de deuterio (D_2O o agua pesada), cuya señal de RMN, aunque existente, es en extremo reducida y se expresa en regiones alejadas del espectro.

El procedimiento experimental básico para los estudios que dan forma a este trabajo, consiste en sellar dentro de un tubo de muestra de RMN, una pequeña cantidad de una solución de concentración conocida del azúcar a trabajar, en D_2O, incluyendo en el tubo un pequeño capilar con la referencia de cloroformo. De esta muestra, llamada de tiempo cero, se obtiene un espectro de resonancia magnética (generalmente, de 24 iteraciones) que representa la cantidad de azúcar inicial. El tubo de RMN se lleva, entonces, a un bloque o baño de temperatura constante, en donde se calienta por un tiempo determinado. Después del periodo elegido, el tubo se enfría en hielo y su espectro es extraído nuevamente. De la comparación entre el área de los picos del azúcar, que disminuye con el tiempo, y el área del pico de cloroformo, que se mantiene constante, puede determinarse aritméticamente la concentración del azúcar que resta en la muestra antes de iniciar el segundo tiempo de calentamiento. Cada tubo fue calentado al menos tres veces, escogiendo los tiempos de manera tal que se llegara alrededor del 50% del azúcar inicial restante, salvo en las pruebas de caracterización de la reacción, en que el tratamiento se mantuvo hasta tener únicamente el 5% del compuesto inicial. En la Figura 2 puede observarse una gráfica de la relación entre la concentración del azúcar, en este caso ribosa, y el tiempo de tratamiento. Como puede fácilmente apreciarse a partir de la relación lineal entre el logaritmo de la concentración y el tiempo, que aparece en la gráfica de la Figura 3, la descomposición de la ribosa sigue una cinética de primer orden respecto al azúcar. Este hecho, por demás afortunado si se toma en cuenta lo complejo de la reacción y el gran número de productos, no sólo simplifica enormemente la determinación de las constantes de reacción, sino que, como se discutirá más adelante, conlleva importantes consecuencias dentro del marco de la evolución química.

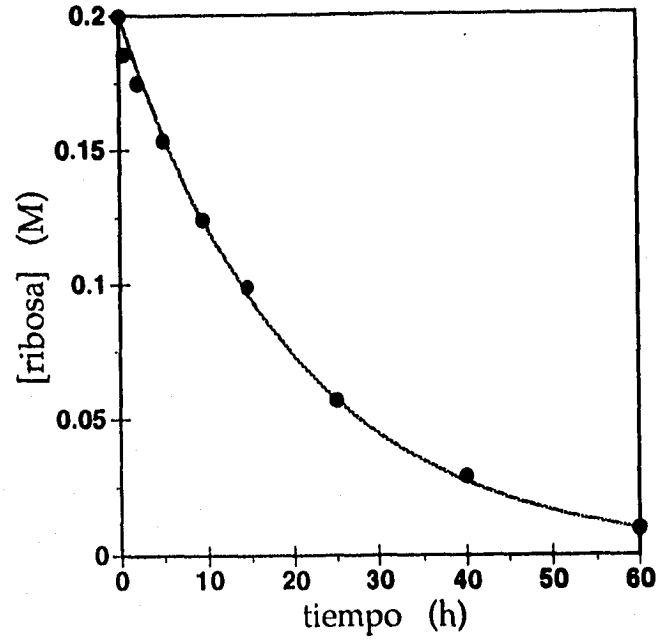


Figura 2 .- Relación entre la concentración de la ribosa y el tiempo a lo largo de una típica reacción de descomposición. La curva permite suponer una relación logarítmica entre las variables. El último punto corresponde aproximadamente al 5% restante del azúcar inicial.
(Ribosa 0.2 M, pD 4.4 en amortiguador de acetatos 1M, 100°C)

Fueron necesarias ciertas precauciones en la manipulación de las muestras, aunque probablemente innumerables detalles del procedimiento quedaron sin control alguno. Sellar al calor el vidrio de la boca del tubo de muestra ayudó a mantener el volumen de ésta constante; cierta homogeneidad en el calentamiento fue procurada, al construir las muestras pequeñas y en tubos delgados; pruebas previas de resistencia al calor intentaron evitar fugas de la referencia hacia la muestra; la precisión en el tiempo de exposición, pretendió

alcanzarse asegurando cambios rápidos en la temperatura, mediante inmersión en aceite caliente o en agua con hielo, según el caso; todos los tubos permanecieron en agua fría (alrededor de 5°C) mientras esperaban el momento de ser calentados o llevados a la máquina de RMN, intentando disminuir al máximo la descomposición de la muestra que pudiera darse entre intervalos del tratamiento.

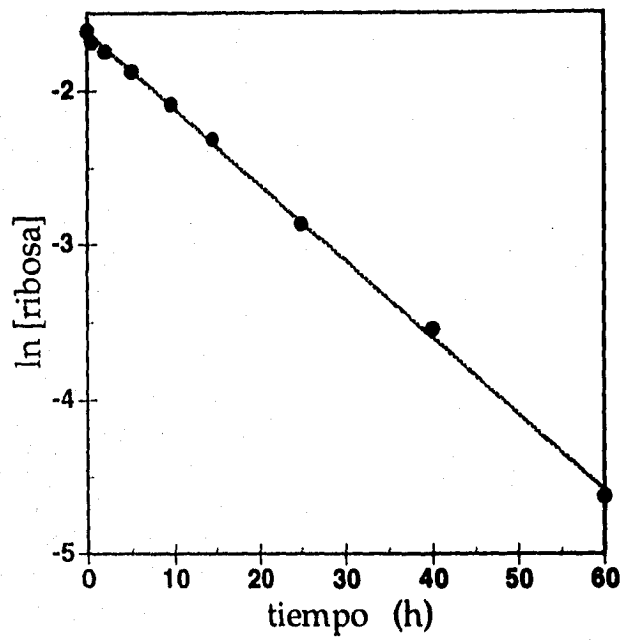


Figura 3 .- Relación entre el logaritmo natural de la concentración de ribosa y el tiempo. La función lineal entre las variables denota una cinética de primer orden, respecto al azúcar, en esta reacción de descomposición. El último punto esta tomado después de transcurrido poco más de cuatro veces el tiempo de vida media de la reacción.
(Ribosa 0.2 M, pD 4.4 en amortiguador de acetatos 1M, 100°C)

Como se ha indicado, las reacciones no se llevaron a cabo en agua, sino en óxido de deuterio, así que resultó imprescindible encontrar si la velocidad de descomposición se veía afectada por este cambio isotópico. Para esto, se realizó un experimento control usando H_2O como solvente, en el que una solución de ribosa 0.05M a pH=7, fue sellada en varios tubos que se expusieron a una temperatura de 100°C. Después de ser calentadas por distintos intervalos de tiempo, las muestras fueron deshidratadas al vacío y reconstituidas en D_2O, sólo por el tiempo necesario para obtener sus respectivos espectros. Los espectros de las muestras se compararon con el espectro de una parte de la solución que no se expuso al tratamiento. En la tabla II aparecen los resultados de este control, enlistados, por comodidad, junto con los datos correspondientes a otros experimentos testigo, que fueron considerados importantes durante distintos momentos del trabajo. Al parecer, la diferencia existente entre la velocidad de descomposición que se da en los dos solventes, no amerita realmente un cambio de modelo en este estudio.

Diversos autores coinciden en que durante la época en que el origen de la vida tiene que haberse dado, la cantidad de O_2 atmosférico debe haber sido en extremo reducida. El oxígeno es notablemente reactivo, pero difícilmente podría haber representado, en aquellos tiempos, una seria amenaza para las moléculas orgánicas existentes. Sin embargo, su presencia podría alterar de forma importante los resultados de los experimentos, al fomentar la degradación de las muestras sin apego al modelo. Un experimento, llevado a cabo bajo una atmósfera de nitrógeno, parece indicar que la presencia de oxígeno tampoco representa una variable importante en la velocidad de descomposición de la ribosa (ver Tabla II), aunque quizás sí en la distribución y naturaleza de los productos de la reacción, lo cual no resulta del todo sorprendente, tomando en cuenta la complejidad de ésta.

La acidez es un fenómeno intrínsecamente relacionado con la presencia de iones H^+, así que resulta absurdo, en un sistema completamente deuterado, hablar de pH, como no sea para expresar

directamente la lectura de un potenciómetro (en este caso, un Corning modelo 250), así que en el presente estudio se reporta el pD, determinado como:

$$pD = pH + 0.4 \qquad (33)$$

Experimentos control.		
	k (s^{-1})	**$t_{1/2}$ (min)**
agua vs deuterio 100°C, pH 7, pD 7.4, amortiguador de fosfatos 0.05 M	$8.17x10^{-5}/1.18x10^{-4}$	141/98
oxígeno vs no oxígeno 80°C, pD 7.4, amortiguador de fosfatos 0.05 M	$2.61x10^{-4}/2.34x10^{-4}$	44/49
carbonatos vs fosfatos 100°C, pD 7.4, amortiguador de carbonatos o fosfatos, 0.05 M	$3.68x10^{-3}/1.18x10^{-4}$	177/98

Tabla II.- Donde se expresa el valor de las constantes de reacción de descomposición de la ribosa en los distintos experimentos control mencionados (ver texto). Las condiciones de cada experimento se citan bajo el título.

Reuniendo las constantes de reacción correspondientes a una gran variedad de condiciones, se construyó un perfil de respuesta de la descomposición de la ribosa al pD y la temperatura, que puede apreciarse en la figura 4. Como se puede observar, la velocidad de reacción es aproximadamente proporcional a la concentracion de OD^-,

en el intervalo de pD entre 4 y 6. Al incrementar la alcalinidad, la curva se dobla, lo que sugiere la posibilidad de que el paso determinante de la reacción sea la ionización de algún intermediario, aunque este comportamiento podría deberse a otros factores. Resultados complementarios, no descritos por su falta de detalle, indican que para valores de pD menores que 4.4, la velocidad de la reacción vuelve a crecer, presumiblemente debido a una catálisis ácida.

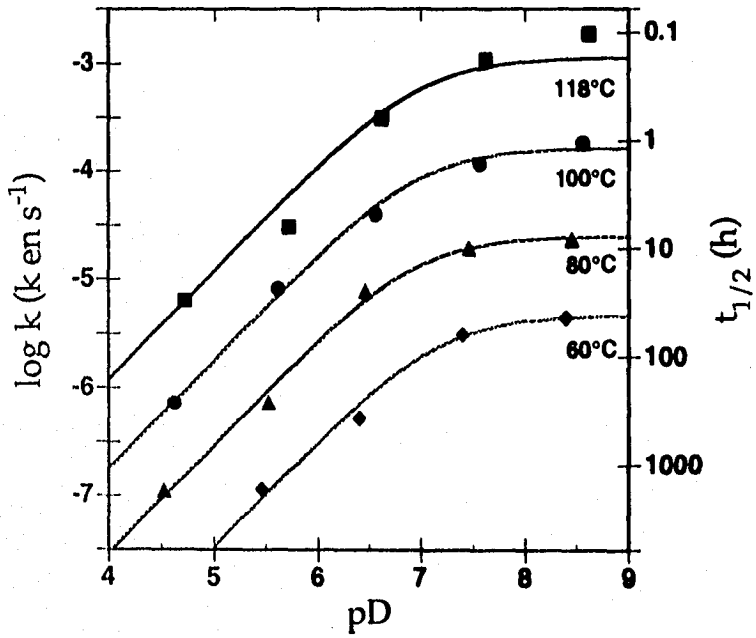


Figura 4 .- En la figura se pueden apreciar las constantes de reacción de la descomposición de la ribosa en función del pD. Las curvas fueron ajustadas a los datos siguiendo una fórmula del tipo:

$$k = k_0/1+([H^+]/k_a)$$

que supone la aparición de un anión como paso determinante para la reacción.

En los datos de la figura 4, puede apreciarse que, para temperaturas altas o medias y bajo condiciones de acidez casi neutras, como las que imperan actualmente en el océano y en el interior de las células de la mayoría de los sistemas biológicos, la vida media de la ribosa se encuentra siempre dentro de intervalos de minutos, horas o, a lo más, escasos días.

Al reordenar algunos de los resultados expuestos en la figura 4, puede verse que la descomposición de la ribosa cumple con una curva de Arrhenius en su dependencia a la temperatura, de forma:

$$k = Ae^{-Ea/RT}$$

ó

$$\ln k = \ln A - Ea/RT$$

(donde k es la constante de reacción, T es la temperatura absoluta, R representa la constante de los gases, Ea la energía de activación y A una constante, conocida como el factor pre-exponencial)

como puede apreciarse en la relación lineal entre el logaritmo de la constante de reacción y el recíproco de la temperatura de la figura 5, de ecuación:

$$\log k = 11.23 - 5608/T$$

(donde k está expresada en s^{-1})

La energía de activación de la reacción, 107.5 KJ (25.7 Kcal), puede extraerse fácilmente a partir de la pendiente de la recta. Esta información permite extrapolar hacia temperaturas bajo las cuales sería realmente complicado llevar a cabo estos experimentos, así que puede calcularse que la vida media de la ribosa, a pD 7.4 y cero grados centígrados, sería de aproximadamente 44 años.

La fuerte tendencia de los productos de la reacción a acidificar el medio, hizo necesaria la utilización de soluciones amortiguadoras. Amortiguadores de fosfatos, acetatos y carbonatos, en concentraciones varias entre 0.05 y 1 M, se utilizaron para obtener los resultados expuestos. Todos los amortiguadores usados se elaboraron en agua deuterada, después de secar, al vacío o por calor, las sales a disolver. La reacción probó ser considerablemente sensible

a la concentración de la solución amortiguadora, mostrando una importante catálisis general de base, que puede apreciarse en las gráficas de concentración de amortiguador contra constante de reacción de las figuras 6 (fosfatos) y 7 (acetatos). Dada la curva en la relación de las variables y las incertidumbres asociadas al procedimiento, carece de sentido confiar plenamente en la extrapolación hacia la concentración cero del amortiguador.

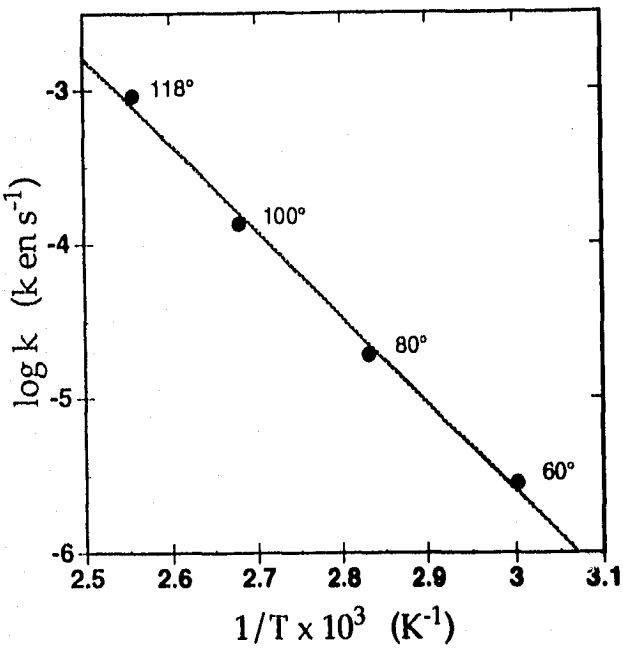


Figura 5 .- Gráfica de Arrhenius de las constantes de reacción de la descomposición de ribosa a pD 7.4. los datos experimentales (Fig. 4) han sido ajustados para el cambio en el pD del amortiguador debido al cambio de temperatura.

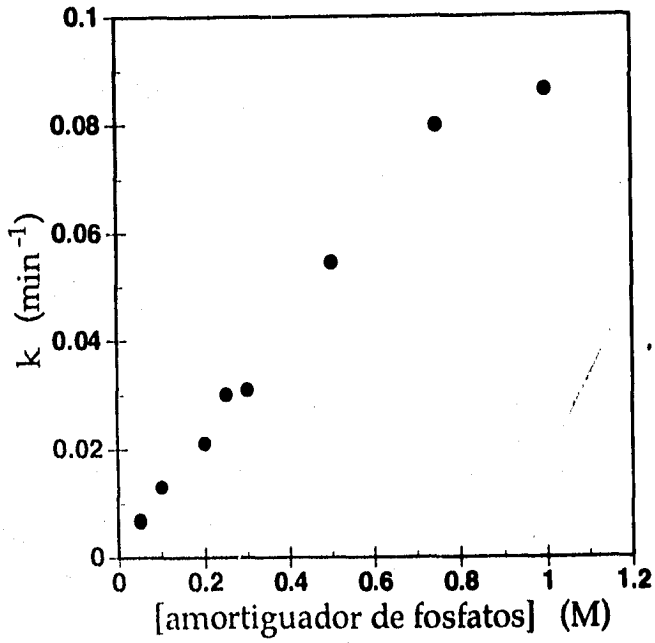


Figura 6 .- Relación entre la constante de reacción de la descomposición de ribosa y la concentración del amortiguador de fosfatos (pD 7.4, 100°C). Si se extrapola haciendo pasar una recta por los puntos de bajas concentraciones, puede obtenerse un valor de k para [amortiguador]=0 y la dependencia de la constante de reacción puede escribirse como:

$$k = 2.86\times10^{-3} + 9.36\times10^{-2}\,([DPO_4^{-2}] + [DPO_4^{-}])$$

Sin embargo, es evidente que la relación entre las variables graficadas da una curva, así que la extrapolación a cero y, por tanto, la función de dependencia, han de ser tomadas con precaución (ver Fig. 7).

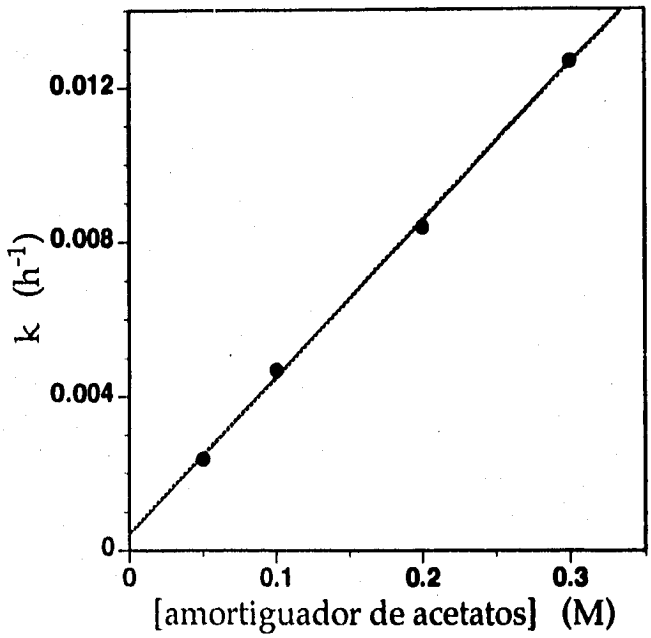


Figura 7 .- Relación entre la constante de reacción de la descomposición de ribosa y la concentración del amortiguador de acetatos (pD 4.4, 100°C). Se muestra aquí tan sólo la sección de bajas concentraciones, donde las extrapolaciones a [amortiguador]=0 podrían ser llevadas a cabo si se supone una relación lineal entre los valores, como se muestra en la figura. Lamentablemente, pequeños cambios debidos a imprecisiones propias del método utilizado, alteran considerablemente el valor de la extrapolación, volviéndola poco confiable (ver Fig. 6).

Debido, pues, a la necesidad de mantener lo menos alterada posible a la reacción, la menor concentración de amortiguador que mantenía aún el pH constante, 0.05 M, fue utilizada durante las

mediciones de la descomposición de los azúcares cuyas constantes se reportan, a menos que se indique lo contrario.

Para poder calificar la validez de este trabajo en el ámbito del modelo planteado de evolución química, conviene considerar cuidadosamente este inesperado problema que representan los amortiguadores.

La concentración de fosfatos y acetatos en el océano contemporáneo es bastante baja, así que la presencia de éstos en las muestras, debilita la confiabilidad de los resultados. Sin embargo, en condiciones naturales, existe una considerable acción amortiguadora gracias a los carbonatos en solución (HCO_3^-). Es imposible saber a ciencia cierta la composición del océano primitivo, pero la concentración de HCO_3^- actual, 2.3×10^{-3} M, se vería incrementada de forma importante bajo las atmósferas de alto contenido en CO_2 que se han propuesto para la tierra primitiva (34-35). Así, queda esperar que los amortiguadores naturalmente presentes en la Tierra, llevarían a cabo la catálisis que sobre nuestra reacción ejercen los amortiguadores utilizados, validando el modelo que soporta esta manipulación experimental.

Dada esta situación, se decidió realizar un control más, a fin de comparar la velocidad con que se descompone la ribosa en presencia de un amortiguador de carbonatos, contra aquélla relativa a fosfatos. La constante de reacción en el sistema de carbonatos 0.05 M, a pD 7.4 y 100°C, representa aproximadamente la mitad (52%) de la obtenida a partir de fosfatos, a las mismas condiciones (Tabla II). Al parecer, los amortiguadores naturales afectan de forma semejante la descomposición de los azúcares, así que puede considerarse que los resultados aquí expuestos son válidos, por un orden de magnitud, para cualquier modelo razonable de océano primitivo.

Los datos acerca de la descomposición de otros azúcares semejantes a la ribosa, son de interés no sólo porque estos compuestos son de importancia extrema en los sistemas biológicos, sino porque pueden considerarse como alternativas evolutivas para la constitución de los esqueletos de las primeras macromoléculas informativas. A pesar de que casi cualquier carbohidrato está expuesto a los mismos problemas que la ribosa en cuanto a la

especificidad con que se obtiene a partir de las síntesis prebióticas conocidas, es posible que ciertas características estructurales de algún azúcar lo dotaran de una estabilidad fuera de lo común. Si tal situación se diera, nos encontraríamos quizás ante un fuerte candidato, una substancia que quizás podría haber llevado, tiempo atrás, el papel que ahora juega la ribosa.

El resto de la familia de las aldosas, hexosas y pentosas por igual, fue sometida a estudio, a fin de poder realizar una comparación directa entre sus propiedades y las de la ribosa. A la vez, fueron analizados ciertos derivados de la ribosa, considerados importantes por su papel biológico contemporáneo: la 2-desoxirribosa (presente en el DNA) y la ribosa-5-fosfato (5 es la posición en que se encuentran los grupos fosfato de los nucleótidos, antes de polimerizarse para conformar propiamente ácidos nucléicos).

Varios estudios llevados a cabo por el grupo de Albert Eschenmoser (21), parecen indicar que cierto derivado de la ribosa, la ribosa-2,4-difosfato, resulta considerablemente más estable que la ribosa, en condiciones extremas de alcalinidad, 2 M NaOH, y temperatura ambiente. Este es un dato en extremo interesante, dado que los mismos autores pueden obtener dicho carbohidrato con cierto grado de especificidad, a partir de una modificación de la reacción de la formosa, lo cual ha llevado al autor a proponer este azúcar como posible constituyente de los ancestros moleculares de los ácidos nucléicos actuales (36). Independientemente de las consideraciones sobre la plausibilidad de la presencia en la tierra primitiva del glicolaldehído fosfatado (el reactivo inicial en la reacción modificada, en vez de formaldehído), este resultado merece atención. Por esto, la ribosa-2,4-difosfato ha sido incluída en este análisis.

El tratamiento al que todos estos azúcares fueron sometidos, es esencialmente idéntico a aquel ya relatado para la ribosa, a fin de que la comparación sea válida. Medio mililitro de solución 0.1 M del azúcar, con un pD 7.4 controlado por un amortiguador de fosfatos 0.05 M, fue puesto a descomponer a 100°C.

En la gráfica de la figura 8, pueden apreciarse las distintas constantes de descomposición de las aldosas, arregladas como

función de la fracción molar del aldehído libre de cada uno de los carbohidratos. Es de hacer notar la clara correlación entre las variables, quizás señalando que el paso inicial de la descomposición se da en la estructura abierta de los azúcares, a semejanza de las reacciones de isomerización (37-39). La incertidumbre en la medición de la fracción de cadena abierta es, en general, bastante grande, y los datos con que se ha construido esta gráfica pertenecen a mediciones realizadas a temperatura ambiente. Es posible que la relación entre la velocidad de descomposición y la cantidad de aldehído libre se acerque más a la linealidad, pero hasta no tener disponibles mejores resultados, tendrá que ser suficiente el saber que probablemente son fenómenos estrechamente asociados. Los últimos resultados sobre glucosa y el estudio de la idosa fueron realizados por Michael P. Robertson.

De la gráfica de la figura 8, puede extraerse que, a pesar de las claras diferencias existentes entre los diversos azúcares, dentro de un punto de vista geológico todas las aldosas se descomponen en un lapso de tiempo semejante y bastante reducido. Si las energías de activación de este conjunto de reacciones degradativas son también casi independientes del azúcar de que se trate, entonces se puede generalizar, siempre con el marco temporal de los acontecimientos geológicos, que aquello que se cumple para la ribosa, es cierto para el resto de las aldosas.

Los resultados correspondientes a los derivados estudiados, pueden encontrarse en la tabla III, ya que al carecerse de datos concretos acerca de la proporción de cadena abierta que caracteriza a estos azúcares en solución, resulta imposible compararlos de forma gráfica con el resto de los carbohidratos analizados.

Todos los azúcares, exceptuando la ribosa-2,4-difosfato, obtenida gracias al Dr. Stefan Pitsch, se consiguieron a partir de firmas comerciales (la glucosa de Fisher, la gulosa de Biospherics y el resto, de Sigma) y fueron utilizadas directamente, sin ningún procedimiento de purificación.

La escasa cantidad disponible de la ribosa-2,4-difosfato, obligó a que las maniobras experimentales variaran ligeramente en su caso. La concentración inicial del carbohidrato fue tan sólo de 0.023 M, así

que la señal de tiempo cero resultaba demasiado débil para ser confiablemente leída en la cercanía del pico del agua. Dado el problema, y aprovechando la marcada susceptibilidad del agua a variar su posición conforme a la temperatura, se decidió realizar lecturas de RMN a 50°C, desplazando la señal del agua un poco para liberar algo la lectura de los picos correspondientes al azúcar.

Derivados de la ribosa		
	$k\ (s^{-1})$	$t_{1/2}$ (min)
Ribosa	1.18×10^{-4}	98
2-Desoxirribosa	5.12×10^{-5}	225
Ribosa-5-fosfato	1.34×10^{-3}	9
Ribosa-2,4-difosfato	2.91×10^{-4}	40

Tabla III.- Donde pueden apreciarse las constantes de reacción de la descomposición de los derivados de la ribosa, en comparación a ésta. En todos los casos, la reacción se llevó a cabo a pD 7.4 en buffer de fosfatos y 100°C.

Por otro lado, se utilizó ^{31}P-RMN para dar seguimiento a los grupos fosfato del compuesto y a fin de contar con una segunda serie de mediciones que sirvieran como control para las realizadas sobre protones. La determinación de la concentración de azúcar en la muestra, se llevó a cabo básicamente de la misma manera en el RMN de fósforo que en el de protones, salvo en el hecho de que la medida de referencia en el caso del fósforo, fue la suma de las áreas de todos los picos del espectro. El número de átomos de fósforo tiene que mantenerse constante dentro de la muestra y es de suponer que los grupos fosfato no se destruyen a lo largo de la descomposición, sino que se transfieren completos, ya sea al medio por desfosforilación o a

las cadenas resultantes de la reacción. Dada, pues, la mínima variedad de núcleos de fósforo susceptibles a entrar en resonancia que existía en la muestra, el área total del espectro resultó una medida útil, que permitió ahorrarse los problemas que implica el tener dos referencias externas en el mismo tubo de muestra.

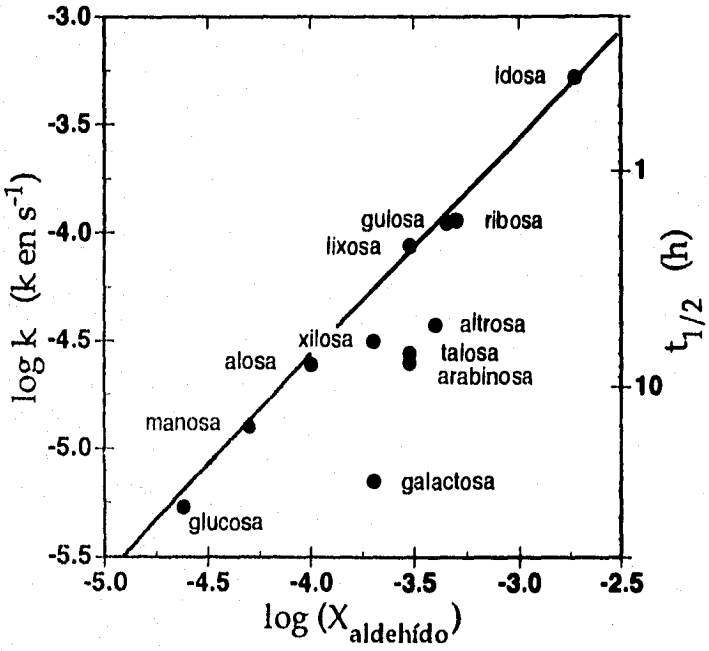


Figura 8 .- Constantes de reacción de descomposición de las aldosas, medidas a pD 7.4 en 0.05 M amortiguador de fosfatos y 100°C, contra la fracción molar de aldehído libre de cada azúcar, medida a 20°C. La recta supone una proporcionalidad directa entre k y X_{ald} y fue trazada de manera que pasara cerca de la ribosa y la mayoría del resto de los azúcares. Debido a que la fracción de aldehído libre de la gulosa se desconoce, este punto ha sido arbitrariamente colocado cerca de la línea, suponiendo una X_{ald} semejante al de la ribosa. El valor para la glucosa es una extrapolación de su constante de reacción de descomposición a 80°C en 1 M amortiguador de fosfatos, pD 7.4.

Los resultados de la descomposición de la ribosa-2,4-difosfato se encuentran resumidos junto con los demás derivados de la ribosa, en la tabla III. La descomposición de este carbohidrato, mucho más rápida que lo que cabría esperar a partir de los datos publicados para temperatura ambiente (21), parece comenzar por una desfosforilación, aunque una isomerización también resulta posible.

Vistos en retrospectiva los resultados y ciertas complicaciones del metodo, resulta relativamente sencillo mejorar la calidad de estos experimentos y, por tanto, la exactitud de los datos que se han expuesto. Un mayor control del pH sin la gravosa necesidad de la utilización de amortiguadores, hubiera sido más que apreciable, al permitir alargar las reacciones hasta alcanzar su término; un conocimiento a profundidad de los productos, abriría un enorme campo a la dilucidación de los mecanismos con que opera la reacción de descomposición de los azúcares y dejaría extender la interpretación de las repercusiones que este proceso pueda tener en el origen de la vida y la fisiología de los sistemas biológicos; la utilización de técnicas más precisas en el sentido cuantitativo, limpiaría un tanto los resultados, quizás lo suficiente como para realmente poderlos hacer reflejar todo el espectro de condiciones que el modelo de la Tierra primitiva ofrece. Sin embargo, a pesar de ser innegable la posibilidad de perfeccionarlo, este procedimiento experimental ha resultado exitoso y consistente, ya que brinda resultados coherentes entre sí, que aportan argumentos para la vasta y heterogénea discusión que quizás podrá coalecer, algún día, en la postulación de un relato completo y probable del origen de la vida en este planeta.

Discusión

La interpretación de los resultados expuestos, puede llevarse a cabo en diversos niveles y es necesario revisar la información desde distintos puntos de vista, a fin de llegar a conclusiones válidas.

En cuanto a la ribosa se refiere, el perfil de comportamiento de su descomposición parece indicar fuertemente que, en solución y a altas temperaturas, este azúcar tiene vidas medias que resultan cortas incluso desde la dimensión del tiempo humano, por llamarlo de alguna manera.

Diversos autores (40-43), han planteado que el origen de la vida debe haber ocurrido en un medio ambiente de temperatura mayor a los 80°C. Imaginando un escenario del tipo del provisto por una chimenea océanica termal, muchos indican como evidencia el hecho de que la base de los árboles filogenéticos se haya, casi sin excepción, poblada de organismos termofílicos e hipertermofílicos. Si bien es cierto que se acepta, ya casi sin lugar a dudas, que el último ancestro común de los tres principales grupos de organismos que se conocen, debe haber poseído como característica la de resistir altas temperaturas, quizás incluso la necesidad fisiológica de ellas, hay que recordar que toda la información filogenética resulta invaluable como herramienta para caracterizar al último ancestro común, pero poco nos dice acerca de la historia evolutiva de éste. Todo aquello que podemos extraer de las relaciones entre los organismos, será en extremo útil para dilucidar las características del punto de partida de la biodiversidad de la historia del planeta; podemos, incluso, ir un poco mas allá y, rastreando posibles duplicaciones génicas, estructurar un modelo que describa hasta cierto punto algunos fenómenos evolutivos que tuvieron que haber ocurrido antes de que las tres ramas -eucariotes, arqueobacterias y eubacterias, siguiendo una de las múltiples denominaciones- divergieran. Sin embargo, toda la información con que contamos parece indicar que el último ancestro común representa un nivel en extremo avanzado de evolución biológica (44), con características metabólicas y reproductivas elaboradas, semejantes en complejidad a aquéllas que llevan a cabo los sistemas biológicos actuales. Considerar que las condiciones que dieron pie al origen de la vida, tienen que ser las mismas que reinaban en los tiempos del último ancestro común, requiere de postular ya sea la emergencia espontánea de una estructura altamente sofisticada o la negación de que durante la evolución que diera lugar a dicha estructura, es posible que ocurrieran sorprendentes cambios en el medio ambiente, cambios que, por supuesto, podrían marcar su huella en dicha trayectoria evolutiva.

Miller y Bada (45) han propuesto la posibilidad de que el océano primitivo estuviera completamente congelado, merced a la baja energía de radiación que al parecer poseyera el joven Sol de aquel entonces. La colisión con meteoritos y/o cometas, haría posible que el hielo se derritiera y el agua alcanzara, por un corto tiempo, altas temperaturas, pero la mayoría de los acontecimientos de evolución química, y quizás, biológica, tendrían que haber ocurrido a temperaturas cercanas a los 0°C.

Por estricta formalidad, debiera mantenerse una posición neutra al respecto, hasta que se generen o encuentren evidencias suficientes para dibujar las características del medio ambiente de esos tiempos.

Los resultados del presente estudio, señalan que la idea de un origen de la vida a altas temperaturas, se contradice con la presencia de la ribosa como componente substancial de las moléculas que conformaran los primeros sistemas biológicos, incluso si se considera a éstos un mero conjunto de simples secuencias, portadoras, tan sólo, de la información suficiente para autoduplicarse. En el caso de las bajas temperaturas, la argumentación no es tan contundente, pero al considerar la vastedad del tiempo geológico, incluso estas condiciones relativamente benignas parecen ser insuficientes. La ribosa se descompone con demasiada rapidez como para alimentar la idea de que haya jugado un papel trascendental en el surgimiento de los primeros sistemas de información biológica, de las primeras estructuras evolutivamente importantes, de los primeros seres vivos.

Hay que mencionar que dichas consideraciones se aplican con mayor rigor si se supone que en el océano primitivo privaban condiciones semejantes a las del actual, lo cual es hasta ahora indemostrable. Lo cierto es que, independientemente de las características precisas del océano primitivo, lo dicho anteriormente resultaría certero para cualquier circunstancia en que el azúcar esté disuelto en el agua y el medio vaya de neutro a alcalino, circunstancias que no parece del todo descabellado esperar.

Si se descartan las aún escasas evidencias de la existencia de una catálisis ácida de la descomposición de la ribosa, un ambiente de bajo pH pareciera proteger al azúcar, brindando, a primera vista, la

opción de un escenario en que este carbohidrato podría permanecer intacto el tiempo suficiente para establecer una concentración en que pudiera desempeñar un papel importante en la historia evolutiva. Sin embargo, los ambientes ácidos son los menos adecuados para intentar la síntesis de azúcares, así que en el mejor de los casos, se haría necesario que un ambiente en extremo alcalino, que sintetizara eficientemente gran cantidad de carbohidratos, sin especificidad alguna, se transformara de improviso en un medio ácido, donde el contenido de azúcares sería preservado por algún tiempo. De cierta forma, aunque lo recién expuesto no es imposible de imaginar, sí resulta difícil de creer. El echar mano a cuadros improbables, se vuelve no sólo peligrosamente especulativo, sino frágil, puesto que, mientras más condiciones detalladas requiera cierto modelo para funcionar, mas débil resultará la argumentación a favor de su plausibilidad.

Aunque resulta innegable que la ribosa es considerablemente menos estable que algunos de los otros azúcares estudiados, el tiempo de vida media de su descomposición es tan pequeño desde el punto de vista geológico, que apenas una diferencia de un par de órdenes de magnitud empezaría a ser esperanzador en la búsqueda de un carbohidrato que pudiera brindar una buena alternativa para el problema de la presencia de azúcares en los esqueletos de las primeras moléculas portadoras de información biológica. Lamentablemente, en el caso de las aldosas y el resto de los azúcares estudiados, tal diferencia no es patente, de manera que parece ser que las conclusiones derivadas del estudio de la descomposición de la ribosa, pueden considerarse generales para todo el grupo de compuestos.

Es verdad que el resto de los azúcares fueron analizados bajo condiciones más bien restringidas, así que la dependencia de su degradación a la temperatura es desconocida, abriendo la posibilidad de que, en ambientes menos exigentes, alguno de estos carbohidratos posea una estabilidad extraordinaria en comparación a la ribosa y al resto de los compuestos de esta familia. Sin embargo, no parece ser el caso, dada la general homogeneidad del grupo, pero se requiere de resultados cuantitativos para poder ser categóricos en este sentido. Tomando en cuenta lo anterior, quizás convenga hacer un comentario acerca de la ribosa-2,4-difosfato, dados los resultados antes

mencionados de la relativa especificidad con que puede ser sintetizada y, sobre todo, por su especial resistencia a la descomposición a temperatura ambiente (21). Los resultados de los experimentos realizados sobre este compuesto, son en extremo desalentadores para la concepción de que la ribosa-2,4-difosfato pueda representar una buena opción para la ribosa, dado que se muestra, a altas temperaturas, como uno de los carbohidratos más inestables con los que se trabajó. En este caso, probablemente más que en el de los demás azúcares, urge contar con datos precisos sobre su comportamiento bajo otras condiciones.

El hecho de que la descomposición de la ribosa y el resto de los azúcares haya resultado seguir una cinética de primer orden, permite realizar una evaluación acerca de las características de este fenómeno. Para empezar, es una reacción que no depende de la concentración inicial del compuesto, así que no es necesario tratar de interpretar cómo se vería afectada la velocidad de descomposición en multitud de distintos escenarios, donde empezarían a volverse variables importantes para el problema consideraciones acerca de la existencia de un océano primitivo general y homogéneo vs la posibilidad de la presencia de multitud de lagos; el volumen del dicho océano o del lago que contuviera los azúcares sería determinante en la velocidad de la reacción de que se habla; la posibilidad, amén de la velocidad y eficiencia, de llevar a cabo la síntesis de los compuestos en las inmediaciones, tendría que ser tomada en cuenta y el posible efecto de la interacción entre dos moléculas de distintos azúcares debería ser medida, a fin de establecer si el fenómeno pudiera verse acelerado o detenido por dichas causas.

Encontrar, pues, escenarios favorables para la suposición de los carbohidratos como compuestos importantes en el origen de la vida, se dificulta enormemente, puesto que, casi de manera independiente de las características del ambiente, los azúcares representan un caso difícil de sostener.

Por otro lado, si bien dentro de los espectros de la ribosa en descomposición, puede identificarse sin demasiados problemas uno de los picos correspondientes a la ribulosa, la cinética de primer orden indica que, aún existiendo isomerización, no hay reversibilidad en la descomposición, es decir, los productos no están dando lugar

nuevamente a los reactivos. Una vez desaparecida, la ribosa no regresa a la muestra, al menos no de forma medible.

El paso entre aldosas y cetosas es relativamente fácil (26, 46-47). En el caso del sistema ribosa-ribulosa, el equilibrio entre los dos compuestos, que favorece más o menos 3:1 a la ribosa a temperatura ambiente, tiende al 1:1 cerca de los 100°C y se invierte al pasar los 120°C, en un 1.2:1 a favor de la ribulosa (cálculos personales a partir de datos en 48). Si con el hecho de subir la temperatura de la muestra, obligamos a la ribosa a convertirse en ribulosa, únicamente una pequeña fracción de lo medido como descomposición, realmente lo sería; el resto, representaría tan sólo una isomerización, una especie de almacenamiento, de donde la ribosa regresaría al bajar la temperatura o al empezar a forzar el equilibrio mediante alguna reacción. Lo que la cinética de primer orden indica en este caso, es que, si bien es cierto que cierta cantidad de ribulosa está apareciendo en la muestra, no hay forma de que esté guardando o, para efectos del experimento, escondiendo a la ribosa, puesto que la ribosa no está siendo obtenida nuevamente, ya sea porque la ribulosa se descompone rápidamente tras ser sintetizada, o porque antes de isomerizarse eficientemente, la ribosa desaparece. Así, aunque no ha habido aún pruebas específicas para evaluar la resistencia de la ribulosa en las condiciones que se manejaron en estos experimentos, pareciera que ésta tampoco representa una solución aceptable para el problema de la estabilidad de la ribosa y otros azúcares como reactivos prebióticos.

Cabe mencionar que el hecho de que la presencia de oxígeno sea poco importante para la velocidad de descomposición, ayuda también a formarse un cuadro claro de lo que podría haber sido la situación de los azúcares en la Tierra primitiva. Si en los resultados del experimento realizado bajo nitrógeno, se hubiera demostrado una fuerte dependencia de la reacción a la presión parcial de O_2, las conclusiones que de este trabajo derivan habrían de tener un tono mucho más cauto en sus apreciaciones. En general, se toma por sentado que la concentración de oxígeno molecular presente en la atmósfera primitiva era baja, mas no hay acuerdo alguno entre los expertos en una cantidad específica, así que los datos para la velocidad de descomposición de los azúcares, tendrían que darse en función de un factor desconocido, los resultados serían de carácter

incierto y las conclusiones válidas tan sólo para un conjunto de condiciones demasiado restringidas para resultar esclarecedores en la interpretación de los acontecimientos importantes de la historia del planeta. En cambio, el haber encontrado cierta independencia hacia el oxígeno atmosférico, permite que los resultados de este trabajo puedan generalizarse a gran cantidad de escenarios, haciéndolos más flexibles y más útiles para el discurso.

Resultó sorprendente el constatar que no existe diferencia alguna entre el uso del agua y el D_2O como solvente en las reacciones de descomposición que se llevaron a cabo en este trabajo. Se sabe que en la mutarotación, al igual que en otras isomerizaciones, la utilización de agua deuterada como solvente suele disminuir, en algunos casos de forma considerable, la velocidad de reacción (**25, 39**), probablemente porque el mayor tamaño y peso del ión de deuterio, lo vuelve menos móvil e intercambiable que el H^+. Con este antecedente a la mano, se pensó que el presente estudio contaría con una especie de margen positivo para los resultados, dado que podría afirmarse que los datos expuestos representaban un límite superior para lo probable, la velocidad de descomposición sería siempre mayor en condiciones naturales, que aquélla medida en el laboratorio. Los resultados, sin embargo, probaron lo contrario, con lo que es sensato admitir que la descomposición de los azúcares es una reacción demasiado compleja como para prestarse únicamente a análisis teóricos, volviendo necesario el construir un respaldo experimental antes de dar por sentadas sus características.

La forma de la función que se resuelve en el perfil de la descomposición de la ribosa (**Figura 4**), puede también aportar algunos elementos en la discusión. Las líneas que pueden apreciarse en la gráfica, bastante bien adaptadas a los datos, responden a un modelo de mecanismo de reacción en el que se supone que el paso determinante de la reacción consiste en la aparición de un ion (un anión de la ribosa en este caso). El ion, tendría un pK_a de alrededor de 6.9, que resulta sospechoso, dada la reconocida influencia de la presencia de los amortiguadores en la reacción, puesto que es demasiado parecido al segundo pK_a del sistema de amortiguamiento de fosfatos. El hecho de que los puntos de la gráfica que provienen de acetatos caigan tan bien en la línea, es un buen argumento en contra de la suposición de que lo que puede apreciarse en la gráfica,

es tan sólo la acción de los fosfatos, en vez de una catálisis básica general debida al pH de la reacción. Sin embargo, no puede descartarse que el doblez en la curva se deba al cambio de $D_2PO_4^-$ a DPO_4^{-2}, en vez de a la generación de una forma aniónica de la ribosa. Si se piensa que el hidrógeno que se pueda estar perdiendo, no tiene por fuerza que ser uno de los intercambiables con el solvente (es decir, uno de los que constituyen los grupos alcohólicos del azúcar), se podría entender que no exista diferencia en la velocidad de reacción mediante el cambio isotópico en el solvente pero, sólo para complicar más las cosas, un pK_a de 6.9 no parece pertenecer a ninguno de los iones de la ribosa (Dr Charles L. Perrin, comunicación personal). Así pues, difícilmente habrá forma de proponer algo más que suposiciones acerca de los mecanismos con que opera la descomposición de los azúcares, hasta no contar con información experimental más completa.

El problema que representa la fuerte influencia de los amortiguadores, no termina en el obscurecimiento de los mecanismos de reacción. Como ya se ha indicado en el segundo capítulo, es de suma importancia sopesar la trascendencia de esta interacción con cuidado. Debido a las limitaciones inherentes al desarrollo experimental y a las características de la descomposición, resulta en extremo difícil determinar con precisión el valor de la constante de la reacción en ausencia de amortiguadores y, de igual manera, la extrapolación a cero a partir de la relación entre k y la concentración de éstos (Figuras 6 y 7), es poco sencilla de realizar, puesto que la corta sección lineal de la función, no permite extraer gráficamente un resultado confiable del valor de la constante de reacción para concentración igual a cero. Afortunadamente, a pesar que el dato sería útil, la presencia de amortiguadores en la naturaleza hace que la velocidad de descomposición en ausencia total de amortiguadores no sea una cifra estrictamente necesaria. Una vez más, hubiera sido conveniente el poseer datos de ese estilo, ya que hubieran permitido acotar el intervalo de lo posible, convirtiendo los resultados de este trabajo en un tope mínimo para la rapidez de degradación de azúcares en sistemas naturales. Un experimento control que resultaría interesante llevar a cabo, es una descomposición de ribosa en un aparato de pH constante (pH-stato), a fin de poder calificar las extrapolaciones que se generan de los resultados que aquí se exponen. Es de lamentar que no haya forma de hacer trabajar a este

tipo de aparatos en altas temperaturas y que su forma de funcionamiento, a partir de pequeñas inyecciones de ácidos y bases fuertes, resulte en transformar, de forma modesta pero continua, la concentración de la muestra.

Así pues, parece ser que los azúcares, y sobre todo la ribosa, se descomponen muy rápido, en la escala de tiempo geológico, en prácticamente cualquier conjunto de condiciones que suenen verosímiles para la Tierra primitiva. Es necesario, entonces, enfrentar la idea de que es extremadamente improbable que los azúcares representaran reactivos prebióticos fundamentales, lo cual implica que los primeros polímeros genéticos no pueden haber estado estructurados con base en carbohidratos. De esta forma, se vuelve necesario trabajar sobre otras dos preguntas: si no de azúcares, ¿de qué estaban compuestos los esqueletos de las primeras macromoléculas portadoras de información? y ¿cómo es que los azúcares llegaron a formar parte fundamental del metabolismo primario y a ser uno de los constituyentes principales de los genomas de todos los sistemas biológicos conocidos?.

Y a se han propuesto opciones estructurales para los ácidos nucléicos contemporáneos, así que cierto trabajo se ha invertido ya en brindar soluciones al primero de los problemas mencionados. Quizás la más interesante de estas alternativas, sea el planteado por Nielsen (49), los ácidos péptido-nucléicos (PNA), donde el esqueleto está constituido por enlaces de tipo amida (parecidos al peptídico) en vez del enlace fosfodiester de los ácidos nucléicos modernos. Otras propuestas incluyen bases nitrogenadas alternativas, que podrían hacer mayor el potencial catalítico de las macromoléculas (50) y marcos estructurales constituidos con base en derivados del glicerol o compuestos semejantes (51). Todas estas consideraciones, fundamentan la posible existencia de una etapa evolutiva previa al mundo del RNA, en donde los polímeros genéticos fueran a la vez los catalizadores básicos de las reacciones primarias, pero sin ser imágenes completamente fieles del RNA, con Adenina-Uracilo-Guanina-Citosina como bases y ribosa y fosfato como soporte.

El problema de la introducción de los azúcares al metabolismo fundamental de los sistemas biológicos, empieza en la imposibilidad que probablemente enfrentaron los primeros seres vivos, de tomarlos

directamente del medio, dada la escasez que la inestabilidad de estos compuestos generaría. Sin embargo, es obvio que los azúcares tienen que haberse introducido muy pronto en el curso de la evolución, así que deben haber sido relativamente fáciles de conseguir a partir de pequeñas transformaciones de otros compuestos más abundantes. Un ejemplo de que dichas reacciones podrían haberse dado en la presencia de un sistema extremadamente rudimentario de catalizadores, se presenta en la figura 9, donde un solo paso enzimático se vuelve necesario para recuperar a la ribosa a partir de algunos de sus productos de descomposición.

Otras opciones, incluirían el plantear la existencia de un catalizador de tipo enzimático que hiciera posible la conversión directa de un grupo carboxílico a un aldehído, regenerando el azúcar a partir de sus derivados. Si esquemas de este tipo funcionan eficientemente, entonces no resulta difícil imaginar a los azúcares introduciéndose muy pronto al metabolismo primitivo, una vez establecido un sistema de catalizadores.

Los azúcares, pues, son constituyentes fundamentales de todo sistema biológico conocido, pero no parecen haber estado presentes en el primero de todos. Los obstáculos que se presentan al planteamiento de que los azúcares formaron parte de los más antiguos polímeros genéticos son demasiados: requieren de condiciones especiales para su síntesis y no se generan con una especificidad satisfactoria, al estar en proporciones favorables, difícilmente llevan a cabo las reacciones que darían lugar a nucleósidos y, además, se descomponen con pasmosa facilidad, incluso sin tomar en cuenta procesos degradativos, considerablemente eficientes, que involucran otras condiciones ambientales o moléculas orgánicas, como fragmentación por radiación (52), combinaciones con aminoácidos (reacción de Maillard) (53-54), reacciones con HCN, etc.

Verdad es que imaginar escenarios perennemente fuera del equilibrio químico, de características especiales confinadas a espacios relativamente pequeños, puede llevar, eventualmente, a la esquematización de un conjunto de condiciones en que la ribosa y/u otros azúcares podrían convertirse en reactivos prebióticos de suma importancia. Sin embargo, es de considerar cuál sería la importancia global de un proceso tan localizado y si no vale más la pena el buscar opciones químicas más plausibles, circunscritas en un marco un poco más generalizable de la Tierra primitiva y lo poco o mucho que de élla sabemos.

El problema de la excesiva teorización sobre los fenómenos que se pretende investigar, es un mal especialmente peligroso en un campo con inclinaciones históricas, como es el que estudia la evolución química y el origen de la vida. Este es un campo que tiene el grave complejo de saber, desde el principio, que será siempre incapaz de llegar a ser plenamente satisfecho. No hay forma alguna de que, sin recurrir a nociones de tipo religioso, sepamos, a ciencia cierta, cómo se dio el proceso que llevó a que la vida de este planeta se originara, nunca sabremos la historia completa, quizás ni siquiera sepamos bastante de la fragmentada. Lo único que nos queda, tarea ya por de más compleja, es intentar estructurar historias que hubieran podido ocurrir, relatos probables, cuentos posibles. El problema es que, así como es prácticamente imposibe probar que las cosas pasaron de cierta manera, así como es difícil sustentar que es probable que un evento ocurriera de una forma en especial, se vuelve extremadamente complicado demostrar que algún fenómeno nunca sucedió o que jamás tuvo trascendencia alguna. Por esto, porque ninguno de los extremos es plenamente asequible, porque es igualmente difícil brindar un categórico *sí* que un *no* sin lugar a dudas, es tan peligrosamente sencillo volverse superficial en este campo, porque se requiere de una buena imaginación para concebir mil y un procesos posibles, pero se necesita una enorme disciplina para seleccionar y perseguir sólo aquéllos que resultan probables.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

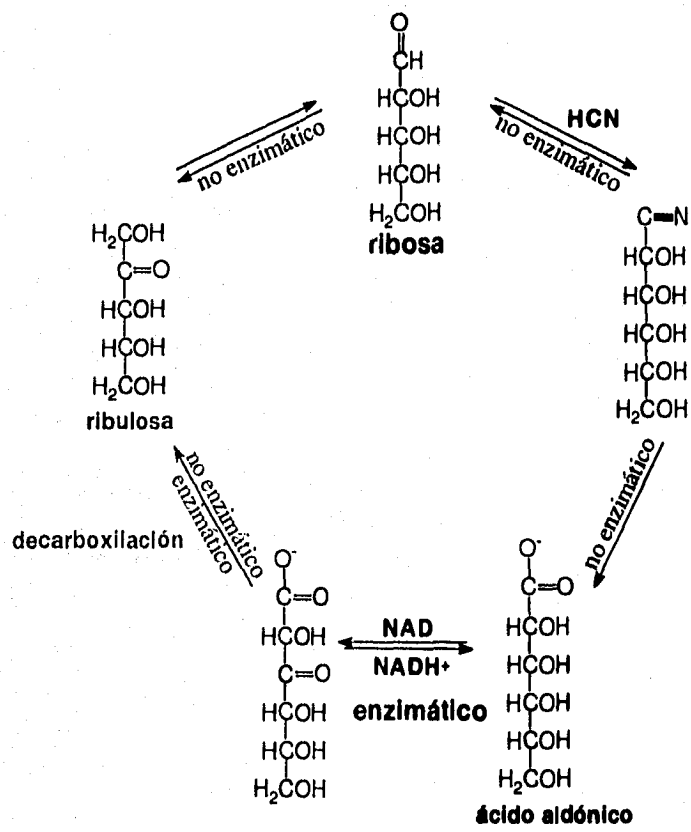


Figura 9 .- En la figura se ejemplifica una de las posibles vías de recuperación de la ribosa a partir de alguno de sus derivados relativamente estables. Este ciclo, además de asemejarse a la ruta metabólica de síntesis de la ribosa (a partir de fosfogluconato), sólo requiere de un paso de catálisis enzimática. La condensación de tipo Kiliani del aldehído con el HCN, para eventualmente dar el ácido carboxílico, es una reacción en extremo eficiente (**55-56**) y HCN es considerado como uno de los reactivos prebióticos de mayor importancia (**1, 5-6**).

Conclusiones

La ribosa se descompone demasiado rápido, en la escala de tiempo geológico, como para haber podido ser un reactivo prebiótico de importancia, sobre todo, considerando un escenario de altas temperaturas. Por tanto, la ribosa difícilmente pudo haber sido un constituyente fundamental de los primeros polímeros genéticos.

El resto de las aldosas, la 2-desoxirribosa, la ribosa-5-fosfato y la ribosa-2,4-difosfato, no representan, por su inestabilidad, buenas opciones para sustituir a la ribosa.

Existen derivados estables de la ribosa u otros azúcares y rutas metabólicas suficientemente sencillas como para imaginar a los carbohidratos entrando en etapas muy tempranas a la evolución de los sistemas vivos, una vez existiendo catalizadores de tipo enzimático.

Es necesario buscar estructuras alternativas a los azúcares, para los esqueletos de las primeras macromoléculas portadoras de información biológica.

Bibliografía

1.- Miller, S. L.; (1953) *Science* **117**, 528.

2.- Darwin, C.; (1871) carta a Hooker, publicada en Calvin, M.; (1969) Chemical evolution: molecular evolution towards the origin of living systems on the Earth and elsewhere, Oxford University Press, Oxford.

3.- Oparin, A. I.; (1938) The Origins of Life, MacMillan, NY.

4.- Fox, S. W. & Dose, K.; (1977) Molecular evolution and the origin of life, Marcel Dekker, NY.

5.- Cronin, J. R., Pizzarello, S. & Cruickshank, D. P.; (1988) in Meteorites and the Early Solar System, eds, Kerridge, J. F. & Matthews, M. S. (U. of Arizona Press, Tucson) pp 819-857.

6.- Oró, J.; (1960) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2**:407.

7.- Butlerow, A.; (1861) *Liebigs. Ann. Chem.* **120**, 295.

8.- Woese, C.; (1967) The Genetic Code, Harper & Row, NY pp 179-195.

9.- Crick, F.H.C.; (1968) *J. Mol. Biol.* **38**, 367-379.

10.- Orgel, L. E.; (1968) *J. Mol. Biol.* **38**, 381-393.

11.- Kruger, K., Graboski, P. J., Sands, J., Gottschling, D. E. & Chec, T. R.; (1982) *Cell* **31**, 147-157.

12.- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. & Altman, S.; (1983) *Cell* **35**, 849-857.

13.- Szostack, J. & Ellington, A. D.; (1993) en The RNA world, eds, Gesteland, R. F. & Atkins, J. F.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

14.- Fuller, W. D. Sánchez, R. A. & Orgel, L. E.; (1972) *J. Mol. Biol.* **67**, 25-33.

15.- Fuller, W. D. Sánchez, R. A. & Orgel, L. E.; (1972) *J. Mol. Biol.* **1**, 249-257.

16.- Joyce, G. F., Schwartz, A. W., Miller, S. L., & Orgel, L.E.; (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **84**, 4398-4402.

17.- Decker, P., Schweer, H. & Polhmann, R.; (1982) *J. Chromatog.* **244**, 281-291.

18.- Shapiro, R.; (1988) *Orig. Life Evol. Biosph.* **18**, 71-85.

19.- Gabel, N. W. & Ponnamperuma, C.; (1967) *Nature* **216**, 453-455.

20.- Reid, C. & Orgel, L. E.; (1967) *Nature* **216**, 455.

21.- Müller, D., Pitsch, S., Kittaka, A., Wagner, E., Wintner, C. & Eschenmoser, A.; (1990) *Helv. Chim. Acta* **73**, 1410-1468.

22.- Evans, W.L.; (1942) *Chem. Rev.* **31**, 537-560.

23.- Khym, J. X., Doherty, D. G. & Cohn, W. E.; (1954) *J. Am. Chem. Soc.* **6**, 5523-5530.

24.- Isbell, H. S., Frush, H. L., Wade, W.R. & Hunter, C. E.; (1969) *Carbohyd. Res.* **9**, 163-175.

25.- Pigman, W. & Anet, E. F. L. J.; (1972) in The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry, 2da ed., eds, Pigman W. &Horton, D., Academic Press, NY vol 1 A.

26.- El Khadem, H. S., Ennifar, S. & Isbell, H. S.; (1987) *Carbohyd. Res.* **169**, 13-21.

27.- Simpson, F. J. & Wood, W. A.; (1958) *J. Biol. Chem.* **230**, 473-486.

28.- Hurwitz, J. & Horecker, B. L.; (1956) J. *Biol. Chem.* **223**, 993-1008.

29.- Borenfreund, E. & Dische, Z.; (1957) *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 215-216.

30.- Mopper, K., Dawson, R., Liebezeit, G., & Ittekkot, V.; (1980) *J. Marine Chemistry* **10**, 55-66.

31.- Browne, C. A. & Zerban, F. W.; (1941) Physical and Chemical Methods of Sugar Analysis, Wiley, NY pp 645-659.

32.- Gadian, D. G.; (1982) Nuclear magnetic resonance and its applications to living systems, Clarendon, Oxford.

33.- Bates, R. G.; (1964) Determination of pH: Theory and Practice, 2nd ed., Wiley, NY.

34.- Walker, J.C. G.; (1983) *Nature* **302**, 518-520.

35.- Kasting, J. F.; (1993) *Science* **259**, 920-926.

36.- Pitsch, S., Wendeborn, S., Jaun, B. & Eschenmoser, A.; (1993) *Helv. Chim. Acta* **76**, 2161-2183.

37.- Isbell, H.S., Frush, H. L., Wade, C. W. R. & Hunter, C. E.; (1969) *Carbohyd. Res.* **9**, 163-175.

38.- de Wit, G., Kieboom, A. P. G. & van Bekkum, H.; (1979) *Carbohyd, Res.* **74**, 157-175.

39.- Isbell, H. S. & Pigman, W.; (1969) *Adv. in Carbohyd. Chem. and Biochem.* **24**, 13-65.

40.- Harvey, R. B.; (1924) *Science* **60**, 481-482.

41.- Holm, N. G., ed; (1992) Marine Hydrotermal Systems and the Origin of Life, Klüger, Academic Publ., Dordrecht, pp 242.

42.- Pace, N. R.; (1991) *Cell* **65**, 531-533.

43.- Stetter, K. O.; (1994) en Early Life on Earth Nobel Symposium No. 84, ed Dengston, S.,. Columbia University Press, NY.

44.- Lazcano, A.(1994) *Microbiologia SEM* **11**, 1-13.

45.- Bada, J. L., Brigham, C. & Miller S. L.; (1994)*Proc. Natl. Acad. Sci USA* **91**, 1248-1250.

46.- Axelrod, B. & Jang R.; (1954) *J. Biol. Chem.* **209**, 847-855.

47.- Cohen, S. S.; (1953) *J. Biol. Chem.* **201**, 71-84.

48.- Goldberg, R. N. & Tewari, Y. B.; (1989) *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **18**.

49.- Nielsen, P. E.; (1993) *Orig. Life Evol. Biosph.* **23**, 323-327.

50.- Robertson, M. P. & Miller, S. L., (1995) *Science* **268**, 702-705.

51.- Orgel, L. E.; (1987) The origin of the genetic code: a review, Cold Spring Harbour Symposium Quant Biol **52**, 9.

52.- Phillips, G. O.; (1972) en The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry, 2da ed. vol 1 B. Academic Press, NY.

53.- Paulsen, H. & Pflughaupt, K. W.; (1972) en The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry, 2da ed., vol 1 B. Academic Press, NY.

54.- Bunn, H. F. & Higgins, P. J.; (1981) *Science* **213**, 222-224.

55.- Serianni, A. S., Nunez, H. A. & Barker, R.; (1979) *Carbohyd. Res.* **72**, 71-78.

56.- Blazer, R. M. & Whaley, T. W.; (1980) *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 5082-5085.